



HAL
open science

Développement de stratégies de bioconjugaison innovantes : Application à l'élaboration d'agents d'imagerie moléculaire

Coline Canovas

► To cite this version:

Coline Canovas. Développement de stratégies de bioconjugaison innovantes : Application à l'élaboration d'agents d'imagerie moléculaire. Chimie organique. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCK058 . tel-03131166

HAL Id: tel-03131166

<https://theses.hal.science/tel-03131166v1>

Submitted on 4 Feb 2021

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

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

THÈSE

Présentée

À L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

UFR Sciences et Techniques

Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne – UMR CNRS 6302

Par

Coline CANOVAS

Maître ès Sciences

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTÉ**

Discipline : Chimie

**Développement de stratégies de bioconjugaison innovantes :
Application à l'élaboration d'agents d'imagerie moléculaire**

Thèse soutenue le 9 novembre 2018, devant la commission d'examen composée de :

A. ROMIEU	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Président
M-C. VIAUD-MASSUARD	Professeur à l'Université de Tours	Rapporteur
C. SABOT	Chargé de recherche au CNRS, Rouen	Rapporteur
T. LAHOUTTE	Directeur du Dépt. de Médecine Nucléaire, Bruxelles	Examinateur
F. DENAT	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Directeur
V. GONCALVES	Maître de conférences à l'Université de Bourgogne, Dijon	Co-Directeur

- TABLES DES MATIÈRES -

- ABBRÉVIATIONS	4
- INTRODUCTION	8
I. L'IMAGERIE MEDICALE	13
I.1. L'imagerie moléculaire	13
I.2. Les différentes modalités utilisées en imagerie moléculaire	14
I.3. L'imagerie multimodale	28
II. LE CIBLAGE SPECIFIQUE DES PATHOLOGIES	33
II.1. Ciblage passif	34
II.2. Ciblage actif	36
III. LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOCONJUGAISON	44
III.1. Les méthodes usuelles de bioconjugaison	45
III.2. Vers une bioconjugaison site-spécifique	47
III.3. Modification d'acides aminés rares	50
III.4. Modification des sites de glycosylation	54
III.5. Modification enzymatique de <i>tags</i> peptidiques	56
III.6. Incorporation d'acides aminés non naturels	58
III.7. Les réactions bioorthogonales : un outil puissant en bioconjugaison	60
IV. DOUBLE MODIFICATION DE BIOMOLECULES	67
IV.1. Vers l'élaboration d'agents hybrides	67
IV.2. Introduction de deux molécules distinctes	68
IV.3. Introduction d'une molécule hybride	70
V. PRÉSENTATION DES PROJETS DE RECHERCHE	79
- CHAPITRE I - Double modification site-spécifique de protéines <i>via</i> une réaction de IEDDA	82
I. INTRODUCTION	86
I.1. La réaction de IEDDA	86
I.2. Aperçu des diverses applications de la réaction de IEDDA	88
I.3. Les différentes techniques permettant l'obtention de dérivés cliquables	90
I.4. La dichlorotétrazine : un précurseur efficace	93
I.5. Présentation du projet	96
II. RESULTATS ET DISCUSSION	97
II.1. Mise au point des conditions des deux réactions de S_NAr	97
II.2. Synthèse d'une série de tétrazines bifonctionnalisées	99
II.3. Bioconjugaison régiospécifique à la protéine vectrice	101
II.4. Optimisation des conditions de radiomarquage du bioconjugué	104
II.5. Evaluation <i>in vivo</i> par imagerie bimodale TEMP-CT/fluorescence	105
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	107

- CHAPITRE II - Double modification cystéine-spécifique de protéines grâce à la dichlorotétrazine	110
I. INTRODUCTION	114
I.1. La bioconjugaison cystéine-spécifique grâce aux maléimides	114
I.2. Les fonctions de bioconjugaison alternatives au maléimide.....	118
I.3. Modification site-spécifique des ponts disulfure	123
I.4. Double modification sélective des résidus cystéines : quelles solutions ?.....	126
I.5. Présentation du projet	131
II. RESULTATS ET DISCUSSION	134
II.1. Evaluation préliminaire de la stratégie sur un peptide modèle	134
II.2. Synthèse des différents intermédiaires.....	140
II.3. Double modification cystéine-spécifique de l'albumine de sérum bovin	141
II.4. Evaluation <i>in vivo</i> de l'agent de ciblage 30 par imagerie optique	146
II.5. Application de la stratégie à la préparation d'un agent théranostique	147
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	153
- CHAPITRE III - Marquage cystéine-spécifique de protéines par le fluorophore proche infrarouge IR783	156
I. INTRODUCTION	160
I.1. Structure et propriétés spectrales du fluorophore IR783	160
I.2. Applications du fluorophore IR783 <i>in vivo</i>	161
I.3. Fonctionnalisation du cyclohexyle : impact sur les propriétés spectrales de IR783	163
I.4. Stratégies classiquement utilisées pour la vectorisation de IR783	165
I.5. Limitations des méthodes actuelles et introduction à la stratégie développée.....	167
II. RESULTATS ET DISCUSSION	169
II.1. Validation de l'approche sur un peptide modèle	169
II.2. Evaluation de la stratégie par greffage de IR783 sur un fragment Fab' d'anticorps	171
II.3. Marquage fluorescent de l'albumine par IR783	177
II.4. Validation de la stratégie <i>in vivo</i>	179
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	181
- CHAPITRE IV - Développement de radiotraceurs pour le diagnostic du cancer de la prostate	184
I. INTRODUCTION	188
I.1. Imageries du cancer de la prostate	188
I.2. La PSMA (<i>Prostate specific membrane antigen</i>).....	190
I.3. Les ligands spécifiques de la PSMA	192
I.4. Les agents imageants spécifiques de la PSMA	195
I.5. L'emploi du cuivre-64 pour le diagnostic du cancer de la prostate.....	200
I.6. Présentation du projet	201
II. RESULTATS	202
II.1. Élaboration et évaluation d'un nouveau radiotraceur spécifique de la PSMA.....	202
II.2. Optimisation de l'espaceur	213
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	216
- CONCLUSION GÉNÉRALE -	218

- PARTIE EXPÉRIMENTALE -	224
MATERIALS AND METHODS	228
CHAPTER I - EXPERIMENTAL PART.....	231
CHAPTER II - EXPERIMENTAL PART.....	270
CHAPTER III – EXPERIMENTAL PART.....	309
CHAPTER IV – EXPERIMENTAL PART.....	328
- VALORISATION DES RÉSULTATS -	362
- REMERCIEMENTS -	368

- ABBRÉVIATIONS -

Note au lecteur : Les molécules décrites dans ce manuscrit ont, pour la plupart, un poids moléculaire assez élevé. Nous utiliserons une notation arbitraire pour les nommer, choisie pour simplifier au maximum la lecture de ce mémoire tout en essayant de maintenir une certaine logique. Les noms IUPAC correspondant sont indiqués dans la partie expérimentale.

ADC :	Antibody-drug conjugate
BAM :	Bromoacétamide
BODIPY :	Bore-dipyrrrométhène
Boc :	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BCN :	(1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylméthoxy-carbonyl
BSA :	<i>Bovine serum albumin</i>
Cbz :	Carboxybenzyle
CDI :	1,1'-carbonyldiimidazole
COSY :	<i>Correlation spectroscopy</i>
CT :	<i>Computed tomography</i>
DAD :	Diode array detector
DAR :	<i>Drug to antibody ratio</i>
DCM :	Dichlorométhane
DFO :	Déféroxamine
DIC :	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIPEA :	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF :	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DODT :	2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol
DOL :	<i>Degree of labeling</i>
DOTA :	Acide 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayl)tétraacétique
DTNB :	Acide dithio-5,5'-bis(nitro-2-benzoïque)
DTPA :	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPR :	<i>Enhanced permeability and retention</i>
ESI :	<i>Electrospray ionization</i>
FA :	Acide formique
FBS :	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA :	<i>Food and drug administration</i>
Fmoc :	9-fluorénylméthoxy-carbonyl
FPLC :	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GSH :	Glutathion
HATU :	1-[bis(diméthylamino)méthylène]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxyle hexafluorophosphate

HBED-CC :	Acide <i>N,N'</i> -bis(2-hydroxy-5-(carboxyéthyl)benzyl)éthylènediamine- <i>N,N'</i> -diacétique
HEPES :	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HER2 :	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMQC :	<i>Heteronuclear multiple-quantum correlation</i>
HOBt :	1-hydroxybenzotriazole
HRMS :	<i>High resolution mass spectrometry</i>
IAM:	Iodoacétamide
ICG :	<i>Indocyanine green</i>
IEDDA :	<i>Inverse electron demand Diels-Alder</i>
IgG :	Immunoglobuline G
Inh :	Inhibiteur
i.o. :	Intra-osseux
IRM :	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
ITLC :	<i>Instant thin layer chromatography</i>
i.v. :	Intraveineuse
LRMS :	<i>Low resolution mass spectrometry</i>
mAb :	<i>Monoclonal antibody</i>
MALDI-TOF :	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation - Time of flight</i>
NCS :	Isothiocyanate
NHS :	<i>N</i> -hydroxysuccinimidyle
NAA :	<i>N</i> -acétylaspartate
NAAG :	<i>N</i> -acétylaspartatylglutamate
NIR :	<i>Near-infrared</i>
NOTA :	Acide 2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacétique
PAGE :	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PB :	<i>Phosphate buffer</i>
PBS :	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDT :	<i>Photodynamic therapy</i>
PEG :	Polyéthylène glycol
PET :	<i>Positron emission tomography</i>
2-PMPA :	Acide 2-(phosphonométhyl)pentanedioïque
p.i. :	Post-injection
PSA :	<i>Prostate specific antigen</i>
PSMA :	<i>Prostate specific membrane antigen</i>
rdt :	Rendement
rf :	Rapport frontal
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROI :	<i>Region of interest</i>
RP-HPLC :	<i>Reversed-Phase High Performance (or Pressure) Liquid Chromatography</i>
rpm :	<i>Rotation per minute</i>
RPMI :	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
s.c. :	Sous-cutané
SD :	<i>Standard deviation</i>
SDS :	Dodécylsulfate de sodium

S _N Ar :	Substitution nucléophile aromatique
SPPS :	Synthèse peptidique sur phase solide
SPECT :	<i>Single-positron emission computed tomography</i>
TA :	Température ambiante
TCEP :	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TCO :	<i>trans</i> -cyclooctène
TEMP :	Tomographie par émission monophotonique
TEP :	Tomographie par émission de positron
TFA :	Acide trifluoroacétique
TIC :	<i>Total ion chromatogram</i>
TIPS :	Triisopropylsilane
TMS :	Tétraméthylsilane
t _R :	Temps de rétention
Tris:	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TSTU :	tétrafluoroborate de <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl)uronium
Tz :	Tétrazine
uAA :	unnatural amino-acid
US :	Ultrasons

- *INTRODUCTION* -

- INTRODUCTION	8
I. L'IMAGERIE MEDICALE	13
I.1. L'imagerie moléculaire	13
I.2. Les différentes modalités utilisées en imagerie moléculaire	14
a. L'imagerie par atténuation des rayons X	15
b. L'imagerie par réflexion des ultrasons	16
c. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire	17
d. L'imagerie par émission radioactive	18
e. L'imagerie optique	22
I.3. L'imagerie multimodale	28
a. Les principaux exemples d'imagerie multimodale	28
b. La combinaison imagerie optique/imagerie nucléaire	30
II. LE CIBLAGE SPECIFIQUE DES PATHOLOGIES	33
II.1. Ciblage passif	34
II.2. Ciblage actif	36
a. Les cibles	36
b. Les vecteurs utilisés pour le ciblage actif	38
III. LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOCONJUGAISON	44
III.1. Les méthodes usuelles de bioconjugaison	45
III.2. Vers une bioconjugaison site-spécifique	47
III.3. Modification d'acides aminés rares	50
a. Bref aperçu des réactions de bioconjugaison les plus courantes	51
b. Acides aminés natifs ou introduits par mutation génétique : le cas des cystéines	52
c. Modification d'acides aminés non standards	53
III.4. Modification des sites de glycosylation	54
III.5. Modification enzymatique de <i>tags</i> peptidiques	56
III.6. Incorporation d'acides aminés non naturels	58
III.7. Les réactions bioorthogonales : un outil puissant en bioconjugaison	60
a. Le concept de bioorthogonalité	60
b. Aperçu des différentes réactions bioorthogonales	61
IV. DOUBLE MODIFICATION DE BIOMOLECULES	67
IV.1. Vers l'élaboration d'agents hybrides	67
IV.2. Introduction de deux molécules distinctes	68
IV.3. Introduction d'une molécule hybride	70
a. Les plateformes de type acide aminé	72
b. Les plateformes de type benzène	75
c. Autres types de plateformes	76
d. Les plateformes homotrifonctionnelles	77
V. PRÉSENTATION DES PROJETS DE RECHERCHE	79

Ces travaux de thèse ont pour finalité l'élaboration de nouveaux agents traçables pour l'imagerie médicale et le diagnostic du cancer. Les principaux projets abordés visent au développement de nouvelles stratégies de bioconjugaison chimiospécifiques. En particulier, nous nous sommes intéressés à la mise en place de techniques permettant l'obtention d'agents imageants bimodaux, nucléaires et fluorescents, *via* la double modification de biomolécules.

Dans la première partie de ce chapitre introductif, nous présenterons les différentes techniques d'imagerie classiquement utilisées en médecine ainsi que leurs applications dans le domaine de l'imagerie moléculaire. Les stratégies basées sur la combinaison de plusieurs modalités d'imagerie connaissent un essor remarquable depuis quelques années. Ces approches multimodales constituent le cœur de nos travaux de recherche et une attention toute particulière leur sera accordée.

Dans une seconde partie, nous développerons le principe du ciblage spécifique. Cette approche, généralement basée sur l'emploi de molécules vectrices, permet la visualisation précise de pathologies et notamment de tumeurs. Les principales familles d'agents de vectorisation, utilisées pour acheminer les molécules traçables jusqu'à la zone d'intérêt, seront exposées en détail.

La troisième partie sera consacrée aux différentes techniques de bioconjugaison permettant le couplage d'une molécule traçable à une protéine vectrice. En particulier, nous présenterons les progrès récents réalisés dans le domaine de la bioconjugaison dite « site-spécifique ». Il est à noter que les différentes technologies qui ont été développées au cours de ces trois années de thèse sont utilisables pour la construction d'agents imageants mais peuvent également permettre l'élaboration de divers agents pharmaceutiques. Ainsi, nous prendrons soin d'inclure des exemples issus des différents champs d'application, tels que le domaine de la thérapie ciblée.

Enfin la dernière partie sera dédiée à la présentation des différentes approches permettant l'élaboration de protéines doublement modifiées. Comme nous l'expliquerons par la suite, l'optimisation des procédés permettant la préparation de cette nouvelle génération de conjugués constitue un point crucial dans divers domaines, dont celui de l'imagerie médicale bimodale. Les avantages et limitations des stratégies envisageables seront discutés et nous développerons plusieurs exemples précis de techniques basées sur l'utilisation de plateformes.

I. L'IMAGERIE MEDICALE

L'imagerie médicale est un outil extrêmement puissant qui permet de visualiser de manière non invasive l'anatomie interne du corps humain ainsi que les processus physiologiques et les échanges chimiques survenant au sein d'organismes vivants. Ainsi, le développement des différentes technologies d'imagerie a permis une énorme avancée en médecine ainsi qu'en recherche biomédicale et en biologie. La construction des images repose sur la mesure de phénomènes physiques bien précis tels que l'absorption des rayons X, la résonance magnétique nucléaire, la réflexion des ultrasons, la radioactivité ou encore l'émission de signaux optiques. Chacune des différentes modalités d'imagerie correspondantes possède des propriétés particulières, met en jeu des appareils très différents et donne lieu à des applications bien définies.¹ Ces différents points seront développés par la suite.

Les informations délivrées au terme d'un examen médical par imagerie peuvent être séparées en deux grands types : structurelles ou fonctionnelles. Ainsi, les données d'ordre structurel, ou anatomique, renseignent sur la morphologie, la localisation ou la composition macroscopique des différents organes et tissus examinés. Au contraire, les informations de type fonctionnel mettent en lumière des événements biochimiques et physiologiques à des niveaux cellulaires et même moléculaires.

I.1. L'imagerie moléculaire

L'imagerie fonctionnelle inclut notamment le procédé consistant à réaliser l'acquisition d'images après l'administration d'une molécule possédant des propriétés particulières qui vont augmenter (ou dans certains cas diminuer) le signal mesuré. L'injection de ces molécules dites « imageantes » permet par exemple l'amélioration du contraste entre différents types de tissus dans l'organisme. Ces agents de contraste peuvent être vectorisés au moyen de molécules possédant une forte sélectivité pour des phénomènes biologiques précis (voir Introduction, Partie II). Ils peuvent alors, se révéler extrêmement efficaces pour la visualisation et la localisation de nombreuses pathologies (cancers, infections, maladies cardiovasculaires, troubles thyroïdiens, cérébraux, osseux, gastro-intestinaux...) par ciblage des changements physiopathologiques correspondants.¹ Depuis ses prémises remontant au milieu du 20^{ème} siècle, ce concept, appelé « imagerie moléculaire », s'est énormément développé. Il est à présent largement répandu, comme le montre l'utilisation récurrente d'agents imageants en médecine ainsi que les nombreuses études cliniques relatives à ce type d'agents pharmaceutiques.²

L'imagerie moléculaire permet donc le diagnostic rapide et précis de nombreuses maladies, et elle est, en particulier, largement utilisée dans le domaine de l'oncologie. En effet, le cancer peut induire une multitude de processus physiologiques, tels que la variation du nombre de récepteurs cellulaires de surface, l'altération de voies de signalisation, l'augmentation des besoins en acides aminés,

¹ James, M. L.; Gambhir, S. S. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897–965

² Srinivasarao, M.; Galliford, C. V.; Low, P. S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 203–219

lipides, glucose, l'angiogenèse, l'hypoxie, l'apoptose, la modification du système immunitaire ou encore la modification des gènes qui régulent la prolifération.^{3,4} Tous ces changements fonctionnels précèdent généralement les changements morphologiques, ce qui explique l'importance des techniques d'imagerie fonctionnelle pour le diagnostic précoce du cancer. La détection des tumeurs cancéreuses à un stade précoce est un facteur décisif quant à la guérison du patient. En effet, la chirurgie curative est une approche très efficace pour soigner de nombreux types de cancer, cependant elle n'est possible que pour des stades peu avancés.^{5,6}

Par ailleurs, l'utilisation de marqueurs imageants moléculaires permet la détection de réactions biochimiques, telles que des interactions protéine-protéine ou des réactions enzymatiques, qui facilitent la compréhension des mécanismes impliqués dans ces pathologies. L'imagerie moléculaire rend également possible l'appréciation de l'agressivité des cancers détectés et la différenciation entre des tumeurs bénignes et malignes.

Outre son potentiel pour un diagnostic rapide, précis et non invasif, l'imagerie moléculaire est largement utilisée pour la découverte et le développement de nouveaux médicaments et plus généralement pour l'optimisation des stratégies thérapeutiques.⁷ Par exemple, grâce à l'approche « théranostique », le métabolisme, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des agents thérapeutiques peuvent être suivis en temps réel.⁸ L'évaluation de la progression de la pathologie par imagerie permet également d'évaluer le succès du traitement reçu. D'autre part, la thérapie personnalisée, pratique en grande partie basée sur l'imagerie moléculaire,⁹ est de plus en plus courante. Elle consiste en la visualisation du profil d'expression des marqueurs moléculaires associés à diverses pathologies. L'identification de ce « phénotype moléculaire », propre à chaque personne, permet la sélection des patients qui seront réceptifs vis-à-vis d'un agent thérapeutique moléculaire donné.

I.2. Les différentes modalités utilisées en imagerie moléculaire

Les différentes modalités d'imagerie (basées sur les rayons X, la radioactivité, les ultrasons, les signaux optiques, la résonance magnétique...) sont plus ou moins adaptées aux applications en imagerie moléculaire et il est primordial de choisir avec application la technique la plus adéquate selon l'objectif visé. Les points importants qui doivent être étudiés sont par exemple les impératifs de sensibilité, résolution, et quantification du signal, ainsi que le temps d'acquisition requis et le coût de l'imagerie. Pour certaines applications, il n'est pas indispensable de réaliser des images sur le sujet dans sa globalité (image corps-entier) ou d'utiliser une technique d'imagerie qui soit transposable en clinique. Le principe et les avantages et limitations de ces différentes modalités sont présentés ci-après, accompagnés des applications de chacune d'elles en imagerie moléculaire

³ McAllister, S. S.; Weinberg, R. A. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 4022–4028

⁴ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell.* **2011**, *144*, 646–674

⁵ Schiller, J. H.; Harrington, D.; Belani, C. P.; Langer, C.; Sandler, A.; Krook, J.; Zhu, J.; Johnson, D. H. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 92–98

⁶ Scott, W. J.; Howington, J.; Feigenberg, S.; Movsas, B.; Pisters, K. *Chest.* **2007**, *132*, 234S-242S

⁷ Weissleder, R. *Science.* **2006**, *312*, 1168–1171

⁸ Kelkar, S. S.; Reineke, T. M. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1879–1903

⁹ Kircher, M. F.; Hricak, H.; Larson, S. M. *Mol. Oncol.* **2012**, *6*, 182–195

(tableau 1). L'imagerie photoacoustique ainsi que les techniques basées sur l'effet Cherenkov ne seront pas abordées ici car elles sont encore assez peu développées en clinique.

Tableau 1. Caractéristiques des principales modalités utilisées en imagerie moléculaire ; tableau adapté de revue.¹

Modality	Temporal Resolution	Spatial Resolution	Depth of Penetration	Sensitivity	Cost
Computed tomography (CT)	Minutes	50–200 μm (preclinical) 0.5–1 mm (clinical)	Limitless	ND	\$\$
Magnetic resonance imaging (MRI)	Minutes-hours	25–100 μm (preclinical) ~1 mm (clinical)	Limitless	10^{-3} to 10^{-5} M	\$\$\$
Positron emission tomography (PET)	Seconds-minutes	1–2 mm (preclinical) 5–7 mm (clinical)	Limitless	10^{-11} to 10^{-12} M	\$\$\$
Single photon emission tomography (SPECT)	Minutes	1–2 mm (preclinical) 8–10 mm (clinical)	Limitless	10^{-10} to 10^{-11} M	\$\$
Ultrasound (US)	Seconds-minutes	0.01–0.1 mm for superficial applications 1–2 mm for deeper (few cm depth) applications	mm-cm	Excellent when microbubbles are used (~10–12 M)	\$
Optical fluorescence imaging	Seconds-minutes	2–3 mm	<1 cm	$\sim 10^{-9}$ to 10^{-12} M	\$

ND = Not determined

a. L'imagerie par atténuation des rayons X

La tomodensitométrie, technique basée sur la mesure de l'atténuation des rayons X, est une modalité d'imagerie de transmission utilisée en routine chez l'homme. Elle permet la construction d'images anatomiques en trois dimensions par tomographie assistée par ordinateur (CT pour *computed tomography*). Les images sont obtenues à l'aide de rayons X produits par un générateur, détectés au travers de la zone à imager (figure 1. A). Le contraste observé correspond à l'épaisseur de la zone traversée ainsi qu'à la capacité d'atténuation qui se révèle plus ou moins forte selon la nature des tissus biologiques. Par exemple, les os qui absorbent fortement les rayons X apparaissent en blanc, tandis que l'air est retranscrit sous la forme de zones sombres.

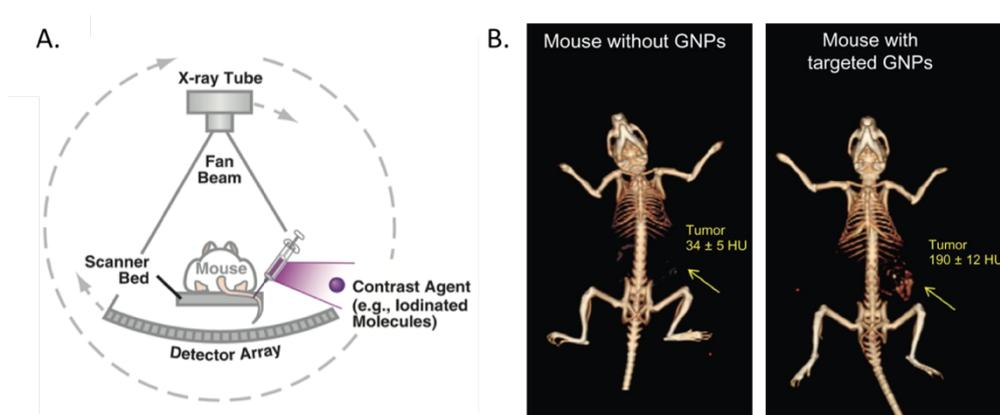


Figure 1. A. Principe de l'imagerie par tomographie assistée par ordinateur, figure extraite de revue ;¹ B. Représentations tridimensionnelles obtenues par tomographie assistée par ordinateur aux rayons X d'une souris présentant une tumeur de type épidermoïde (flèche jaune) sans agent de contraste (gauche) et 6 h après l'injection de nanoparticules d'or ciblant les cellules carcinomiques épidermales (droite) ; figure extraite d'article¹⁰.

¹⁰ Reuveni, T.; Motiei, M.; Romman, Z.; Popovtzer, A.; Popovtzer, R. *Int. J. Nanomedicine*. 2011, 2011, 2859–2864

L'acquisition des images par CT est simple à mettre en œuvre, relativement peu coûteuse et requiert peu de temps tout en présentant une résolution spatiale élevée. L'imagerie par CT, également appelée « scanner », constitue ainsi la modalité d'imagerie structurale par excellence pour de nombreuses applications. L'imagerie moléculaire basée sur cette modalité est possible, avec des composés iodés par exemple.¹¹ Cependant, elle reste limitée par une sensibilité très basse, qui ne peut pas être compensée par l'augmentation du nombre de scans en raison du caractère ionisant des rayons X. Des agents de contraste de type nanoparticulaires permettent d'augmenter le temps de résidence dans l'organisme et ainsi d'augmenter la proportion de composé injecté qui atteint effectivement sa cible. D'autre part, l'emploi d'éléments possédant des numéros atomiques encore supérieurs à celui de l'iode (or,¹⁰ bismuth,¹² tantale,¹³ ...) permet d'obtenir un meilleur contraste (**figure 1. B**). La quantité nécessaire d'agent de contraste pour obtenir un effet visible reste cependant de l'ordre du mM ce qui peut engendrer des problèmes de toxicité.¹

b. L'imagerie par réflexion des ultrasons

L'exemple le plus connu d'imagerie réalisée à l'aide des ultrasons est l'échographie fœtale. Cette technique s'appuie sur la réflexion d'ondes ultrasonores générées par un transducteur. Le temps mesuré entre l'envoi de l'onde et le retour ainsi que l'intensité du signal renvoyé permet de produire des images en deux dimensions (**figure 2**). Comme la CT, cette technique d'imagerie apporte essentiellement des informations de type morphologique. La résolution spatiale et temporelle intéressante, le faible coût et le côté très pratique (le dispositif utilisé ayant l'avantage d'être portable) ont permis la généralisation de cette technique. La profondeur de pénétration est cependant assez faible (mm - cm) et peut être améliorée seulement au détriment de la résolution. Au contraire de l'imagerie par CT, l'échographie est limitée aux tissus mous et ne permet pas la visualisation du squelette ou des organes composés en grande partie d'air comme les poumons.

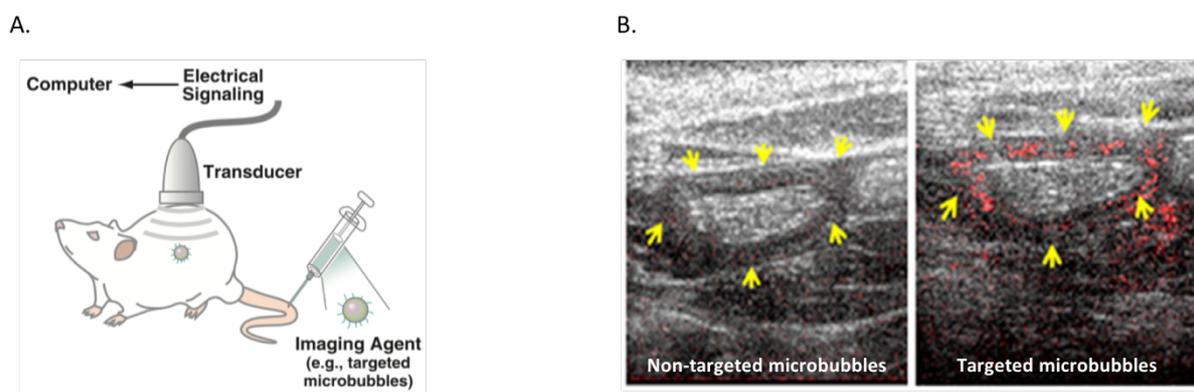


Figure 2. A. Principe de l'imagerie par ultrasons ; figure extraite de revue ;¹ **B.** Imagerie par ultrasons chez un porc présentant une inflammation de l'iléum ; les microbulles vectorisées (droite) permettent une nette augmentation du signal par rapport aux microbulles non vectorisées (gauche) ; figure extraite d'article.¹⁴

¹¹ Lusic, H.; Grinstaff, M. W. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 1641–1666

¹² Rabin, O.; Perez, J. M.; Grimm, J.; Wojtkiewicz, G.; Weissleder, R. *Nat. Mater.* **2006**, 5, 118–122

¹³ Lu, Y.-C.; Yang, C.-X.; Yan, X.-P. *Nanoscale.* **2015**, 7, 17929–17937

¹⁴ Abou-Elkacem, L.; Bachawal, S. V.; Willmann, J. K. *Eur. J. Radiol.* **2015**, 84, 1685–1693

Les agents de contraste les plus souvent utilisés sont constitués de microbulles d'air emprisonnées par des structures lipidiques ou polymériques.¹⁵ Les propriétés de biodistribution des microbulles peuvent être améliorées par leur vectorisation au moyen de biomolécules ciblantes (**figure 2. B**).¹⁶ Bien que la sensibilité de détection de ces microbulles soit excellente (10^{-12} M), ces dernières présentent un diamètre trop important (quelques micromètres) pour traverser les parois vasculaires. Les applications en imagerie moléculaire sont par conséquent restreintes à certains domaines comme l'angiographie.¹⁷

c. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie très puissante s'appuyant sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques et pouvant fournir, selon le mode utilisé, des informations structurelles comme fonctionnelles.¹ Le dispositif utilisé est constitué d'un aimant supraconducteur qui génère un champ magnétique autour du sujet et provoque une polarisation des atomes possédant un moment magnétique de spin (**figure 3**). Des variations de la radiofréquence sont appliquées par impulsion et le retour des dipôles à leur orientation initiale génère alors un signal dont les caractéristiques sont dépendantes de leur environnement physicochimique.¹⁸ En clinique, le noyau le plus communément utilisé pour l'IRM est l'hydrogène constituant les molécules d'eau présentes dans une large majorité de tissus. L'imagerie précise des tissus mous, qui constitue un challenge en CT, peut ainsi être effectuée avec une très haute résolution par IRM. Les organes plus pauvres en hydrogène, tels que les corticales osseuses, sont par contre plus difficiles à imager.

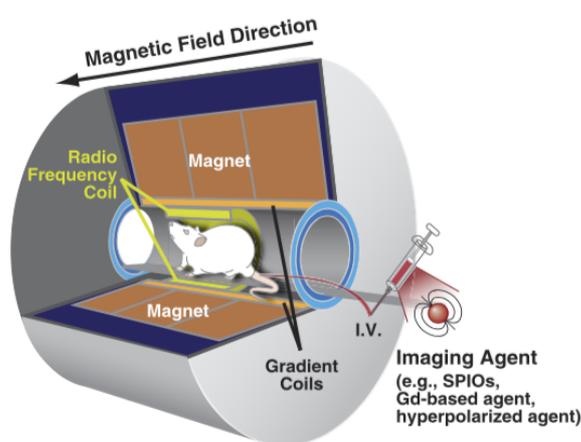


Figure 3. Principe de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire ; figure extraite de revue.¹

Des images fonctionnelles peuvent également être obtenues *via* l'injection d'agents imageants tels que des complexes de gadolinium(III).¹⁹ Les sept électrons non appariés de cet élément lui confèrent un très fort moment magnétique et il est capable d'augmenter efficacement la vitesse de relaxation des protons des molécules d'eau environnantes et ainsi de diminuer le temps de relaxation

¹⁵ Liang, H.-D.; Blomley, M. J. K. *Br. J. Radiol.* **2003**, 76, S140–S150

¹⁶ Deshpande, N.; Needles, A.; Willmann, J. K. *Clin. Radiol.* **2010**, 65, 567–581

¹⁷ Deshpande, N.; Pysz, M. A.; Willmann, J. K. *Angiogenesis.* **2010**, 13, 175–188

¹⁸ Jacobs, R. E.; Cherry, S. R. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, 11, 621–629

¹⁹ Caravan, P. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 512–523

longitudinal T_1 (**figure 4. A**). Ce phénomène se traduit par l'apparition de zones plus claires sur l'images. Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (SPIO-NPs) sont aussi très utilisées (**figure 4. B**).²⁰ Ces agents de contraste accélèrent la relaxation transversale T_2 , générant ainsi des zones plus sombres. Sont également utilisés certains atomes paramagnétiques comme le fluor-19,²¹ le carbone-13²² ou le phosphore-31²³ qui possèdent un spin magnétique de 1/2 et un rapport gyromagnétique élevé. L'injection de ces agents de contraste préalablement à un examen par IRM permet par exemple de visualiser la microvascularisation des tumeurs, le réseau lymphatique ou les inflammations. Comme pour la plupart des agents de contraste, l'ajout d'un vecteur au sein de leur structure peut s'avérer très utile pour accéder à des informations d'ordre biochimique. La principale limitation à l'utilisation d'agents de contraste en IRM est la faiblesse du signal émis qui implique des temps d'acquisition longs et l'injection de quantités importantes qui peuvent se révéler toxiques.²⁴

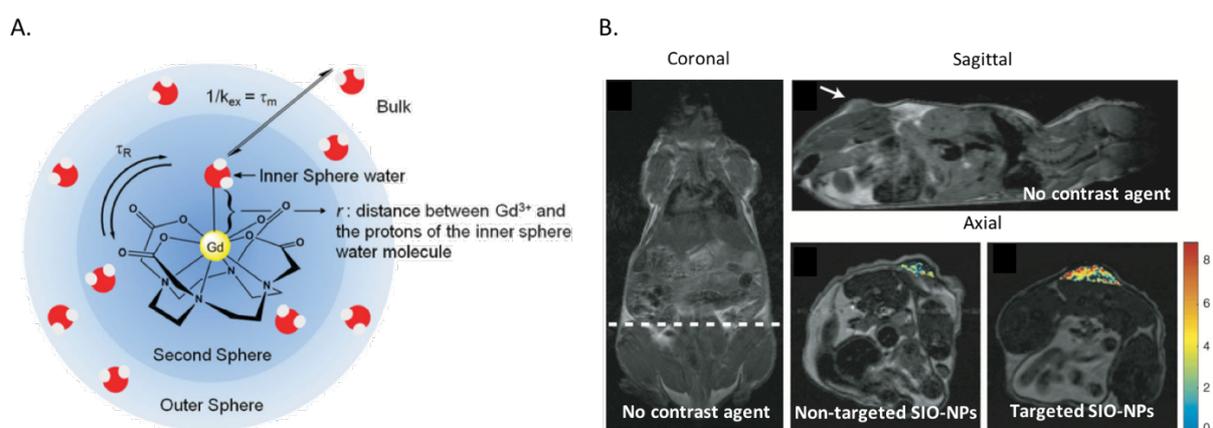


Figure 4. A. Représentation schématique d'un complexe de gadolinium(III) et des molécules d'eau avoisinantes ; figure extraite d'article ;²⁵ **B.** Images IRM d'une souris porteuse d'un gliome ; imagerie structurale en vue coronale et sagittale ; superposition de l'imagerie fonctionnelle et structurale en vue axiale 3 h après l'injection de SPIO-NPs non vectorisées ou vectorisées par la chlorotoxine ; figure extraite d'article²⁶

d. L'imagerie par émission radioactive

Principe

L'imagerie par émission nucléaire (ou scintigraphie) est une modalité exclusivement fonctionnelle qui implique l'injection d'un agent radiopharmaceutique émettant des rayons gamma (**figure 5. A**). Grâce à leur haute résolution, leur excellente sensibilité et l'absence de limite de pénétration des tissus, les techniques d'imagerie nucléaire constituent une des modalités idéales pour le diagnostic

²⁰ Vuong, Q. L.; Gillis, P.; Roch, A.; Gossuin, Y. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9*, 1468–1489

²¹ Tirota, I.; Dichiarante, V.; Pigliacelli, C.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Bombelli, F. B.; Metrangolo, P.; Resnati, G. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1106–1129

²² Gallagher, F. A.; Kettunen, M. I.; Brindle, K. M. *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 1006–1015

²³ Rodgers, C. T.; Clarke, W. T.; Snyder, C.; Vaughan, J. T.; Neubauer, S.; Robson, M. D. *Magn. Reson. Med.* **2013**, *72*, 304–315

²⁴ Rogosnitzky, M.; Branch, S. *BioMetals.* **2016**, *29*, 365–376

²⁵ Verwilt, P.; Park, S.; Yoon, B.; Kim, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1791–1806

²⁶ Sun, C.; Veiseh, O.; Gunn, J.; Fang, C.; Hansen, S.; Lee, D.; Sze, R.; Ellenbogen, R. G.; Olson, J.; Zhang, M. *Small.* **2008**, *4*, 372–379

par imagerie fonctionnelle. Généralement, ces techniques sont combinées à une modalité d'imagerie de type structurel afin d'obtenir des données anatomiques permettant de situer plus aisément la position du signal radioactif au sein de l'organisme. Par ailleurs, bien que les quantités d'agent imageant nécessaires soient généralement très faibles (nM), la toxicité des rayonnements radioactifs est un frein important et le nombre et la fréquence des examens par patient sont limités.

Il existe deux types d'imagerie basée sur la radioactivité : la tomographie par émission de positons (TEP, ou PET en anglais) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP, ou SPECT en anglais). La différence réside dans le mode de désintégration du nucléide utilisé (**figure 5. B**). Les radioisotopes relatifs à l'imagerie TEMP se désintègrent en émettant directement un rayonnement gamma (rayonnement photonique) selon des modes variables : l'émission gamma pur (technétium-99 métastable), la capture électronique (indium-111) ou la désintégration β^- (lutécium-177). Les rayonnements gamma produits selon les deux derniers modes de désintégration sont souvent accompagnés d'autres particules/rayonnements (électrons, rayons X, électrons Auger ...). Les radioisotopes utilisés en TEP (fluor-18, gallium-68, cuivre-64, zirconium-89, ...), se désintègrent en émettant un positon β^+ qui va parcourir les tissus biologiques sur une distance allant de 0,5 à 5 mm, jusqu'à rencontrer un électron. La collision de ces deux particules provoque un phénomène d'annihilation qui s'accompagne de l'émission de deux photons possédant une énergie de 511 keV dans des directions opposées.

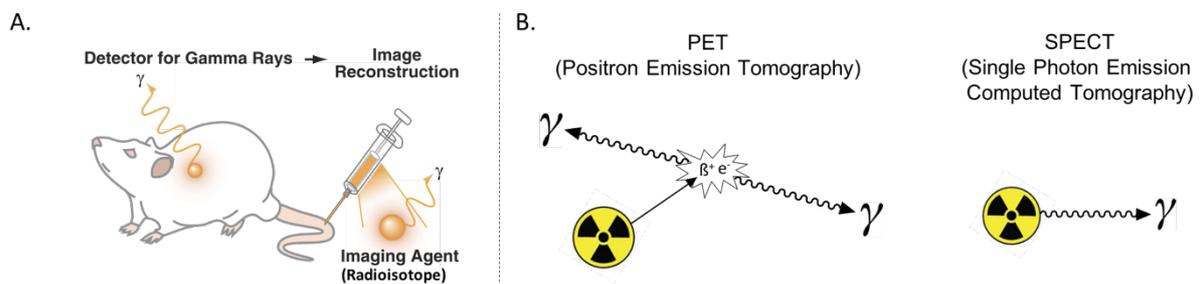


Figure 5. A. Principe de l'imagerie par émission radioactive, figure extraite de revue ;¹ **B.** Représentation schématique des modes de désintégration des radioémetteurs de positon β^+ (gauche) et gamma (droite).

Caractéristiques des systèmes d'acquisition

Ces deux modes d'émission photonique (direct et indirect) impliquent l'utilisation de dispositifs de détection spécifiques et les propriétés des deux modalités correspondantes (TEMP et TEP) diffèrent légèrement. Ainsi la détection des photons en imagerie TEMP est réalisée au moyen d'une gamma-caméra équipée d'un collimateur, ce dernier permettant de localiser la source du signal mesuré avec une résolution spatiale d'une dizaine de millimètres en clinique. La caméra effectue une rotation autour du sujet ce qui fournit une information volumique et permet la reconstruction informatisée d'une image tridimensionnelle (**figure 6. A**). Malgré l'application de facteurs de correction prenant en compte les phénomènes d'atténuation, le signal mesuré en TEMP n'est que semi-quantitatif. Ce dernier point a légèrement ralenti le développement de la TEMP en clinique, par comparaison à la TEP. Néanmoins en préclinique, cette technique est très appréciée car la quantification du signal est possible et la résolution spatiale est bien meilleure que chez l'homme (en dessous d'un millimètre). Le système d'acquisition employé pour l'imagerie TEP met à profit la double émission de photons

générée par le phénomène d'annihilation (**figure 6. B**). La caméra TEP, basée sur ce principe de coïncidence, est constituée d'un scintillateur entourant le sujet. Seuls les photons détectés par paire, au même instant et selon un angle de 180°C, seront pris en compte pour la construction de l'image volumique. Ce procédé permet de réduire considérablement le bruit de fond et d'améliorer légèrement la résolution (5-7 mm en clinique) par rapport à la TEMP. Ses excellentes propriétés ainsi que la mise sur le marché du ^{18}F -FDG (voir Introduction, Partie II. 2. b.) ont très vite hissé l'imagerie TEP au rang des techniques les plus couramment utilisées en clinique.

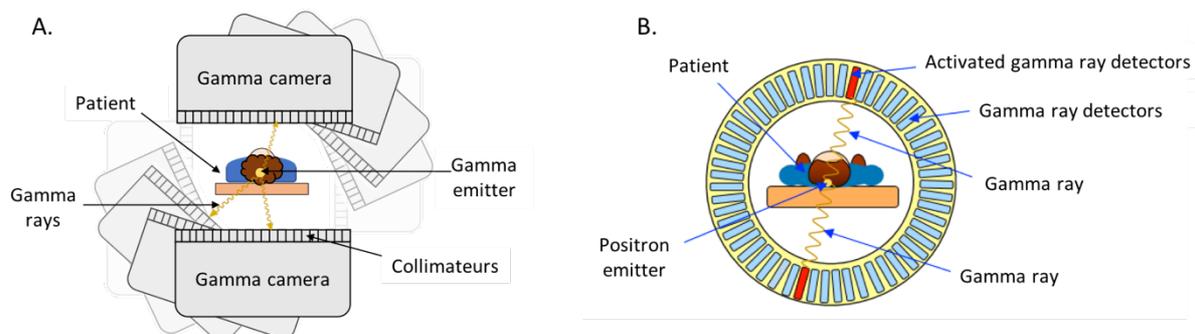


Figure 6. Schéma des dispositifs de détection utilisés pour les examens d'imagerie TEMP (A.) ou TEP (B.) ; figure extraite de site web.²⁷

Choix du radionucléide approprié

Actuellement, les modalités TEP et TEMP sont utilisées pour différents objectifs, en clinique comme en préclinique. Les propriétés des radionucléides disponibles pour l'une ou l'autre des techniques déterminent assez souvent les applications possibles (**tableau 2**).²⁸

Tableau 2. Principaux radioisotopes utilisés en imagerie, leur demi-vie et leur mode de production.

Modalité d'imagerie	Radionucléide	Demi-vie	Mode de production
TEP	^{18}F	109.8 min	Cyclotron
	^{68}Ga	67.8 min	Générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$
	^{64}Cu	12.7 h	Cyclotron
	^{86}Y	14.7 h	Cyclotron
	^{124}I	99.6 h	Cyclotron
	^{89}Zr	3.3 d	Cyclotron
	^{11}C	20.3 min	Cyclotron
TEMP	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.0 h	Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$
	^{111}In	67.9 h	Cyclotron
	^{67}Ga	78.3 h	Cyclotron
	^{177}Lu	6.7 h	$^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$
	^{123}I	13.2 h	Cyclotron

²⁷ Schoolphysics. <http://www.schoolphysics.co.uk/age16-19/Medical%20physics/text/PET%20scans/index.html> (accessed Sep 06, 2018)

²⁸ Brasse, D.; Nonat, A. *Dalton Trans.* **2015**, 44, 4845–4858

Ainsi, les isotopes produits par cyclotrons peuvent être distribués en grosse quantité pour les études cliniques de routine ou effectuées sur un grand nombre de patients. Lorsque la demi-vie de l'isotope est courte, comme pour le fluor-18, le temps de transport entre le cyclotron et l'hôpital peut être un problème. Les générateurs sont très pratiques pour la recherche et les applications biomédicales. Par exemple, le nombre croissant d'études employant le gallium-68 (produit grâce à un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$) montre bien le potentiel de ces systèmes de production.

Les radionucléides possédant des demi-vies courtes sont adaptés aux agents d'imagerie présentant une biodistribution rapide, et leur vectorisation par des macromolécules est généralement proscrite. Ainsi, le ^{18}F est limité au marquage de petites molécules, peptides ou protéines à pharmacocinétique rapide, tandis que le ^{64}Cu , l' ^{111}In ou le ^{89}Zr sont plus appropriés pour l'élaboration d'agents de ciblage à base d'anticorps. D'un autre côté, une décroissance trop lente peut poser des problèmes de radiotoxicité pour le patient et compliquer la gestion des déchets radioactifs.

Il existe également des éléments qui présentent, parmi leurs isotopes, un émetteur de positon ou de photon pour l'imagerie nucléaire, et un émetteur de β^- , de rayons α ou d'électrons Auger pour la radiothérapie. Ainsi, les combinaisons de radioisotopes de l'iode (123, 124, 125, 131), de l'yttrium (86, 90), du cuivre (61, 62, 64, 67), du plomb (203, 212), du terbium (149, 152, 155, 161) et de l'arsenic (71, 72, 74, 77) constituent des outils théranostiques très puissants car ils permettent l'élaboration d'agents imageants possédant exactement les mêmes propriétés chimiques que les agents thérapeutiques correspondants.

Un dernier paramètre très important, qui va fortement influencer le choix du radionucléide utilisé, est le mode de greffage au biovecteur. Les radioisotopes non métalliques (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O et ^{18}F) sont généralement introduits sur le biovecteur au moyen de liaisons covalentes.²⁹ Ce type d'émetteurs n'ayant pas été utilisé durant ma thèse, les stratégies permettant leur introduction sur le biovecteur ne seront pas détaillées ici. Lorsque le radionucléide est un métal, un chélateur bifonctionnel joue le rôle d'intermédiaire pour lier l'émetteur au vecteur et du même coup supprimer la toxicité généralement induite par les métaux non complexés. Le cahier des charges d'un chélateur bifonctionnel efficace comprend 1) une bonne stabilité thermodynamique et cinétique du complexe, 2) des conditions de radiomarquage pas trop drastiques, 3) la présence d'une fonction permettant la conjugaison au vecteur. Par exemple pour le second point, le temps de réaction nécessaire à la complexation doit être adapté par rapport à la demi-vie de l'isotope et si un vecteur de type protéine est utilisé, le radiomarquage doit pouvoir être effectué à des températures pas trop élevées et à un pH voisin de 7. Actuellement, pour chacun des radionucléides utilisés classiquement en médecine nucléaire, il existe un ou plusieurs chélateurs efficaces et de nombreux autres sont constamment développés (**figure 7**).^{30, 31}

²⁹ Deng, X.; Rong, J.; Wang, L.; Vasdev, N.; Zhang, L.; Josephson, L.; Liang, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 10.1002/anie.201805501

³⁰ Price, E. W.; Orvig, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 43, 260–290

³¹ Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. *Dalton Trans.* **2016**, 45, 15702–15724

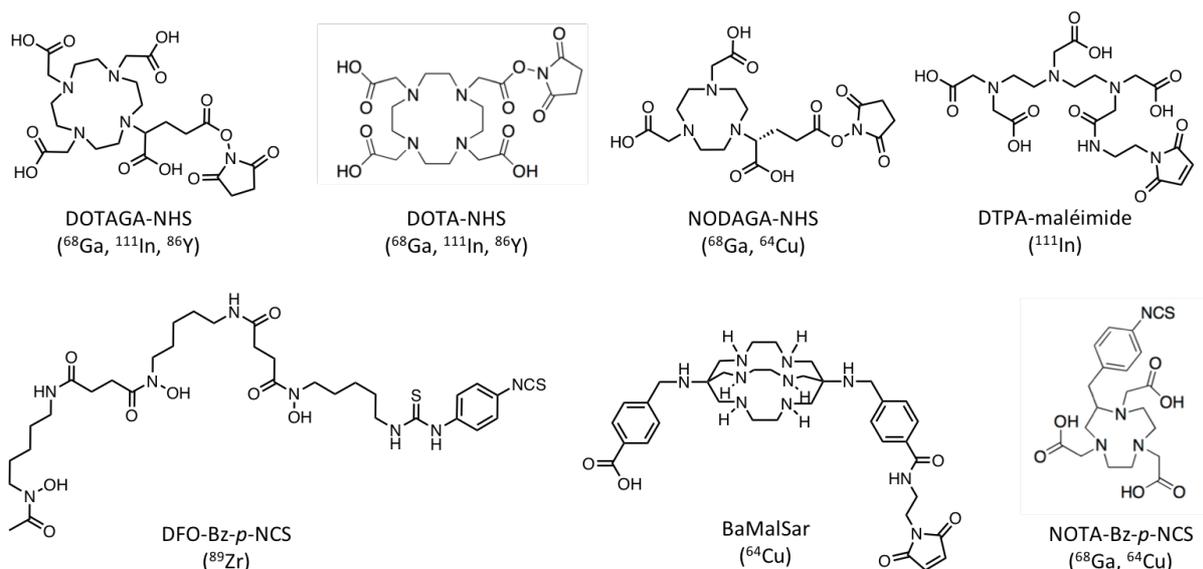


Figure 7. Quelques exemples de chélateurs bifonctionnels couramment utilisés pour la complexation de radioisotopes métalliques.

e. L'imagerie optique

Principe

Comme les méthodes d'imagerie nucléaire, l'imagerie optique fournit uniquement des informations d'ordre fonctionnel. Elle est basée sur la détection de photons émis dans les domaines du visible et de l'infrarouge et regroupe différentes techniques telles que la fluorescence et la bioluminescence. Cette dernière met en jeu une réaction enzymatique chimioluminescente, tandis que la fluorescence implique soit l'utilisation de cellules mutées exprimant une protéine fluorescente, soit l'injection de molécules fluorescentes. Seule l'approche basée sur l'emploi de fluorophores organiques (**figure 8. A**) sera discutée ici.

Le phénomène physique mis en jeu débute par l'absorption d'un ou plusieurs photons par le fluorophore, ce qui génère un transfert électronique de l'état fondamental à un état singulet de plus haute énergie. Suite à une étape de relaxation vibrationnelle, le fluorophore se désexcite en émettant un photon de fluorescence qui est détecté par une caméra CCD (*charge-coupled device*). On appelle « déplacement de Stokes » la différence entre la position du maximum du spectre d'excitation et celle du maximum du spectre d'émission de la même transition électronique. Le diagramme de Jablonski (**figure 8. B**) présente les différentes transitions électroniques pouvant opérer à la suite de l'irradiation lumineuse d'un fluorophore organique.

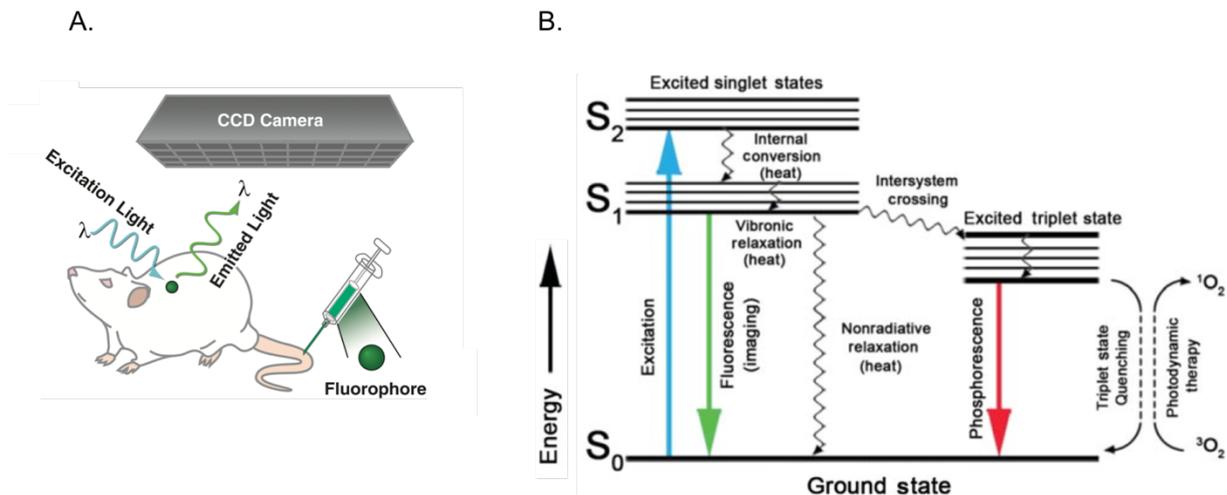


Figure 8. A. Principe de l'imagerie par fluorescence ; figure extraite de revue ;¹ **B.** Diagramme de Jablonski représentant les différentes transitions énergétiques impliquées dans le phénomène de fluorescence, figure extraite de revue.⁵¹

Avantages et limitations

Le dispositif permettant l'irradiation et la détection nécessaire à la réalisation d'images de fluorescence est très facile à mettre en œuvre et également peu coûteux. L'acquisition est très rapide ce qui permet le suivi de processus biologiques en temps réel. Du fait de leur faible énergie, les photons émis au cours de l'examen sont sans danger. Les fluorophores sont des molécules potentiellement toxiques mais grâce à son excellente sensibilité, l'imagerie par fluorescence requiert l'injection de quantités infimes (de l'ordre du nanomolaire) ce qui limite l'apparition d'effets néfastes.³² Un autre avantage réside dans le fait que les propriétés spectrales des fluorophores peuvent être modulées par modification de leur structure. Ainsi, il est assez aisé de mettre en place l'acquisition d'images en « couleurs multiples » où différents processus biochimiques sont mis en évidence simultanément grâce à l'utilisation de plusieurs fluorophores possédant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes.

Les rayonnements utilisés en imagerie optique sont très sensibles aux phénomènes d'absorption, de réflexion et de diffusion et, par conséquent, pénètrent peu dans les tissus (quelques mm à 1 cm selon le fluorophore utilisé) (**figure 9. A**). Le sang et l'eau peuvent en partie absorber le rayonnement appliqué pour exciter le fluorophore ainsi que le signal réémis, ce qui engendre un phénomène d'atténuation. Certaines biomolécules endogènes sont également excitables dans l'UV ou le visible, à l'origine d'un phénomène dit d'autofluorescence. Ces aspects sont peu limitants pour les imageries de surface (peau,³³ œil³⁴) ou pour les études par microscopie sur cellules ou échantillons de biopsie (**figure 9. B**). L'imagerie par fluorescence est également largement utilisée en préclinique (**figure 9. C**), notamment pour l'évaluation préliminaire d'agents imageants ou thérapeutiques. Il est alors préférable de choisir un fluorophore émettant dans la fenêtre thérapeutique dont la gamme

³² Alford, R.; Simpson, H. M.; Duberman, J.; Hill, G. C.; Ogawa, M.; Regino, C.; Kobayashi, H.; Choyke, P. L. *Mol. Imaging*. **2009**, *8*, 341–354

³³ Borisova, E. G.; Angelova, L. P.; Pavlova, E. P. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2014**, *20*, 211–222

³⁴ Baillif, S.; Wolff, B.; Paoli, V.; Gastaud, P.; Mauget-Faÿsse, M. *Retina*. **2011**, *31*, 1156–1163

correspond plus ou moins aux domaines proche infrarouge I (NIR-I) et II (NIR-II) (**figure 9. D**). En clinique, cette faible pénétrabilité pose un réel problème pour l'enregistrement d'images sur corps entier, en revanche elle est de plus en plus utilisée pour les diagnostics assistés par endoscopie³⁵ ou pour guider les actes chirurgicaux.³⁶

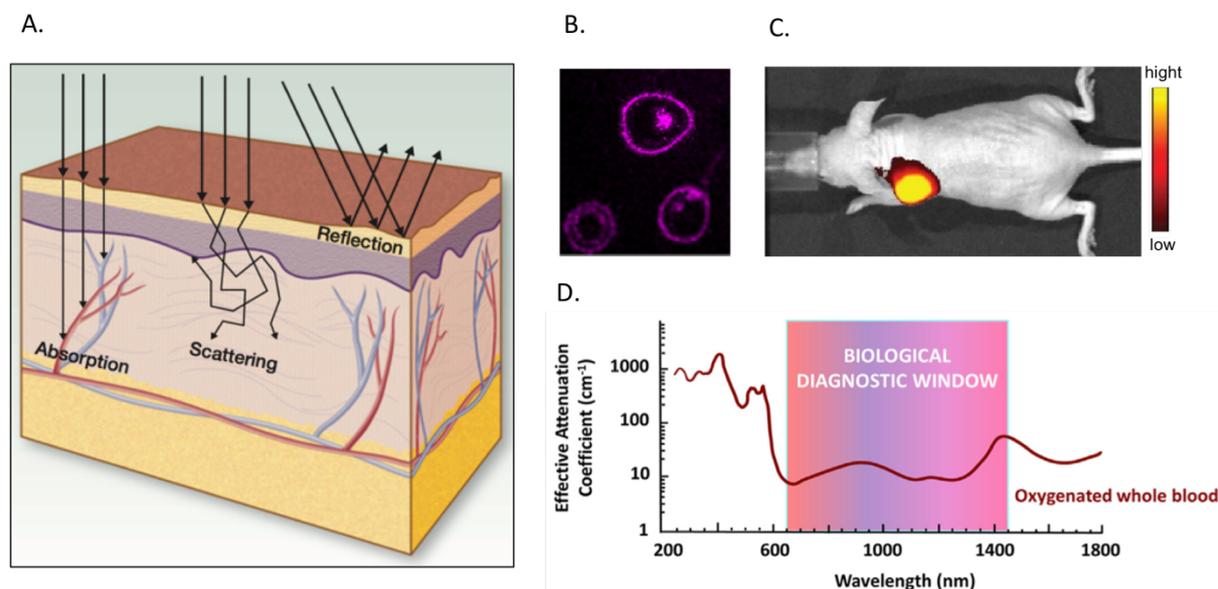


Figure 9. A. Phénomènes d'absorption, de réflexion et de diffusion diminuant la distance de pénétration des rayonnements lumineux dans les tissus, figure extraite d'article;³⁷ **B.** Observation microscopique par fluorescence de cellules après incubation en présence d'un fluorophore organique vectorisé;³⁸ **C.** Images par fluorescence proche-infrarouge après injection d'un fluorophore vectorisé chez une souris portant une tumeur xénotransgénée en sous-cutané;³⁹ **D.** Absorption de l'oxyhémoglobine et représentation de la fenêtre thérapeutique définie de 650 nm à 1450 nm.⁴⁰

Assistance à la chirurgie

Lors d'une chirurgie curative traditionnelle, les indicateurs permettant de différencier les tissus cancéreux des tissus sains sont limités à l'apparence et à la texture. L'analyse d'échantillons de biopsies peut également être effectuée au cours de l'opération, mais cette pratique est longue et peu efficace. La délimitation des marges chirurgicales est par conséquent difficile, or la présence de cellules cancéreuses après le retrait d'une tumeur par voie chirurgicale entraîne souvent la résurgence du cancer.

³⁵ Witjes, J. A.; Redorta, J. P.; Jacqmin, D.; Sofras, F.; Malmström, P.-U.; Riedl, C.; Jocham, D.; Conti, G.; Montorsi, F.; Arentsen, H. C.; Zaak, D.; Mostafid, A. H.; Babjuk, M. *Eur. Urol.* **2010**, *57*, 607–614

³⁶ Low, P. S.; Singhal, S.; Srinivasarao, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *45*, 64–72

³⁷ Keereweer, S.; Van Driel, P. B. A. A.; Snoeks, T. J. A.; Kerrebijn, J. D. F.; Baatenburg de Jong, R. J.; Vahrmeijer, A. L.; Sterenborg, H. J. C. M.; Löwik, C. W. G. M. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 3745–3754

³⁸ Sato, K.; Gorka, A. P.; Nagaya, T.; Michie, M. S.; Nani, R. R.; Nakamura, Y.; Coble, V. L.; Vasalatiy, O. V.; Swenson, R. E.; Choyke, P. L.; Schnerrmann, M. J.; Kobayashi, H. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 404–413

³⁹ Adumeau, P.; Carnazza, K. E.; Brand, C.; Carlin, S. D.; Reiner, T.; Agnew, B. J.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. *Theranostics.* **2016**, *6*, 2267–2277

⁴⁰ Martinić, I.; Eliseeva, S. V.; Petoud, S. *J. Lumin.* **2017**, *189*, 19–43

Au cours de ces dernières années, des systèmes d'acquisition ont été développés permettant la détection de la fluorescence en intraopératif (**figure 10. A**). Grâce à l'injection d'un agent fluorescent spécifique des cellules tumorales, il est alors possible de détecter en temps réel les tissus cancéreux à éliminer (**figure 10. B**). Cette approche facilite également la localisation des petites métastases et des ganglions lymphatiques infectés dont la résection est cruciale pour l'efficacité de la chirurgie. L'imagerie intraopérative par fluorescence permet aussi la visualisation de certains organes qui doivent être préservés, comme les nerfs ou les vaisseaux sanguins. Une équipe californienne a ainsi développé des fluorophores vectorisés capables de cibler sélectivement les tissus nerveux (**figure 10. C**).⁴¹ De tels composés pourraient se révéler très utiles dans de nombreux cas. Par exemple, les ablations chirurgicales pratiquées sur les patients atteints de cancers des glandes salivaires ou de la thyroïde entraînent assez souvent des blessures des nerfs faciaux et ceci pourrait être évité par l'injection préalable de ces agents imageants.

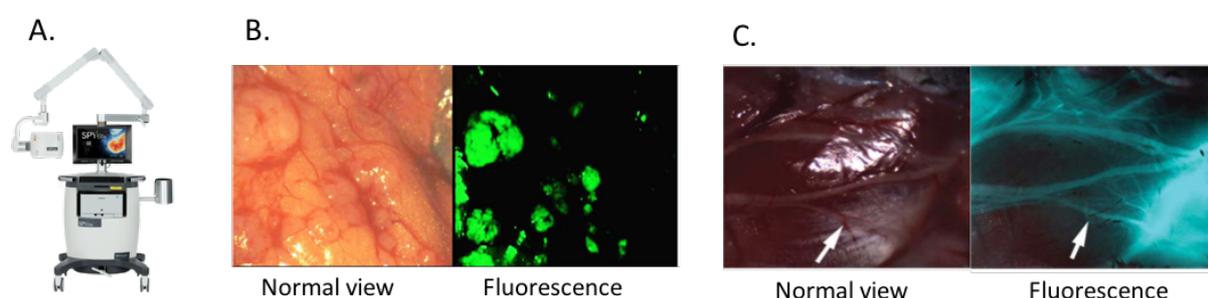


Figure 10. A. Dispositif SPY développé par NOVADAQ pour l'assistance à la chirurgie ; **B.** Images en lumière blanche et en fluorescence de tissus cancéreux chez une patiente atteinte d'un cancer ovarien ;⁴² **C.** Images en lumière blanche et en fluorescence des nerfs faciaux d'une souris.⁴¹

Choix de la sonde fluorescente

Comme discuté brièvement ci-dessus, il est important de choisir une sonde fluorescente dont les longueurs d'onde d'absorption (λ_{Abs}) et d'émission (λ_{Em}) sont situées dans la fenêtre thérapeutique (650–1450 nm). Les fluorophores émettant dans le domaine NIR-II, tels que les lanthanides, permettent d'obtenir une très haute résolution et un bon ratio signal/bruit de fond. Cependant, leur développement est encore assez récent et des problèmes de toxicité ont été rencontrés.⁴³ Pour notre part, nous nous intéresserons plus particulièrement aux fluorophores organiques qui possèdent des λ_{Abs} et des λ_{Em} compris dans le domaine proche infrarouge NIR-I (650-1000 nm).

Outre les longueurs d'onde d'absorbance et d'émission, il existe différents paramètres d'ordre photophysique qui permettent d'évaluer le potentiel d'une molécule donnée en tant que sonde fluorescente. Le déplacement de Stokes doit être le plus large possible pour éviter les interférences, le coefficient d'extinction molaire (ϵ) ainsi que le rendement quantique (Φ_F) doivent être suffisamment élevés, et enfin le fluorophore ne doit pas être trop sensible au photoblanchiment. Par ailleurs, d'autres critères d'ordre chimique entrent en compte, tels que la stabilité dans les milieux

⁴¹ Wu, A. P.; Whitney, M. A.; Crisp, J. L.; Friedman, B.; Tsien, R. Y.; Nguyen, Q. T. *The Laryngoscope*. **2011**, 121, 805–810

⁴² van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M. A.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J. G.; van der Zee, A. G. J.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V. *Nat. Med.* **2011**, 17, 1315–1319

⁴³ He, S.; Song, J.; Qu, J.; Cheng, Z. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 4258–4278

biologiques et la présence d'une fonction de greffage au sein de la structure permettant la vectorisation. L'hydrosolubilité est également un facteur important et il peut se révéler très utile d'ajouter des groupements hydrosolubilisants au sein de la structure pour éviter l'agrégation en solution aqueuse.⁴⁴

Il existe de nombreuses familles de fluorophores organiques, dont les propriétés sont plus ou moins adaptées à l'imagerie par fluorescence *in vivo*.⁴⁰ Des exemples appartenant aux principales familles sont regroupés dans la **figure 11. A**. L'un des rares fluorophores approuvés par la FDA est le vert d'indocyanine (*indocyanine green*, ICG), un fluorophore de la famille des cyanines, qui possèdent des $\lambda_{Abs, max}$ et des $\lambda_{Em, max}$ aux alentours de 800 nm (**figure 11. B**). Ce fluorophore est efficace mais présente une stabilité chimique et photochimique assez mauvaise et il tend à perdre en popularité au profit d'équivalents plus stables et surtout possédant une fonction pour la bioconjugaison (**figure 11. C**).

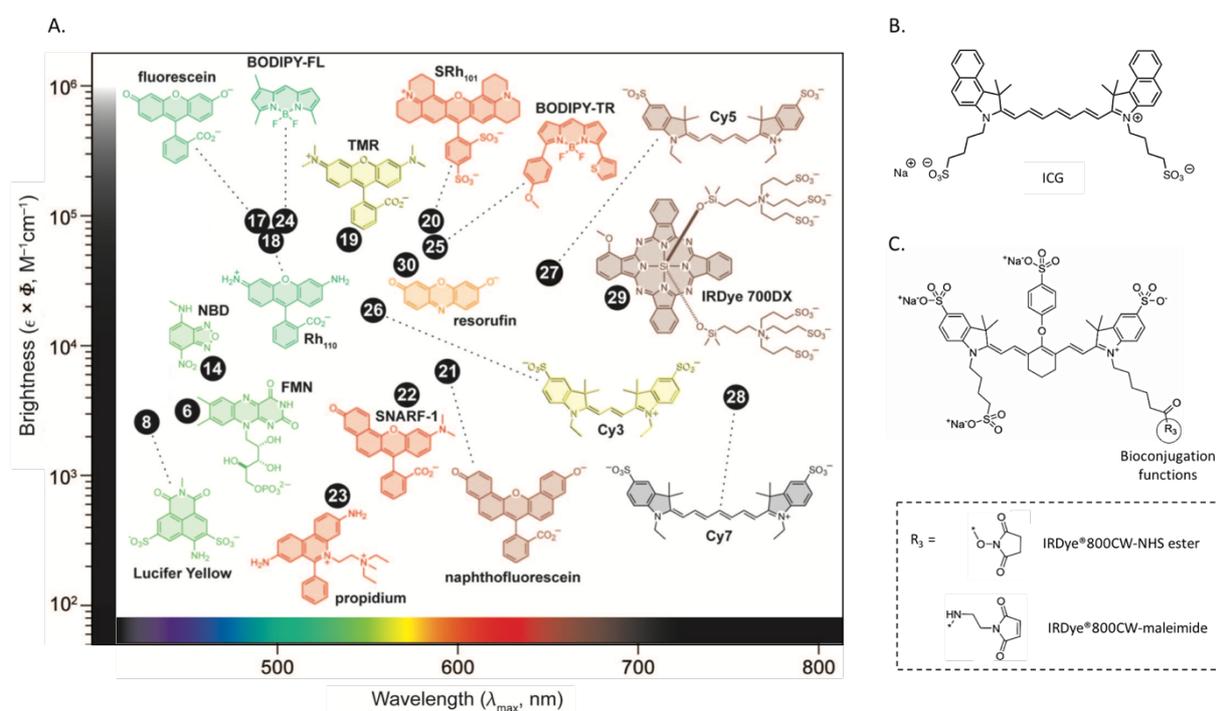


Figure 11. A. Quelques exemples de fluorophores classés en fonction de leur brillance (définie comme la multiplication de ϵ et de Φ_f) et de leur λ_{Abs} ; figure adaptée de revue;⁴⁵ **B.** Structure du vert d'indocyanine ; **C.** Structure de la sonde IRDye 800DX.

En imagerie, il existe une approche très élégante qui consiste à injecter un agent imageant éteint qui s'activera seulement une fois sa cible atteinte. L'utilisation de ces agents « *on/off* » permet d'augmenter considérablement le ratio signal/bruit de fond. Cette technique est particulièrement courante en imagerie par fluorescence et il existe de nombreuses stratégies permettant de rendre « activable » un fluorophore organique.^{46, 47, 48} Une méthode courante consiste à combiner au

⁴⁴ Garland, M.; Yim, J. J.; Bogyo, M. *Cell Chem. Biol.* **2016**, 23, 122–136

⁴⁵ Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142–155

⁴⁶ Owens, E. A.; Henary, M.; El Fakhri, G.; Choi, H. S. *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 1731–1740

⁴⁷ Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Chem. - Asian J.* **2017**, 12, 2008–2028

fluorophore un *quencher* de type accepteur FRET au moyen d'un lien clivable. La rupture du lien, par réaction enzymatique par exemple, libère le fluorophore et le signal fluorescent augmente.⁴⁹

Thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) est une approche thérapeutique de plus en plus utilisée dans le domaine de l'oncologie.⁵⁰ Elle est basée sur l'utilisation de molécules organiques appelées photosensibilisateurs, capables de former, sous irradiation lumineuse, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'oxygène singulet, des radicaux libres ou des peroxydes. La production de ces espèces induit une inflammation ainsi que des dommages irréversibles sur les tissus environnants, ce qui peut conduire à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Cet effet induit au moyen d'irradiations localisées est très efficace pour le traitement des tumeurs se développant en surface. Par ailleurs, le photosensibilisateur peut être vectorisé pour cibler plus efficacement les cellules tumorales et ainsi augmenter la sélectivité du traitement. Comme le montre le schéma de la **figure 8**, la génération de ROS est un processus photochimique qui peut avoir lieu en parallèle de l'émission de fluorescence. La PDT est donc assez souvent liée à l'imagerie par fluorescence, puisqu'une même molécule peut être utilisée à la fois pour ses propriétés traçables et pour son potentiel thérapeutique.⁵¹ Ainsi, les propriétés fluorescentes de ces agents théranostiques permettent la réalisation d'images précises de la zone cancéreuse qui servent ensuite de guide lors de l'irradiation.

Comme les sondes fluorescentes, les photosensibilisateurs présentent des structures aromatiques et les dérivés de porphyrines ou de phtalocyanines sont très courants (**figure 12**). Aujourd'hui, il existe de nombreux photosensibilisateurs utilisés en clinique pour le traitement de différents cancers, de maladies infectieuses, mais également en dermatologie et en ophtalmologie.⁵²

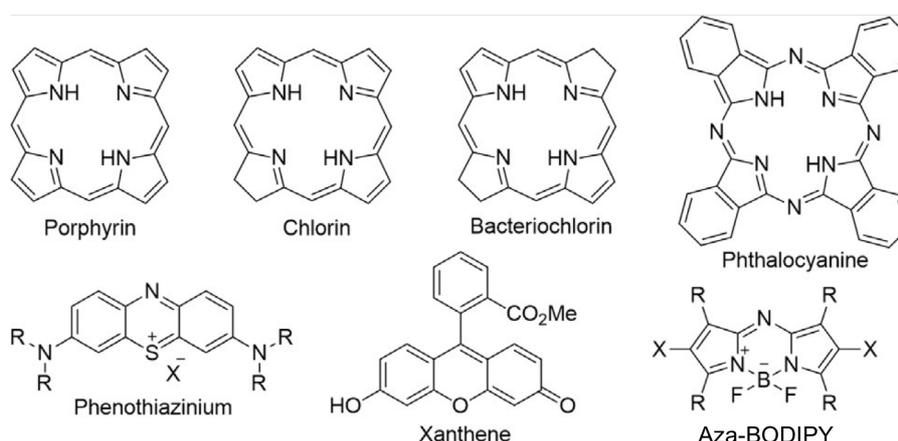


Figure 12. Squelettes structuraux des photosensibilisateurs les plus fréquents ; figure extraite de revue.⁵³

⁴⁸ Lee, M. H.; Sharma, A.; Chang, M. J.; Lee, J.; Son, S.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 28–52

⁴⁹ Staderini, M.; Megia-Fernandez, A.; Dhaliwal, K.; Bradley, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 2816–2826

⁵⁰ Callaghan, S.; Senge, M. O. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, 10.1039/c8pp00008e

⁵¹ Yuan, A.; Wu, J.; Tang, X.; Zhao, L.; Xu, F.; Hu, Y. *J. Pharm. Sci.* **2013**, 102, 6–28

⁵² Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. *Biochem. J.* **2016**, 473, 347–364

⁵³ Zhang, J.; Jiang, C.; Figueiró Longo, J. P.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A. *Acta Pharm. Sin. B.* **2018**, 8, 137–146

I.3. L'imagerie multimodale

a. Les principaux exemples d'imagerie multimodale

En combinant deux techniques d'imagerie (ou plus), l'imagerie multimodale permet l'obtention simultanée de données complémentaires qui peuvent s'avérer extrêmement précieuses. Depuis la commercialisation du premier dispositif permettant l'acquisition d'images par TEP et par tomodensitométrie (PET-scan), l'imagerie multimodale n'a eu de cesse de se développer et à présent la totalité des examens TEP sont réalisés conjointement avec la tomodensitométrie (**figure 13. A**). En effet, la combinaison d'une technique fonctionnelle et d'une technique structurale constitue un outil très puissant. Un autre exemple basé sur ce principe est le couple TEP/IRM dont l'utilisation en clinique tend à se généraliser même si les difficultés techniques ont ralenti sa progression par rapport au PET-scan (**figure 13. B**). L'IRM étant plus adaptée que la tomodensitométrie pour l'évaluation des tissus mous, la bimodalité TEP/IRM peut se révéler très utile en neurologie et pour le diagnostic de cancers du sein, de la prostate ou du foie.⁵⁴ D'autres combinaisons fonctionnel/structurel un peu moins développées existent (optique/CT, optique/IRM, US/CT, TEMP/IRM, TEMP/CT, IRM fonctionnel/CT...). Notamment, l'équipe de V. Ntziachristos a développé un dispositif de tomographie informatisée hybride fluorescence/tomodensitométrie permettant la reconstruction d'images 3D extrêmement précises (**figure 13. C**).⁵⁵

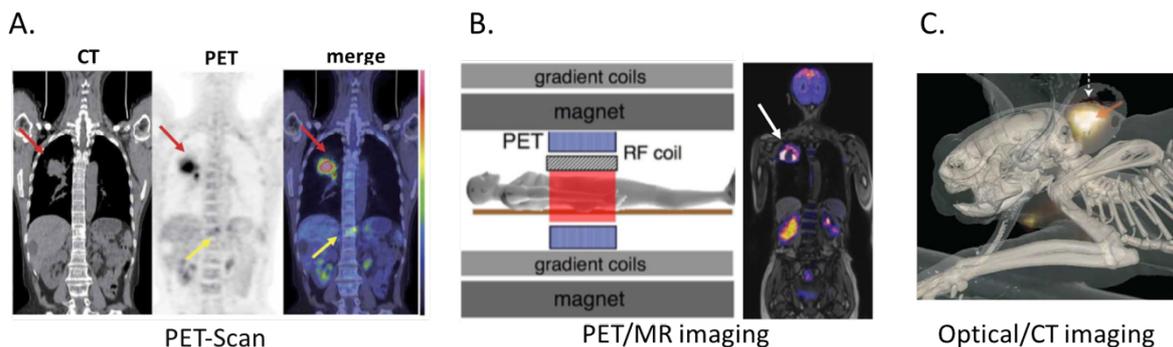


Figure 13. Exemples les plus probants de bimodalité, basés sur une combinaison d'informations structurales et fonctionnelles ; **A.** Combinaison TEP-tomodensitométrie aux rayons X;⁵⁶ **B.** Combinaison TEP-IRM;⁵⁷ **C.** Combinaison Imagerie Optique-tomodensitométrie aux rayons X.⁵⁵

Par ailleurs, la visualisation conjointe de processus physiopathologiques selon deux modalités d'imagerie complémentaires permet le recoupement des informations obtenues *via* les deux techniques, facilite l'interprétation des images et augmente ainsi la fiabilité du diagnostic. L'emploi d'agents imageants hybrides alliant les techniques nucléaire/IRM, optique/CT ou optique/IRM a ainsi montré de très bons résultats (**figure 14**). La combinaison de l'imagerie optique et de l'imagerie

⁵⁴ Grueneisen, J.; Nagarajah, J.; Buchbender, C.; Hoffmann, O.; Schaarschmidt, B. M.; Poeppel, T.; Forsting, M.; Quick, H. H.; Umutlu, L.; Kinner, S. *Invest. Radiol.* **2015**, 50, 505–513

⁵⁵ Ale, A.; Ermolayev, V.; Herzog, E.; Cohrs, C.; Angelis, M. H. de; Ntziachristos, V. *Nat. Methods.* **2012**, 9, 615–620

⁵⁶ Sun, X.; Xiao, Z.; Chen, G.; Han, Z.; Liu, Y.; Zhang, C.; Sun, Y.; Song, Y.; Wang, K.; Fang, F.; Wang, X.; Lin, Y.; Xu, L.; Shao, L.; Li, J.; Cheng, Z.; Gambhir, S. S.; Shen, B. *Sci. Transl. Med.* **2018**, 10, eaan8840

⁵⁷ Cherry, S. R.; Louie, A. Y.; Jacobs, R. E. *Proc. IEEE.* **2008**, 96, 416–438

nucléaire est également très puissante et donne naissance à des applications innovantes que nous détaillerons dans la partie I. 3. b..

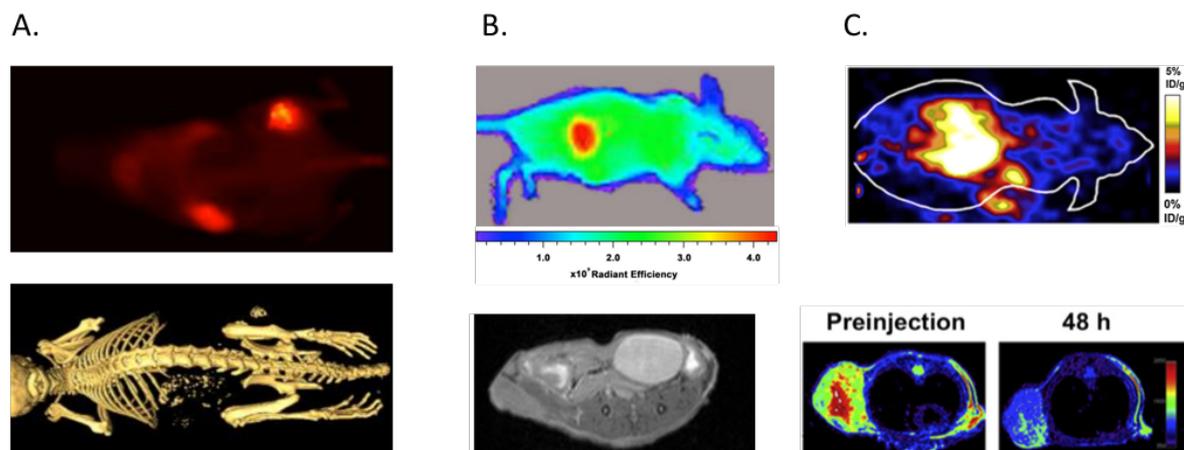


Figure 14. Exemples d'études montrant la détection de tumeurs chez des souris par imagerie bimodale associant deux modalités fonctionnelles ; **A.** Imagerie bimodale optique/CT par injection d'un agent constitué d'huile iodée et de *quantum dots* ; des métastases ont également été détectées ;⁵⁸ **B.** Imagerie bimodale optique/IRM grâce à l'emploi d'un agent combinant une cyanine et plusieurs complexes de gadolinium(III) ;⁵⁹ **C.** Imagerie bimodale TEP/IRM par injection d'un agent imageant hybride vectorisé.⁶⁰

Bien qu'il soit possible d'injecter, successivement ou simultanément, les deux agents imageants correspondant à chacune des modalités d'imagerie, il est préférable, pour une meilleure corrélation, d'utiliser un agent imageant hybride traçable *via* les deux techniques. La principale difficulté rencontrée lors de l'élaboration de ces agents imageants hybrides est l'importante différence de sensibilité pouvant exister entre les deux modalités. Par exemple, la tomodensitométrie et l'IRM sont très peu sensibles comparées à l'imagerie optique, la TEP ou la TEMP. Harrison *et al.* ont tenté d'atténuer cette différence par l'élaboration d'un agent hybride combinant trois complexes de gadolinium pour l'IRM et un unique fluorophore pour l'imagerie optique.⁵⁹ Une autre solution très efficace consiste en la synthèse de sondes hybrides basées sur des nanostructures.^{61, 62, 25} En effet, la modularité de cette approche permet d'associer les différents groupes imageants avec le ratio désiré. Ainsi, de nombreux agents imageants bimodaux ont été obtenus par fonctionnalisation de nanoparticules métalliques,^{13, 63, 64, 65} par autoassemblage de lipides sous forme de liposomes ou de micelles,⁵⁸ par utilisation de structures de type dendrimère,⁶⁶ ou encore par modification post-synthétique de quantum dots.⁶⁷ Quelques exemples sont représentés dans la **figure 15**. Ces systèmes

⁵⁸ Qin, M.-Y.; Yang, X.-Q.; Wang, K.; Zhang, X.-S.; Song, J.-T.; Yao, M.-H.; Yan, D.-M.; Liu, B.; Zhao, Y.-D. *Nanoscale*. **2015**, *7*, 19484–19492

⁵⁹ Harrison, V. S. R.; Carney, C. E.; MacRenaris, K. W.; Waters, E. A.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9108–9116

⁶⁰ Yang, M.; Cheng, K.; Qi, S.; Liu, H.; Jiang, Y.; Jiang, H.; Li, J.; Chen, K.; Zhang, H.; Cheng, Z. *Biomaterials*. **2013**, *34*, 2796–2806

⁶¹ Zhao, J.; Chen, J.; Ma, S.; Liu, Q.; Huang, L.; Chen, X.; Lou, K.; Wang, W. *Acta Pharm. Sin. B*. **2018**, *8*, 320–338

⁶² Kiani, A.; Esquevin, A.; Lepareur, N.; Bourguet, P.; Le Jeune, F.; Gauvrit, J. *Contrast Media Mol. Imaging*. **2016**, *11*, 92–98

⁶³ Ai, F.; Ferreira, C. A.; Chen, F.; Cai, W. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2015**, *8*, 619–630

⁶⁴ Řehoř, I.; Vilímová, V.; Jendelová, P.; Kubíček, V.; Jiráček, D.; Herynek, V.; Kapcalová, M.; Kotek, J.; Černý, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5185–5194

⁶⁵ Cha, E.-J.; Jang, E. S.; Sun, I.-C.; Lee, I. J.; Ko, J. H.; Kim, Y. I.; Kwon, I. C.; Kim, K.; Ahn, C.-H. *J. Control. Release*. **2011**, *155*, 152–158

⁶⁶ Oostendorp, M.; Douma, K.; Hackeng, T. M.; Dirksen, A.; Post, M. J.; Zandvoort, M. A. M. J. van; Backes, W. H. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 7676–7683

⁶⁷ Jing, L.; Ding, K.; Kershaw, S. V.; Kempson, I. M.; Rogach, A. L.; Gao, M. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 6367–6386

ont fait preuve de leur efficacité sur de nombreux modèles précliniques. Néanmoins, leur taille importante a un impact important sur leur biodistribution, et leur production ainsi que leur caractérisation précise peuvent s'avérer difficiles.

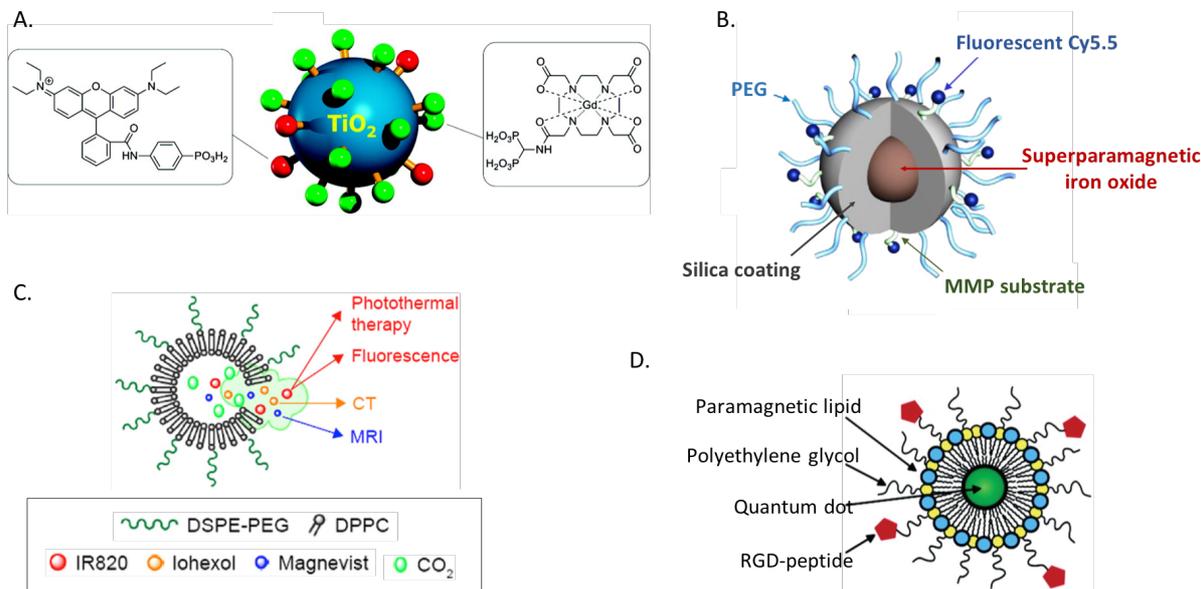


Figure 15. **A.** Nanoparticule d'oxyde de titane fonctionnalisée par un fluorophore de type rhodamine et un complexe de gadolinium(III) pour l'imagerie par IRM ;⁶⁴ **B.** Nanoparticule de fer superparamagnétique recouverte d'une couche de silice permettant le greffage de chaînes solubilisantes polyéthylène glycol (PEG) et de cyanines 5.5 fluorescentes ;⁶⁵ **C.** Structure liposomique multifonctionnelle capable de libérer, sous irradiation lumineuse, une cyanine 5.5 utilisée pour la fluorescence ou la thérapie, un composé triiodé pour l'imagerie CT et un complexe de gadolinium(III) pour l'IRM ;⁶⁸ **D.** Nanoparticule de *quantum dots* fluorescents incorporée au sein d'une micelle lipidique fonctionnalisée par des chaînes PEG, des complexes de gadolinium(III) et des vecteurs peptidiques pour le ciblage.⁶⁹

b. La combinaison imagerie optique/imagerie nucléaire

La combinaison de l'imagerie optique et de l'imagerie nucléaire constitue une alliance très complémentaire. Bien qu'encore assez peu courante en clinique, elle a déjà permis de grandes avancées dans le domaine de la recherche biomédicale. Comparée aux associations précédemment discutées (nucléaire/IRM, optique/CT, optique/IRM), l'imagerie bimodale optique/nucléaire est beaucoup plus simple à mettre en œuvre puisque la sensibilité des deux techniques est comparable. Des concentrations très faibles en agent imageant hybride peuvent ainsi être visualisées indifféremment selon l'une ou l'autre des deux techniques. Hormis leur sensibilité, l'imagerie optique et l'imagerie nucléaire possèdent des propriétés assez différentes mais très complémentaires comme le montrent les applications présentées ci-après.

Par exemple, l'imagerie nucléaire peut servir de contrôle lors de la validation de nouvelles techniques optiques pour l'imagerie moléculaire *in vivo*. En effet, il a été mentionné que l'imagerie par fluorescence est une technique encore émergente ; le développement de nouveaux agents optiques peut donc s'avérer difficile. En particulier, la faible pénétration de la fluorescence dans les

⁶⁸ Wu, B.; Wan, B.; Lu, S.-T.; Deng, K.; Li, X.-Q.; Wu, B.-L.; Li, Y.-S.; Liao, R.-F.; Huang, S.-W.; Xu, H.-B. *Int. J. Nanomedicine*. **2017**, *12*, 4467–4478

⁶⁹ Mulder, W. J. M.; Strijkers, G. J.; van Tilborg, G. A. F.; Cormode, D. P.; Fayad, Z. A.; Nicolay, K. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 904–914

tissus empêche la quantification du signal détecté et complique énormément l'évaluation de la biodistribution. L'utilisation d'agents imageants hybrides optique/nucléaire permet d'évaluer l'efficacité de la sonde optique par comparaison avec une technique bien établie comme l'imagerie nucléaire. A l'inverse, la résolution atteinte en imagerie optique surpasse celle de l'imagerie nucléaire et l'association de ces deux modalités ouvre de nouveaux champs d'applications inaccessibles au moyen de l'imagerie nucléaire seule. Ainsi, grâce à un agent bimodal optique/nucléaire, il est possible d'évaluer la pharmacocinétique *in vivo* par acquisition de la radioactivité, puis *ex vivo* l'imagerie optique permet le suivi de phénomènes biochimiques à un niveau cellulaire voire subcellulaire. Cette approche est ainsi utilisée en préclinique et en clinique pour faciliter la compréhension des mécanismes d'action des nouveaux médicaments et accélérer leur développement.

Une des applications les plus remarquables de la bimodalité nucléaire/optique consiste à combiner les propriétés de diagnostic des techniques scintigraphiques (TEP et TEMP) avec le potentiel de l'imagerie par fluorescence pour l'assistance à la chirurgie.

Comme le montre la **figure 16**, le traitement basé sur cette approche est séparé en plusieurs étapes successives. Dans un premier temps, l'agent hybride nucléaire/optique est injecté, puis une fois le composé accumulé dans la tumeur et les éventuelles métastases, l'imagerie est réalisée par acquisition de la radioactivité. Cette image pré-opérative sert à l'identification des zones cancéreuses et permet ainsi la planification de la chirurgie. L'absence de limite de pénétration de l'imagerie nucléaire permet de détecter des métastases profondément enfouies dans les tissus. Enfin, une chirurgie assistée par imagerie optique est effectuée et les tumeurs et métastases peuvent être éliminées efficacement.

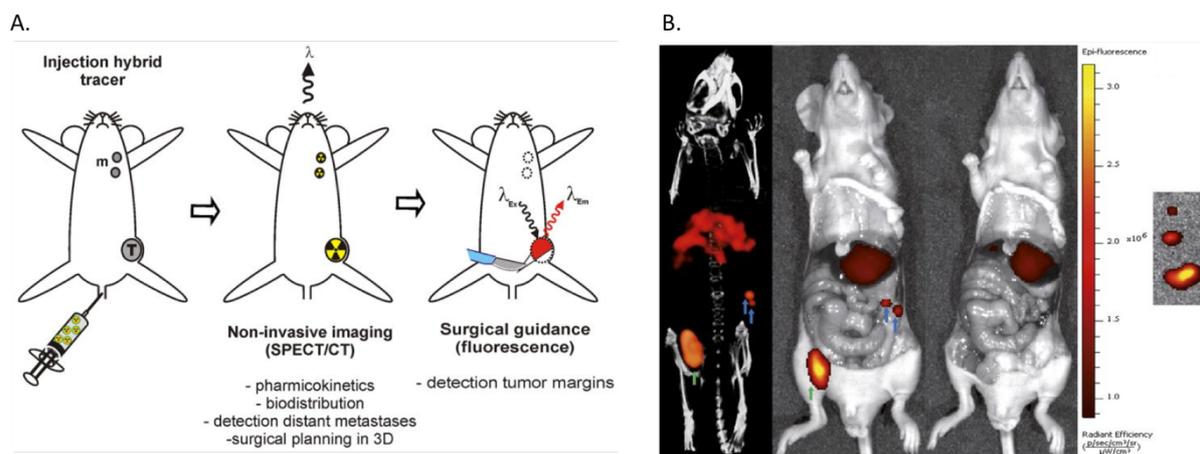


Figure 16. A. Le ciblage de tumeurs par imagerie bimodale nucléaire/optique permet la détection des tumeurs par imagerie nucléaire pré-opérative suivie de la résection des lésions par chirurgie assistée par l'imagerie optique ; figure extraite d'article ;⁷⁰ **B.** Imagerie bimodale nucléaire/optique après l'injection d'un agent imageant hybride, radioactif et fluorescent, chez une souris portant des tumeurs (flèches vertes et bleues) ; de gauche à droite : imagerie par TEMP-CT, imagerie par fluorescence avant et après résection des tumeurs et image par fluorescence des tumeurs éliminées.⁷¹

⁷⁰ Bunschoten, A.; Buckle, T.; Visser, N. L.; Kuil, J.; Yuan, H.; Josephson, L.; Vahrmeijer, A. L.; van Leeuwen, F. W. B. *ChemBioChem*. **2012**, 13, 1039–1045

⁷¹ Lütje, S.; Rijpkema, M.; Franssen, G. M.; Fracasso, G.; Helfrich, W.; Eek, A.; Oyen, W. J.; Colombatti, M.; Boerman, O. C. J. *Nucl. Med.* **2014**, 55, 995–1001

Une étude a ainsi montré que des micrométastases invisibles lors de l'imagerie nucléaire préopératoire, pouvaient être détectées et éliminées lors de la chirurgie assistée par fluorescence (**figure 17. A**).⁷² La translation de ce procédé en clinique serait particulièrement intéressante car de cette manière, l'imagerie ainsi que la chirurgie peuvent être effectuées dans des délais très courts et *via* une unique injection. Ceci améliorerait le confort du patient et diminuerait largement les frais liés à l'hospitalisation. A ce jour, de nombreuses études précliniques ont montré l'efficacité de cette approche,^{70, 71, 73} et la translation en clinique est en cours. Notamment, l'équipe de M. Hekman a montré le potentiel de cette approche par une étude *ex vivo* sur des reins humains présentant des tumeurs (**figure 17. B**).⁷⁴

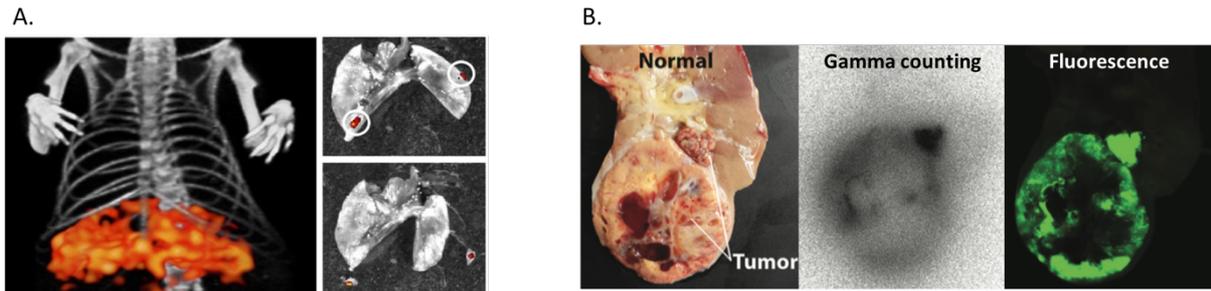


Figure 17. A. Gauche : l'imagerie corps-entier par TEMP-CT ne permet pas la mise en évidence des lésions pulmonaires ; droite : l'imagerie par fluorescence révèle la présence de micronodules cancéreux sur les poumons et permet leur résection⁷² ; **B.** Gauche : photographie en lumière blanche de tissus rénaux humains cancéreux ; milieu : autoradiographie ; droite : image obtenue par fluorescence. L'étude est réalisée au moyen de dispositifs de détection utilisés en clinique et montre une bonne correspondance entre les deux modalités.⁷⁴

Le parallèle peut être fait avec l'utilisation de sondes gamma qui permettent la détection de la radioactivité au cours de la chirurgie. Ces dispositifs sont actuellement utilisés pour faciliter la résection des ganglions sentinelles lors du traitement de cancers par voie chirurgicale. Ces chirurgies radioguidées restent tout de même assez limitées puisqu'elles fournissent uniquement une valeur (ou un signal sonore) correspondant à la radioactivité détectée dans les régions situées à proximité directe de la sonde. De plus, elle expose le praticien à des radiations ionisantes. La fluorescence est donc beaucoup plus pertinente pour ces applications intraopératoires. Néanmoins, dans le cas où l'agent imageant utilisé est un composé hybride, le chirurgien peut avoir recours, en plus du dispositif de détection par fluorescence, à une sonde gamma permettant la détection de nodules tumoraux recouverts par les tissus.

⁷² Hekman, M. C. H.; Rijpkema, M.; Bos, D. L.; Oosterwijk, E.; Goldenberg, D. M.; Mulders, P. F. A.; Boerman, O. C. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 706–710

⁷³ Rijpkema, M.; Oyen, W. J.; Bos, D.; Franssen, G. M.; Goldenberg, D. M.; Boerman, O. C. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 1519–1524

⁷⁴ Hekman, M. C. H.; Boerman, O. C.; de Weijert, M.; Bos, D. L.; Oosterwijk, E.; Langenhuijsen, H. F.; Mulders, P. F. A.; Rijpkema, M. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 4634–4642

II. LE CIBLAGE SPECIFIQUE DES PATHOLOGIES

En imagerie moléculaire, il est extrêmement important que l'agent imageant utilisé soit hautement spécifique du phénomène physiologique/biochimique que l'on souhaite détecter. En effet, pour obtenir un contraste suffisant il est nécessaire que la concentration d'agent imageant soit plus élevée au niveau de la zone d'intérêt que dans les tissus avoisinants. Ce critère est d'autant plus important en thérapie où l'injection d'un agent cytotoxique trop peu spécifique peut entraîner des effets secondaires désastreux. Par exemple, la biodistribution non sélective des agents classiquement utilisés en chimiothérapie réduit fortement la fenêtre thérapeutique et peut générer des phénomènes de résistance sévères, une dépression de la moelle osseuse, des troubles gastro-intestinaux et des douleurs importantes.

Un des premiers paramètres à prendre en compte lors de la conception d'un agent pharmaceutique (diagnostique ou thérapeutique) sont ses propriétés pharmacocinétiques. La pharmacocinétique décrit le devenir d'une substance pharmaceutique suite à son administration dans un organisme, notamment sur le plan de son adsorption, de sa distribution, de son métabolisme et de son excrétion, sous sa forme initiale ou sous la forme de métabolites (**figure 18**). D'une manière générale les molécules plutôt lipophiles et présentant une taille importante circuleront assez longtemps dans le sang puis seront ensuite éliminées par voie hépatique. Au contraire, les petites molécules hydrophiles seront éliminées très rapidement par voie rénale. Ainsi, pour chaque agent pharmaceutique développé, il est important de prendre en considération ces différents paramètres et si possible, de les ajuster selon l'objectif visé. Le nombre et la nature des charges (positives ou négatives) du composé joue également un rôle important dans sa pharmacocinétique.³⁸

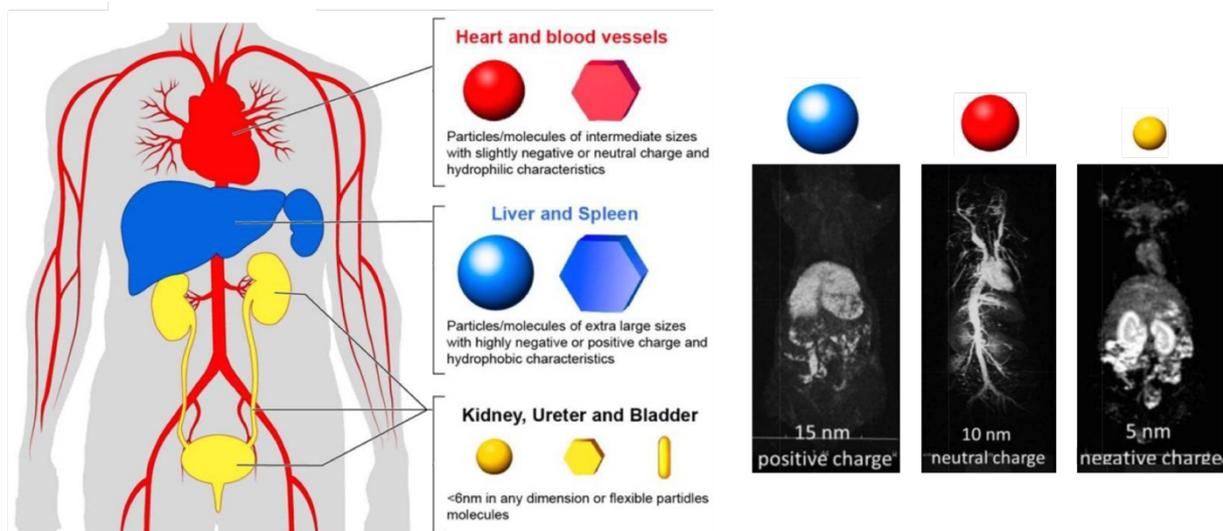


Figure 18. Pharmacocinétique et voies d'élimination de différents agents pharmaceutiques en fonction de leur taille, de leur hydrophilie et de leur charge ; figure adaptée de revue.⁷⁵

⁷⁵ Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. *Theranostics*. **2013**, *4*, 81–89

Ces aspects d'ordre pharmacocinétique établis, nous allons présenter les différentes stratégies permettant l'accumulation de l'agent pharmaceutique dans les tissus visés. La plupart des maladies, et en particulier le cancer, induisent des modifications au niveau tissulaire, cellulaire, et même moléculaire. En ciblant spécifiquement ces changements, il est possible de localiser/traiter la pathologie correspondante. Pour ce faire, il existe une méthode d'une grande modularité qui consiste à conjuguer la molécule imageante/cytotoxique à un agent de vectorisation (**figure 19. A**).

Par la suite, nous nous focaliserons sur le cas particulier de l'oncologie et nous verrons qu'il existe une très large variété de vecteurs incluant des dérivés biologiques aussi bien que des molécules synthétiques. La **figure 19. B** répertorie les principales familles de vecteur accompagnées du poids moléculaire, de la taille approximative et d'un exemple d'agent d'imagerie représentatif de chacune d'entre elles.

Il existe deux principaux modes de ciblage : passif ou actif. Les cinq premières familles (petites molécules, peptides, *affibodies*, aptamères et anticorps) sont basées sur un ciblage actif tandis que la dernière famille (nanoparticule) fait plutôt intervenir un ciblage de type passif. Néanmoins, ces deux modes de ciblage ne sont pas incompatibles et leur association permet dans certains cas d'améliorer les propriétés de ciblage d'un agent donné.

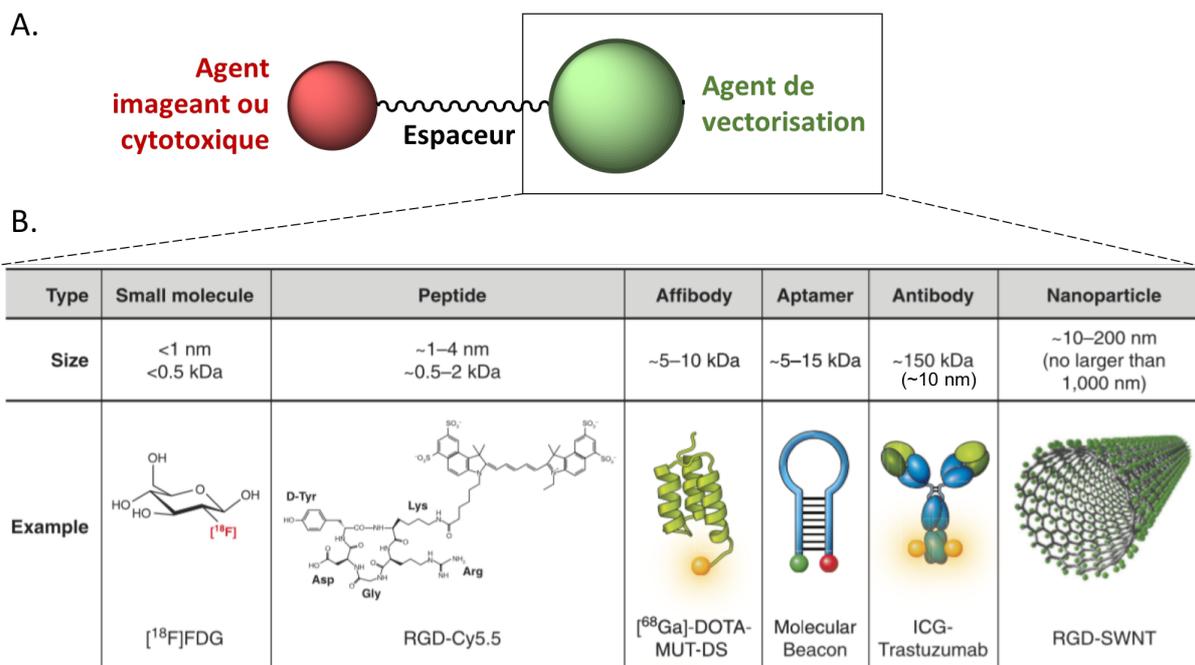


Figure 19. A. Structure schématique d'un agent pharmaceutique vectorisé ; **B.** Principales familles de vecteurs ; figure adaptée de revue.¹

II.1. Ciblage passif

La rapide expansion des tissus tumoraux accélère fortement le processus d'angiogenèse et les néovaisseaux sanguins formés peuvent présenter une architecture anormale qui se traduit par des cellules endothéliales désordonnées et des pores beaucoup plus larges que dans les vaisseaux

sanguins normaux (**figure 20**).^{76, 77} Les molécules/particules de taille importante, qui sont d'ordinaire retenues par les vaisseaux sanguins, peuvent alors traverser la paroi endothéliale et quitter le système vasculaire pour atteindre la tumeur. Cette perméabilité renforcée s'accompagne généralement d'un système lymphatique défectueux et les macromolécules sont alors retenues au sein de la tumeur. Ces différents phénomènes observés dans les tissus cancéreux (et parfois aussi lors de phénomènes inflammatoires) sont connus sous le nom d'effet EPR (*enhanced permeability and retention*).

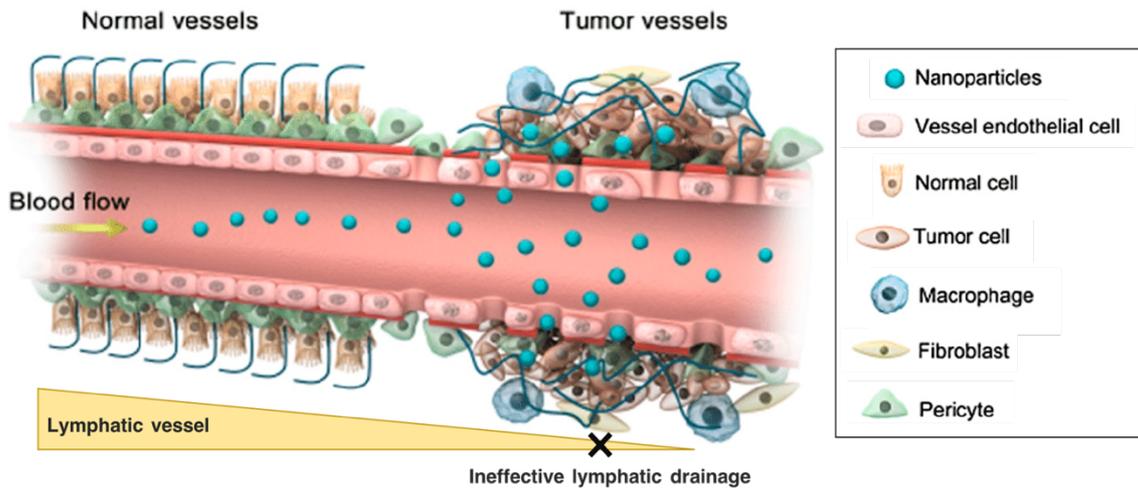


Figure 20. Représentation schématique de l'effet EPR basé sur les différences physiologiques des systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques au sein de tissus sains ou cancéreux ; figure adaptée de revue.⁷⁸

Le comportement des petites molécules est peu impacté par cet effet car elles peuvent traverser indifféremment les parois des vaisseaux sanguins cancéreux ou normaux et le drainage lymphatique, plus faible au niveau des tissus tumoraux, peut tout de même suffire à les évacuer. Cependant, à partir d'une certaine taille (>4 nm ou 30 kDa), les molécules/particules subissent fortement l'influence de cet effet EPR.⁷⁹ C'est le cas des nanoparticules, des liposomes, des agrégats de molécules organiques (agrégat de fluorophores, par exemple³⁶), de polymères de poids moléculaire important (dextrane, polylysine, ...) et de certaines protéines (anticorps, albumine, ...). Il y a près de 30 ans, Y. Matsumura et Maeda ont mis en évidence l'importance de cet effet pour le ciblage des tumeurs en thérapie.⁸⁰

Il existe de très nombreux agents pharmaceutiques capables de s'accumuler spécifiquement dans la tumeur grâce à ce ciblage dit « passif ».⁸¹ Les composés à base de nanoparticules en sont l'exemple le plus répandu. En effet, ces structures, dont la taille est généralement comprise entre 10 et 200 nm, sont parfaitement adaptées au ciblage par effet EPR. Comme nous l'avons brièvement indiqué

⁷⁶ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell*. **2011**, 144, 646–674

⁷⁷ Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182–1186

⁷⁸ Abdalla, A. M. E.; Xiao, L.; Ullah, M. W.; Yu, M.; Ouyang, C.; Yang, G. *Theranostics*. **2018**, 8, 533–548

⁷⁹ Kue, C. S.; Kamkaew, A.; Burgess, K.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Lee, H. B. *Med. Res. Rev.* **2016**, 36, 494–575

⁸⁰ Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1986**, 46, 6387–6392

⁸¹ Tanaka, T.; Shiramoto, S.; Miyashita, M.; Fujishima, Y.; Kaneo, Y. *Int. J. Pharm.* **2004**, 277, 39–61

précédemment, ces nanoparticules sont constituées de matériaux variés (carbone, or, cadmium, sélénium, silice, oxyde de titane, de zinc, de cérium, oxyde de fer superparamagnétique, ...) et peuvent adopter des formes diverses (sphériques, cylindriques, agrégats de nanoparticules plus petites, ...). Les nanoparticules elles-mêmes peuvent présenter des propriétés imageantes ou thérapeutiques, cependant elles sont également largement utilisées en tant qu'agent de vectorisation et leur mode de fonctionnalisation multivalent est alors un atout considérable. En effet, elles peuvent ainsi jouer le rôle de plateforme et permettre l'introduction d'un nombre très important de molécules imageantes ou cytotoxiques, la combinaison de différents types d'émetteurs ou encore l'élaboration d'agents théranostiques. Il est également possible de mettre à profit les ciblage passif et actif en greffant des vecteurs biologiques sur la surface de la nanoparticule.

Le développement d'agents pharmaceutiques à base de nanoparticules est cependant ralenti par l'absence d'études concluantes quant à leur biodégradabilité et leur tolérance par l'organisme.^{82, 83} En effet, les nanoparticules sont souvent constituées de matériaux associés à une forte toxicité. De plus, les doses nécessaires sont souvent assez élevées car une proportion importante de la quantité initialement injectée est prise en charge par le système réticuloendothélial. Les difficultés rencontrées pour contrôler et mesurer le degré de fonctionnalisation peuvent aussi être un frein au développement de ce type de composés.

II.2. Ciblage actif

Le ciblage actif est basé sur l'utilisation de vecteurs qui vont reconnaître des cibles biologiques présentes à la surface des cellules cancéreuses. Les agents pharmaceutiques élaborés à partir de ce type de vecteurs possèdent généralement une très forte spécificité pour les tissus cancéreux.

a. Les cibles

Le système vasculaire n'est pas le seul élément qui subit un désordre important au sein des tissus tumoraux. En effet, les processus biochimiques sont aussi perturbés et il existe des différences considérables entre une cellule saine et une cellule cancéreuse. En particulier, les différentes protéines impliquées dans le métabolisme et la signalisation cellulaire, et dans l'interaction avec le milieu extracellulaire, sont très souvent modifiées dans les cellules cancéreuses. Il en est de même pour les cellules qui constituent le microenvironnement tumoral. Ces protéines constituent donc des biomarqueurs très utilisés pour le ciblage des tumeurs. La revue de M. Boonstra est très complète sur le sujet et la plupart des informations qui suivent proviennent de cet article.⁸⁴

Parmi les très nombreuses protéines surexprimées par les cellules cancéreuses, seules certaines d'entre elles réunissent les différents critères requis pour permettre la mise en place d'une imagerie ciblée efficace. L'un des paramètres les plus importants est l'accessibilité. Ainsi, la plupart de ces cibles sont des protéines transmembranaires. Le nombre de protéines exprimées par cellule

⁸² Fard, J. K.; Jafari, S.; Eghbal, M. A. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, *5*, 447–454

⁸³ Bahadar, H.; Maqbool, F.; Niaz, K.; Abdollahi, M. *Iran. Biomed. J.* **2016**, *20*, 1–11

⁸⁴ Boonstra, M. C.; de Geus, S. W. L.; Prevoo, H. A. J. M.; Hawinkels, L. J. A. C.; van de Velde, C. J. H.; Kuppen, P. J. K.; Vahrmeijer, A. L.; Sier, C. F. M. *Biomark. Cancer.* **2016**, *8*, 119–133

cancéreuse doit également être largement supérieur par comparaison à une cellule normale et on considère que le ratio doit être d'au moins dix.⁸⁵ De préférence, le nombre de marqueurs exprimés à la surface d'une cellule cancéreuse doit être élevé, afin d'éviter des phénomènes de saturation. Il est également recommandé que les protéines soient réparties de façon homogène à la surface de la cellule mais aussi sur l'ensemble des cellules composant la tumeur. Selon l'objectif visé, le caractère global (*i.e.* la proportion de type de cancer surexprimant le biomarqueur) et la capacité de la protéine à internaliser le vecteur, sont des facteurs à prendre en compte.

Les différentes cibles peuvent être séparées en quatre classes : les récepteurs, les protéines d'adhésion cellulaire, les enzymes membranaires et les transporteurs (**figure 21**).

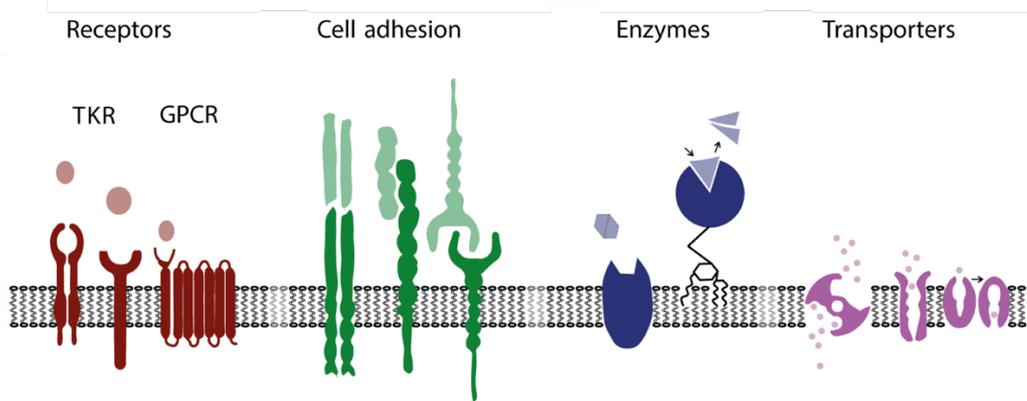


Figure 21. Les différentes classes de protéines membranaires utilisées en médecine pour le ciblage actif de pathologies ; figure extraite de revue.⁸⁴

- Les biomarqueurs de type récepteur incluent notamment les récepteurs à la tyrosine kinase (TKRs). Par exemple, le récepteur HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) est surexprimé dans 20 à 30 % des cancers du sein et dans 10 % à 20 % des cancers de l'estomac. Ce récepteur a l'avantage d'être associé à une forte agressivité de la maladie et à un important taux de mortalité. Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) constituent une autre famille de récepteurs impliqués dans la transduction du signal, comprenant notamment les récepteurs à la somatostatine, à la gastrine, à la bombésine et à la cholécystokinine qui sont utilisés en clinique pour l'imagerie et/ou le traitement des tumeurs neuroendocrines. Le récepteur à l'acide folique (FR) fait partie des protéines greffées à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ce récepteur est surexprimé par des types de cancer variés.

- L'antigène carcinoembryonnaire (CEA), les molécules d'adhésion cellulaire de l'épithélium (EpCAM), l'E-cadherin et les intégrines sont les principaux représentants de la famille des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) surexprimées par les cellules tumorales. Comme le FR, le CEA possède une ancre glycosylphosphatidylinositol. L'expression du CEA est généralement associée au cancer colorectal. Parmi les différentes intégrines existantes, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un marqueur assez universel qui est surexprimé dans une large variété de cancers.

⁸⁵ van Oosten, M.; Crane, L. M.; Bart, J.; van Leeuwen, F. W.; van Dam, G. M. *Transl. Oncol.* **2011**, *4*, 71–82

- Les enzymes membranaires utilisées pour l'imagerie ou la thérapie ciblée sont généralement des protéases. Sont répertoriés notamment, la glutamate carboxypeptidase 2 (ou PSMA), l'aminopeptidase N (ou CD13) et les métalloprotéinases de la matrice (MMPs). L'activité protéolytique de ces enzymes peut s'avérer un atout pour l'activation d'agents imageants ou de « *pro-drugs* ». ⁸⁶ D'autres enzymes n'appartenant pas à la catégorie des peptidases, comme l'anhydrase carbonique 9 (CAIX), sont également intéressantes.

- Enfin, les transporteurs membranaires possèdent une activité métabolique largement renforcée chez les cellules cancéreuses et peuvent être utilisés en tant que cible biologique. Ainsi, les transporteurs du glucose (GLUT) constituent la cible biologique du ¹⁸F- fluorodéoxyglucose ou 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (¹⁸F-FDG), agent imageant TEP extensivement utilisé en clinique.

Toutes ces cibles sont plus ou moins spécifiques. Certaines sont surexprimées dans diverses pathologies dont une majorité des différents types de cancers (transporteurs du glucose) tandis que d'autres ne peuvent être utilisées que pour un type de cancer (PSMA). La plupart des biomarqueurs sont intermédiaires et permettent le ciblage de plusieurs types de cancer (MMPs, intégrines, ...). Les biomarqueurs surexprimés dans un grand nombre de maladies ont jusqu'à présent été privilégiés en thérapie et en imagerie clinique, cependant les agents basés sur le ciblage de ces protéines sont généralement peu spécifiques. ⁸⁷

b. Les vecteurs utilisés pour le ciblage actif

Un vecteur efficace doit montrer une haute affinité pour sa cible ainsi qu'une spécificité élevée. Comme on l'a vu, le poids moléculaire des agents pharmaceutiques influence considérablement leur vitesse d'élimination. En effet, un agent possédant un poids moléculaire élevé présente généralement un long temps de résidence dans la circulation sanguine, ce qui améliore nettement ses capacités d'accumulation dans les différents organes et tissus. Cependant, lorsque la taille de l'agent est très importante, son aptitude à traverser les barrières biologiques est amoindrie. Ainsi, en plus des critères d'affinité et de sélectivité, il est important de trouver le bon équilibre en termes de poids moléculaire. Nous avons, ci-après, fait le choix de classer les vecteurs associés aux cibles précédemment présentées en fonction de leur poids moléculaire.

Les petites molécules

Les petites molécules vectrices sont généralement des ligands possédant une forte affinité pour le site de liaison (*binding pocket*) offert par la protéine ciblée. Elles présentent des pharmacocinétiques très rapides, une grande robustesse, et leur fonctionnalisation peut être effectuée assez facilement *via* les réactions chimiques classiquement utilisées en synthèse organique. Certaines d'entre elles sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique ce qui en fait des outils de choix pour la neuro-imagerie. L'introduction de sondes imageantes sur ces petites molécules a malheureusement tendance à fortement modifier leur comportement biologique. Les molécules de taille importante ou très hydrophobes comme les fluorophores ne sont donc pas un choix idéal pour ce type de vecteur.

⁸⁶ Shin, W. S.; Han, J.; Verwilt, P.; Kumar, R.; Kim, J.-H.; Kim, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1419–1426

⁸⁷ Hussain, T.; Nguyen, Q. T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 90–100

Néanmoins, des voies de synthèse ont été développées, qui permettent l'introduction d'atomes radioactifs non métalliques (^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O) sans modifier la structure chimique du ligand. La synthèse et l'identification de ces ligands peuvent cependant se révéler assez longues. Quelques exemples sont donnés dans la **figure 22**.

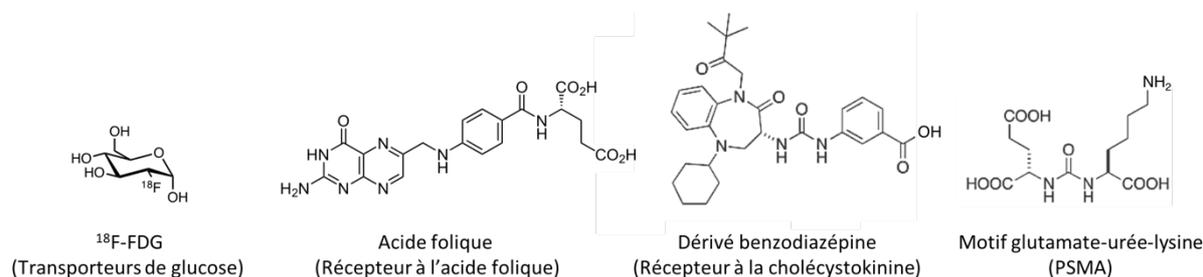


Figure 22. Structure du ^{18}F -FDG et de quelques petites molécules utilisées pour la vectorisation ; la cible biologique de chacun des ligands est donnée entre parenthèses.

Les peptides

Identifiés grâce au criblage de bibliothèques ou dérivés de ligands endogènes, les vecteurs de type peptidique présentent d'excellentes propriétés de ciblage qui résultent de leur forte affinité pour un site de liaison. Comme les petites molécules, ces peptides possèdent une bonne stabilité et une clairance rapide. Leur sélectivité est souvent meilleure et leur synthèse peut être effectuée de façon automatisée par synthèse peptidique en phase solide (SPPS). Les vecteurs peptidiques sont très sensibles aux enzymes de type protéase mais il est possible d'introduire des variations structurales qui ralentissent leur dégradation (utilisation d'acides aminés non protéinogènes ou de type D, cyclisations, modification des positions terminales, ...). Quelques exemples de vecteurs peptidiques parmi les plus réputés sont présentés dans la **figure 23**.

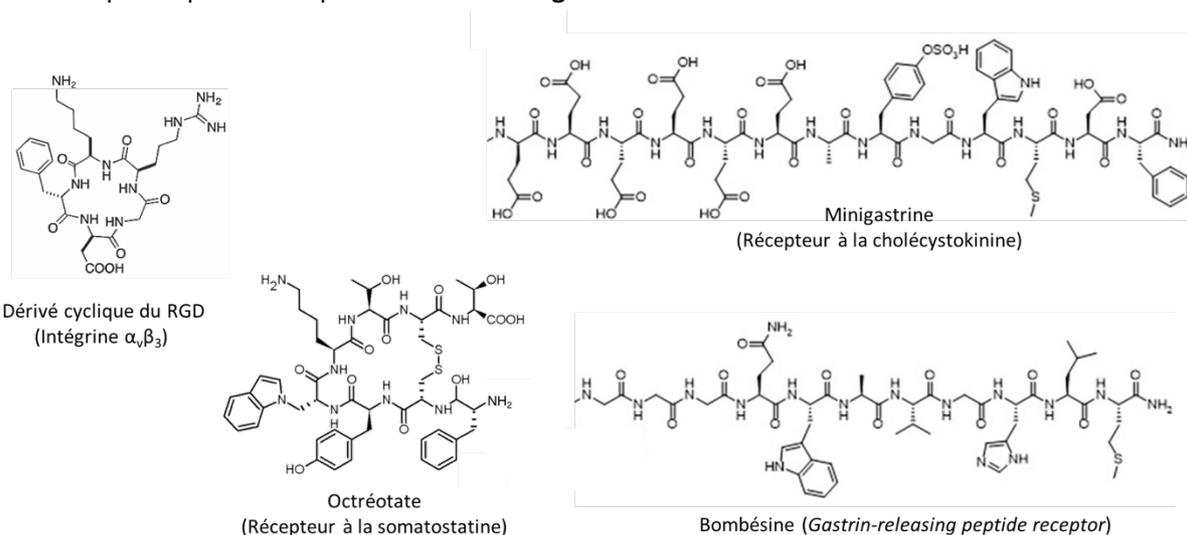


Figure 23. Structures de quelques peptides utilisés pour la vectorisation ; la cible biologique de chacun des peptides est donnée entre parenthèses.

Les anticorps

Les anticorps monoclonaux (mAbs), également appelés immunoglobulines G (IgGs), sont des glycoprotéines d'environ 150 kDa qui sont largement utilisées en médecine pour l'immunothérapie mais également en tant qu'agents de vectorisation en imagerie moléculaire. L'emploi de ces anticorps comme vecteur est assez ancien et le premier agent imageant à base d'anticorps, commercialisé sous le nom d'OncoScint®, a été approuvé en 1992.⁸⁸ Depuis, de nombreux autres agents de ce type sont utilisés chez l'homme pour le diagnostic de cancers, tels que le cancer de la prostate (ProstaScint®), le cancer colorectal (CEA Scan®), et certains lymphomes (Zevalin®, Bexxar®). Les anticorps sont caractérisés par une très forte affinité et une haute spécificité pour leur cible, également appelée « antigène ». Ils sont constitués de quatre chaînes protéiques (deux chaînes lourdes et deux chaînes légères) reliées entre elles par des ponts disulfure pour former une structure en Y (**figure 24**). Les deux extrémités, appelées paratopes, permettent la reconnaissance de l'antigène *via* un mode de liaison bivalent, et confèrent à l'anticorps une excellente affinité pour sa cible.

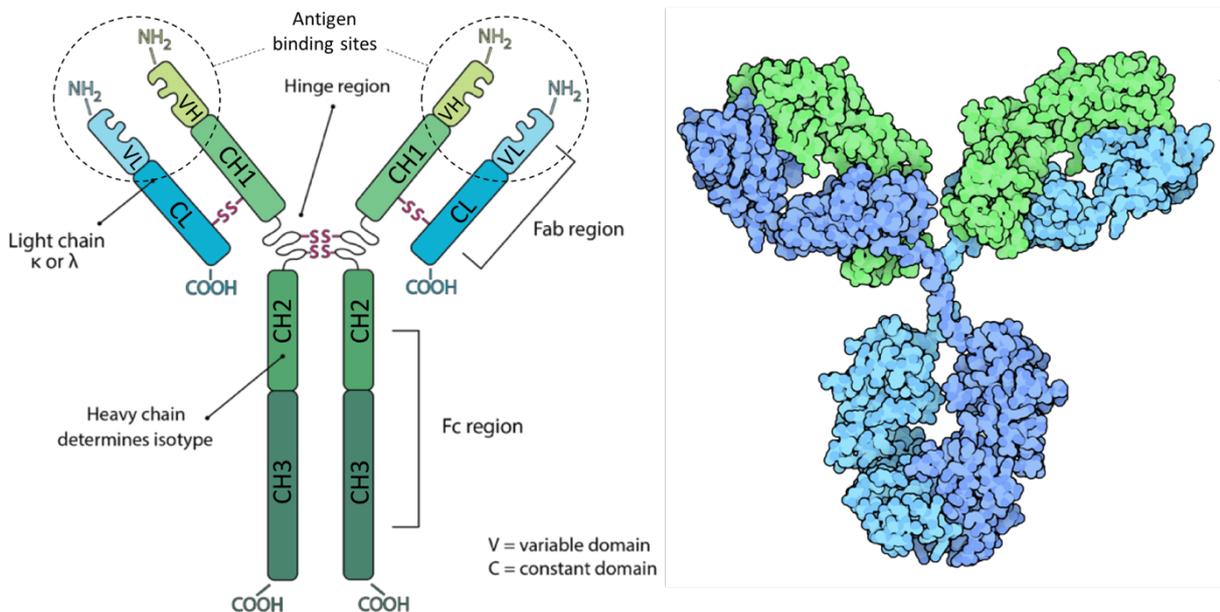


Figure 24. Représentations schématiques des différents domaines constituant les anticorps de type IgG1 ; figure extraite de page web.⁸⁹

Un autre avantage des agents imageants vectorisés par un anticorps réside dans le fait qu'ils peuvent être utilisés dans le cadre de la médecine personnalisée afin de réaliser des examens dit « compagnons ». En effet, les anticorps sont très utilisés en thérapie et l'injection préalable de la version imageante de l'anticorps peut être très utile pour confirmer la surexpression de l'antigène ciblé. En plus de leur potentiel en immunothérapie, les anticorps sont également très utilisés pour la vectorisation d'agents thérapeutiques. Les agents pharmaceutiques combinant un anticorps et une (ou plusieurs) molécule(s) cytotoxique(s) sont nommés ADCs (pour *Antibody-Drug Conjugates*).

⁸⁸ Bohdiewicz, P. J. *J. Nucl. Med. Technol.* **1998**, 26, 155–163

⁸⁹ RCSB: PDB-101. Molecule of the Month: Nanobodies. <http://pdb101.rcsb.org/motm/136/> (accessed Sep 01, 2018)

Depuis quelques années, ce domaine est en pleine expansion et il existe un grand nombre de revues récentes traitant de ce sujet.^{90, 91, 92, 93}

Les principales limitations de l'utilisation d'agents imageants ou cytotoxiques vectorisés par des anticorps sont : 1) L'injection des premières générations d'anticorps, souvent d'origine murine, pouvait induire une réponse immunitaire chez le patient. Cependant, ce caractère immunogène est désormais limité par l'emploi d'anticorps chimériques ou humanisés, voire totalement humains.⁹⁴ 2) La demi-vie des anticorps dans le sérum peut atteindre plusieurs semaines,⁹⁵ ce qui peut générer des problèmes de toxicité, en particulier lorsque l'anticorps transporte un élément radioactif pour l'imagerie nucléaire. 3) Leur taille importante (~10 nm) diminue leur chance de traverser les membranes biologiques, ce qui peut dans certains cas diminuer l'efficacité du ciblage. La taille des anticorps peut cependant se révéler être un atout car, par comparaison aux petites molécules et aux peptides, leurs propriétés sont moins perturbées par l'introduction d'agents imageants ou cytotoxiques.

Il est à noter que des anticorps (et fragments), issus d'espèces telles que le requin ou le chameau, diffèrent de la structure classique des immunoglobulines trouvées chez l'homme. Leur structure plus simple et plus petite (en l'absence de chaîne légère), leur confère des propriétés uniques qui en font des outils particulièrement intéressants pour la vectorisation de sondes imageantes ou de médicaments.^{96, 97, 98}

Les fragments d'anticorps

Afin de réduire les difficultés induites par la taille importante des anticorps (pharmacocinétique lente et faible pénétration des barrières biologiques), il est possible d'utiliser des fragments d'anticorps constitués de seulement certains domaines de l'anticorps. Le principe consiste à conserver les domaines variables, VH et VL, responsables des propriétés de reconnaissance de l'anticorps, mais d'éliminer la fraction constante (Fc) qui est connue pour activer des mécanismes immunitaires *via* son interaction avec le récepteur Fc. Initialement, la fragmentation des IgG a été réalisée par digestion enzymatique, cependant il est possible d'accéder à une plus grande variété de fragments par des procédés de biosynthèse développés en ingénierie génétique.⁹⁹

Ces fragments présentent une grande diversité de poids moléculaire, de pharmacocinétique mais également de valence (**figure 25**). Il a été montré que les fragments dont le poids ne dépasse pas 60 kDa sont éliminés par voie rénale tandis qu'au-delà, ils sont pris en charge par le système

⁹⁰ Gordon, M. R.; Canakci, M.; Li, L.; Zhuang, J.; Osborne, B.; Thayumanavan, S. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2198–2215

⁹¹ Lambert, J. M.; Morris, C. Q. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 1015–1035

⁹² Joubert, N.; Denevault-Sabourin, C.; Bryden, F.; Viaud-Massuard, M.-C. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 393–415

⁹³ Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315–337

⁹⁴ Penichet, M. L.; Morrison, S. L. *Drug Dev. Res.* **2004**, *61*, 121–136

⁹⁵ Vasquez, K. O.; Casavant, C.; Peterson, J. D. *PLoS One.* **2011**, *6*, e20594

⁹⁶ Leslie, M. *Science.* **2018**, *360*, 594–597

⁹⁷ Vincke, C.; Muyldermans, S. Introduction to Heavy Chain Antibodies and Derived Nanobodies. In *Single Domain Antibodies: Methods and Protocols*; Humana Press: Totowa, NJ, **2012**; Vol. 911, pp 15-26

⁹⁸ D'Huyvetter, M.; Xavier, C.; Cavelliers, V.; Lahoutte, T.; Muyldermans, S.; Devoogdt, N. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 1939–1954

⁹⁹ Holliger, P.; Hudson, P. J. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1126–1136

hépatique.¹⁰⁰ Le fragment scFv (*single chain variable fragment*),¹⁰¹ et les fragments plus gros comme les Fab, les Fab', les *diabodies* ou les *minibodies* présentent des comportements pharmacocinétiques particulièrement bien adaptés aux applications en imagerie.^{102, 103, 104}

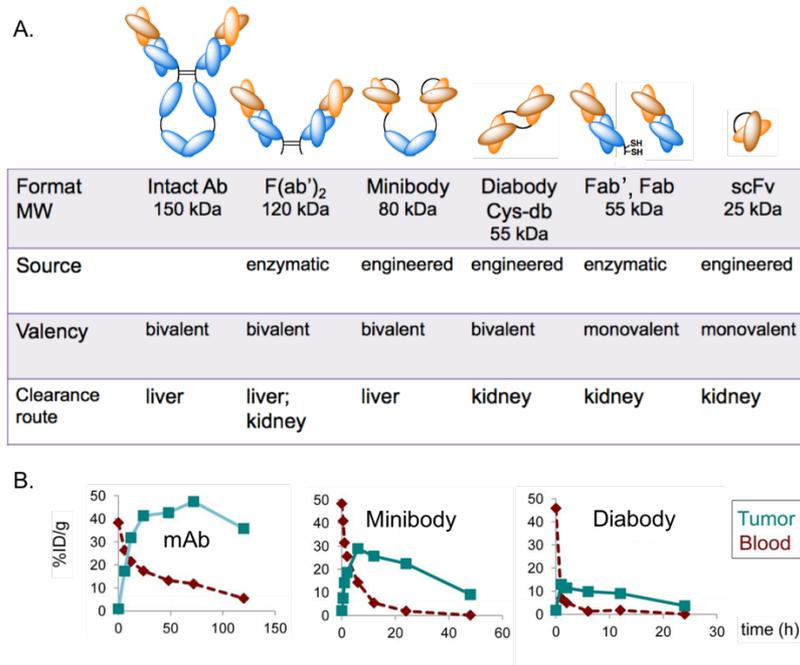


Figure 25. A. Structures et caractéristiques des anticorps monoclonaux entiers et des principaux fragments d'anticorps ; figure adaptée de revue ;¹⁰³ **B.** Intensité du signal radioactif (exprimée en %ID/g) d'un anticorps intact, d'un *minibody* et d'un *diabody* anti-CEA dans la tumeur et dans le sang chez une souris présentant une tumeur de cancer du côlon implantée en sous-cutané.¹⁰⁵

Autres protéines synthétiques

Il existe également des protéines produites spécifiquement pour la reconnaissance de diverses cibles, qui ne sont pas basées sur la structure des IgGs.^{106, 107} Ces protéines sont généralement obtenues par incorporation d'une ou plusieurs séquences variables (possédant une affinité élevée pour un biomarqueur donné) au sein d'une protéine parente qui joue le rôle de « *scaffold* ». Ces protéines synthétiques possèdent une taille comprise entre 6 et 20 kDa et sont classées selon la nature de la protéine parente utilisée. Ainsi, à titre d'exemple, les *affibodies* sont produits à partir du domaine Z de la protéine A et les *adnectines* sont issues de la fibronectine de type II (**figure 26**). Comme les fragments d'anticorps, ces protéines ont été développées pour palier certaines limitations inhérentes à l'utilisation des anticorps entiers comme vecteurs. Ainsi, leur taille plus

¹⁰⁰ Freise, A. C.; Wu, A. M. *Mol. Immunol.* **2015**, 67, 142–152

¹⁰¹ Olafsen, T.; Wu, A. M. *Semin. Nucl. Med.* **2010**, 40, 167–181

¹⁰² Cai, W.; Olafsen, T.; Zhang, X.; Cao, Q.; Gambhir, S. S.; Williams, L. E.; Wu, A. M.; Chen, X. *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 304–310

¹⁰³ Wu, A. M. *Methods.* **2014**, 65, 139–147

¹⁰⁴ Lütje, S.; van Rij, C. M.; Franssen, G. M.; Fracasso, G.; Helfrich, W.; Eek, A.; Oyen, W. J.; Colombatti, M.; Boerman, O. C. *Contrast Media Mol. Imaging.* **2015**, 10, 28–36

¹⁰⁵ Wu, A. M.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1137–1146

¹⁰⁶ Sha, F.; Salzman, G.; Gupta, A.; Koide, S. *Protein Sci.* **2017**, 26, 910–924

¹⁰⁷ Vazquez-Lombardi, R.; Phan, T. G.; Zimmermann, C.; Lowe, D.; Jermutus, L.; Christ, D. *Drug Discov. Today.* **2015**, 20, 1271–1283

restreinte facilite l'extravasation de la circulation sanguine vers la tumeur et accélère leur clairance, et des doses moins importantes sont nécessaires pour permettre une pénétration des tissus suffisantes. Néanmoins, la barrière hématoencéphalique reste tout de même un obstacle lors de l'utilisation de ce type d'agents de vectorisation. Par ailleurs, ces protéines sont généralement plus robustes que les anticorps (ou les fragments d'anticorps) et sont capables de retrouver spontanément leur structure tridimensionnelle, même après avoir subi une importante variation de pH ou de température.

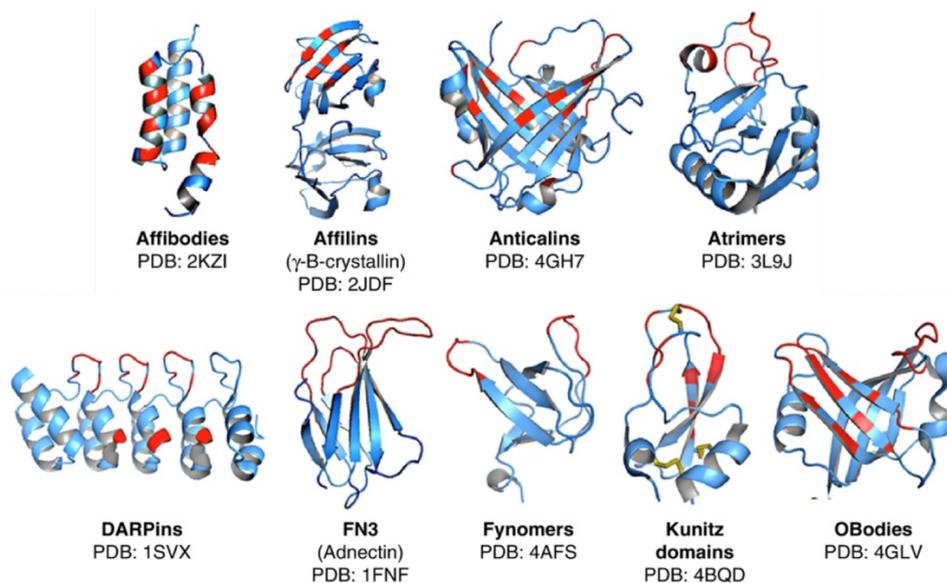


Figure 26. Principaux exemples de protéines vectrices synthétiques ; les séquences variables sont colorées en rouge, les ponts disulfure en jaune ; figure adaptée de revue.¹⁰⁷

La conception de ces protéines est réalisée par des procédés de sélection à partir de milliers de séquences aléatoires. Il s'agit d'un processus très performant qui permet l'identification de protéines présentant une excellente affinité pour leur cible. Leur synthèse peut être effectuée par des systèmes d'expression bactériens qui sont moins coûteux que les systèmes mammaliens utilisés généralement pour produire les anticorps. De plus, grâce à leur mode de synthèse, leurs propriétés sont beaucoup plus modulables et il est plus facile d'ajuster leur pharmacocinétique, leur affinité et leur résistance.

Il existe également d'autres types de vecteurs plus difficilement classables, comme par exemple les aptamères d'ADN ou d'ARN ou les *nanobodies*, les avimères, les *cystines knots*, ... Les aptamères nucléiques sont formés d'un unique brin d'environ 20 à 100 nucléotides qui se replie généralement sur lui-même. Ces aptamères peuvent se révéler assez efficaces (après modification afin d'augmenter leur stabilité plasmatique). Ainsi, en 2004, le pegaptanib a été approuvé par la FDA pour traiter les dégénérescences maculaires liées à l'âge.¹⁰⁸ Les *nanobodies* quant à eux, sont des petites protéines (aux alentours de 15 kDa) dérivées du domaine variable de la chaîne lourde d'immunoglobuline camélidée (VHH).¹⁰⁹

¹⁰⁸ Gijss, M.; Aerts, A.; Impens, N.; Baatout, S.; Luxen, A. *Nucl. Med. Biol.* **2016**, *43*, 253–271

¹⁰⁹ Schoonooghe, S.; Laoui, D.; Van Ginderachter, J. A.; Devoogdt, N.; Lahoutte, T.; De Baetselier, P.; Raes, G. *Immunobiology.* **2012**, *217*, 1266–1272

III. LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOCONJUGAISON

Le couplage de molécules imageantes ou cytotoxiques à un vecteur permettant le ciblage de la zone d'intérêt est une étape critique lors de l'élaboration d'agents pharmaceutiques vectorisés. Comme nous le détaillerons par la suite, il a été prouvé que la technique de conjugaison employée est déterminante quant aux propriétés finales du composé. Dans le cas des protéines, l'étape de couplage, aussi appelé « bioconjugaison », peut se révéler particulièrement complexe et délicate à contrôler. En effet, les protéines sont constituées d'un grand nombre de fonctions chimiques potentiellement réactives qui peuvent interférer lors du greffage de la sonde imageante ou de l'agent thérapeutique sur la protéine. De plus, les protéines sont très sensibles et une simple modification de leur structure tertiaire peut considérablement altérer leurs propriétés de reconnaissance. Il est ainsi recommandé de manipuler en milieux aqueux (ou très majoritairement aqueux), à une température ne dépassant pas les 37°C et à des pH compris entre 5 et 10. Ces contraintes limitent drastiquement les réactifs et les voies de synthèse envisageables.

Le développement et l'optimisation des stratégies de bioconjugaison constituent donc un champ de recherche à part entière et les avancées dans cette discipline peuvent être utiles dans de nombreux domaines.¹¹⁰ Actuellement, le développement des agents pharmaceutiques utilisés en imagerie moléculaire est très étroitement lié aux progrès réalisés en bioconjugaison. Ceci est encore plus manifeste dans le domaine de la thérapie ciblée et plus spécifiquement des ADC où la libération contrôlée du principe actif nécessite la mise en place de stratégies de bioconjugaison encore plus élaborées.¹¹¹ La modification de protéines par des groupements solubilisants est également très utilisée en imagerie comme en thérapie afin de moduler les propriétés pharmacocinétiques des composés.¹¹² Par exemple, l'introduction de chaînes polyéthylène glycol (PEG) est une stratégie très appréciée permettant d'augmenter l'hydrosolubilité et ainsi de diminuer les risques d'agrégation, d'améliorer la stabilité thermique et mécanique, ainsi que la résistance à la dégradation par protéolyse, tout en diminuant l'immunogénicité et la toxicité.^{113, 114}

En outre, les bioconjugués constituent des outils essentiels à la compréhension des processus biologiques et facilitent le développement de nouveaux composés bioactifs ainsi que les études immunohistochimiques.¹¹⁵ Par ailleurs, l'immobilisation de protéines à la surface de supports solides permet de nombreuses applications comme par exemple : 1) la purification ou la capture de biomolécules au moyen de résines modifiées^{116, 117} ; 2) la production de catalyseurs recyclables à base d'enzymes¹¹⁸ ; 3) la production de biocapteurs pour la détection et la quantification rapides de composés biologiques tels que des peptides, des anticorps, des antigènes ou des hormones (test ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*, test de grossesse, dépistages de pathologies, détection

¹¹⁰ Kalia, J.; Raines, R. T. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 138–147

¹¹¹ Joubert, N.; Denevault-Sabourin, C.; Bryden, F.; Viaud-Massuard, M.-C. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 393–415

¹¹² Pelegri-O'Day, E. M.; Lin, E.-W.; Maynard, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14323–14332

¹¹³ Chapman, A. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 531–545

¹¹⁴ Dozier, J. K.; Distefano, M. D. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25831–25864

¹¹⁵ Krall, N.; Da Cruz, F. P.; Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 103–113

¹¹⁶ Huang, J.; Wang, F.; Ye, M.; Zou, H. *J. Chromatogr. A.* **2014**, *1372*, 1–17

¹¹⁷ Tetala, K. K. R.; Vijayalakshmi, M. A. *Anal. Chim. Acta.* **2016**, *906*, 7–21

¹¹⁸ Zhao, X.; Qi, F.; Yuan, C.; Du, W.; Liu, D. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *44*, 182–197

d'allergènes, ...).^{119, 120, 121}

Nous allons à présent exposer les principales stratégies permettant l'introduction d'un (ou de plusieurs) groupement(s) d'intérêt sur une biomolécule vectrice. Le terme « groupement d'intérêt » est utilisé ici pour qualifier l'ensemble des molécules qui, une fois conjuguées au biovecteur, confèrent à l'agent pharmaceutique la propriété recherchée (imageante, thérapeutique, bioactive, solubilisante, ...). Par exemple, les fluorophores organiques, les complexes de gadolinium, les molécules cytotoxiques, les ligands comme la biotine, les radiosensibilisateurs, les chaînes PEG, ou encore les chélateurs de radiométaux métallés ou non métallés constituent des groupements d'intérêt.

III.1. Les méthodes usuelles de bioconjugaison

Parmi les 20 acides aminés constituant la grande majorité des protéines, certains présentent une chaîne latérale possédant une réactivité particulière et peuvent potentiellement être mis à profit pour le greffage covalent du groupement d'intérêt sur la biomolécule vectrice. Les fonctions acide carboxylique et amine des positions C- et N-terminales peuvent également permettre la bioconjugaison (**figure 27**).^{122, 123}

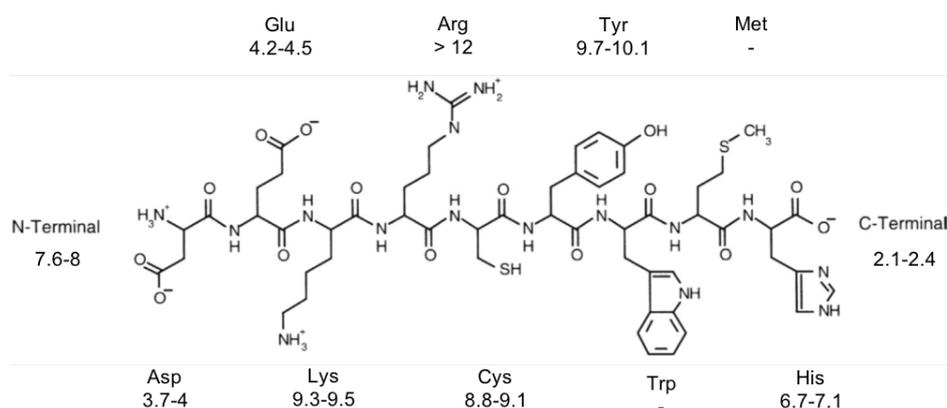


Figure 27. Peptide rassemblant les différentes fonctions réactives pouvant être mises à profit pour la modification de protéines. Les pKa de l'amine N-terminale, de l'acide carboxylique C-terminal et des groupements latéraux de chacun des neuf acides aminés sont également indiqués.¹²²

L'acide carboxylique C-terminal et les acides aspartiques et glutamiques (sous forme de carboxylates à pH physiologique) peuvent être fonctionnalisés par des nucléophiles (tels que des amines) au moyen d'agents d'activation (comme les carbodiimides ou le *N,N'*-carbonyl diimidazole). Cependant, ce sont généralement les acides aminés possédant des fonctions nucléophiles qui sont utilisés en bioconjugaison.

¹¹⁹ Cretich, M.; Damin, F.; Chiari, M. *Analyst*. **2013**, 139, 528–542

¹²⁰ Yoo, S. M.; Lee, S. Y. *Trends Biotechnol.* **2016**, 34, 7–25

¹²¹ Mehrotra, P. J. *Oral Biol. Craniofacial Res.* **2016**, 6, 153–159

¹²² Hermanson, G. T. Chapter 2 - Functional Targets for Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques*; Elsevier: Boston, **2013**; pp 127-128

¹²³ Hermanson, G. T. Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques*; Elsevier: Boston, **2013**; pp 229-258

Ainsi, la technique de bioconjugaison la plus commune consiste à modifier les amines primaires (amine *N*-terminale et lysines) présentes sur la protéine.¹²⁴ Du fait de leur caractère cationique à pH physiologique, elles sont généralement orientées vers l'extérieur de la protéine et sont donc plus accessibles que les acides aminés aliphatiques ou aromatiques. Les lysines constituent donc des sites de greffage pratiques pour la bioconjugaison et diverses fonctions réactives ont été développées afin de modifier sélectivement ces amines primaires.

Les esters de *N*-hydroxysuccinimide

Les esters de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) permettent la modification d'amines par formation de liaisons amide. Ils sont utilisés en bioconjugaison depuis des dizaines d'années et constituent l'une des fonctions de greffage les plus classiques.^{125, 126} Le couplage est généralement effectué à pH 7-8 (**figure 28**).

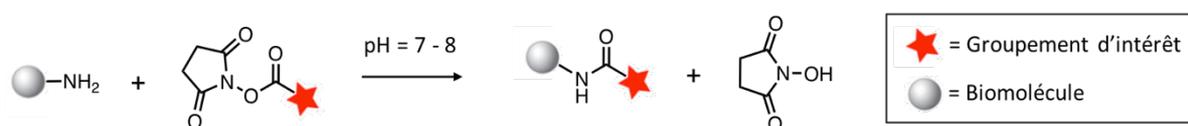


Figure 28. Fonctionnalisation d'une amine par formation d'une liaison amide après l'ajout d'un ester de *N*-hydroxysuccinimide.

La préparation de ces agents d'acylation peut être effectuée simplement par ajout du *N*-hydroxysuccinimide au précurseur carboxylate en présence d'un agent de couplage (comme le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou l'éthyl(diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)). L'ester de NHS est assez peu hydrosoluble et une version sulfonatée a été développée. Ces esters activés sont relativement stables à pH physiologique, cependant à pH 8,0 et à 25 °C leur demi-vie est d'environ 1 h seulement.¹²⁷

Les isothiocyanates

Les dérivés isothiocyanates (NCS) sont très classiquement utilisés pour la fonctionnalisation des amines par formation de liaison thiourée (**figure 29**). La réaction ne libère aucun sous-produit, cependant elle nécessite généralement des conditions plus basiques que pour les esters de NHS (aux environs de pH 9), ce qui peut s'avérer problématique pour certaines protéines. La fonction NCS est obtenue à partir d'amines aromatiques, par addition du thiophosgène. Quoique légèrement plus stables que les esters de NHS, les dérivés NCS sont également sensibles à l'hydrolyse et il est préférable de les conserver dans un dessiccateur ou à basse température.

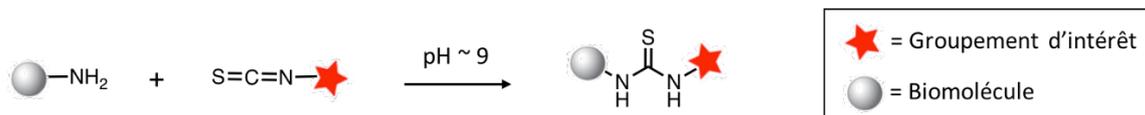


Figure 29. Fonctionnalisation d'une amine par formation d'une liaison thiourée après l'ajout d'un isothiocyanate.

¹²⁴ Koniev, O.; Wagner, A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 5495–5551

¹²⁵ Bragg, P. D.; Hou, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 72, 1042–1048

¹²⁶ Lomant, A. J.; Fairbanks, G. *J. Mol. Biol.* **1976**, 104, 243–261

¹²⁷ Staros, J. V. *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 435–441

Autres fonctions de greffage des amines

Les carbonates de succinimidyle ou de *p*-nitrophényle sont également employés pour fonctionnaliser les amines des protéines par formation de liaisons carbamates à pH 7-9 (**figure 30. A**). Par exemple, le disuccinimidyl carbonate constitue un dérivé carbonate bifonctionnel assez couramment utilisé pour l'activation de groupements d'intérêt portant une fonction alcool. Ils sont également assez sensibles à l'hydrolyse. Les chlorures de sulfonyles présentent une réactivité similaire aux chlorures d'acyle mais s'hydrolysent plus lentement et, à pH neutre, ils sont réputés pour être très stables (**figure 30. B**). Ils sont généralement un peu moins sélectifs des amines, comparés aux réactifs plus standards comme les esters de NHS et les NCS.

Les anhydrides cycliques peuvent également être utilisés. Lors de l'emploi de ce type de réactif, la bioconjugaison s'accompagne de la libération d'un acide carboxylique qui acidifie le milieu et il est important de contrôler le pH ou de se placer en milieu tamponné. Dans le cas des anhydrides cycliques, l'acide carboxylique reste lié de façon covalente au bioconjugué formé (**figure 30. C**). Les anhydrides sont plus sensibles à l'hydrolyse que les esters de NHS et il est parfois nécessaire d'ajouter un large excès pour parvenir à fonctionnaliser la biomolécule. Les esters de fluorophényles constituent une autre variante d'acides carboxyliques activés et plusieurs dérivés ont été développés pour effectuer la fonctionnalisation de protéines (**figure 30. D**).

D'autres fonctions ont également été développées, comme les isocyanates, les azotures d'acyle, les esters de tosylate, les aldéhydes, les époxydes, les imidoesters, les diesters d'acide squarique, ...¹²⁴

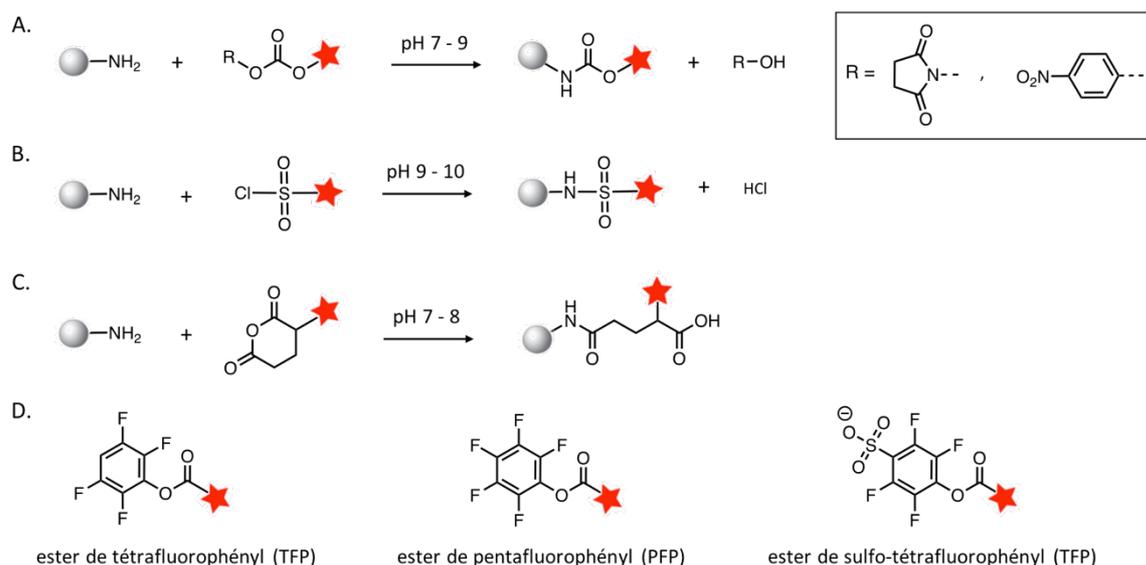


Figure 30. Fonctionnalisation d'une amine : au moyen d'une fonction carbonate (**A.**) ; d'une fonction chlorure de sulfonyle (**B.**) ; ou par ouverture d'un anhydride cyclique (**C.**) ; **D.** Quelques exemples d'acides carboxyliques activés sous forme d'esters de fluorophényles, capables de réagir avec les amines.

III.2. Vers une bioconjugaison site-spécifique

Les résidus lysines sont très nombreux au sein des séquences protéiques. Il est donc délicat de contrôler le nombre et la position des groupements d'intérêt greffés par fonctionnalisation des amines et le bioconjugué résultant est habituellement constitué d'un mélange complexe d'espèces

différentes. Par exemple, il a été montré que la modification d'un anticorps au moyen d'un groupement cytotoxique fonctionnalisé par un ester de NHS pouvait générer plus de 4,5 millions de composés différents (**figure 31**). L'étude a mis en évidence que parmi les 86 lysines de l'anticorps, au moins 40 d'entre elles pouvaient être modifiées.¹²⁸ Le greffage générait ainsi un mélange statistique d'anticorps modifiés par zéro à six molécules cytotoxiques avec un nombre de régioisomères d'autant plus important que le degré de greffage (également appelé DAR dans le cas des ADC pour *Drug to Antibody Ratio*, ou DOL dans le cas des agents imageants pour *degree of labeling*) était élevé.

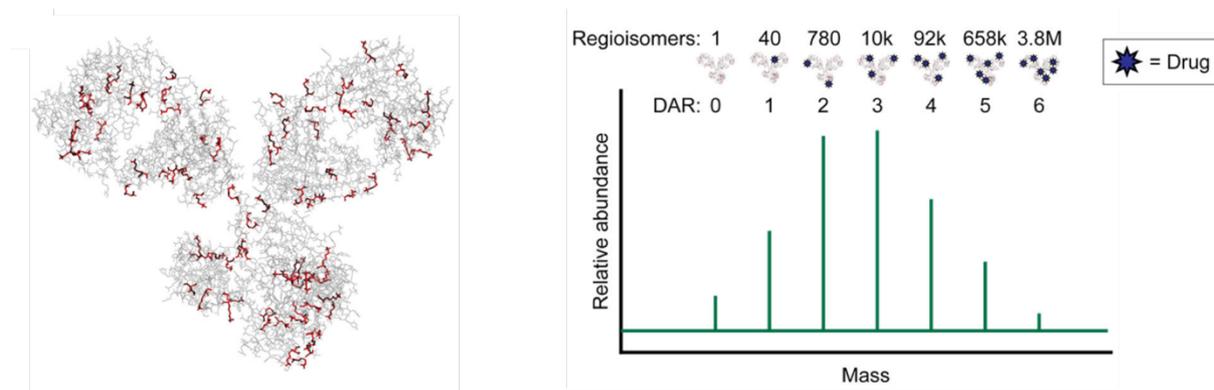


Figure 31. Gauche : Les résidus lysines d'un anticorps humain IgG1 (PDB ID : 1IGY) sont représentés en rouge, mettant en évidence la position des sites de conjugaison potentiels ; Droite : Distribution théorique des différents isomères générés par la modification des lysines, calculée sur une base de 40 lysines réactives ; figures adaptées de revue.¹²⁸

En contrôlant précisément le temps de réaction, le nombre d'équivalents mis en jeu, le pH et la température, il est possible de maîtriser le degré de greffage moyen, cependant la distribution statistique reste très large. De plus, la position des groupements d'intérêt (et donc le nombre de régioisomères) est incontrôlable puisqu'elle dépend du microenvironnement de chacune des lysines. Malgré ces limitations, de nombreux bioconjugués ont pu être obtenus par ce type de modification aléatoire et certains d'entre eux sont approuvés par la FDA, comme les ADCs Mylotarg® et Kadcyla®.^{129, 130} Cependant, cette stratégie de bioconjugaison tend à se raréfier car elle est peu reproductible et les propriétés biologiques des agents résultants sont hétérogènes et difficilement prédictibles.

Depuis quelques années les techniques de greffage régiospécifiques sont au cœur de nombreuses études et plusieurs revues traitent de ce sujet en détail.^{131, 132, 133, 134, 135, 136} L'approche site-spécifique

¹²⁸ Agarwal, P.; Bertozzi, C. R. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 176–192

¹²⁹ Phillips, G. D. L.; Li, G.; Dugger, D. L.; Crocker, L. M.; Parsons, K. L.; Mai, E.; Blättler, W. A.; Lambert, J. M.; Chari, R. V. J.; Lutz, R. J.; Wong, W. L. T.; Jacobson, F. S.; Koeppen, H.; Schwall, R. H.; Kenkare-Mitra, S. R.; Spencer, S. D.; Sliwkowski, M. X. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9280–9290

¹³⁰ Hamann, P. R.; Hinman, L. M.; Hollander, I.; Beyer, C. F.; Lindh, D.; Holcomb, R.; Hallett, W.; Tsou, H.-R.; Upeslakis, J.; Shochat, D.; Mountain, A.; Flowers, D. A.; Bernstein, I. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 47–58

¹³¹ Hu, Q.-Y.; Berti, F.; Adamo, R. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1691–1719

¹³² Adumeau, P.; Sharma, S. K.; Brent, C.; Zeglis, B. M. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18*, 1–17

¹³³ Adumeau, P.; Sharma, S. K.; Brent, C.; Zeglis, B. M. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18*, 153–165

¹³⁴ Chen, X.; Wu, Y.-W. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5417–5439

¹³⁵ Akkapeddi, P.; Azizi, S.-A.; Freedy, A. M.; Cal, P. M. S. D.; Gois, P. M. P.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2954–2963

¹³⁶ Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4740–4753

permet de contrôler deux paramètres primordiaux : le nombre de groupements d'intérêt introduits et leur localisation sur la protéine.

L'introduction d'un nombre trop important de molécules imageantes ou cytotoxiques peut rendre la biomolécule instable et générer des problèmes d'agrégation, en particulier lorsque le groupement introduit est un composé très hydrophobe.^{137, 138} La pharmacocinétique peut également être considérablement modifiée par rapport à celle du biovecteur natif.¹³⁹ Ainsi, le groupe d'O. Boerman a évalué le comportement pharmacocinétique d'un anticorps modifié par 0 à 3 fluorophores et un phénomène d'accumulation hépatique a été observé lorsque l'anticorps portait plus de 1,5 fluorophore (**figure 32. A**).¹⁴⁰ A noter que le taux de greffage ne doit pas être trop faible non plus car la qualité du signal pourrait alors être altérée. De façon plus générale, lorsque la molécule greffée à l'anticorps est très apolaire (comme c'est le cas de nombreux fluorophores et groupements cytotoxiques), un degré de greffage aux alentours de 1 ou 2 est recommandé. Lorsque la molécule est plutôt hydrophile (chélateur de métaux), il est possible d'introduire de 1 à 5 groupements sans trop altérer les propriétés de la protéine.¹⁴¹

En plus du nombre de molécules introduites, il est aussi important de contrôler la position des sites de bioconjugaison afin d'éviter notamment l'introduction d'un groupement au niveau de la zone responsable de la reconnaissance de l'antigène. Comme le montrent différentes études, dont celle de V. Tolmachev (**figure 32. B**), la biodistribution des bioconjugués peut varier considérablement par simple modification du site de bioconjugaison.^{142, 143}

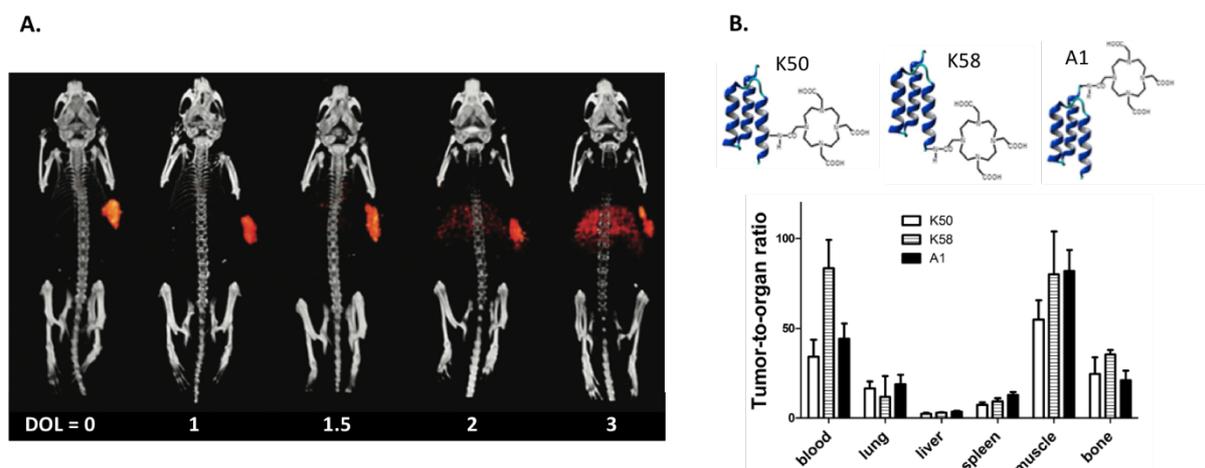


Figure 32. A. Images de la biodistribution *in vivo* de l'anticorps bimodal ¹¹¹In-DTPA-girentuximab-IRDye 800CW, obtenues par SPECT-CT 48 heures après l'injection ; le DOL (*degree of labeling*) correspond au nombre de sondes fluorescentes IRDye 800CW greffées ;¹⁴⁰ **B.** Comparaison de la biodistribution *ex vivo* dans les principaux organes de trois *affibodies* fonctionnalisés à différentes positions par un chélateur DOTA.¹⁴³

¹³⁷ Beckley, N. S.; Lazzareschi, K. P.; Chih, H.-W.; Sharma, V. K.; Flores, H. L. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1674–1683

¹³⁸ Guo, J.; Kumar, S.; Prashad, A.; Starkey, J.; Singh, S. K. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 1710–1723

¹³⁹ Cohen, R.; Vugts, D. J.; Stigter-van Walsum, M.; Visser, G. W. M.; van Dongen, G. A. M. S. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1010–1018

¹⁴⁰ Rijpkema, M.; Bos, D. L.; Cornelissen, A. S.; Franssen, G. M.; Goldenberg, D. M.; Oyen, W. J.; Boerman, O. C. *Mol. Imaging.* **2015**, *14*, 348–355

¹⁴¹ Ghosh, S. C.; Azhdarinia, A. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3390–3404

¹⁴² Perols, A.; Honarvar, H.; Strand, J.; Selvaraju, R.; Orlova, A.; Eriksson Karlström, A.; Tolmachev, V. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1661–1670

¹⁴³ Strop, P.; Liu, S.-H.; Dorywalska, M.; Delaria, K.; Dushin, R. G.; Tran, T.-T.; Ho, W.-H.; Farias, S.; Casas, M. G.; Abdiche, Y.; Zhou, D.; Chandrasekaran, R.; Samain, C.; Loo, C.; Rossi, A.; Rickert, M.; Krimm, S.; Wong, T.; Chin, S. M.; Yu, J.; Dilley, J.; Chaparro-Riggers, J.; Filzen, G. F.; O'Donnell, C. J.; Wang, F.; Myers, J. S.; Pons, J.; Shelton, D. L.; Rajpal, A. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 161–167

En imagerie diagnostique comme en thérapie ciblée, plusieurs études comparatives montrent que les agents élaborés par des techniques site-spécifiques apportent une nette plus-value *in vivo*, comparés à ceux produits par les méthodes de greffage aléatoire traditionnelles. Par exemple, en limitant le nombre de principes actifs greffés, un agent thérapeutique est souvent mieux toléré par l'organisme et il est ainsi possible d'augmenter l'index thérapeutique.^{144, 145} Par ailleurs, les phénomènes d'accumulation parasite, notamment dans le foie, peuvent être évités et, en diagnostique, il a ainsi été observé que le ratio tumeur/bruit de fond était ainsi nettement augmenté.^{146, 147}

La plupart du temps, les stratégies de bioconjugaison régiospécifiques sont basées sur la modification spécifique d'acides aminés rares ou d'ancres réactives préalablement incorporées à la position désirée de la séquence protéique. Les réactions impliquées doivent donc être orthogonales vis-à-vis des autres groupements constituant la protéine. Pour ce faire, des fonctions réactives hautement chimiosélectives sont employées.

III.3. Modification d'acides aminés rares

La fonctionnalisation d'acides aminés rares est une approche assez simple permettant de restreindre le nombre de molécules introduites sur une protéine, en modifiant les résidus les moins fréquemment représentés au sein de celle-ci (**figure 33**).

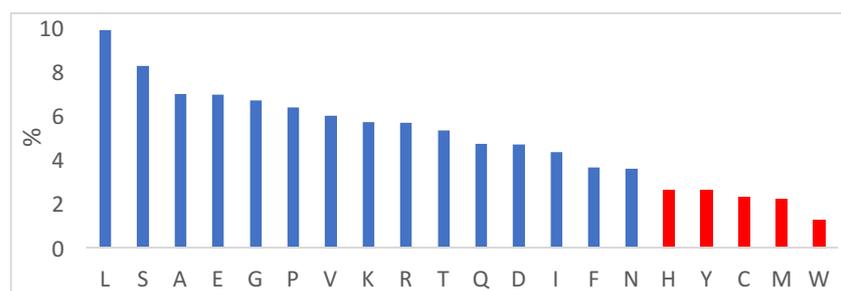


Figure 33. Pourcentage des 20 acides aminés dans le protéome humain (diagramme construit à partir des données de l'article de Tekaia et Yeramian).¹⁴⁸

Par exemple, d'après la publication de Tekaia et Yeramian, les cystéines constituent seulement 2,3 % du protéome humain¹⁴⁸ et la plupart des groupements thiols jouent un rôle structural au sein de la protéine et s'apparient pour former des ponts disulfure peu réactifs. Les cystéines accessibles sont donc très rares et il est donc possible de limiter le nombre de sites de modification en ciblant ces

¹⁴⁴ Hamblett, K. J.; Senter, P. D.; Chace, D. F.; Sun, M. M. C.; Lenox, J.; Cerveny, C. G.; Kissler, K. M.; Bernhardt, S. X.; Kopcha, A. K.; Zabinski, R. F.; Meyer, D. L.; Francisco, J. A. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7063–7070

¹⁴⁵ Junutula, J. R.; Raab, H.; Clark, S.; Bhakta, S.; Leipold, D. D.; Weir, S.; Chen, Y.; Simpson, M.; Tsai, S. P.; Dennis, M. S.; Lu, Y.; Meng, Y. G.; Ng, C.; Yang, J.; Lee, C. C.; Duenas, E.; Gorrell, J.; Katta, V.; Kim, A.; McDorman, K.; Flagella, K.; Venook, R.; Ross, S.; Spencer, S. D.; Wong, W. L.; Lowman, H. B.; Vandlen, R.; Sliwkowski, M. X.; Scheller, R. H.; Polakis, P.; Mallet, W. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925–932

¹⁴⁶ Kijanka, M.; Warnders, F.-J.; El Khattabi, M.; Lub-de Hooge, M.; van Dam, G. M.; Ntziachristos, V.; de Vries, L.; Oliveira, S.; van Bergen En Henegouwen, P. M. P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2013**, *40*, 1718–1729

¹⁴⁷ Tavaré, R.; Wu, W. H.; Zettlitz, K. A.; Salazar, F. B.; McCabe, K. E.; Marks, J. D.; Wu, A. M. *Protein Eng. Des. Sel.* **2014**, *27*, 317–324

¹⁴⁸ Tekaia, F.; Yeramian, E. *BMC Genomics.* **2006**, *7*, 307

résidus. Ainsi, la vaste majorité des stratégies de bioconjugaison régiospécifique par modification d'acides aminés rares sont basées sur la fonctionnalisation de résidus cystéines. Un aperçu des différentes fonctions de bioconjugaison permettant la dérivation sélective des cystéines sera donné dans le chapitre II.

D'autres acides aminés tels que les résidus tryptophane, tyrosine, méthionine et histidine constituent également des sites de bioconjugaison intéressants. Quelques exemples parmi les réactions les plus souvent employées sont présentés ci-après. Cependant, pour une liste plus exhaustive, il est préférable de se reporter à la revue très détaillée publiée par Koniev et Wagner en 2015.¹²⁴

a. *Bref aperçu des réactions de bioconjugaison les plus courantes*

Les tyrosines présentent deux sites réactifs (l'hydroxyle et le carbone en *ortho* de l'hydroxyle) et chacun des deux a été mis à profit pour des réactions de bioconjugaison. Cependant, en présence des cystéines et des lysines dont les fonctions latérales sont très nucléophiles, les *O*-fonctionnalisations de la tyrosine sont très peu sélectives. Les *C*-substitutions sont plus favorables et divers réactifs ont été utilisés pour modifier plus sélectivement la tyrosine tel que la combinaison d'un dérivé amine et du formaldéhyde (*via* une réaction de type Mannich),¹⁴⁹ des sels de diazonium¹⁵⁰ ou des triazolinediones.^{151, 152} A l'aide d'un agent oxydant, il est également possible d'introduire directement les radioisotopes ¹²³I ou ¹²⁴I pour l'imagerie nucléaire ou ¹³¹I pour la radiothérapie.¹⁵³

Des réactions catalysées par des métaux de transition tels que le rhodium ont permis, *via* la modification de résidus tryptophane, l'obtention d'un mélange de bioconjugués *N*- et *C*-substitués. Malheureusement, la réaction nécessite des pH très acides et n'est donc pas compatible avec la plupart des protéines.¹⁵⁴ La méthionine peut être dérivée par des agents d'alkylation et il est possible d'atteindre une certaine sélectivité en se plaçant à un pH suffisamment bas pour que les autres nucléophiles présents sur la protéine restent sous forme protonée et donc peu réactifs.¹⁵⁵

L'amine *N*-terminale (par définition unique pour une chaîne protéique) peut également être utilisée pour la modification régiosélective de protéines. Du fait de son pKa assez faible, cette amine peut être sélectivement modifiée en diminuant le pH pour éviter la compétition des amines ε des résidus lysines (**figure 34**).^{156, 157} Ainsi, à un pH aux alentours de 7, certains réactifs classiquement utilisés pour la modification des lysines, comme les isothiocyanates ou les esters de NHS, sont sélectifs de l'amine α en *N*-terminal.

¹⁴⁹ Romanini, D. W.; Francis, M. B. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 153–157

¹⁵⁰ Jones, M. W.; Mantovani, G.; Blindauer, C. A.; Ryan, S. M.; Wang, X.; Brayden, D. J.; Haddleton, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7406–7413

¹⁵¹ Ban, H.; Gavriilyuk, J.; Barbas, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1523–1525

¹⁵² Hu, Q.-Y.; Allan, M.; Adamo, R.; Quinn, D.; Zhai, H.; Wu, G.; Clark, K.; Zhou, J.; Ortiz, S.; Wang, B.; Danieli, E.; Crotti, S.; Tontini, M.; Brogioni, G.; Berti, F. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3827–3832

¹⁵³ Béhé, M.; Gotthardt, M.; Behr, T. M. Chapter 20 - Radioiodination of Proteins and Peptides. In *Cell Biology*; Elsevier: USA, **2006**; pp 149-154

¹⁵⁴ Antos, J. M.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256–10257

¹⁵⁵ Kramer, J. R.; Deming, T. J. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5144–5146

¹⁵⁶ Gaertner, H. F.; Offord, R. E. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 38–44

¹⁵⁷ Rosen, C. B.; Francis, M. B. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 697–705

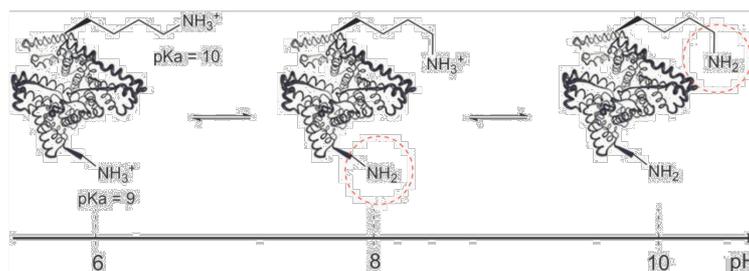


Figure 34. Equilibres entre les formes acides et basiques des différentes amines primaires présentes au sein des protéines (l'amine la plus nucléophile est encerclée en rouge) ; figure extraite de revue.¹²⁴

Des stratégies de transamination ont également été employées pour convertir l'amine terminale en cétone (ou en aldéhyde) qui pourra être fonctionnalisée ultérieurement au moyen d'une réaction bioorthogonale (voir Partie III. 7. b.)^{158, 159, 160} Lorsque l'acide aminé en position *N*-terminale est une sérine, il est possible de former une cétone (ou un aldéhyde) par simple oxydation au périodate de sodium.¹⁶¹ D'autres approches ont également été développées dans le cas particulier où l'acide aminé en position *N*-terminale est une cystéine. Les techniques de ligation chimique native (NCL) et l'utilisation du réactif 2-cyanobenzothiazole (CBT) en sont les exemples les plus courants.

b. Acides aminés natifs ou introduits par mutation génétique : le cas des cystéines

Il existe deux approches permettant d'effectuer une bioconjugaison au moyen de la modification d'acides aminés rares :

- Il est possible d'utiliser un acide aminé rare naturellement présent dans la séquence de la protéine à modifier, cependant cette approche implique : 1) que l'acide aminé soit présent sur la protéine d'intérêt ; 2) que son nombre d'occurrences ne soit pas trop élevé (ni trop faible selon l'application visée) ; 3) que sa position dans la séquence soit accessible et de préférence éloignée du site de reconnaissance de la protéine.

- L'introduction d'un acide aminé rare par mutation génétique constitue une seconde stratégie qui peut être très utile dans les cas où les conditions requises pour la mise en place de la première approche ne sont pas réunies. En effet, il existe des méthodes d'encodage génétique relativement simples permettant d'insérer l'acide aminé adéquat à la position désirée de la séquence protéique.

Dans le cas des cystéines, il existe quelques protéines natives possédant des cystéines non appariées (c'est le cas de l'albumine), cependant la stratégie la plus répandue implique la réduction préalable de ponts disulfure. Les IgG1 par exemple possèdent 4 ponts disulfure intercaténaux et leur réduction libère 8 cystéines potentiellement réactives. L'ADC Adcetris® est ainsi obtenu *via* la

¹⁵⁸ Gilmore, J. M.; Scheck, R. A.; Esser-Kahn, A. P.; Joshi, N. S.; Francis, M. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5307–5311

¹⁵⁹ Scheck, R. A.; Francis, M. B. *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 247–251

¹⁶⁰ Witus, L. S.; Netirojjanakul, C.; Palla, K. S.; Muehl, E. M.; Weng, C.-H.; Iavarone, A. T.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 17223–17229

¹⁶¹ Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 138–146

réduction de ses ponts disulfure suivie de l'addition de l'agent cytotoxique monométhyl auristatine E (MMAE) portant une fonction réactive vis-à-vis des thiols.¹⁶² Cette approche est régiosélective dans le sens où la position des molécules introduites est plus facilement contrôlable que lors de la modification des fonctions amines des lysines. Cependant, le bioconjugué résultant est également constitué d'un mélange de différentes espèces possédant des degrés de greffage variables, allant de 0 à 8, et dont les propriétés *in vivo* peuvent drastiquement varier (**figure 35. A**).

L'incorporation de cystéines par génie génétique est une approche plus généralisable qui permet de mieux contrôler le nombre d'espèces générées lors de l'étape de bioconjugaison (**figure 35. B**).^{163, 132} En outre, cette technique fragilise beaucoup moins les protéines car elle permet de conserver les ponts disulfure intacts. La modification des résidus cystéines étant une approche assez simple et très efficace, de nombreuses protéines présentant une cystéine libre ont été élaborées. De façon logique, l'introduction d'un résidu cystéine par voie génétique est particulièrement courante dans le cas des protéines recombinantes (*affibodies*, *affitins*, *nanobodies*, ...). Cependant, la stratégie a également été appliquée à des anticorps entiers. Ainsi, en 2000, le groupe de F. Kull a pu remplacer, par manipulation génétique, la sérine en position 442 (domaine CH3) par une cystéine.¹⁶⁴ Ces anticorps mutants, appelés « ThiomAbs », ont depuis, été largement utilisés pour la construction d'ADC^{144, 145} et d'agents imageants.¹⁶⁵

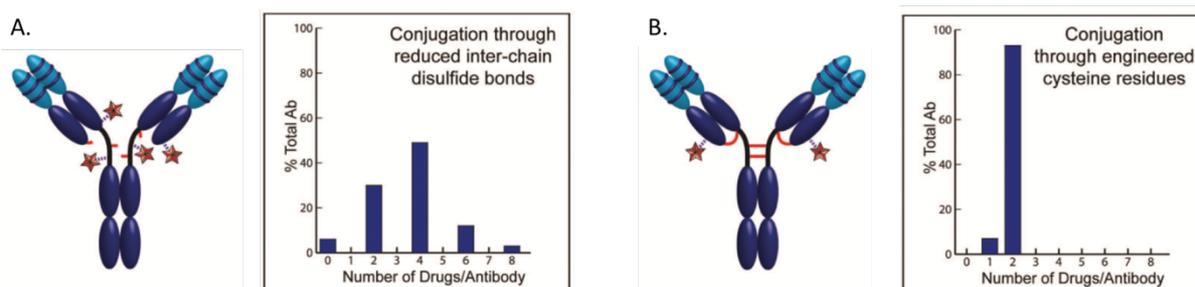


Figure 35. Exemples de conjugués à base d'anticorps élaborés par réduction des ponts disulfure puis fonctionnalisation des cystéines (**A.**) ou par modification de deux cystéines introduites régiosélectivement par modification génétique (**B.**) ; le graphique indique les différents degrés de greffage des espèces générées et leur proportion.¹⁶³

c. Modification d'acides aminés non standards

Les acides aminés sélénocystéine et pyrroline-carboxy-lysine (**figure 36**) sont des acides aminés non standards mais néanmoins intéressants pour des applications de bioconjugaison site-spécifique. En effet, ils possèdent des groupements latéraux uniques qui leur confèrent une réactivité particulière. La réactivité de la sélénocystéine s'apparente à celle de la cystéine et cet acide aminé est ainsi capable de réagir avec la plupart des réactifs classiquement utilisés pour la fonctionnalisation des

¹⁶² Francisco, J. A.; Cerveny, C. G.; Meyer, D. L.; Mixan, B. J.; Klussman, K.; Chace, D. F.; Rejniak, S. X.; Gordon, K. A.; DeBlanc, R.; Toki, B. E.; Law, C.-L.; Doronina, S. O.; Siegall, C. B.; Senter, P. D.; Wahl, A. F. *Blood*. **2003**, 102, 1458–1465

¹⁶³ Panowski, S.; Bhakta, S.; Raab, H.; Polakis, P.; Junutula, J. R. *mAbs*. **2014**, 6, 34–45

¹⁶⁴ Stimmel, J. B.; Merrill, B. M.; Kuyper, L. F.; Moxham, C. P.; Hutchins, J. T.; Fling, M. E.; Kull, F. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 30445–30450

¹⁶⁵ Tinianow, J. N.; Gill, H. S.; Ogasawara, A.; Flores, J. E.; Vanderbilt, A. N.; Luis, E.; Vandlen, R.; Darwish, M.; Junutula, J. R.; Williams, S.-P.; Marik, J. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, 37, 289–297

cystéines.^{166, 167} Néanmoins, le groupement séléniol est plus nucléophile que son équivalent thiol et son pKa est plus faible (~ 5,5). Ainsi, même lorsque des cystéines sont présentes sur la protéine, il est possible de modifier uniquement les sélénocystéines en abaissant le pH de la réaction.¹⁶⁸ La pyrroline-carboxy-lysine est une forme déméthylée de la pyrrolysine, qui est produite par les enzymes de biosynthèse de la pyrrolysine lorsque le milieu de culture des cellules, eucaryotes ou procaryotes, est supplémenté en *D*-ornithine. Elle peut réagir sélectivement avec les groupements 2-amino-benzaldéhyde ou 2-amino-acétophenone pour former un lien résistant à l'hydrolyse.¹⁶⁹

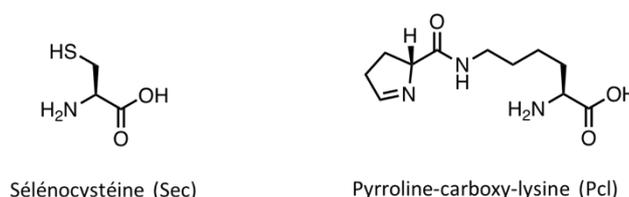


Figure 36. Structure des acides aminés non standards sélénocystéine et pyrroline-carboxy-lysine.

La sélénocystéine peut être présente à l'état natif dans quelques enzymes bien spécifiques et la pyrrolysine est présente uniquement dans certains systèmes procaryotes. Ainsi, contrairement aux 20 premiers acides aminés naturels, ces deux acides aminés doivent impérativement être introduits artificiellement dans la séquence de la protéine vectrice. Bien que ces deux acides aminés soient protéinogènes, leur incorporation au sein d'une protéine par mutagenèse dirigée est plus délicate que pour les acides aminés standards. La sélénocystéine est codée par le codon stop opale (UGA) tandis que dans les organismes de type procaryote la pyrrolysine est exprimée par traduction du codon stop ambre (UAG). Afin de produire des protéines recombinantes présentant l'un de ces résidus, l'ARN messager utilisé doit contenir une séquence d'insertion bien spécifique (SECIS ou PYLIS) qui va permettre la traduction des codons stops en leurs résidus respectifs (Sec et Pyl).^{170, 171, 172}

III.4. Modification des sites de glycosylation

Les anticorps possèdent deux sites de glycosylation au niveau des asparagines-297 de la chaîne lourde (domaine CH2). Après la traduction de la protéine, des chaînes oligosaccharidiques sont greffées aux sites de glycosylation par réactions enzymatiques (**figure 37**). La réactivité de ces chaînes glycosylées diffère de celle des acides aminés et les glycanes peuvent donc être manipulés assez aisément sans modifier le reste de la protéine. Les sites de glycosylation étant éloignés des

¹⁶⁶ Hofer, T.; Skeffington, L. R.; Chapman, C. M.; Rader, C. *Biochemistry*. **2009**, *48*, 12047–12057

¹⁶⁷ Li, X.; Nelson, C. G.; Nair, R. R.; Hazlehurst, L.; Moroni, T.; Martinez-Acedo, P.; Nanna, A. R.; Hymel, D.; Burke, T. R.; Rader, C. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 433–442

¹⁶⁸ Li, X.; Patterson, J. T.; Sarkar, M.; Pedzisa, L.; Kodadek, T.; Roush, W. R.; Rader, C. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2243–2248

¹⁶⁹ Ou, W.; Uno, T.; Chiu, H.-P.; Grünewald, J.; Cellitti, S. E.; Crossgrove, T.; Hao, X.; Fan, Q.; Quinn, L. L.; Patterson, P.; Okach, L.; Jones, D. H.; Lesley, S. A.; Brock, A.; Geierstanger, B. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 10437–10442

¹⁷⁰ Caban, K.; Copeland, P. R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 73–81

¹⁷¹ Cheng, Q.; Arnér, E. S. J. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 5476–5487

¹⁷² Mukai, T.; Englert, M.; Tripp, H. J.; Miller, C.; Ivanova, N. N.; Rubin, E. M.; Kyrpides, N. C.; Söll, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5337–5341

paratopes, leur modification ne risque pas de diminuer l'affinité de l'anticorps pour son antigène. La formation de ces chaînes d'oligosaccharides n'est cependant pas homogène et il faut prendre en compte le fait que certains sucres (acide sialique, galactose et fucose) ne sont pas nécessairement présents. Il est donc généralement nécessaire d'homogénéiser la séquence au moyen de réactions enzymatiques avant d'envisager la bioconjugaison.

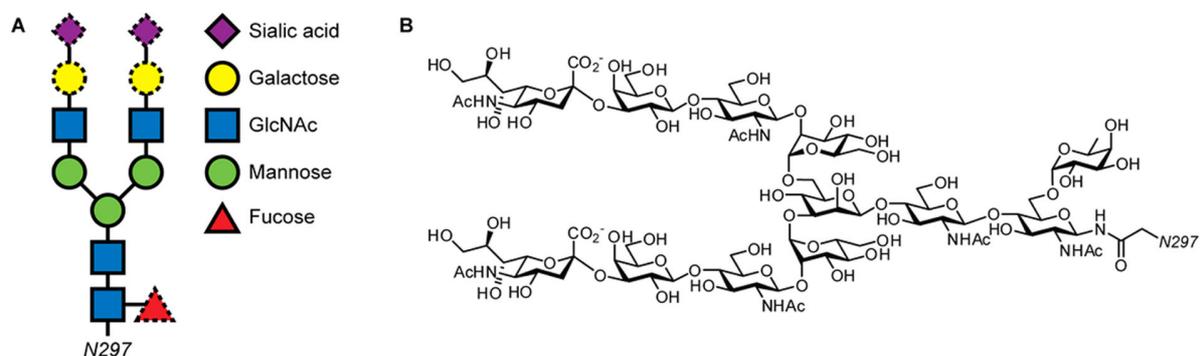


Figure 37. Composition des chaînes d'oligosaccharides attachées à l'asparagine 297 des chaînes lourdes des anticorps de type IgG ; figure extraite d'article.¹²⁸

Différentes techniques se sont avérées efficaces pour introduire un groupement d'intérêt sur ces sites de glycosylation. L'une des plus anciennes consiste à oxyder les sucres contenant des diols vicinaux (le fucose et l'acide sialique) pour générer des aldéhydes qui peuvent ensuite réagir avec des groupements oxyamines ou hydrazines (**figure 38. A et B**).¹⁷³ Cependant, cette chimie peut induire l'oxydation non désirée des résidus méthionine.

Une approche plus complexe, mais également plus efficace, consiste à utiliser des enzymes de type glycotransférases ayant subi une mutation génétique leur permettant de reconnaître des sucres non naturels. Il est possible grâce à ces enzymes mutantes d'introduire dans la séquence des galactoses ou des acides sialiques modifiés contenant des fonctions bioorthogonales telles que des cétones ou des azotures (**figure 38. C et D**).¹⁷⁴ Dans l'exemple de la **figure 38. D**, une étape de *trimming* est préalablement effectuée pour enlever la quasi-totalité de la chaîne glycosylée et ne laisser que le cœur N-acétylglucosamine. Cette étape permet de s'affranchir du fait qu'environ 5 à 17 % des anticorps sont seulement mannosylés et sont donc inertes vis-à-vis des réactions d'oxydation ou de transferts enzymatiques.¹⁷⁵

¹⁷³ Bejot, R.; Goggi, J.; Moonshi, S. S.; Padmanabhan, P.; Bhakoo, K. K. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2012**, *55*, 346–353

¹⁷⁴ Zeglis, B. M.; Davis, C. B.; Abdel-Atti, D.; Carlin, S. D.; Chen, A.; Aggeler, R.; Agnew, B. J.; Lewis, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 2123–2128

¹⁷⁵ Tang, F.; Wang, L.-X.; Huang, W. *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1702–1721

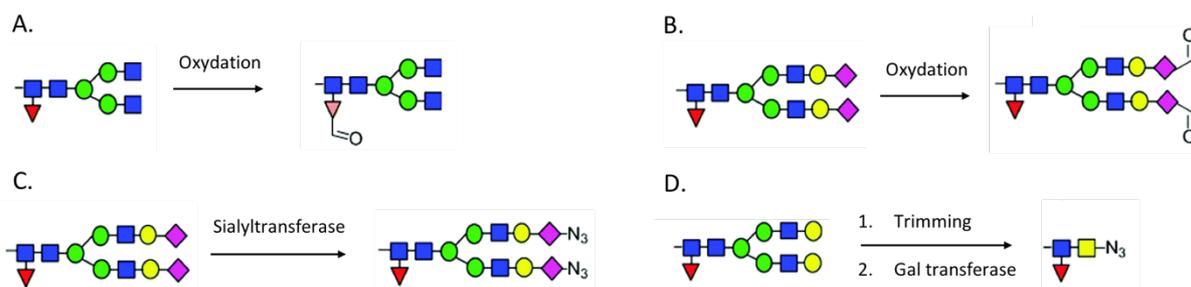


Figure 38. Quelques exemples de réactions oxydantes ou enzymatiques permettant l'introduction d'ancres bioorthogonales pour la bioconjugaison sur les chaînes glycosylées ; figure adaptée de revue.¹³¹

Une alternative à la modification des glycanes natifs par réaction enzymatique consiste à incorporer des sucres modifiés, présentant des fonctions bioorthogonales, directement lors de l'expression de l'anticorps (**figure 39**). Cette incorporation dite « métabolique » est réalisée par l'enrichissement du milieu dans lequel est produit l'anticorps avec le sucre modifié. Grâce à l'utilisation d'enzymes mutantes, il est ainsi possible de remplacer le substrat naturel (galactose, fucose, ...) par l'analogue correspondant (2-acétyl-2-désoxy-galactose, thiofucose, ...).¹⁷⁶

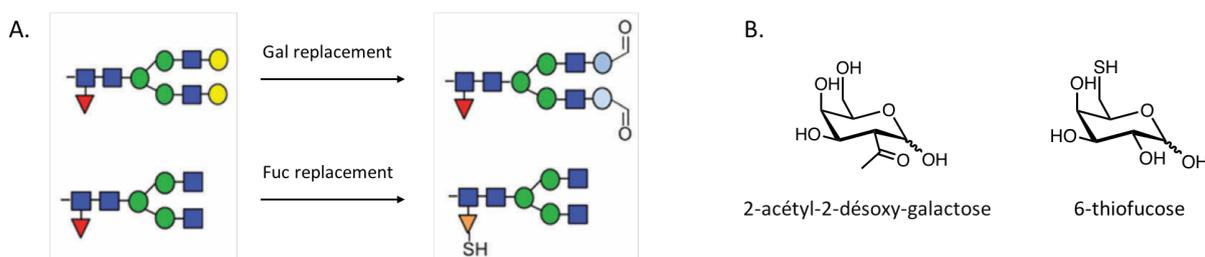


Figure 39. A. Exemples d'incorporation de sucres modifiés par voie métabolique ; figure adaptée de revue ;¹³¹ **B.** Structures des analogues non naturels du fucose et du galactose : le 2-acétyl-2-désoxy-galactose et le 6-thiofucose.

III.5. Modification enzymatique de *tags* peptidiques

En plus des glycotransférases utilisées pour la restructuration des glycanes, il existe de nombreuses autres enzymes naturelles dont la fonction initiale a été détournée pour des applications en bioconjugaison.^{177, 178, 179} Il est ainsi possible d'insérer régiosélectivement sur la protéine à modifier une séquence précise d'acides aminés (*tag* peptidique) qui sera reconnue par l'enzyme correspondante. Il existe tout un panel d'enzymes capables de catalyser la formation d'une liaison covalente entre le tag peptidique et le groupement d'intérêt. Ces modifications enzymatiques présentent généralement une très haute spécificité, cependant l'efficacité de la conversion est

¹⁷⁶ Okeley, N. M.; Alley, S. C.; Anderson, M. E.; Boursalian, T. E.; Burke, P. J.; Emmerton, K. M.; Jeffrey, S. C.; Klussman, K.; Law, C.-L.; Sussman, D.; Toki, B. E.; Westendorf, L.; Zeng, W.; Zhang, X.; Benjamin, D. R.; Senter, P. D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 5404–5409

¹⁷⁷ Sunbul, M.; Yin, J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3361–3371

¹⁷⁸ Rashidian, M.; Dozier, J. K.; Distefano, M. D. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277–1294

¹⁷⁹ Lin, S.; He, C. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, *29*, 1017–1021

dépendante de l'accessibilité et donc de la position du tag peptidique. Quelques exemples de bioconjugaison basés sur des réactions enzymatiques sont présentés ci-après (**figure 40**).

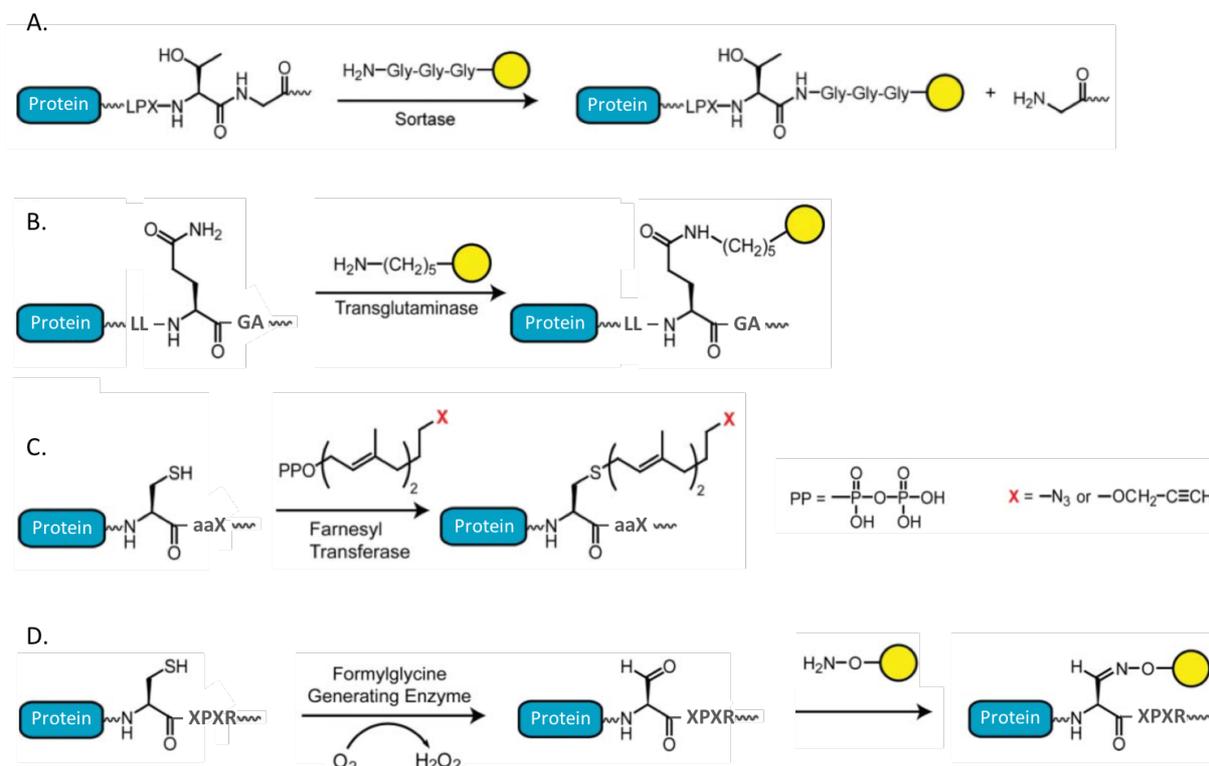


Figure 40. Réactions enzymatiques couramment utilisées pour introduire sélectivement un groupement d'intérêt (ou une fonction bioorthogonale dans le cas de l'enzyme farnésyle transférase) sur une protéine présentant un tag peptidique ; figure adaptée de revue.¹⁷⁷

La sortase est une enzyme possédant une activité transpeptidase. Elle reconnaît le motif LPXTG, catalyse l'hydrolyse de la liaison amide entre la thréonine et la glycine, puis forme une nouvelle liaison entre l'acide carboxylique de la thréonine et l'amine terminale d'un motif oligoglycine (**figure 40. A**). Paterson *et al.* ont ainsi greffé un chélateur de radioisotope sur un fragment scFv selon ce procédé.¹⁸⁰ L'une des limitations à l'utilisation de la sortase réside dans le fait que le produit formé contient le motif substrat (LPXTG) et que la réaction est donc réversible.

La transglutaminase est capable de former une liaison covalente entre la glutamine du tag peptidique LLQGA et une molécule portant une fonction amine primaire (**figure 40. B**). Le procédé a été appliqué avec succès au greffage de fluorophores ou d'auristatine sur des tags incorporés régiosélectivement sur les chaînes lourdes et légères de divers anticorps.¹⁴³ Il a été montré que lorsque le groupement portant l'amine primaire est trop gros, l'enzyme rencontre des difficultés à le prendre en charge et la conversion est moins efficace. Il est donc préférable d'utiliser la transglutaminase pour introduire une ancre bioorthogonale de petite taille et dans un second temps,

¹⁸⁰ Paterson, B. M.; Alt, K.; Jeffery, C. M.; Price, R. I.; Jagdale, S.; Rigby, S.; Williams, C. C.; Peter, K.; Hagemeyer, C. E.; Donnelly, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 6115–6119

le groupement d'intérêt est ajouté par voie non enzymatique.^{181, 182} D'autre part, la glutamine naturellement présente en position 295 de la séquence des anticorps peut également être reconnue et dérivée par la transglutaminase. Néanmoins, ceci implique la déglycosylation préalable de l'anticorps afin de diminuer l'encombrement stérique aux alentours de la position 295.¹⁸¹

La protéine farnésyle transférase (PFTase) catalyse l'attache covalente entre un isoprénoïde farnésyle pyrophosphate (FPP) et la cystéine du motif CaaX introduit proche de la position C-terminale (**figure 40. C**). Les « a » de la séquence CaaX représentent des acides aminés aliphatiques et le « X » peut correspondre aux résidus Ser, Ala, Glu ou Met. La PFTase peut être modifiée pour tolérer des analogues FPP portant diverses fonctions bioorthogonales telles que des azotures, des alcynes ou des aldéhydes.

L'enzyme génératrice de formylglycine (FGE) est un peu différente des précédentes car la réaction enzymatique a lieu directement lors de l'expression de la protéine. La FGE catalyse l'oxydation de la cystéine contenue par la séquence peptidique CXPXR. La protéine est donc produite avec une fonction formylglycine à la position choisie (**figure 40. D**). Une étape supplémentaire est alors nécessaire pour achever la bioconjugaison et introduire le groupement d'intérêt par ligation oxime (voir Introduction, Partie III. 7. b.).

De nombreuses autres enzymes ont également été utilisées pour faciliter l'étape de bioconjugaison, comme la trypsiligase, la lipote-protéine ligase ou la ligase de biotine. Il existe aussi des méthodes de marquage très élégantes mais plus complexes basées sur la fusion de la protéine à modifier avec une enzyme. Dans cette catégorie, les enzymes de type intéines sont les plus utilisées.

III.6. Incorporation d'acides aminés non naturels

L'incorporation d'acides aminés non naturels (uAAs, pour *unnatural amino acids*) par extension du code génétique est une technique extrêmement puissante en bioconjugaison mais également plus difficile à mettre en place.

En théorie, il est possible grâce à cette approche d'insérer, à n'importe quelle position de la séquence protéique, un uAA possédant une structure très éloignée de celle des acides aminés standards. L'approche est cependant très complexe et requiert des compétences particulières en génie génétique. En pratique, cette technique n'est donc pas utilisée pour introduire directement le groupement d'intérêt à la position désirée de la protéine vectrice. Par contre, elle a rendu possible l'incorporation de diverses ancrs bioorthogonales qui permettent ensuite l'introduction site-spécifique du groupement d'intérêt au moyen d'une réaction chimiosélective (**figure 41. A**). Plus d'une centaine d'uAAs ont pu être introduits sélectivement au sein de divers biovecteurs.^{183, 184} La *p*-acéto-L-phénylalanine (*p*-AcF) et la *p*-azido-L-phénylalanine (*p*-AzF) font partie des uAAs les plus couramment employés (**figure 41. B**)

¹⁸¹ Jeger, S.; Zimmermann, K.; Blanc, A.; Grünberg, J.; Honer, M.; Hunziker, P.; Struthers, H.; Schibli, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9995–9997

¹⁸² Dennler, P.; Chiotellis, A.; Fischer, E.; Brégeon, D.; Belmant, C.; Gauthier, L.; Lhospice, F.; Romagne, F.; Schibli, R. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 569–578

¹⁸³ Lang, K.; Chin, J. W. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764–4806

¹⁸⁴ Liu, C. C.; Schultz, P. G. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444

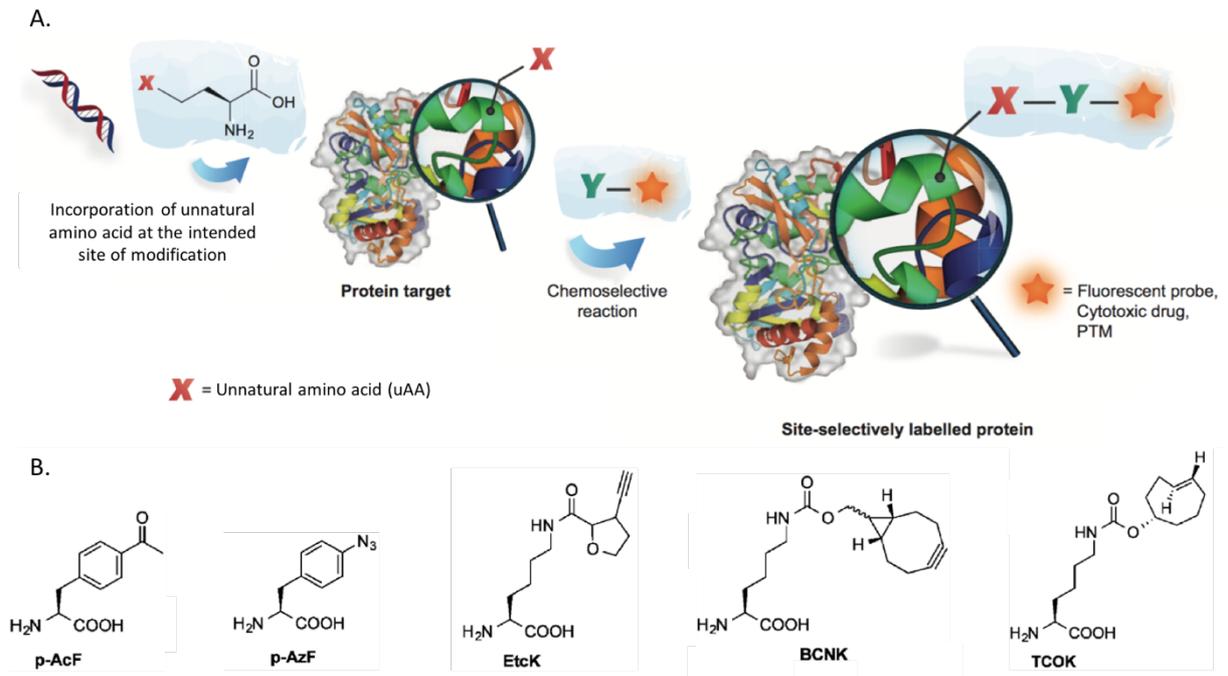


Figure 41. A. Schéma général de la stratégie de bioconjugaison, en deux étapes, basée sur la modification régiosélective d'uAAs introduits par extension du code génétique ; figure adaptée de revue ;¹¹⁵ B. Quelques exemples d'uAAs portant des fonctions bioorthogonales permettant la modification régiosélective de protéines.

L'insertion d'uAAs implique l'incorporation d'une machinerie biosynthétique dans le système d'expression de la protéine (*E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, cellules de mammifères, ...) pour que les cellules soient capables de produire une protéine modifiée. Comme le montre la **figure 42**, plusieurs étapes sont nécessaires. Dans un premier temps, l'acide aminé non naturel est ajouté au milieu de culture, pris en charge par la cellule et reconnu par une protéine mutée de type aminoacyl-tARN synthétase (aaRS). L'enzyme charge ensuite l'uAA sur l'ARN de transfert (tARN) qui est ensuite décodé par le ribosome en réponse au codon ambre (UAG). A noter que le codon ambre est introduit au préalable à la position désirée de l'ARN messager, ce qui permet l'insertion régiosélective de l'uAA dans la séquence protéique.

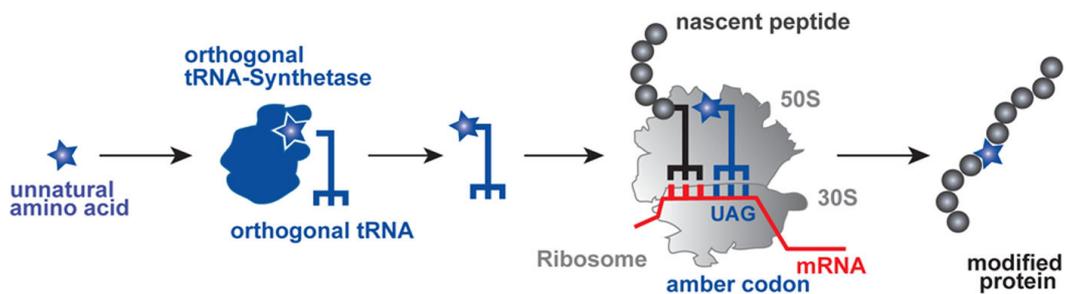


Figure 42. Différentes étapes impliquées dans l'incorporation régiosélective d'un uAA au sein d'une séquence protéique ; figure extraite de revue.¹¹⁵

Le pionnier dans ce domaine est Peter Schultz qui a décrit l'utilisation de paires aaRS/tARN à base d'enzymes mutantes de type glutaminyl-tARN synthétase (GlnRS).¹⁸⁵ Depuis, d'autres paires

¹⁸⁵ Liu, D. R.; Magliery, T. J.; Pastrnak, M.; Schultz, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, 94, 10092–10097

mutantes ont été développées, dont les paires à base de pyrrolysyl/tRNA synthétase (PylRS/tRNA) qui sont actuellement les plus utilisées.^{186, 187, 188}

D'autre part, il a été montré que l'incorporation d'uAAs pouvait également être réalisée dans des milieux exempts de cellules (tels que des lysats cellulaires clarifiés). Grâce à ce procédé, il est possible de cribler un grand nombre de conditions dans des plaques micropuits et ainsi d'optimiser l'incorporation de divers uAAs au sein de protéines modèles.¹⁸⁹ Cependant, les protéines recombinantes exprimées par ces systèmes ne sont pas glycosylées ce qui peut générer des problèmes d'immunogénicité et leur repliement est souvent inachevé ou incorrect.

Il existe une alternative intéressante qui permet de s'affranchir de ces procédés basés sur la réinterprétation du codon non-sens UAG. Cette approche s'apparente à l'introduction de sucres modifiés par voie métabolique dont nous avons précédemment parlé (voir Introduction, partie III. 4.). Elle consiste à introduire dans le milieu d'expression un uAA dont la structure est analogue à l'un des 20 acides aminés naturels. L'uAA sera reconnu comme substrat par l'enzyme aaRS correspondante, ce qui va conduire à l'insertion de l'uAA sur toutes les positions normalement destinées à l'acide aminé naturel. Il est évident que cette technique n'est pas adaptée pour tout type d'applications puisque le nombre et la position des uAAs introduits ne sont pas directement contrôlables et dépendent de la protéine en question et de l'acide aminé naturel remplacé. Cependant, elle peut s'avérer pratique dans certains cas car elle ne nécessite pas de manipulation génétique.^{183, 190}

III.7. Les réactions bioorthogonales : un outil puissant en bioconjugaison

a. Le concept de bioorthogonalité

Hormis l'approche basée sur le ciblage d'acides aminés rares et certaines réactions enzymatiques, la plupart des stratégies de bioconjugaison site-spécifique précédemment présentées impliquent une réaction dite « bioorthogonale ». C'est le cas notamment des bioconjugaisons basées sur la modification des glycanes ou sur l'introduction d'uAAs.

Le concept de chimie « *click* » a été introduit en 2001, par Kolb, Finn et Sharpless et définit une approche idéale de la chimie organique inspirée des réactions opérant dans les milieux biologiques.¹⁹¹ Une réaction doit ainsi réunir plusieurs critères pour être considérée comme réaction de chimie *click*. Les réactifs et solvants utilisés doivent être facilement accessibles et non toxiques. La réaction doit être efficace, reproductible, adaptable à de petites comme de grandes échelles et ne doit pas nécessiter un environnement anhydre ou exempt d'oxygène. Le produit de la réaction doit

¹⁸⁶ Borrmann, A.; Milles, S.; Plass, T.; Dommerholt, J.; Verkade, J. M. M.; Wiessler, M.; Schultz, C.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L.; Lemke, E. A. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2094–2099

¹⁸⁷ Lang, K.; Davis, L.; Wallace, S.; Mahesh, M.; Cox, D. J.; Blackman, M. L.; Fox, J. M.; Chin, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317–10320

¹⁸⁸ Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600–10604

¹⁸⁹ Zimmerman, E. S.; Heibeck, T. H.; Gill, A.; Li, X.; Murray, C. J.; Madlansacay, M. R.; Tran, C.; Uter, N. T.; Yin, G.; Rivers, P. J.; Yam, A. Y.; Wang, W. D.; Steiner, A. R.; Bajad, S. U.; Penta, K.; Yang, W.; Hallam, T. J.; Thanos, C. D.; Sato, A. K. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 351–361

¹⁹⁰ Johnson, J. A.; Lu, Y. Y.; Van Deventer, J. A.; Tirrell, D. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 774–780

¹⁹¹ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021

être stéréoisomériquement pur, non toxique et obtenu avec un haut rendement. La purification, si elle est nécessaire, doit être simple et ne pas faire intervenir de méthodes chromatographiques.

La bioorthogonalité est un concept différent et une réaction est dite « bioorthogonale » lorsqu'elle peut être effectuée en milieu biologique sans interférence avec son environnement. Une réaction bioorthogonale doit donc être réalisable en conditions aqueuses et la grande diversité des fonctions biologiques ainsi que les variations de pH ou de potentiel redox ne doivent pas gêner son processus. De plus, les réactifs engagés, les produits et les sous-produits formés ne doivent pas réagir avec le milieu biologique, et il est impératif qu'ils ne soient pas toxiques.

A présent, les deux définitions sont étroitement liées et qualifient des réactions qui sont à la fois très efficaces, sélectives, compatibles avec les milieux biologiques et suffisamment rapides pour pouvoir être réalisées à basse concentration et en conditions douces. Ces réactions sont très utiles en bioconjugaison où les critères précédemment listés sont généralement requis. Notamment, elles se révèlent très intéressantes en radiochimie où leur cinétique rapide permet de compenser la décroissance des radioéléments présentant des demi-vies courtes.^{192, 193, 194, 195} Par ailleurs, la possibilité d'effectuer l'étape de bioconjugaison *in cellulo* ou même *in vivo* a donné naissance aux applications de *pretargeting* (voir Chapitre I, Partie I. 2.).¹⁹⁶

b. Aperçu des différentes réactions bioorthogonales

Les différentes réactions bioorthogonales développées pour des applications en bioconjugaison peuvent être classées en fonction de leur cinétique, un paramètre généralement proportionnel à l'efficacité de la réaction en bioconjugaison (**figure 43**).

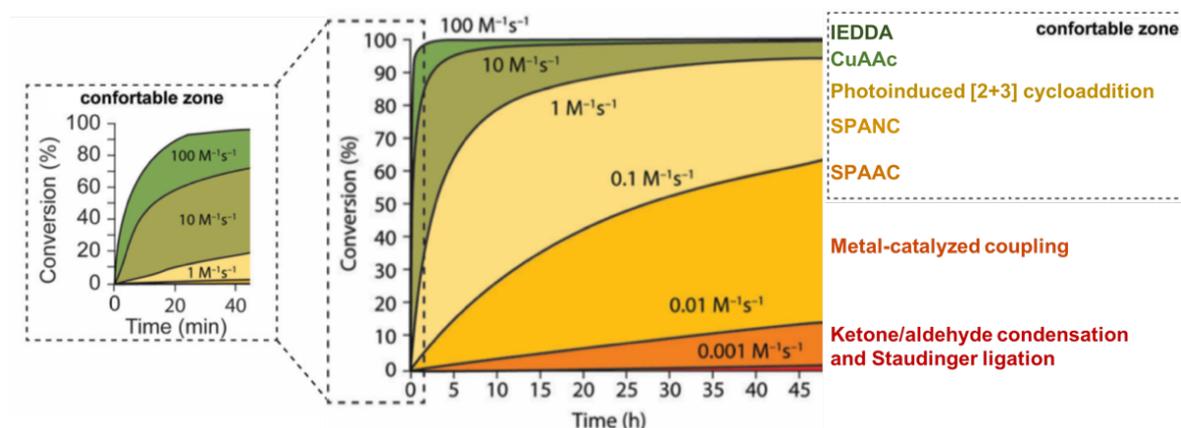


Figure 43. Cinétiques de conversion des réactions bioorthogonales les plus courantes. Les valeurs correspondent aux constantes de vitesse de 2nd ordre, calculées par simulation ; figure extraite de revue.¹⁹⁷

¹⁹² Meyer, J. P.; Adumeau, P.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 2791–2807

¹⁹³ Zeng, D.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S.; Anderson, C. J. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 829–832

¹⁹⁴ Pretze, M.; Pietzsch, D.; Mamat, C. *Molecules.* **2013**, *18*, 8618–8665

¹⁹⁵ Kim, D. W. *J. Fluor. Chem.* **2015**, *174*, 142–147

¹⁹⁶ Rossin, R.; Robillard, M. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 161–169

¹⁹⁷ Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950

Ligations avec les cétones ou les aldéhydes

Les condensations basées sur le motif carbonyle sont les premières à avoir été développées en tant qu'outil bioorthogonal pour la bioconjugaison. Cette ligation permet la modification d'une protéine portant un groupement carbonyle (cétone ou aldéhyde) *via* l'introduction d'un groupement d'intérêt fonctionnalisé par un nucléophile possédant un fort effet α , tel qu'une oxyamine ou une hydrazine (**figure 44. A**).

La réaction est assez lente et un catalyseur et/ou des conditions de réaction acides peu compatibles avec les protéines (pH 4-6) sont généralement requis.¹⁹⁸ Le lien oxime ou hydrazone formé est assez instable, néanmoins cette difficulté a pu être surmontée grâce au développement de la ligation Pictet-Spengler qui forme un lien oxacarboline résistant à l'hydrolyse (**figure 44. B**).¹⁹⁹ Malgré ces limitations, cette réaction reste assez utilisée car il existe de nombreux moyens d'introduire une fonction cétone ou aldéhyde sur une protéine (clivage oxydant de 1,2-diols (fucose, acide sialique ; voir Introduction, Partie III. 4.) ou de 1,2-aminoalcools (sérine ; voir Introduction, Partie III. 3. b.), génération de formylglycine par l'enzyme FGE (voir Introduction, Partie III.5.), etc.).

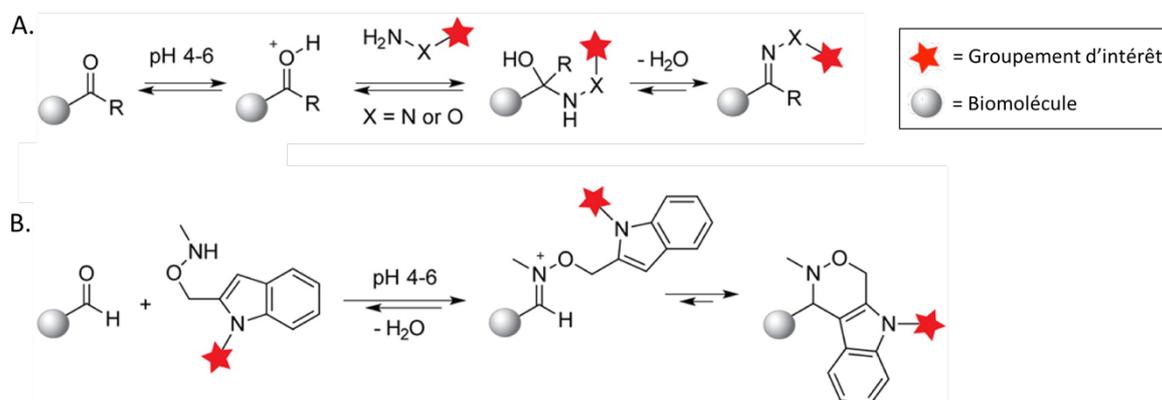


Figure 44. A. Modification de biomolécules par réaction entre un carbonyle et une oxyamine ou une hydrazine pour former un lien oxime ou hydrazone, respectivement ; **B.** Variante Pictet-Spengler permettant l'obtention de conjugués plus stables ; figure adaptée de revue.¹⁸³

Ligation de Staudinger

Cette réaction bioorthogonale dérivée de la réduction de Staudinger est également assez ancienne.^{200, 201} Le réactif triphénylphosphine classiquement utilisé pour la réduction de Staudinger a été modifié pour présenter un ester en *ortho* d'un des phényles. Ce groupement électrophile est attaqué par l'azote de l'intermédiaire aza-ylure. Ceci provoque un réarrangement intramoléculaire subséquent à l'hydrolyse de la liaison azote-phosphore et permet la formation d'un lien amide stable entre le groupement d'intérêt et la protéine (**figure 45. A**). Il existe également des versions « *traceless* » permettant de libérer l'oxyde de phosphine (**figure 45. B**).^{202, 203} Bien qu'elle soit

¹⁹⁸ Kölmel, D. K.; Kool, E. T. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10358–10376

¹⁹⁹ Agarwal, P.; van der Weijden, J.; Sletten, E. M.; Rabuka, D.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 46–51

²⁰⁰ Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science.* **2000**, *287*, 2007–2010

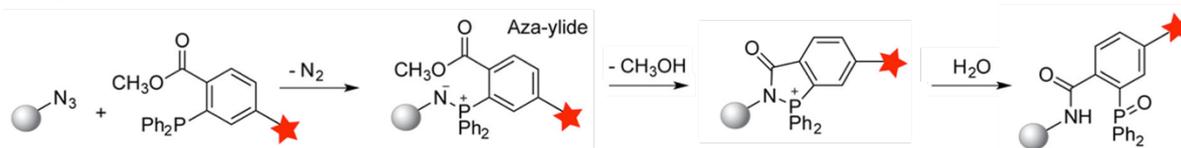
²⁰¹ Liu, S.; Edgar, K. J. *Biomacromolecules.* **2015**, *16*, 2556–2571

²⁰² Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143

²⁰³ Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941

malheureusement très lente, la ligation de Staudinger à tout de même l'avantage de mettre en jeu une fonction azoture qui est totalement inerte en milieu biologique et qui peut être ajoutée relativement aisément du fait de sa petite taille. Les phosphines sont par contre sensibles à l'oxydation et peuvent notamment réduire les ponts disulfure biologiques.

A. Ligation de Staudinger :



B. Ligation de Staudinger « traceless » :

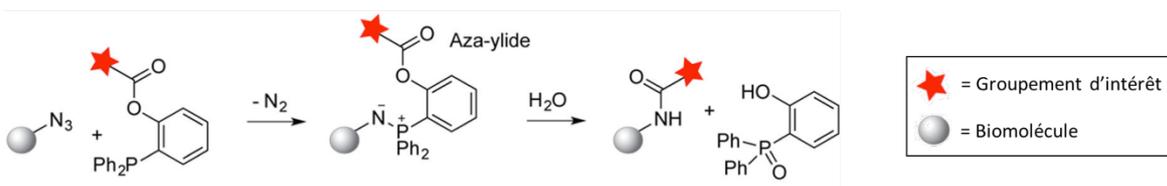


Figure 45. Modification de biomolécules par ligation de Staudinger ; **A.** Version classique ; **B.** Version « traceless » ; figure adaptée de revue.¹⁸³

Ligations métallo-catalysées

Plusieurs réactions métallo-catalysées ont été appliquées au domaine de la bioconjugaison.²⁰⁴ C'est le cas de la métathèse croisée d'oléfines qui a permis la modification de diverses protéines grâce à l'emploi d'un complexe de ruthénium, le catalyseur de Hoveyda–Grubbs de seconde génération (**figure 46. A.**)^{205, 206} Des couplages pallado-catalysés ont également été utilisés.¹³⁶ Ainsi, le couplage de Suzuki-Miyaura (**figure 46. B.**) a permis l'introduction d'un fluorophore boronique sur un acide aminé non naturel de type *p*-iodophénylalanine génétiquement encodé sur une protéine située à la surface de bactéries *E. coli*.²⁰⁷

²⁰⁴ Malins, L. R. *Aust. J. Chem.* **2016**, 69, 1360–1364

²⁰⁵ Lin, Y. A.; Boutureira, O.; Lercher, L.; Bhushan, B.; Paton, R. S.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 12156–12159

²⁰⁶ Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. *ChemBioChem*. **2009**, 10, 959–969

²⁰⁷ Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2747–2749

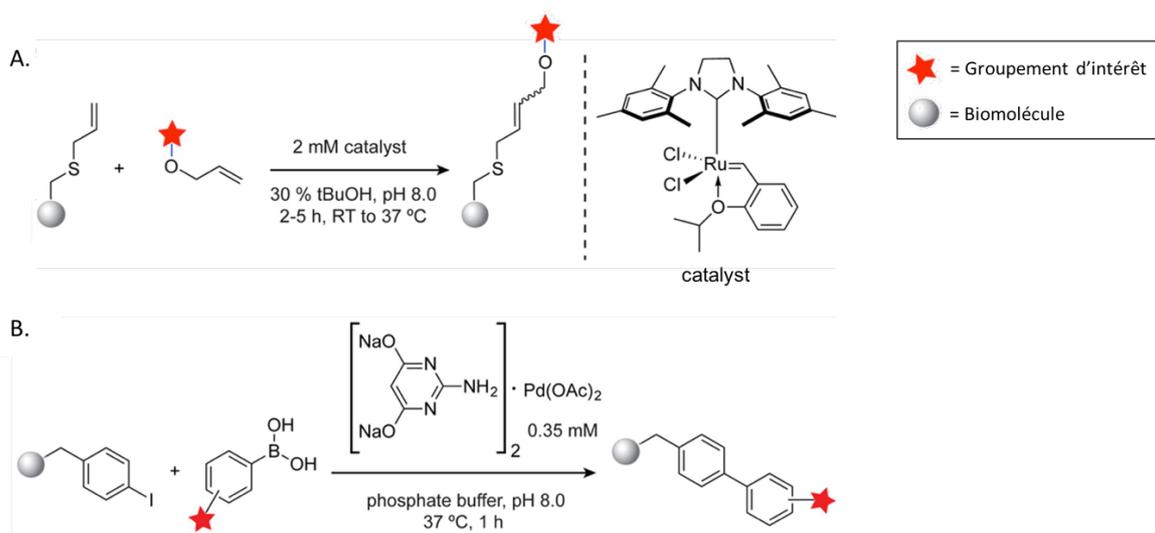


Figure 46. Modification de biomolécules par ligation métallo-catalysée ; **A.** Métathèse croisée de protéines présentant un groupement S-allylcystéine avec des esters allyliques ; **B.** Couplage carbone-carbone par réaction de Suzuki–Miyaura entre un résidu *p*-iodophénylalanine et un acide boronique ; figure adaptée de revue.¹⁸³

Cycloaddition [3+2] d'azoture et d'alcyne

La cycloaddition [3+2] entre le dipôle 1,3 de type azoture et un alcyne a été rapportée pour la première fois par A. Michael en 1893. Cette réaction est appelée cycloaddition de Huisgen depuis l'étude plus approfondie réalisée par R. Huisgen, il y a plus de 50 ans.²⁰⁸ Ce n'est qu'assez récemment qu'elle a été appliquée à la bioconjugaison,²⁰⁹ mais elle est très vite devenue la réaction *click* la plus utilisée dans ce domaine.^{210, 211, 212} Il en existe deux versions (**figure 47**) : l'une fait intervenir un catalyseur au cuivre(I) (CuAAC pour *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) ce qui permet d'atteindre des cinétiques très intéressantes,^{213, 214, 215} tandis que l'autre est basée sur l'emploi d'alcynes cycliques contraints dont la réactivité renforcée va permettre la cycloaddition sans nécessiter de catalyseur.²¹⁶ La cinétique de ce type de cycloadditions dites SPAAC (pour *strained-promoted azide-alkyne cycloaddition*) est généralement inférieure à la CuAAC, cependant l'absence d'élément métallique est très appréciée car elle permet d'éviter des problèmes de toxicité. De plus, dans les cas où le groupement bioconjugué est un chélateur (imagerie nucléaire, IRM) ou lorsque la protéine est capable de lier des métaux, l'utilisation de catalyseurs métalliques lors de la bioconjugaison est à éviter.

²⁰⁸ Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565–598

²⁰⁹ Kiviniemi, A.; Virta, P.; Lönnberg, H. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1726–1734

²¹⁰ Milan, V. *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*; Springer, **2016**

²¹¹ Das, R.; Majumdar, N.; Lahiri, A. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* **2014**, 4, 467–472

²¹² Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J. *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29, 686–701

²¹³ Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1302–1315

²¹⁴ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064

²¹⁵ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599

²¹⁶ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047

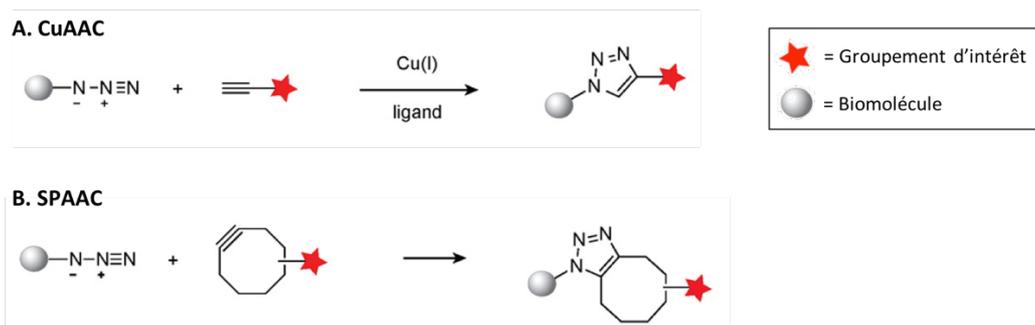


Figure 47. Modification de biomolécules par cycloaddition [3+2] entre un azoture et un alcyne ; figure adaptée de revue ;¹⁸³
A. Cycloaddition catalysée au cuivre (I) ; **B.** Version faisant intervenir un alcyne cyclique contraint de type cyclooctyne dont la réactivité est renforcée par rapport à l'alcyne terminal (d'autre type d'alcynes contraints peuvent également être utilisés).

SPANC (*strained promoted alkyne-nitrone cycloaddition*)

La SPANC s'apparente à la SPAAC mais l'azoture est remplacé par un dipôle 1,3 de type nitroène (**figure 48**). Les nitroènes sont plus réactives et la cinétique de la cycloaddition est donc améliorée,²¹⁷ cependant elles sont également moins stables et il est souvent nécessaire de les préparer *in situ* juste avant l'ajout de l'alcyne contraint.²¹⁸

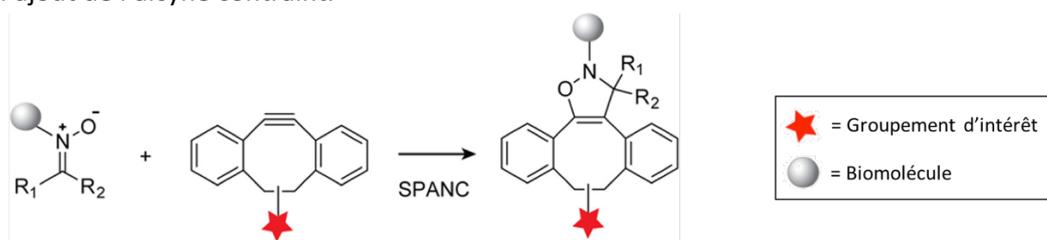


Figure 48. Modification de biomolécules par cycloaddition [3+2] entre une nitroène et un alcyne cyclique contraint DIBO (d'autre type d'alcynes contraints peuvent également être utilisés) ; figure adaptée de revue.¹⁸³

IEDDA (*inverse electron demand Diels-Alder*)

L'IEDDA est une cycloaddition [4+2] qui fait classiquement intervenir un hétérocycle de type 1,2,4,5-tétrazine et un alcène (ou un alcyne).^{197, 219} Cette cycloaddition peut être effectuée grâce à l'utilisation d'alcènes (ou d'alcynes) incorporés dans un cycle tendu (**figure 49**) et les cinétiques obtenues sont souvent considérablement supérieures à celle des autres réactions de *click*. Cette réaction particulièrement efficace en bioconjugaison sera présentée en détail dans le chapitre I.

²¹⁷ Ning, X.; Temming, R. P.; Dommerholt, J.; Guo, J.; Ania, D. B.; Debets, M. F.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3065–3068

²¹⁸ P. Temming, R.; Eggermont, L.; Eldijk, M. B. van; Hest, J. C. M. van; Delft, F. L. van. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 2772–2779

²¹⁹ Boger, D. L. *Chem. Rev.* **1986**, 86, 781–793

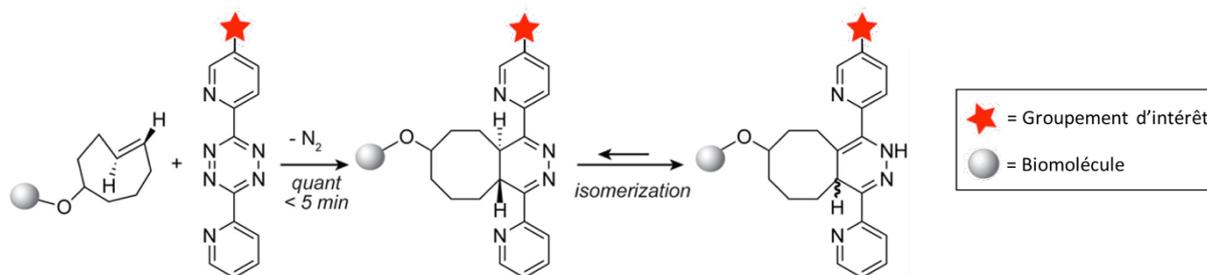


Figure 49. Modification de biomolécules par une cycloaddition [4+2] faisant intervenir un *trans*-cyclooctène et une 3,6-dipyridyltétrazine (différents types d'alcènes et d'alcynes contraints ainsi que de 1,2,4,5-tétrazines peuvent également être utilisés) ; figure adaptée de revue.¹⁸³

Les différentes réactions de *click* présentées ci-dessus ne sont que des échantillons sélectionnés parmi les très nombreuses approches bioorthogonales développées en bioconjugaison.^{220, 221, 222, 223}

Ainsi, il existe une variante de la cycloaddition [3+2] qui a l'avantage d'être à la fois photoinduite et fluorogénique.²²⁴ Le groupe de F. Taran a montré que la cycloaddition [3+2] entre une fonction sydnone et un groupement alcyne, qui nécessitait initialement des températures très élevées, pouvaient être réalisées à l'aide d'un catalyseur au cuivre. Cette cycloaddition sydnone-alcyne catalysée présente une sélectivité et une cinétique intéressante.²²³ Des cycloadditions de type [2+2+2]²²⁵ et [4+1]²²⁶ ont aussi été étudiées.

²²⁰ Debets, M. F.; Hest, J. C. M. van; Rutjes, F. P. J. T. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6439–6455

²²¹ Tang, W.; Becker, M. L. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 7013–7039

²²² Qin, L.-H.; Hu, W.; Long, Y.-Q. *Tetrahedron Lett.* **2018**, 59, 2214–2228

²²³ Decuypère, E.; Plougastel, L.; Audisio, D.; Taran, F. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 11515–11527

²²⁴ Wang, Y.; Lin, Q. *Org. Lett.* **2009**, 11, 3570–3573

²²⁵ Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17570–17573

²²⁶ Wainman, Y. A.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Stöckmann, H.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 7297–7300

IV. DOUBLE MODIFICATION DE BIOMOLECULES

Actuellement, une génération de conjugués multifonctionnels commence à émerger. Ces conjugués, obtenus *via* l'introduction de deux groupements d'intérêt distincts sur une biomolécule, ouvrent la voie à tout un champ d'applications encore inexploré.²²⁷

Le développement de cette famille de bioconjugués a permis d'important progrès dans le domaine de l'imagerie bimodale dont nous avons déjà parlé en détail. En effet, les agents imageants bimodaux obtenus grâce à l'introduction de deux molécules imageantes sur un biovecteur ont montré un fort potentiel en imagerie médicale. L'étude du repliement tridimensionnel de structures protéiques ou oligonucléotidiques grâce à la technique de FRET (*Förster resonance energy transfer*) est aussi un bon exemple d'application où il est nécessaire de doubler la biomolécule en question.^{228, 229}

Comme précédemment mentionné, l'ajout d'un groupement solubilisant ou capable de moduler la pharmacocinétique, tel qu'une chaîne PEG, peut considérablement améliorer les propriétés d'un agent pharmaceutique donné. L'introduction conjointe d'un groupement PEG et d'un groupement imageant ou cytotoxique sur la même biomolécule peut donc s'avérer très intéressante.²³⁰ Par ailleurs, les agents théranostiques sont des outils très puissants en thérapie ciblée et leur élaboration repose généralement sur la double modification de biomolécules par une molécule imageante et un groupement cytotoxique.²³⁰ Enfin, la double modification de protéines trouve également une application en thérapie, où elle permet la construction d'agents thérapeutiques bivalents constitués d'un biovecteur et de deux molécules cytotoxiques. En effet, l'utilisation d'agents bivalents possédant deux mécanismes d'action complémentaires s'est révélée très efficace pour le traitement de tumeurs constituées de populations de cellules hétérogènes, ou ayant développé des mécanismes de résistance.^{231, 232}

IV.1. Vers l'élaboration d'agents hybrides

La synthèse de ces bioconjugués multifonctionnels n'est pas triviale et malgré les nombreuses stratégies développées, l'obtention de protéines doublement modifiées est encore actuellement problématique.^{227, 233, 234}

Hormis les études basées sur le principe de FRET, la plupart des stratégies listées ci-dessus sont, en théorie, réalisables par l'injection conjointe (ou successive) de deux conjugués monofonctionnels distincts (**figure 50**).^{235, 236, 237, 238}

²²⁷ Maruani, A.; Richards, D. A.; Chudasama, V. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6165–6178

²²⁸ Schuler, B.; Eaton, W. A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 16–26

²²⁹ Jefferson, R. E.; Min, D.; Corin, K.; Wang, J. Y.; Bowie, J. U. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 424–437

²³⁰ Maruani, A.; Smith, M. E. B.; Miranda, E.; Chester, K. A.; Chudasama, V.; Caddick, S. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6645–6654

²³¹ Levengood, M. R.; Zhang, X.; Hunter, J. H.; Emmerton, K. K.; Miyamoto, J. B.; Lewis, T. S.; Senter, P. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 733–737

²³² Mallick, A.; More, P.; Ghosh, S.; Chippalkatti, R.; Chopade, B. A.; Lahiri, M.; Basu, S. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2015**, *7*, 7584–7598

²³³ Calvete, M. J. F.; Pinto, S. M. *Curr. Org. Synth.* **2017**, *14*, 704–714

²³⁴ Ahn, S. H.; Boros, E. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2018**, *10.1089/cbr.2018.2499*

²³⁵ Ogawa, M.; Regino, C. A. S.; Seidel, J.; Green, M. V.; Xi, W.; Williams, M.; Kosaka, N.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2177–2184

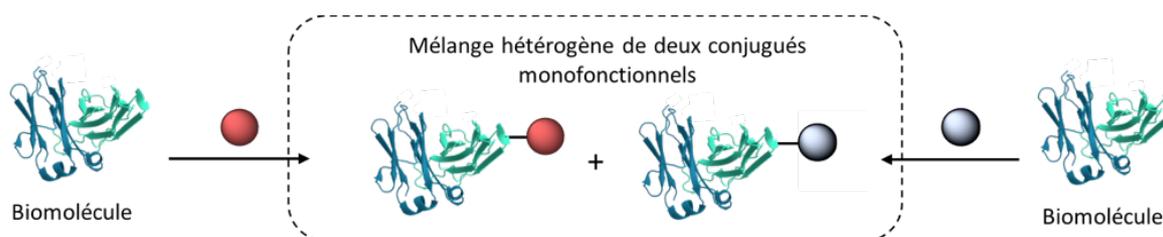


Figure 50. Schéma général de l'approche « cocktail ».

En pratique, cette approche dite « cocktail », bien que très simple à mettre en œuvre, est loin d'être idéale. En effet, le comportement pharmacocinétique du biovecteur étant dépendant de la nature de la molécule introduite, les comportements *in vivo* des deux conjugués injectés peuvent être considérablement différents. En imagerie bimodale, ceci implique des difficultés à corréliser les informations obtenues *via* l'une ou l'autre des modalités. En thérapie bivalente, l'efficacité du traitement peut être moindre si les deux agents cytotoxiques n'atteignent pas simultanément leur cible. De plus, l'approche cocktail implique d'effectuer les études de toxicité, souvent longues et coûteuses, pour chacun des deux composés. Pour ces différentes raisons, il est donc préférable d'injecter un agent hybride constitué d'un biovecteur portant les deux fonctionnalités.

Les stratégies développées pour la synthèse d'agents hybrides dépendent bien évidemment du type de biomolécules utilisées comme vecteur. Dans le cas des peptides, qui sont peu fragiles, les stratégies employées font souvent appel à des réactions chimiques (stratégie de protection/deprotection) ou des techniques (SPPS) non transposables aux protéines.^{239, 79} Malheureusement, il est parfois délicat d'introduire deux groupements d'intérêt sur un peptide tout en conservant une affinité élevée pour sa cible.²⁴⁰ Les protéines paraissent donc plus adaptées pour les applications nécessitant l'introduction de deux fonctionnalités.

IV.2. Introduction de deux molécules distinctes

Un nombre assez conséquent d'anticorps bimodaux optique/nucléaire ont été développés grâce à l'introduction séquentielle d'un fluorophore et d'un chélateur au moyen de deux étapes de bioconjugaison successives.^{71, 72, 73, 139, 241, 242} Malheureusement, dans ces exemples, les conjugaisons étaient effectuées par modification aléatoire des amines (**figure 51**). Dans ces conditions, il est donc très difficile de contrôler le ratio fluorophore/chélate. En particulier, le mélange d'espèces obtenu

²³⁶ Terwisscha van Scheltinga, A. G. T.; van Dam, G. M.; Nagengast, W. B.; Ntziachristos, V.; Hollema, H.; Herek, J. L.; Schröder, C. P.; Kosterink, J. G. W.; Lub-de Hoog, M. N.; de Vries, E. G. E. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1778–1785

²³⁷ Loganzo, F.; Tan, X.; Sung, M.; Jin, G.; Myers, J. S.; Melamud, E.; Wang, F.; Diesl, V.; Follettie, M. T.; Musto, S.; Lam, M.-H.; Hu, W.; Charati, M. B.; Khandke, K.; Kim, K. S. K.; Cinque, M.; Lucas, J.; Graziani, E.; Maderna, A.; O'Donnell, C. J.; Arndt, K. T.; Gerber, H.-P. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 952–963

²³⁸ Yu, S.-F.; Zheng, B.; Go, M.; Lau, J.; Spencer, S.; Raab, H.; Soriano, R.; Jhunjhunwala, S.; Cohen, R.; Caruso, M.; Polakis, P.; Flygare, J.; Polson, A. G. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3298–3306

²³⁹ Moss, J. A.; Vavere, A. L.; Azhdarinia, A. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3255–3265

²⁴⁰ Achilefu, S.; Jimenez, H. N.; Dorshow, R. B.; Bugaj, J. E.; Webb, E. G.; Wilhelm, R. R.; Rajagopalan, R.; Jöhler, J.; Erion, J. L. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2003–2015

²⁴¹ Sampath, L.; Kwon, S.; Hall, M. A.; Price, R. E.; Sevic-Muraca, E. M. *Transl. Oncol.* **2010**, *3*, 307–217

²⁴² Zhang, Y.; Hong, H.; Engle, J. W.; Yang, Y.; Barnhart, T. E.; Cai, W. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2012**, *2*, 1–13

peut contenir des protéines modifiées par un seul des deux groupements ce qui peut fausser les résultats.

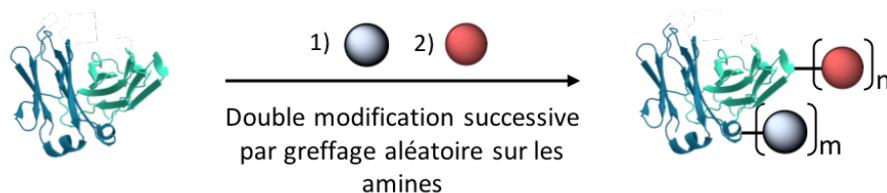


Figure 51. Schéma général de l'obtention d'un bioconjugué bifonctionnel par double modification séquentielle non régiospécifique.

Des techniques plus élégantes ont permis l'introduction de deux groupements d'intérêt par des méthodes régiospécifiques (**figure 52**). Par exemple, l'équipe de B. Zeglis a élaboré un anticorps bimodal par introduction de DFO-alcyne et d'Alexa Fluor 680-alcyne sur les chaînes glycanes préalablement fonctionnalisées par des azotures.¹⁷⁴ Cette approche est intéressante puisqu'elle permet de contrôler les sites de bioconjugaison et d'introduire les deux groupements d'intérêt sélectivement sur les sites de glycosylation. Cependant, les molécules imageantes sont toutes deux introduites au moyen d'une réaction de SPAAC entre un azoture et l'alcyne contraint DIBO (4-dibenzocyclooctynol). Les deux bioconjugaisons ne sont donc pas orthogonales entre elles et le ratio entre les deux sondes imageantes est difficile à contrôler.

Grâce aux progrès réalisés en biologie moléculaire, il est à présent possible d'incorporer par modification génétique deux acides aminés non naturels différents à deux positions prédéfinies de la protéine. Xiao *et al.* ont ainsi décrit la synthèse d'un agent théranostique basé sur l'introduction régiospécifique d'auristatine et d'Alexa Fluor 488 sur un anticorps modifié présentant les fonctions cétone et azoture.²⁴³ Selon une stratégie similaire, le groupe de Chin a pu modifier une protéine par deux fluorophores différents *via* deux réactions bioorthogonales.²⁴⁴ Bien que cette dernière approche soit hautement versatile et très efficace, l'étape permettant l'incorporation des uAAs dans la séquence est très complexe et difficile à mettre en œuvre.

²⁴³ Xiao, H.; Chatterjee, A.; Choi, S.; Bajjuri, K. M.; Sinha, S. C.; Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 14080–14083

²⁴⁴ Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. M.; Lang, K.; Wallace, S.; Mehl, R. A.; Chin, J. W. *Nat. Chem.* **2014**, 6, 393–403

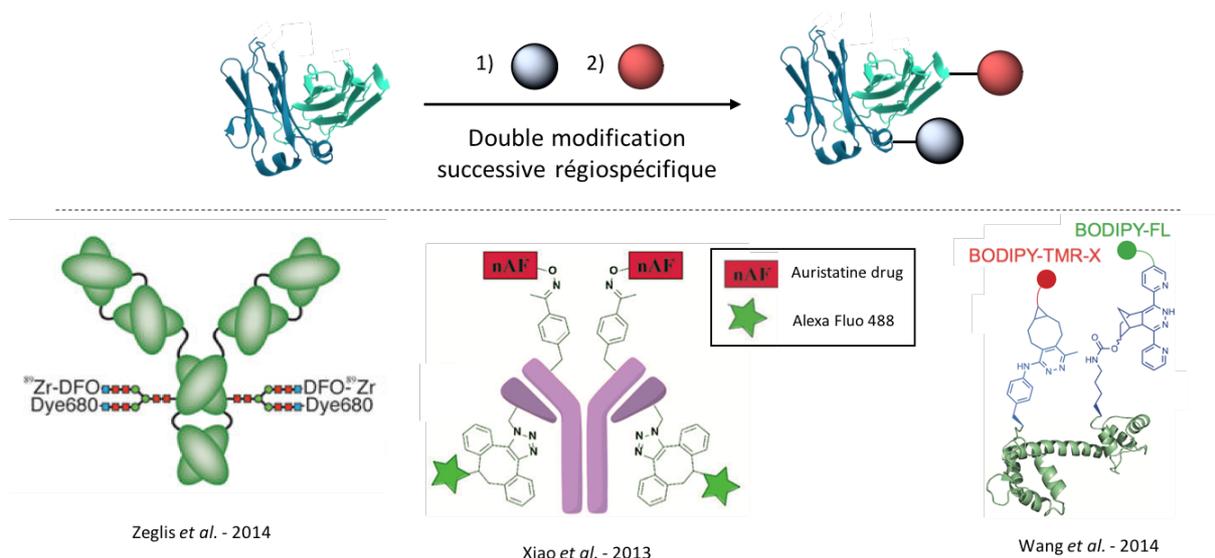


Figure 52. Haut : Schéma général de l'obtention d'un bioconjugué bifonctionnel par double modification séquentielle régiospécifique ; Bas : Exemples de biomolécules doublement modifiées via cette approche.

IV.3. Introduction d'une molécule hybride

Au lieu de modifier la protéine par deux groupements d'intérêt distincts, il est préférable d'introduire une unique molécule portant les deux fonctionnalités (**figure 53**). Ceci simplifie l'étape de bioconjugaison et réduit le nombre de sites de greffage ce qui permet de limiter les risques de perturbation de la structure de la protéine. De plus, grâce à cette approche, le ratio entre les deux groupements d'intérêt introduits est constant même si le mode de bioconjugaison n'est pas régiospécifique.

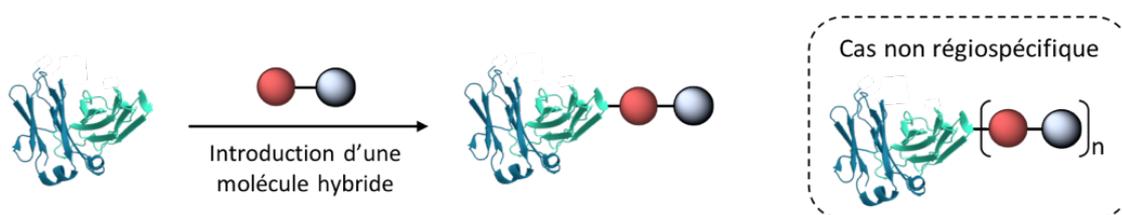


Figure 53. Schéma général de la double modification d'une biomolécule grâce à l'introduction d'une molécule hybride.

Plusieurs groupements hybrides combinant un émetteur radioactif et un fluorophore ont été synthétisés et bioconjugués. Par exemple, un DOTA fonctionnalisé par une cyanine 7 a pu être synthétisé et conjugué à un anticorps grâce à un ester de NHS sulfonaté (**figure 54. A**).²⁴⁵ L'équipe de T. Reiner a décrit l'introduction régiosélective d'un groupement hybride TEP/optique sur l'exendine 4 par réaction de CuAAC (**figure 54. B**).²⁴⁶ Le groupement hybride en question a été obtenu en quatre

²⁴⁵ Ghosh, S. C.; Ghosh, P.; Wilganowski, N.; Robinson, H.; Hall, M. A.; Dickinson, G.; Pinkston, K. L.; Harvey, B. R.; Sevick-Muraca, E. M.; Azhdarinia, A. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 406–416

²⁴⁶ Brand, C.; Abdel-Atti, D.; Zhang, Y.; Carlin, S.; Clardy, S. M.; Keliher, E. J.; Weber, W. A.; Lewis, J. S.; Reiner, T. *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1323–1330

étapes par fonctionnalisation d'un chélateur de type DiAmSar (1,8-diamino-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6,6,6]-eicosane) avec une cyanine 5.0 et un bras PEG-azoture. Des groupements bimodaux plus particuliers ont également été élaborés, comme des porphyrines fluorescentes coordonnant un radioémetteur métallique (**figure 54. C**),^{247, 248} ou des fluorophores de type BODIPY dont l'un des fluors a été échangé par du fluor-18 (**figure 54. D**).^{249, 250}

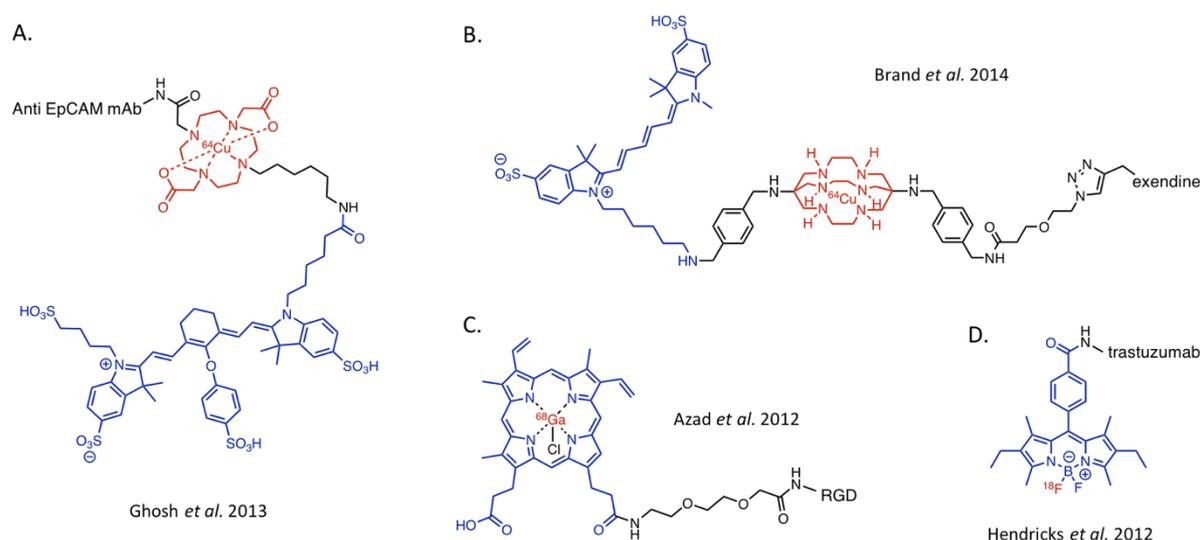


Figure 54. Quelques exemples d'agents imageants bimodaux nucléaire/optique vectorisés obtenus à partir d'une molécule hybride.

Dans ces exemples, les différents groupements hybrides sont généralement obtenus au moyen de synthèses multi-étapes complexes et peu efficaces. De plus, ces approches sont très peu modulables et lorsque d'autres types de groupements bifonctionnels doivent être testés, il est nécessaire de développer toute une nouvelle voie de synthèse. Une alternative beaucoup plus versatile consiste à utiliser une plateforme trifonctionnelle pour combiner les deux groupements d'intérêt et permettre la conjugaison à la biomolécule (**figure 55**).²⁵¹ La plateforme en question est de préférence une petite molécule simple et robuste et les trois sites réactifs doivent être orthogonaux entre eux. Dans l'idéal, cette procédure ne doit pas faire intervenir d'étapes complexes de protection/déprotection et elle ne doit pas nécessiter la purification des différents intermédiaires.

²⁴⁷ Azad, B. B.; Cho, C. F.; Lewis, J. D.; Luyt, L. G. *Appl. Radiat. Isotopes*. **2012**, 70, 505–511

²⁴⁸ Liu, T. W.; Stewart, J. M.; MacDonald, T. D.; Chen, J.; Clarke, B.; Shi, J.; Wilson, B. C.; Neel, B. G.; Zheng, G. *Theranostics*. **2013**, 3, 420–427

²⁴⁹ Hendricks, J. A.; Keliher, E. J.; Wan, D.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Mazitschek, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 4603–4606

²⁵⁰ Paulus, A.; Desai, P.; Carney, B.; Carlucci, G.; Reiner, T.; Brand, C.; Weber, W. A. *EJNMMI Res.* **2015**, 5, 120–128

²⁵¹ Beal, D. M.; Jones, L. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6320–6326

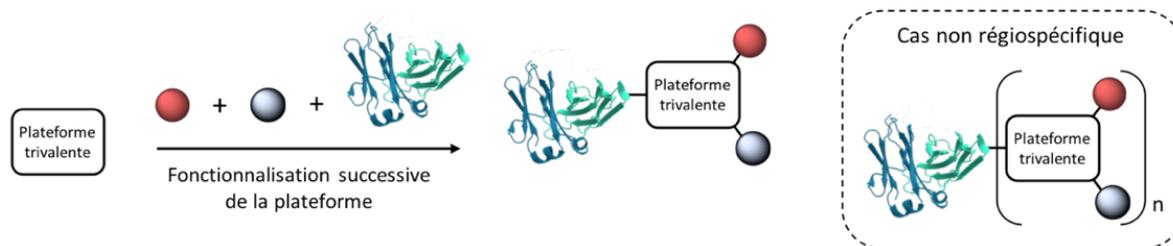


Figure 55. Schéma général de la double modification d'une biomolécule *via* l'utilisation d'une plateforme trivalente permettant la combinaison des deux groupements d'intérêt et de la biomolécule.

a. Les plateformes de type acide aminé

De façon assez logique, les premières plateformes trifonctionnelles développées ont été des acides aminés (ou des analogues d'acides aminés). En effet, lors de la synthèse de biovecteurs de type peptidique par SPPS, il est très simple d'introduire un acide aminé supplémentaire en bout de chaîne pour permettre le greffage de divers groupements d'intérêt sans devoir modifier le reste de la chaîne peptidique. Grâce à la fonction amine de sa chaîne latérale, la lysine constitue une plateforme trifonctionnelle relativement modulable et surtout très facile d'accès (**figure 56. A**). De nombreux agents bimodaux nucléaire/optique à base de peptides ont ainsi été obtenus grâce à l'utilisation d'une plateforme lysine introduite en position *N*-terminale (**figure 56. B**).^{252, 253, 254}

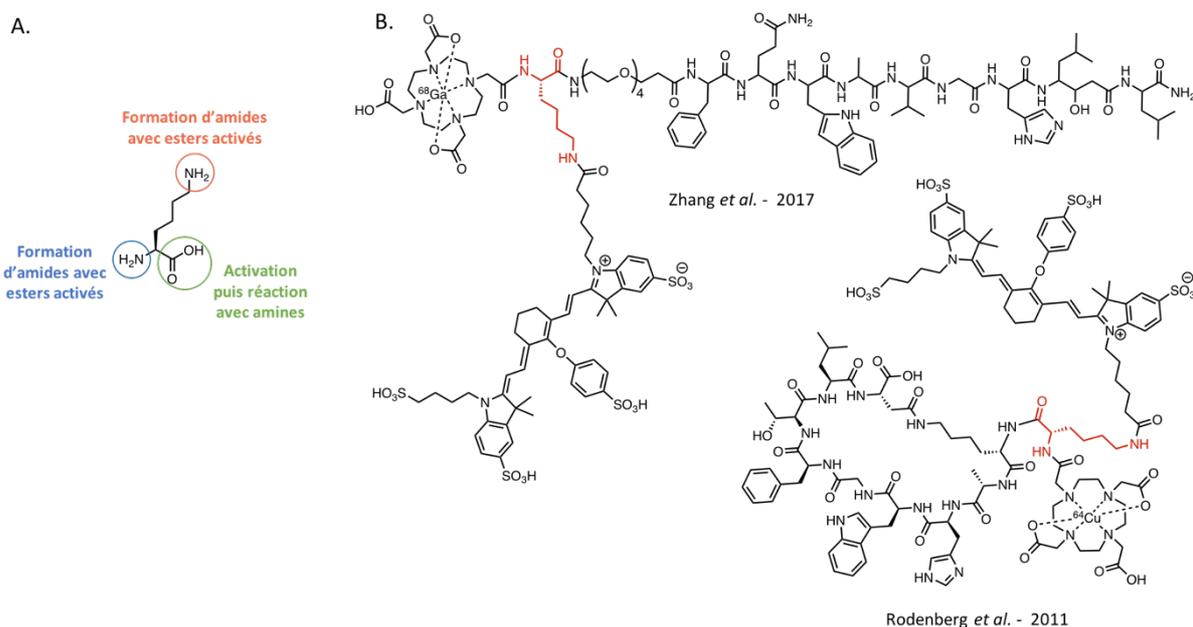


Figure 56. A. La plateforme lysine ; **B.** Deux exemples d'agents imageants bimodaux nucléaire/optique élaborés *via* l'ajout d'une plateforme lysine en *N*-terminal du peptide vecteur.

²⁵² Wang, W.; Ke, S.; Kwon, S.; Yallampalli, S.; Cameron, A. G.; Adams, K. E.; Mawad, M. E.; Sevick-Muraca, E. M. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 397–402

²⁵³ Rodenberg, E.; Azhdarinia, A.; Lazard, Z. W.; Hall, M.; Kwon, S. K.; Wilganowski, N.; Salisbury, E. A.; Merched-Sauvage, M.; Olmsted-Davis, E. A.; Sevick-Muraca, E. M.; Davis, A. R. *Tissue Eng. Part A.* **2011**, *17*, 2487–2496

²⁵⁴ Zhang, H.; Desai, P.; Koike, Y.; Houghton, J.; Carlin, S.; Tandon, N.; Touijer, K.; Weber, W. A. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 29–35

Lorsque le vecteur est une protéine, la stratégie est un peu différente et nécessite généralement plusieurs étapes de protection/deprotection afin de fonctionnaliser successivement les trois positions de la lysine.^{255, 256, 257, 258} Par exemple, en 2007, l'équipe de M. Brechbiel a utilisé la lysine en tant que plateforme pour conjuguer une cyanine et un chélateur à un anticorps (**schéma 1**).²⁵⁹ Pour ce faire, le composé Boc-Lys(Z)-OH est d'abord fonctionnalisé par le chélateur *via* un couplage peptidique. Le groupement Cbz est ensuite éliminé par réduction pour libérer l'amine en ϵ . L'ajout du succinimidyl 4-(*N*-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) permet alors d'introduire une fonction réactive des cystéines sur la chaîne latérale de la lysine. La seconde amine est à son tour déprotégée et la cyanine peut être introduite. Le composé obtenu est finalement conjugué à l'anticorps par modification des résidus cystéines.

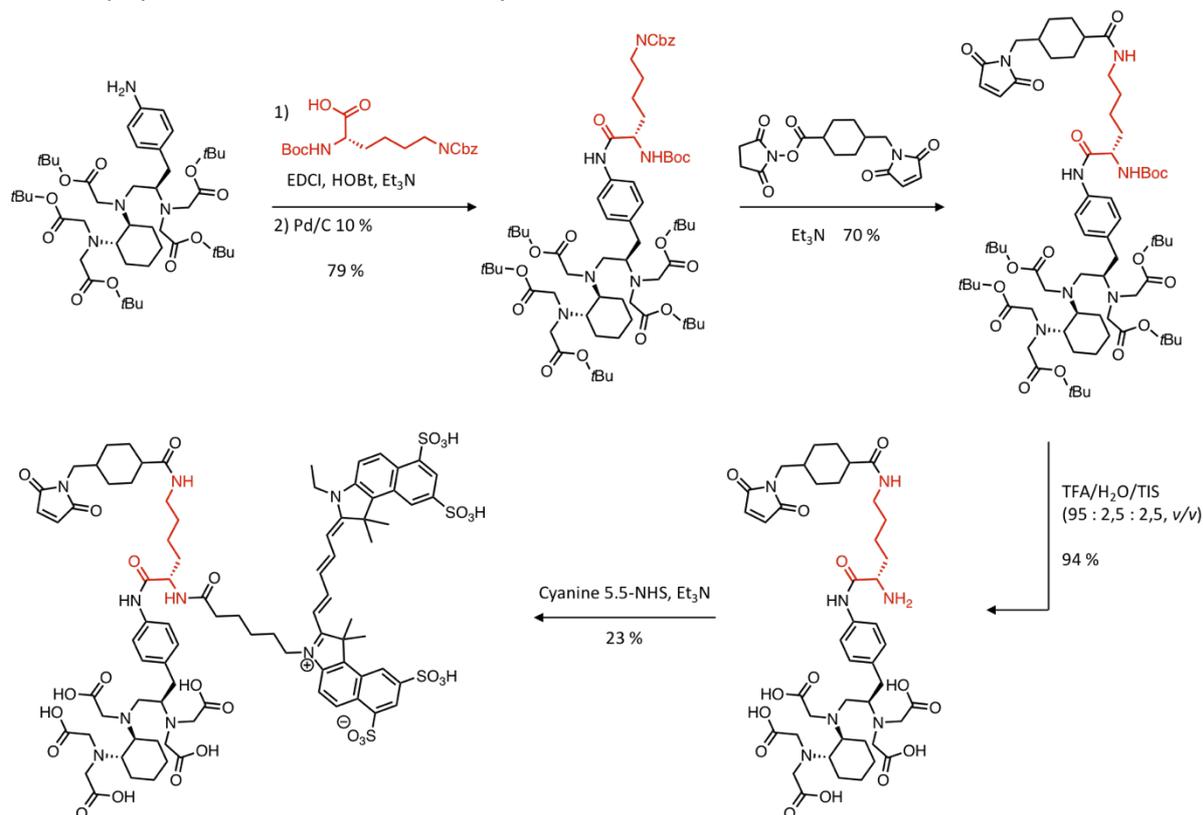


Schéma 1. Exemple d'une voie de synthèse permettant l'élaboration d'une molécule hybride portant un fluorophore, un chélateur et une fonction de bioconjugaison.²⁵⁹

La lysine est l'acide aminé le plus couramment utilisé en tant que plateforme trifonctionnelle pour faciliter la double modification de biomolécules, cependant la cystéine (**figure 57. A**),²⁶⁰ ou des

²⁵⁵ Bhushan, K. R.; Misra, P.; Liu, F.; Mathur, S.; Lenkinski, R. E.; Frangioni, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17648–17649

²⁵⁶ Keliris, A.; Ziegler, T.; Mishra, R.; Pohmann, R.; Sauer, M. G.; Ugurbil, K.; Engelmann, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2529–2540

²⁵⁷ Li, C.; Wang, W.; Wu, Q.; Ke, S.; Houston, J.; Sevick-Muraca, E.; Dong, L.; Chow, D.; Charnsangavej, C.; Gelovani, J. G. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, 33, 349–358

²⁵⁸ Maindron, N.; Ipuay, M.; Bernhard, C.; Lhenry, D.; Moreau, M.; Carme, S.; Oudot, A.; Collin, B.; Vringeaud, J.-M.; Provent, P.; Bruntte, F.; Denat, F.; Goze, C. *Chem. – Eur. J.* **2016**, 22, 12670–12674

²⁵⁹ Xu, H.; Baidoo, K.; Gunn, A. J.; Boswell, C. A.; Milenic, D. E.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4759–4765

²⁶⁰ Li, S.-Y.; Liu, L.-H.; Jia, H.-Z.; Qiu, W.-X.; Rong, L.; Cheng, H.; Zhang, X.-Z. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 11852–11855

analogues d'acides aminés comme la nitrophénylalanine (**figure 57. B**),^{261, 262, 263, 264} ont également été utilisés. Des variantes peptidiques ont été développées, comme par exemple le dipeptide Lys-Cys-NH₂ (**figure 57. C**),^{265, 266, 267} ou le térapeptide Lys-Gly-Gly-Tyr-OH (**figure 57. D**),²⁶⁸ qui ont permis la préparation de nombreux agents bimodaux optiques/nucléaires vectorisés. Le RAFT (*regioselectively addressable functionalized template*) est un cyclodécapeptide pouvant être fonctionnalisé de façon régioselective par différents groupements.²⁶⁹ Cette plateforme a notamment été utilisée pour combiner quatre RGD cycliques avec une cyanine fluorescente et pourrait faciliter la préparation d'agents imageants bimodaux.

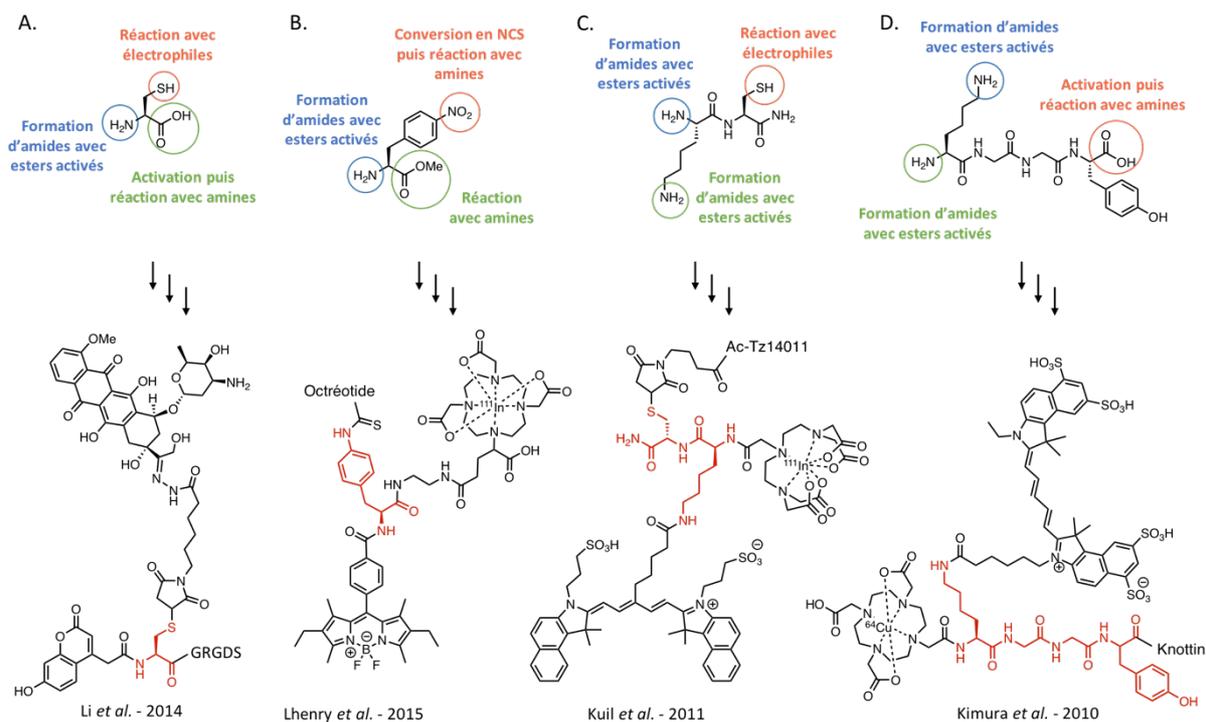


Figure 57. Structures de quelques plateformes à base d'acides aminés, accompagnées d'un exemple de bioconjugué bifonctionnel obtenu *via* leur fonctionnalisation.

Afin de compenser le manque d'orthogonalité entre les différentes fonctions réactives, certaines équipes ont développé des plateformes constituées d'une lysine préfonctionnalisée par des

²⁶¹ Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F. *Chem. Commun.* **2009**, 46, 8267–8269

²⁶² Bernhard, C.; Moreau, M.; Lhenry, D.; Goze, C.; Boschetti, F.; Rousselin, Y.; Brunotte, F.; Denat, F. *Chem. – Eur. J.* **2012**, 18, 7834–7841

²⁶³ Duheron, V.; Moreau, M.; Collin, B.; Sali, W.; Bernhard, C.; Goze, C.; Gautier, T.; Pais de Barros, J.-P.; Deckert, V.; Brunotte, F.; Lagrost, L.; Denat, F. *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 656–662

²⁶⁴ Lhenry, D.; Larrouy, M.; Bernhard, C.; Goncalves, V.; Raguin, O.; Provent, P.; Moreau, M.; Collin, B.; Oudot, A.; Vrigneaud, J.-M.; Brunotte, F.; Goze, C.; Denat, F. *Chem. – Eur. J.* **2015**, 21, 13091–13099

²⁶⁵ Garanger, E.; Aikawa, E.; Reynolds, F.; Weissleder, R.; Josephson, L. *Chem. Commun.* **2008**, 39, 4792–4794

²⁶⁶ Kuil, J.; Buckle, T.; Yuan, H.; van den Berg, N. S.; Oishi, S.; Fujii, N.; Josephson, L.; van Leeuwen, F. W. B. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 859–864

²⁶⁷ Bunschoten, A.; Buckle, T.; Visser, N. L.; Kuil, J.; Yuan, H.; Josephson, L.; Vahrmeijer, A. L.; van Leeuwen, F. W. B. *ChemBioChem.* **2012**, 13, 1039–1045

²⁶⁸ Kimura, R. H.; Miao, Z.; Cheng, Z.; Gambhir, S. S.; Cochran, J. R. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 436–444

²⁶⁹ Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z.; Dumy, P.; Coll, J.-L. *Mol. Ther.* **2005**, 12, 1168–1175

groupements orthogonaux entre eux (**figure 58**).^{270, 271} Cependant, bien que les plateformes résultantes soient assez efficaces, leur synthèse est très laborieuse.

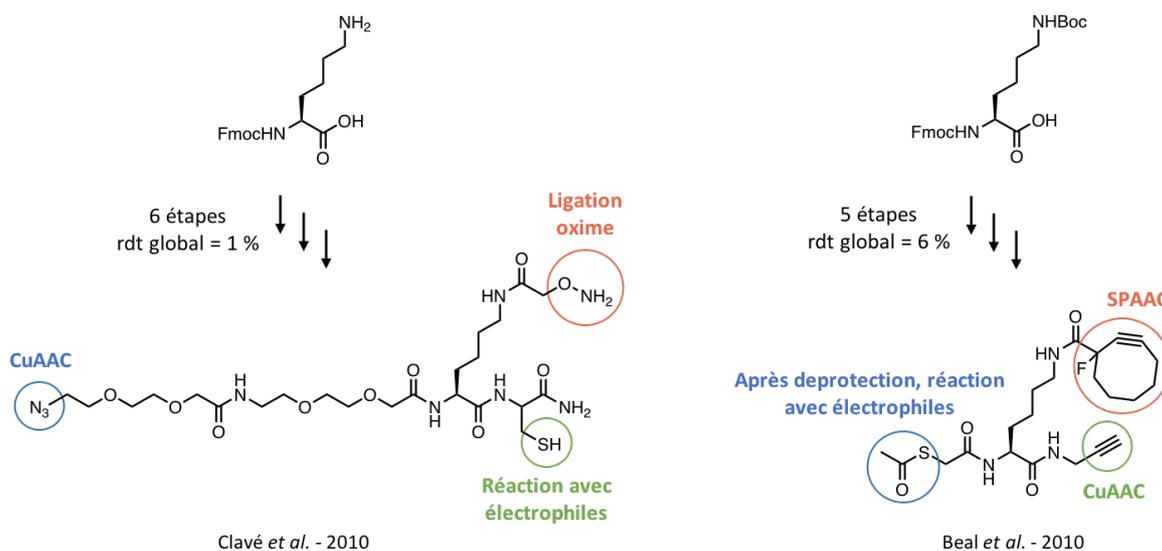


Figure 58. Deux exemples de plateformes trivalentes obtenues à partir de la fonctionnalisation de la lysine et présentant trois fonctions orthogonales entre elles.

b. Les plateformes de type benzène

Dans le but d'obtenir des plateformes moléculaires trivalentes plus robustes et plus versatiles, plusieurs équipes se sont intéressées à des structures trifonctionnelles constituées d'un cœur benzène. Par exemple, l'acide 3-nitro-5-(méthoxycarbonyl)benzoïque a permis la construction d'une plateforme possédant une fonction thiol, un azoture et une oxyamine judicieusement espacés par des chaînes PEG (**figure 59. A**). Cette plateforme s'apparente au composé trifonctionnel basé sur la structure lysine présenté ci-dessus (**figure 58**), cependant grâce à l'utilisation d'un cœur benzène plus versatile, la synthèse nécessite moins d'étapes et le rendement global est bien meilleur.²⁷²

Assez récemment, le groupe de Richard Ting a modifié un anticorps par une cyanine 7 et un fluor-18 grâce à une plateforme trivalente de type acide 3,5-dicarboxyphényl boronique (**figure 59. B**).²⁷³ L'acide boronique permet la formation d'une liaison C-C avec la cyanine 7 par couplage pallado-catalysé, puis le fluor radioactif est introduit par réaction avec l'un des deux acides carboxyliques. Enfin, le second acide carboxylique est activé sous forme d'ester de NHS pour permettre la modification de l'anticorps. Watzke *et al.* ont développé un autre exemple de molécule trivalente à base d'un cycle benzène (**figure 59. C**).²⁷⁴ Cette plateforme, en partie obtenue par synthèse sur phase solide, présente une fonction azoture, un acide carboxylique, et une cystéine pouvant réagir avec le 2-cyanobenzothiazole ou par ligation chimique native, par exemple.

²⁷⁰ Clavé, G.; Volland, H.; Flaender, M.; Gasparutto, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4329–4345

²⁷¹ Beal, D. M.; Albrow, V. E.; Burslem, G.; Hitchen, L.; Fernandes, C.; Laphorn, C.; Roberts, L. R.; Selby, M. D.; Jones, L. H. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *10*, 548–554

²⁷² Viault, G.; Dautrey, S.; Maindron, N.; Hardouin, J.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693–2705

²⁷³ Rodriguez, E. A.; Wang, Y.; Crisp, J. L.; Vera, D. R.; Tsien, R. Y.; Ting, R. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1390–1399

²⁷⁴ Watzke, A.; Köhn, M.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Wacker, R.; Schröder, H.; Breinbauer, R.; Kuhlmann, J.; Alexandrov, K.; Niemeyer, C. M.; Goody, R. S.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408–1412

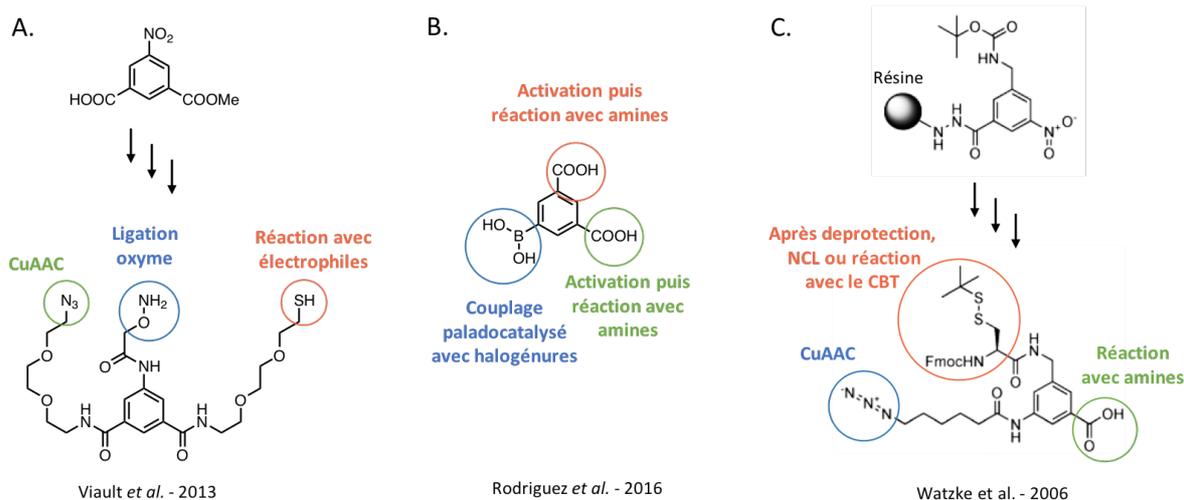


Figure 59. Exemples de plateformes trivalentes basées sur un cœur benzénique.

c. Autres types de plateformes

De nombreuses autres plateformes plus difficilement classables, mais néanmoins très élégantes, ont été mises au point. Des travaux assez anciens mais toutefois intéressants ont décrit une plateforme capable de générer trois CuAAC successives à partir d'un composé combinant un azoture et deux alcynes, l'un protégé par un triéthylsilyle et l'autre par un triisopropylsilyle (**figure 60. A**).²⁷⁵ Grâce à l'orthogonalité des déprotections, il a été possible de contrôler l'ordre des trois fonctionnalisations et d'obtenir le composé tris(triazolyle) en 5 étapes.

A. Knall et son équipe ont élaboré une plateforme composée d'un maléimide, d'un alcyne et d'un norbornène (**figure 60. B**).²⁷⁶ L'évaluation de cette plateforme a été effectuée sur de petites molécules modèles mais son potentiel pour la double modification de biomolécules plus complexes n'a pas encore été démontré. Cette plateforme reste cependant très intéressante car elle peut être obtenue avec de bons rendements et en seulement deux étapes à partir de l'anhydride *endo*-5-norbornène-2,3-dicarboxylique.

En 2015, les équipes de Z. Cheng et de X. Hong ont fait la découverte d'une réaction originale permettant l'addition successive de deux fonctions thiols sur un alcyne, catalysée par une base organique. Cette réaction a été appliquée à la double modification de biomolécule.²⁷⁷ Ainsi, grâce au bicyclo[6.1.0]nonyne dérivé par un ester de NHS, ils ont modifié la lysine du peptide AE105 par un fluorophore et un chélateur pour la complexation du cuivre-64 (**figure 60. C**).

²⁷⁵ Valverde, I. E.; Delmas, A. F.; Aucagne, V. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 7597–7602

²⁷⁶ Knall, A.-C.; Hollauf, M.; Saf, R.; Slugovc, C. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 10576–10580

²⁷⁷ Sun, Y.; Ma, X.; Cheng, K.; Wu, B.; Duan, J.; Chen, H.; Bu, L.; Zhang, R.; Hu, X.; Deng, Z.; Xing, L.; Hong, X.; Cheng, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 5981–5984

Très récemment, les mêmes chercheurs ont décrit une approche similaire mettant en jeu cette fois une fonction propiolamide (**figure 60. D**).²⁷⁸ La réaction impliquée dans cette stratégie est un peu différente de celle décrite dans leurs précédents travaux car les deux thiols introduits se lient tous deux au carbone en β . Cette approche a été validée *via* la modification d'un peptide RGD dimérique par un fluorophore proche infrarouge et un chélateur de type NOTA. Dans un premier temps, le peptide est introduit par couplage peptidique sur l'acide propynoïque, puis les deux groupements imageants (dérivés par des fonctions thiols) sont introduits successivement en position β . En l'état, ces deux approches ne sont pas applicables à la double modification de protéines car elles nécessitent la purification de chaque intermédiaire par chromatographie.

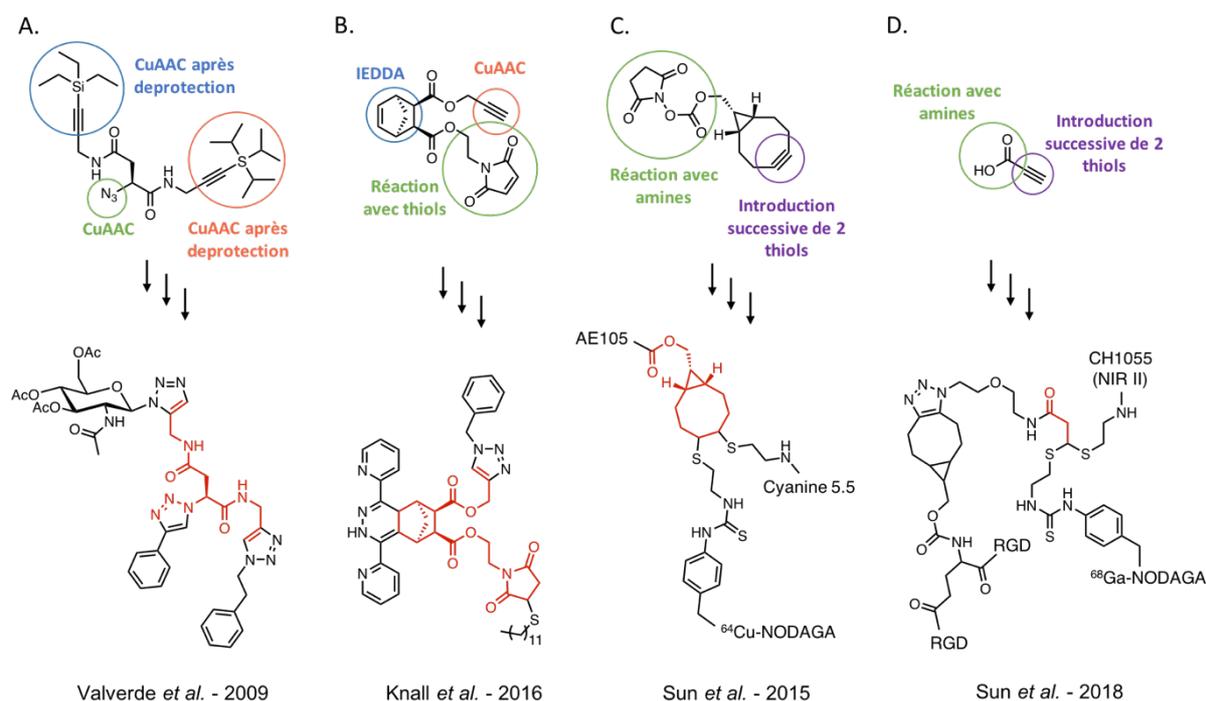


Figure 60. Quatre exemples de plateformes trifonctionnelles permettant la combinaison de trois groupements de façon orthogonale ; les deux dernières ont été appliquées à l'élaboration d'agents bimodaux nucléaire/optique vectorisés.

d. Les plateformes homotrifonctionnelles

Les plateformes précédemment décrites sont constituées de trois fonctions différentes, cependant quelques études ont montré qu'il était également possible d'utiliser des plateformes homotrifonctionnelles tout en gardant une orthogonalité correcte entre chacune des fonctionnalisations. Pour mettre en place une telle stratégie, il est nécessaire de choisir une plateforme dont la réactivité diminue avec le nombre de groupements introduits.

Par exemple, la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine, également connue sous le nom de chlorure cyanurique, peut être fonctionnalisée séquentiellement par trois nucléophiles (généralement des amines ; **figure 61. A**). La substitution successive de chacun des atomes de chlores induit une diminution du

²⁷⁸ Sun, Y.; Zeng, X.; Xiao, Y.; Liu, C.; Zhu, H.; Zhou, H.; Chen, Z.; Xu, F.; Wang, J.; Zhu, M.; Wu, J.; Tian, M.; Zhang, H.; Deng, Z.; Cheng, Z.; Hong, X. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 2092–2097

caractère électrophile de la triazine et ralentit la fonctionnalisation suivante. Ce phénomène, combiné à un contrôle soigneux de la température et de la stœchiométrie, permet d'éviter une double ou une triple substitution non désirée. En contrepartie, la troisième fonctionnalisation nécessite souvent des conditions assez drastiques (température supérieure à 60 °C pendant une nuit) peu compatibles avec l'utilisation de protéines. L'approche adoptée consiste donc à préfonctionnaliser la triazine par des bras portant des fonctions bioorthogonales. En 2014, deux équipes différentes ont publié des articles décrivant l'emploi du chlorure cyanurique pour la modification d'un dendrimère²⁷⁹ ou de peptides.²⁸⁰

Des composés comme le benzotriuranone ou le benzotripyranone ont également montré des réactivités intéressantes (**figure 61. B**). L'avantage de ces plateformes est que la dernière fonctionnalisation peut être effectuée à 41 °C et pourrait éventuellement permettre la modification de protéines. De plus, la réaction ne produit pas d'acide chlorhydrique contrairement à l'approche basée sur la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine. Malheureusement, aucune application en bioconjugaison n'a été répertoriée et, à ce jour, la plateforme n'a permis la combinaison que de molécules modèles.^{281,282}

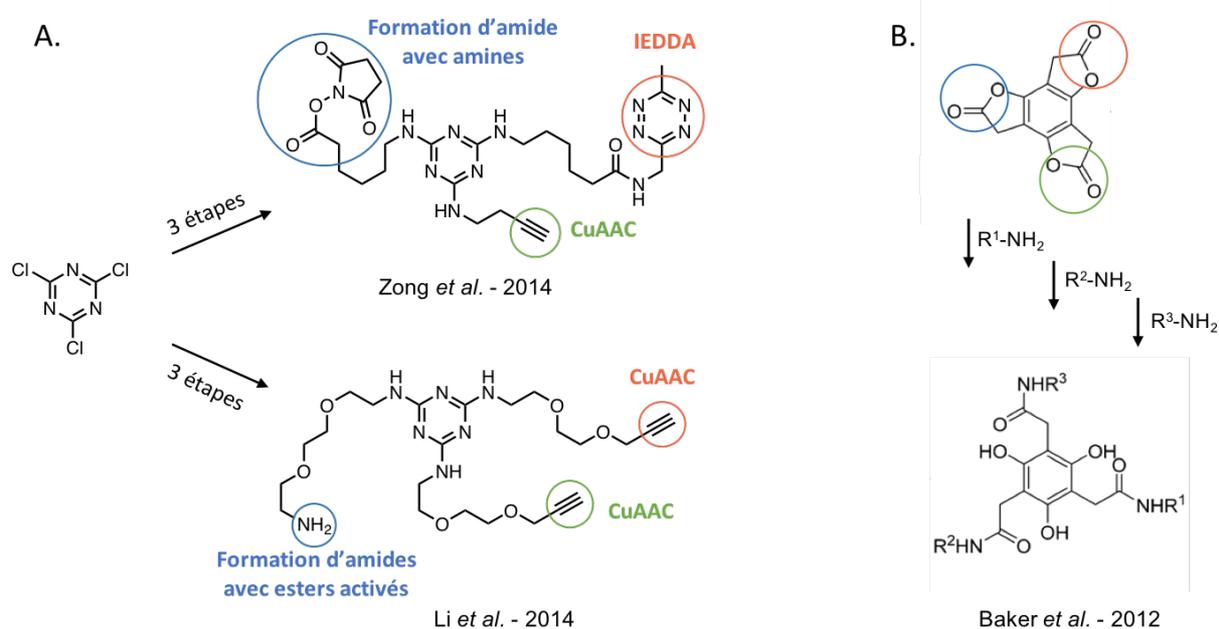


Figure 61. Deux exemples de plateformes homotrifonctionnelles permettant l'introduction séquentielle de trois amines.

Il existe également des plateformes trivalentes qui ont été spécifiquement conçues pour le marquage régiosélectif des résidus cystéines. Ces plateformes seront présentées en détail dans le chapitre II.

²⁷⁹ Zong, H.; Goonewardena, S. N.; Chang, H.-N.; Otis, J. B.; Baker, J. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6288–6296

²⁸⁰ Li, H.; Zhou, H.; Krieger, S.; Parry, J. J.; Whittenberg, J. J.; Desai, A. V.; Rogers, B. E.; Kenis, P. J. A.; Reichert, D. E. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 761–772

²⁸¹ Baker, M. B.; Ghiviriga, I.; Castellano, R. K. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1095–1099

²⁸² Baker, M. B.; Ferreira, R. B.; Tasseroul, J.; Lampkins, A. J.; Al Abbas, A.; Abboud, K. A.; Castellano, R. K. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9279–9288

V. PRÉSENTATION DES PROJETS DE RECHERCHE

Les travaux présentés ci-après s'inscrivent dans une thématique de recherche centrée sur l'imagerie moléculaire. Au cours de ces trois années de thèse, nous avons pu mener à bien différents projets ayant pour but commun la conception de nouveaux agents de ciblage pour le diagnostic du cancer. En particulier, l'imagerie bimodale combinant la fluorescence et l'imagerie nucléaire constitue un point clé parmi les différentes finalités de ces travaux.

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, l'élaboration d'agent imageants permettant la visualisation précise et la détection efficace des tissus cancéreux est un domaine de recherche en pleine expansion. Parmi les différentes disciplines impliquées, l'étude et le développement des procédures permettant la conjugaison de l'agent imageant à un vecteur biologique sont primordiales. Cet axe de recherche très compétitif constitue la thématique principale de cette thèse.

Ainsi, les deux premiers projets présentés portent sur l'élaboration de stratégies de bioconjugaison innovantes permettant la double modification régiosélective de protéines grâce à l'utilisation d'une plateforme trivalente dichlorotétrazine (**figure 62**). La mise au point de ce type d'approches constitue une avancée essentielle pour l'élaboration d'agents imageants bimodaux. La plus-value de ces technologies est également importante pour d'autres domaines d'application tels que la préparation d'agents théranostiques ou l'optimisation des propriétés pharmacocinétiques d'agents thérapeutiques.

La première des stratégies développées permet l'introduction d'une molécule hybride bifonctionnelle sur une protéine possédant une ancre bioorthogonale. La double modification régiosélective de la protéine est ainsi réalisée en une seule étape. La seconde stratégie mise au point consiste en la double modification séquentielle de protéines *via* deux fonctionnalisations successives d'un unique résidu cystéine. L'élaboration ainsi que l'évaluation de chacune de ces deux stratégies sont développées dans les chapitres I et II.

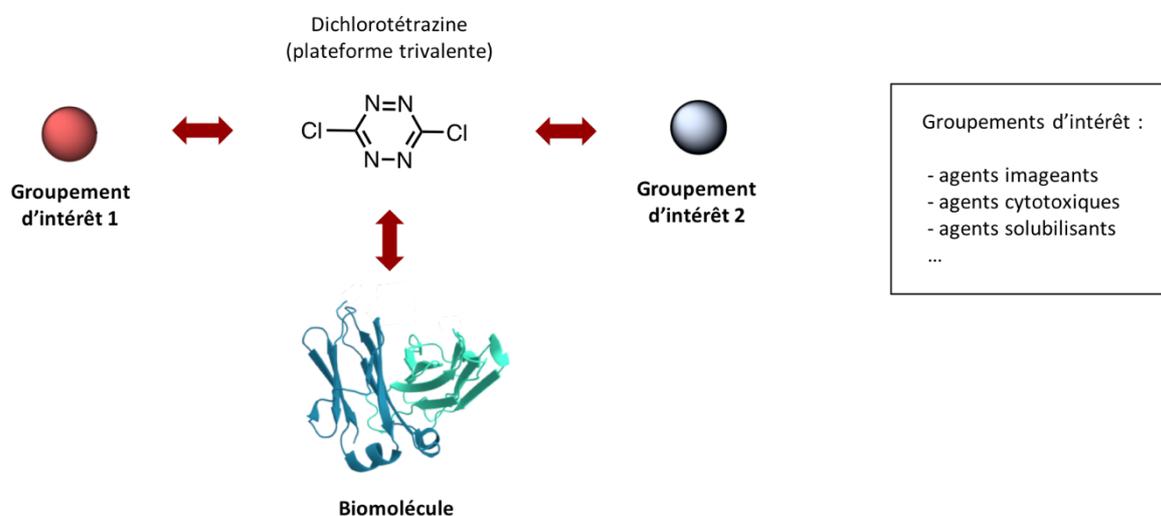


Figure 62. Élaboration de biomolécules doublement modifiées grâce à l'utilisation de la dichlorotétrazine en tant que plateforme trivalente : schéma présentant l'approche générale des stratégies présentées dans les chapitres I et II.

Comme les deux chapitres précédents, le chapitre III se rapporte directement au domaine de la bioconjugaison. Dans cette partie, nous présenterons la conception d'une stratégie innovante permettant l'élaboration d'agents imageants vectorisés fluorescents proche infrarouge (**figure 63**). L'approche est basée sur la fonctionnalisation chimiosélective de résidus cystéines par un fluorophore proche infrarouge en une seule étape. Le fluorophore utilisé est une cyanine 7.0 qui a l'avantage d'être commercialisée à un prix peu élevé.

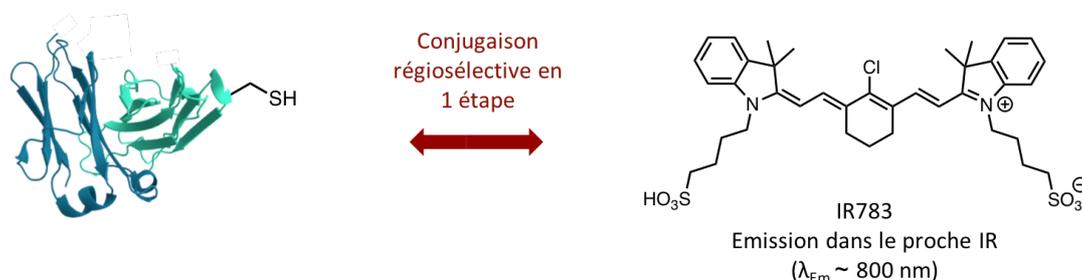


Figure 63. Schéma général de l'approche de bioconjugaison régiospécifique présentée dans le chapitre III.

Le chapitre IV, qui s'inscrit dans une thématique un peu différente de celle des trois premiers, présente la conception d'un agent imageant pour le diagnostic du cancer de la prostate par imagerie nucléaire TEP. Ce radiopharmaceutique est constitué d'un chélateur de radioisotopes conjugué à un vecteur pseudo-peptidique par un bras espaceur (**figure 64**). La mise au point de la synthèse de ce radiotracer ainsi que son évaluation complète *in vitro* et *in vivo* sont développées dans ce dernier chapitre. Des variantes de ce radiotracer, construites à partir d'espaceurs variables, ont été préparées et évaluées afin de déterminer l'impact de la nature du bras espaceur sur l'efficacité de la synthèse ainsi que sur l'affinité de l'agent de ciblage résultant.

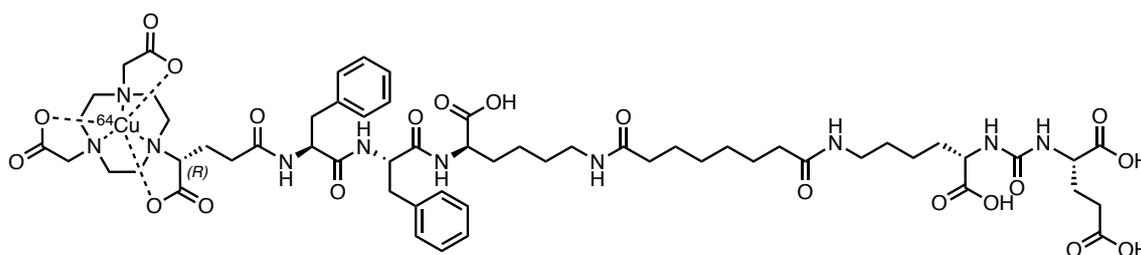


Figure 64. Structure du radiotracer présenté dans le chapitre IV.

- CHAPITRE I -

*Double modification site-spécifique de
protéines via une réaction de IEDDA*

- CHAPITRE I - Double modification site-spécifique de protéines <i>via</i> une réaction de IEDDA.....	82
I. INTRODUCTION.....	86
I.1. La réaction de IEDDA.....	86
I.2. Aperçu des diverses applications de la réaction de IEDDA.....	88
I.3. Les différentes techniques permettant l'obtention de dérivés cliquables.....	90
I.4. La dichlorotétrazine : un précurseur efficace.....	93
I.5. Présentation du projet.....	96
II. RESULTATS ET DISCUSSION.....	97
II.1. Mise au point des conditions des deux réactions de S_NAr	97
II.2. Synthèse d'une série de tétrazines bifonctionnalisées.....	99
II.3. Bioconjugaison régiospécifique à la protéine vectrice.....	101
II.4. Optimisation des conditions de radiomarquage du bioconjugué.....	104
II.5. Evaluation <i>in vivo</i> par imagerie bimodale TEMP-CT/fluorescence.....	105
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	107

I. INTRODUCTION

I.1. La réaction de IEDDA

Avec les progrès réalisés récemment en ingénierie du vivant, les réactions de chimie *click* sont devenues essentielles pour de nombreuses applications dans les domaines de la biologie et de la santé.^{1, 2} Notamment, l'hétérocycle 1,2,4,5-tétrazine est largement utilisé pour sa capacité à réagir selon une réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA ; **figure 65**). En effet, comme le montre le nombre croissant de publications sur le sujet, cette réaction tend à surpasser les autres réactions de chimie *click* en termes de cinétique, orthogonalité et biocompatibilité.^{3, 4, 5, 6, 7}

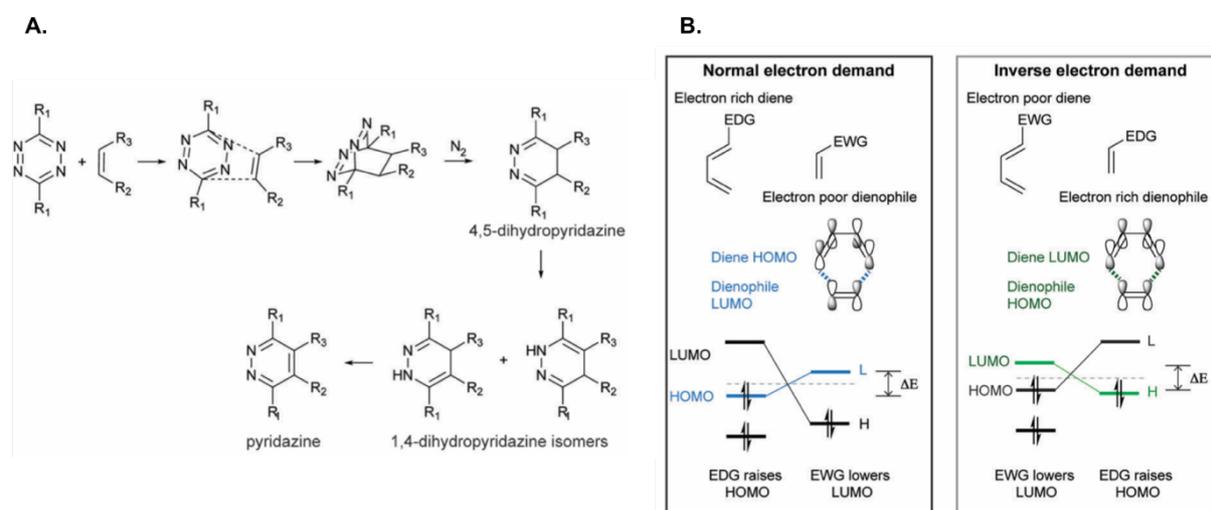


Figure 65. A. Mécanisme de la cycloaddition [4+2] entre une tétrazine et un alcène ; **B.** Représentation schématique de la structure des diènes et diénophiles, des orbitales frontières impliquées et de leur niveau d'énergie, pour la réaction de Diels-Alder normale et à demande inverse en électrons. EDG = *electron-donating group*, EWG = *electron-withdrawing group* ; figure adaptée de revue.³

La cinétique de la réaction de IEDDA est dépendante de plusieurs facteurs et en particulier, les propriétés électroniques des substituants du diène et du diénophile sont très importantes (**figure 65. A**).

Parmi les diènes potentiels, les tétrazines substituées par des groupements très électroattracteurs, tels que des groupes ester ou trifluorométhyle, sont extrêmement réactives mais malheureusement instables en conditions aqueuses.⁸ Les tétrazines portant des groupements de type pyridyle sont

¹ McKay, C. S.; Finn, M. G. *Chem. Biol.* **2014**, 21, 1075–1101

² Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1249–1262

³ Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895–4950

⁴ Knall, A.-C.; Slugovc, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5131–5142

⁵ Mayer, S.; Lang, K. *Synthesis.* **2016**, 48, 830–848

⁶ Wu, H.; Devaraj, N. K. *Top. Curr. Chem.* **2015**, 374, 109–130

⁷ Wu, H.; Devaraj, N. K. *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 1249–1259

⁸ Thalhammer, F.; Wallfaher, U.; Sauer, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 6851–6854

assez couramment utilisées car elles sont légèrement moins réactives et donc utilisables en milieu physiologique. La présence de substituants de type aliphatique, et *a fortiori* de type électrodonneur, diminue fortement la vitesse de la réaction. La gêne stérique influence aussi la cinétique de réaction et les tétrazines monosubstituées sont généralement plus réactives que leurs homologues disubstitués.^{9, 10, 11}

Le partenaire diénophile peut être un alcène ou un alcyne activé par la présence d'un groupement électrodonneur. Cependant les diénophiles de ce type sont assez peu réactifs et peuvent potentiellement réagir, par addition de Michael, avec les nucléophiles présents dans les milieux biologiques.¹² Au contraire, les diénophiles cycliques contraints font preuve d'une excellente bioorthogonalité et réagissent très rapidement.⁸ Il existe toute une gamme d'alcènes et d'alcynes cycliques plus ou moins réactifs (**figure 66**). La famille des *trans*-cyclooctènes (TCO) présente des constantes de vitesse avantageuses et est ainsi couramment utilisée. Le *trans*-cyclooctène a cependant tendance à s'isomériser pour adopter la conformation *cis* plus stable¹³ et l'efficacité de la réaction de cycloaddition peut être impactée lors de l'utilisation de tétrazines peu réactives. En 2010, Dommerholt *et al.* ont développé un nouveau diénophile de type cyclooctyne: le bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN).¹⁴ Cet alcyne cyclique contraint est légèrement moins réactif que le TCO mais possède l'avantage de ne pas s'isomériser.

⁹ Lang, K.; Davis, L.; Wallace, S.; Mahesh, M.; Cox, D. J.; Blackman, M. L.; Fox, J. M.; Chin, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317–10320

¹⁰ Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2263–2270

¹¹ Lang, K.; Davis, L.; Torres-Kolbus, J.; Chou, C.; Deiters, A.; Chin, J. W. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298–304

¹² Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047

¹³ Rossin, R.; van den Bosch, S. M.; ten Hoeve, W.; Carvelli, M.; Versteegen, R. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1210–1217

¹⁴ Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425

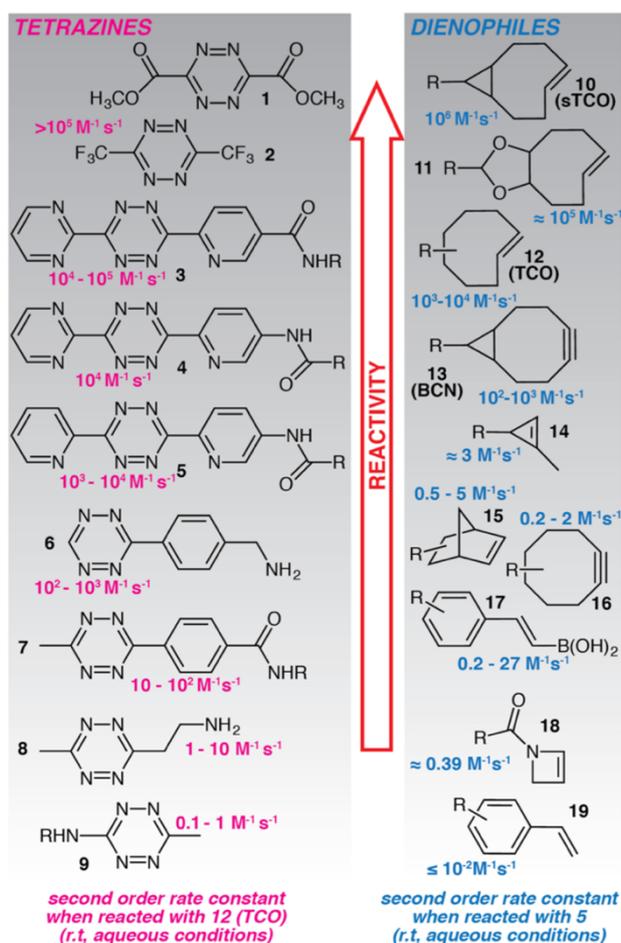


Figure 66. Aperçu des tétrazines et alcènes ou alcynes cycliques contraints les plus couramment utilisés pour la réaction de IEDDA. Les constantes de vitesses indiquées correspondent aux réactions des diènes et des diénophiles, avec le TCO et la 3,6-bis(pyrimidyl)-1,2,4,5-tétrazine respectivement ; figure adaptée de revue.⁵

1.2. Aperçu des diverses applications de la réaction de IEDDA

Cette réaction est très appréciée dans le domaine de la thérapie et de l'imagerie médicale pour réaliser la modification régiospécifique de biomolécules par diverses molécules organiques (agents imageants, cytotoxiques, solubilisants...). Depuis le premier essai réussi de bioconjugaison entre une 3,6-bis(pyrimidyl)-1,2,4,5-tétrazine et la thiorédoxine modifiée par un *trans*-cyclooctène,¹⁵ un nombre considérable d'études ont décrit l'utilisation de cette réaction de IEDDA pour diverses applications. Cette approche a notamment permis, *via* la modification d'anticorps, l'obtention de radiotraceurs très efficaces pour le ciblage de tumeurs *in vivo*.¹⁶ Les propriétés exceptionnelles de cette réaction de *click* sont particulièrement appréciées pour la synthèse d'agents imageants radioactifs. En effet, la bioconjugaison de molécules préalablement radiomarquées peut être effectuée en quelques minutes *via* cette réaction (**schéma 2**).¹⁷ Cette approche astucieuse évite de devoir réaliser le radiomarquage en présence de la protéine vectrice et diminue ainsi le risque de

¹⁵ Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518–13519

¹⁶ Zeglis, B. M.; Mohindra, P.; Weissmann, G. I.; Divilov, V.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Lewis, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 2048–2059

¹⁷ Poty, S.; Membreno, R.; Glaser, J. M.; Ragupathi, A.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 2599–2602

dégradation, tout en autorisant les conditions parfois drastiques utilisées pour l'introduction du radioélément.^{18, 19} De plus, contrairement aux fonctions de greffage classiques (ester de succinimidyle, isothiocyanate, ...), les fonctions diène et diénophile présentent l'avantage d'être suffisamment stables pour supporter les conditions de radiomarquage.¹⁷

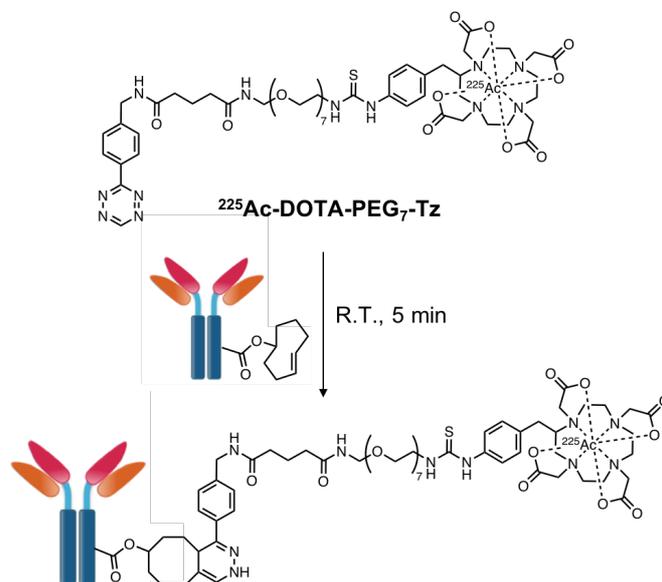


Schéma 2. Exemple de synthèse de radiotracteur obtenu *via* la réaction IEDDA d'un chélateur préalablement radiomarké fonctionnalisé par une 1,2,4,5-tétrazine sur un anticorps modifié par un TCO ; figure adaptée d'article.¹⁷

De par son caractère bioorthogonal, cette réaction peut être effectuée au sein même d'organismes vivants, permettant notamment la visualisation de processus biologiques *in cellulo* par imagerie optique. Par ailleurs, un phénomène photophysique intéressant a été mis en évidence par le groupe de Devaraj ; l'introduction de la tétrazine sur une sonde fluorescente émettant entre 510 et 570 nm fait fortement décroître le signal fluorescent émis. Par la suite, les propriétés spectrales du fluorophore peuvent être recouvrées par réaction d'un diénophile sur la tétrazine. Ces fluorophores dérivés par une tétrazine constituent ainsi des sondes optiques *off/on* capables de générer un signal fluorescent *in situ*.^{20, 21} Cette propriété a été exploitée en particulier pour la visualisation *in vitro* d'acides nucléiques très peu abondants où il est nécessaire d'augmenter au maximum le ratio signal/bruit de fond.^{22, 23, 24}

En imagerie préclinique également, la réaction de IEDDA a été utilisée pour des applications de préciblage (« *pretargeting* » en anglais ; **figure 67**). Une molécule vectrice fonctionnalisée par un groupement réactif bioorthogonal est d'abord administrée par injection intraveineuse. Après accumulation de ce premier composé dans la zone d'intérêt, une sonde imageante fonctionnalisée

¹⁸ Albu, S. A.; Al-Karmi, S. A.; Vito, A.; Dzandzi, J. P. K.; Zlitni, A.; Beckford-Vera, D.; Blacker, M.; Janzen, N.; Patel, R. M.; Capretta, A.; Valliant, J. F. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 207–216

¹⁹ Liu, S.; Hassink, M.; Selvaraj, R.; Yap, L.-P.; Park, R.; Wang, H.; Chen, X.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti, P. S. *Mol. Imaging.* **2013**, *12*, 121–128

²⁰ Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *122*, 2931–2934

²¹ Devaraj, N. K.; Weissleder, R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816–827

²² Wu, H.; Cisneros, B. T.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17942–17945

²³ Seckute, J.; Yang, J.; Devaraj, N. K. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e148

²⁴ Werther, P.; Möhler, J. S.; Wombacher, R. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23*, 18216–18224

par le second partenaire bioorthogonal est injectée. Grâce à la bioorthogonalité de la réaction de IEDDA, l'émetteur va s'accumuler exclusivement dans la zone ciblée. Cette stratégie de ciblage en deux étapes est surtout utilisée pour les diagnostics par imagerie nucléaire car elle rend possible l'utilisation d'un vecteur possédant une pharmacocinétique lente (tel qu'un anticorps), en combinaison avec un radioélément à décroissance rapide ou très radiotoxique.^{25, 26, 27} Pour cette même raison, les méthodes comportant une étape de préciblage sont de plus en plus utilisées en radioimmunothérapie.²⁸

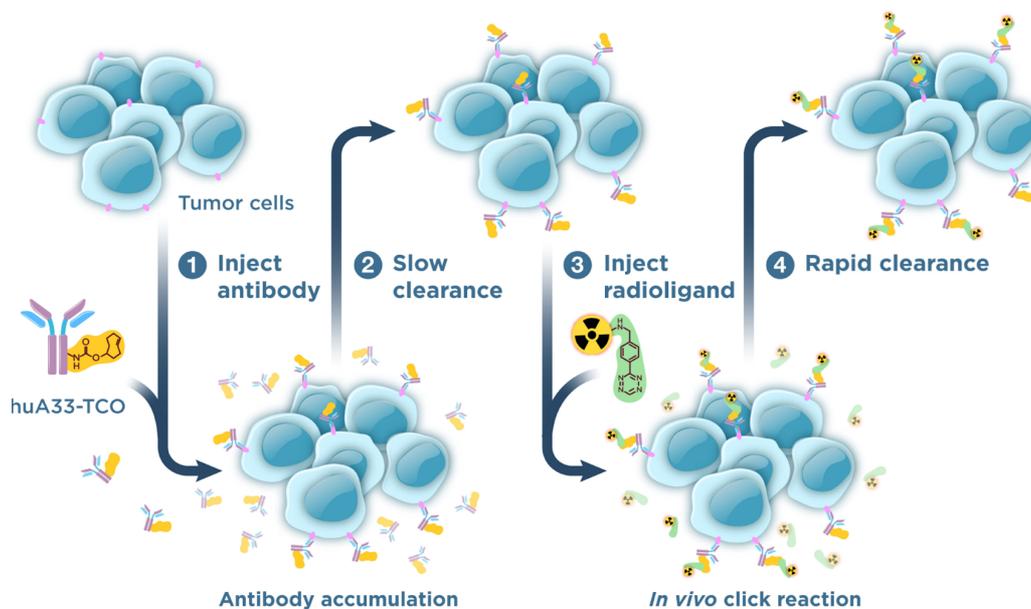


Figure 67. Schéma représentant l'approche de *pretargeting* ; figure extraite de revue.²⁷

I.3. Les différentes techniques permettant l'obtention de dérivés cliquables

Avec le développement de ces diverses applications, des techniques efficaces ont dû être élaborées, permettant l'introduction des fonctions réactives pour la réaction *click* sur les biomolécules vectrices d'une part, et sur les groupements d'intérêt d'autre part. Il est possible de contrôler la position et le nombre de molécules organiques introduites sur la protéine, *via* différentes méthodes permettant l'introduction d'une ancre *click* à l'endroit souhaité de la séquence protéique (voir Introduction, Partie III.).^{29, 30, 31, 32} En particulier, il existe désormais une large variété d'acides aminés non naturels,

²⁵ Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulders, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3375–3378

²⁶ Denk, C.; Svatunek, D.; Mairinger, S.; Stanek, J.; Filip, T.; Matscheko, D.; Kuntner, C.; Wanek, T.; Mikula, H. *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 1707–1712

²⁷ Meyer, J.-P.; Houghton, J. L.; Kozlowski, P.; Abdel-Atti, D.; Reiner, T.; Pillarsetty, N. V. K.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 298–301

²⁸ Shah, M. A.; Zhang, X.; Rossin, R.; Robillard, M. S.; Fisher, D. R.; Buelmann, T.; Hoeben, F. J. M.; Quinn, T. P. *Bioconjugate Chem.* **2017**, 28, 3007–3015

²⁹ Umlauf, B. J.; Mix, K. A.; Grosskopf, V. A.; Raines, R. T.; Shusta, E. V. *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29, 1605–1613

³⁰ Borrmann, A.; Milles, S.; Plass, T.; Dommerholt, J.; Verkade, J. M. M.; Wiessler, M.; Schultz, C.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L.; Lemke, E. A. *ChemBioChem* **2012**, 13, 2094–2099

³¹ Seitchik, J. L.; Peeler, J. C.; Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Rhoads, T. W.; Cooley, R. B.; Refakis, C.; Fox, J. M.; Mehl, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 2898–2901

³² Muttach, F.; Muthmann, N.; Reichert, D.; Anhäuser, L.; Rentmeister, A. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 7947–7953

portant des fonctions alcènes ou alcynes contraints ou des 1,2,4,5-tétrazines sur leur chaîne latérale, qui peuvent être incorporés à des protéines recombinantes par expansion du code génétique (**figure 68**).³

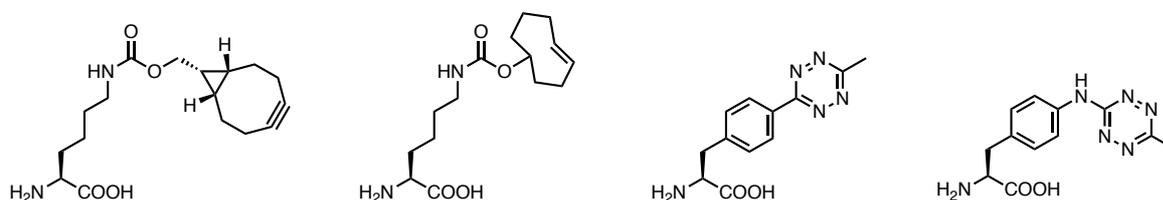


Figure 68. Quelques exemples d'acides aminés non naturels qui ont été introduits par encodage génétique pour des applications en IEDDA

La synthèse de molécules organiques cliquables et plus particulièrement de sondes imageantes cliquables peut être effectuée selon différentes stratégies.

Une méthode efficace mais très peu modulable consiste en la formation du cycle tétrazine à partir d'un marqueur imageant fonctionnalisé par un groupement nitrile. Grâce à cette stratégie, l'équipe de Weissleder a pu élaborer le premier et unique exemple de sonde bimodale optique/nucléaire cliquable basée sur le motif tétrazine.³³ La synthèse débute par la formation d'une tétrazine par ajout d'hydrazine et d'acétonitrile au *para*-cyanophenyl-BODIPY. Un chélateur linéaire habituellement utilisé pour la complexation du ⁸⁹Zr, la déféroxamine, est ensuite introduit en trois étapes sur l'atome de bore du BODIPY (**figure 69. A**). La molécule obtenue est fluorogénique et sa conjugaison à une biomolécule vectrice par IEDDA a pu être suivie par détection de l'augmentation du signal fluorescent du BODIPY (**figure 69. B**). Cette stratégie élégante permet l'obtention d'agents imageants bimodaux vectorisés, cependant la synthèse est longue et n'est pas nécessairement facile à transposer à d'autres familles d'agents imageants.

³³ Meimetis, L. G.; Boros, E.; Carlson, J. C.; Ran, C.; Caravan, P.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 257–263

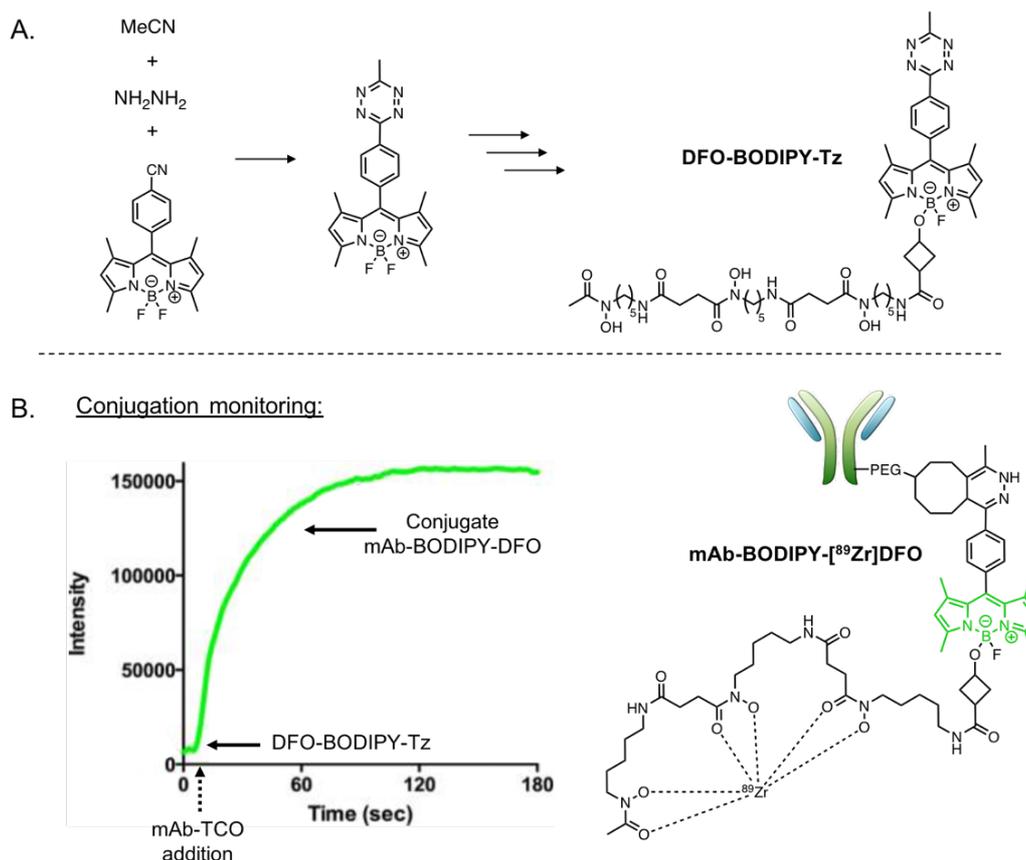


Figure 69. A. Schéma simplifié de l'élaboration de la sonde bimodale cliquable DFO-BODIPY-Tz ; B. Suivi de l'étape de bioconjugaison par fluorescence et structure de l'agent imageant bimodal après radiomarquage ; figure adaptée d'article.³³

Par ailleurs, de nombreux fluorophores ont été fonctionnalisés par la tétrazine *via* des couplages carbone-carbone métallo-catalysés. Cette approche a été largement développée car elle permet de conjuguer les systèmes pi de la tétrazine et du fluorophore et est donc particulièrement adaptée à la formation de sondes fluorogéniques. Les couplages pallado-catalysés sont les plus fréquemment utilisés,^{34, 35, 36, 37,38} mais des métaux comme le zinc, le cuivre, l'étain ou l'aluminium ont également été employés.^{3, 39} Très efficace pour la synthèse de sondes *on/off*, cette stratégie nécessite cependant des conditions parfois drastiques (chauffage jusqu'à 200°C dans certains cas) et les précurseurs mis en jeu sont parfois assez difficiles à synthétiser (triples liaisons, borate, halogénure de zinc, lithien, dérivés iodure, dérivés alkylés d'étain, triflate, mésylate...). De plus, lors de synthèses de sondes nucléaires à base de chélateurs, l'utilisation de certains catalyseurs métalliques peut générer la coordination parasite de métal non radioactif, au détriment de la complexation du radioisotope.

³⁴ Wu, H.; Yang, J.; Šečutė, J.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 126, 5915–5919

³⁵ Knorr, G.; Kozma, E.; Herner, A.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. – Eur. J.* **2016**, 22, 8972–8979

³⁶ Knorr, G.; Kozma, E.; Schaart, J. M.; Németh, K.; Török, G.; Kele, P. *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29, 1312–1318

³⁷ Kormos, A.; Koehler, C.; Fodor, E. A.; Rutkai, Z. R.; Martin, M. E.; Mező, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. – Eur. J.* **2018**, 24, 8841–8847

³⁸ Meimetis, L. G.; Carlson, J. C. T.; Giedt, R. J.; Kohler, R. H.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 7531–7534

³⁹ Wiczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 1506–1510

Actuellement, la méthode la plus pratique et versatile permettant l'obtention de sondes imageantes cliquables, consiste à l'introduction de tétrazines ou d'alcènes/alcynes contraints par formation de liaisons amide ou carbamate. Cette approche est très utilisée car les fonctions réactives mises en jeu sont standards (amine, acide carboxylique, ester de *N*-hydroxysuccinimidyle, carbonate de succinimidyle, carbonate de *p*-nitrophényle, ...) et il existe un grand nombre de précurseurs (aussi bien sonde imageante que partenaire cliquable) disponibles commercialement à des prix abordables (**figure 70**). Cette voie de synthèse est néanmoins limitée pour l'obtention de sondes imageantes bimodales où l'utilisation d'une plateforme complémentaire est alors nécessaire pour permettre l'agencement des différentes sondes imageantes.

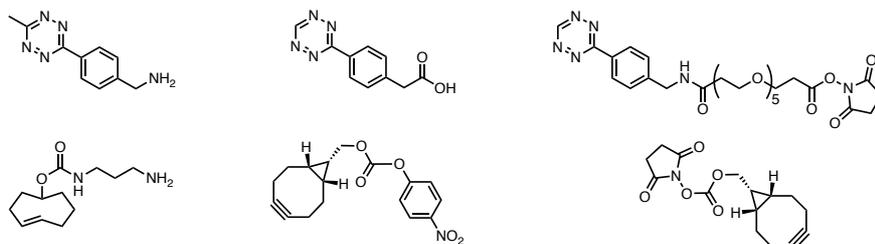


Figure 70. Quelques exemples de précurseurs commerciaux classiquement utilisés pour obtenir des dérivés cliquables à partir des sondes imageantes.

I.4. La dichlorotétrazine : un précurseur efficace

La stratégie sur laquelle nous nous sommes appuyés durant ma thèse est encore assez peu développée mais semble pourtant très prometteuse. Elle est basée sur la fonctionnalisation de la 3,6-dichlorotétrazine et a d'ores et déjà permis l'élaboration de sondes fluorescentes ou nucléaires. Initialement, la dichlorotétrazine a été utilisée comme précurseur dans la synthèse de tétrazines non symétriques.^{40, 41, 42} En effet, l'un des atomes de chlore de la dichlorotétrazine peut être substitué par divers nucléophiles, tels que des amines, des alcools ou des thiols, *via* un mécanisme de substitution nucléophile aromatique (S_NAr ; **figure 71. A**). Ainsi, en 2009, l'équipe de P. Audebert a mis au point les conditions de substitution par des nucléophiles de type alcool (**figure 71. B**)^{43, 44} et a pu obtenir différents dérivés tétrazine de BODIPY *via* la monosubstitution de la dichlorotétrazine par des BODIPY-phénols (**figure 71. C**).⁴⁵ Un peu plus tard, le protocole a été repris par une équipe canadienne pour obtenir une chlorotétrazine dérivée par un atome de fluor-18 utilisable pour la modification régiospécifique de biomolécules et permettant ainsi la synthèse d'agents vectorisés pour l'imagerie TEP (**figure 71. D**).⁴⁶ L'approche a également été utilisée récemment pour introduire une tétrazine sur une sonde proche infrarouge, le BF_2 -azadipyrométhène (**figure 71. E**).⁴⁷

⁴⁰ Chavez, D. E.; Hiskey, M. A. *J. Energ. Mater.* **1999**, 17, 357–377

⁴¹ Kotschy, A.; Novák, Z.; Bostai, B.; Csékei, M.; Lőrincz, K. *Heterocycles.* **2003**, 60, 2653–2668

⁴² Gong, Y.-H.; Audebert, P.; Tang, J.; Miomandre, F.; Clavier, G.; Badré, S.; Méallet-Renault, R.; Marrot, J. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, 592, 147–152

⁴³ Gong, Y.-H.; Miomandre, F.; Méallet-Renault, R.; Badré, S.; Galmiche, L.; Tang, J.; Audebert, P.; Clavier, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 6121–6128

⁴⁴ Clavier, G.; Audebert, P. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3299–3314

⁴⁵ Dumas-Verdes, C.; Miomandre, F.; Lépicier, E.; Galangau, O.; Vu, T. T.; Clavier, G.; Méallet-Renault, R.; Audebert, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 2525–2535

⁴⁶ Zhu, J.; Li, S.; Wängler, C.; Wängler, B.; Lennox, R. B.; Schirmmayer, R. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 12415–12418

⁴⁷ Wu, D.; O'Shea, D. F. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 10804–10807

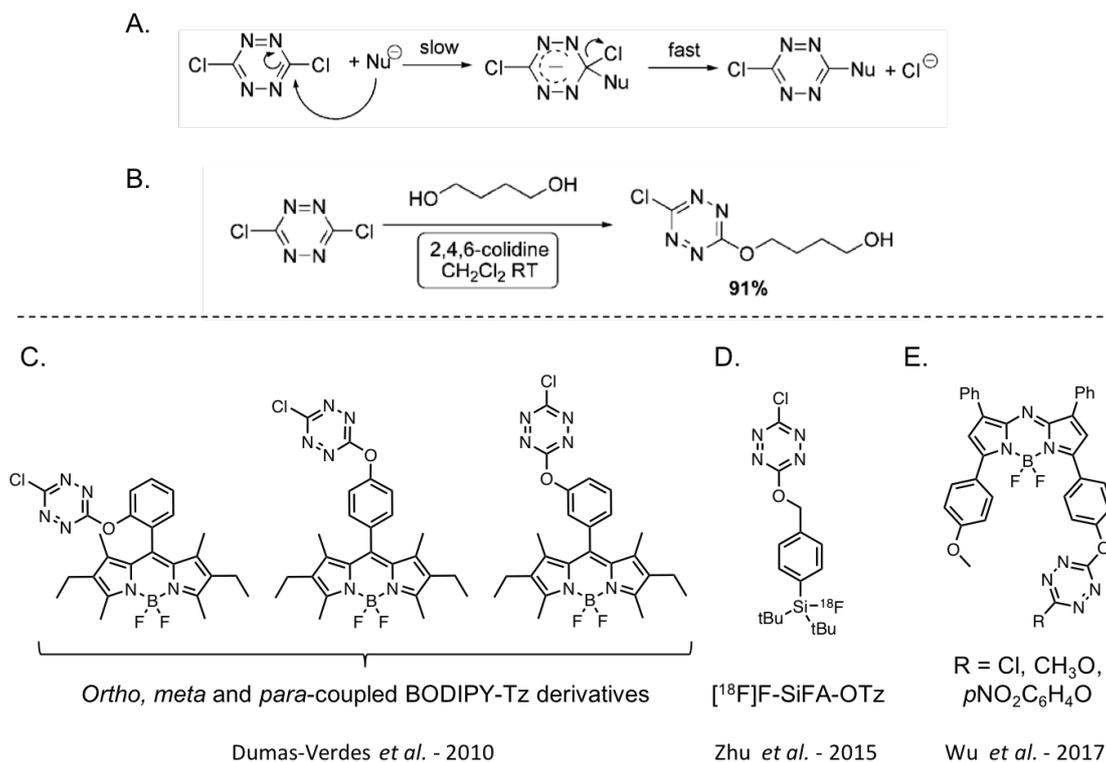


Figure 71. A. Mécanisme de la substitution nucléophile aromatique (S_NAr) d'un des atomes de chlore de la dichlorotétrazine par un nucléophile ; **B.** Conditions optimisées permettant la monosubstitution de la dichlorotétrazine par le butane-1,4-diol ; **C., D. et E.** Exemples de groupements imageants dérivés par la tétrazine obtenus grâce à la monosubstitution de la dichlorotétrazine.

La substitution des deux atomes de chlore de la dichlorotétrazine est également possible et plusieurs exemples sont décrits dans la littérature. L'équipe d'Audebert a ainsi obtenu une tétrazine disubstituée symétrique par introduction de deux BODIPY-phénols sur la dichlorotétrazine.⁴⁵ L'équipe de Hotha a également décrit l'obtention de tétrazines disubstituées dans une très jolie étude où le caractère de plateforme trivalente de la dichlorotétrazine est mis en avant.⁴⁸ La substitution successive des deux atomes de chlore de la dichlorotétrazine est réalisée à 25 °C en une dizaine de minutes par un dérivé de glucose peracétylé fonctionnalisé par un thiol puis par le résidu cystéine d'un tri-peptide. La tétrazine disubstituée obtenue est capable de réagir avec un diénoophile tel que le norbornène, permettant l'introduction d'un marqueur fluorescent (**figure 72**). Ainsi, grâce à sa réactivité particulière, la dichlorotétrazine a rendu possible la combinaison de trois groupements différents par trois réactions successives simples.

⁴⁸ Rao, B. V.; Dhokale, S.; Rajamohanam, P. R.; Hotha. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 10808–10810

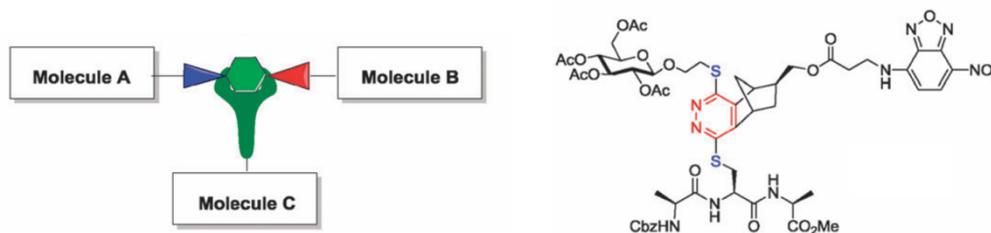


Figure 72. Représentation schématique d'une tétrazine trifonctionnée par trois molécules A, B et C ; structure d'un des composés obtenus grâce à l'utilisation de la dichlorotétrazine comme plateforme trivalente ; figure adaptée d'article.⁴⁸

Le choix approprié des nucléophiles constitue une étape essentielle pour pouvoir accomplir efficacement la double réaction de S_NAr . Comme vu précédemment, la substitution d'un seul des atomes de chlore de la dichlorotétrazine peut être effectuée relativement aisément, à température ambiante, par les amines, les alcools ou les thiols. En revanche, comme le montrent plusieurs études, la substitution du second atome de chlore est plus difficile et nécessite l'utilisation de nucléophiles assez puissants. Ce phénomène est dû à l'apport électronique fourni par l'introduction du premier nucléophile. Les thiols sont ainsi capables de réaliser la double substitution en quelques dizaines de minutes à température ambiante,^{41, 48} alors que les amines ou les alcools requièrent des conditions de réactions plus drastiques, ce qui peut dans certain cas provoquer la dégradation des composés mis en jeu.^{42, 43} Il est à noter que lorsque le premier atome de chlore a été substitué par un thiol, la substitution du second chlore par des nucléophiles plus doux, tels que des alcools, est facilitée.⁴³ La diminution de la réactivité de la seconde substitution par rapport à la première peut se révéler un atout lorsque la dichlorotétrazine est utilisée comme plateforme puisqu'elle génère une certaine orthogonalité entre les deux réactions.

Le type de nucléophile utilisé pour accomplir les S_NAr va également influencer la réactivité de l'hétérocycle tétrazine vis-à-vis de la réaction de *click*. Lorsque les substituants introduits sont riches en électrons, la densité électronique de la tétrazine est accrue, l'énergie de la LUMO sera donc supérieure et la vitesse de la IEDDA amoindrie (**figure 73**). Par conséquent, afin que la tétrazine puisse jouer son rôle de plateforme trivalente, les nucléophiles mis en jeu doivent être judicieusement choisis.

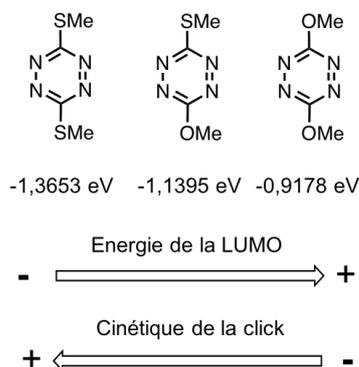


Figure 73. Influence de la nature des substituants de la tétrazine sur la cinétique de la réaction de IEDDA ; figure adaptée de revue.³

I.5. Présentation du projet

En se basant sur ces différentes études, nous avons cherché à savoir si la plateforme trivalente que constitue la dichlorotétrazine pouvait être utilisée pour réaliser la double modification site-spécifique de biomolécules. En effet, dans les travaux de S. Hotha, le caractère bioorthogonal de la réaction d'IEDDA n'est pas vraiment mis à profit et la réaction de *click* n'est considérée que comme une simple réaction orthogonale par rapport aux deux S_NAr qui la précèdent. Nous nous sommes donc demandés si la dichlorotétrazine pouvait être utilisée plus astucieusement, pour greffer sélectivement deux groupements d'intérêt sur une fonction cliquable préalablement introduite sur une protéine (**figure 74**).

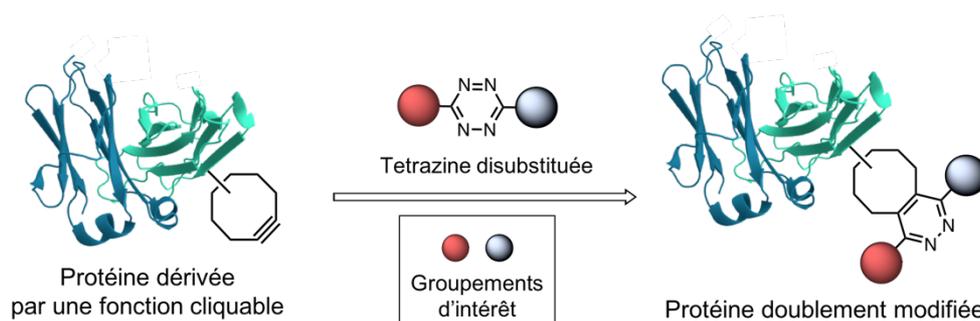


Figure 74. Double modification site-spécifique d'une biomolécule par une tétrazine préalablement bifonctionnalisée par deux groupements d'intérêt.

L'avantage de cette approche par rapport aux différentes plateformes trivalentes présentées dans l'introduction, réside dans sa simplicité. En effet, le greffage régiospécifique de la biomolécule est assurée par la plateforme elle-même, et le nombre d'étapes nécessaires pour obtenir le composé désiré est donc considérablement réduit. De plus, la 3,6-dichloro-1,2,4,5-tétrazine est disponible commercialement à un prix très raisonnable (une centaine d'euros pour un gramme) et les groupements d'intérêt mis en jeu doivent simplement présenter une fonction nucléophile capable d'effectuer la S_NAr .

L'imagerie moléculaire bimodale constitue une application évidente à cette stratégie innovante de bioconjugaison et nous avons mis en évidence la viabilité de notre approche par la synthèse d'agents imageant bimodaux optique/nucléaire vectorisés. Il faut cependant garder à l'esprit que la grande modularité de notre stratégie la rend applicable aux nombreux domaines nécessitant la double modification régiosélective de protéines. Par exemple, dans le domaine de la thérapie ciblée, elle pourrait faciliter l'élaboration d'agents théranostiques ou d'agents cytotoxiques bivalents.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

Les travaux réalisés durant ma thèse ont permis la mise au point de la stratégie de bioconjugaison schématisée dans la **figure 75**.

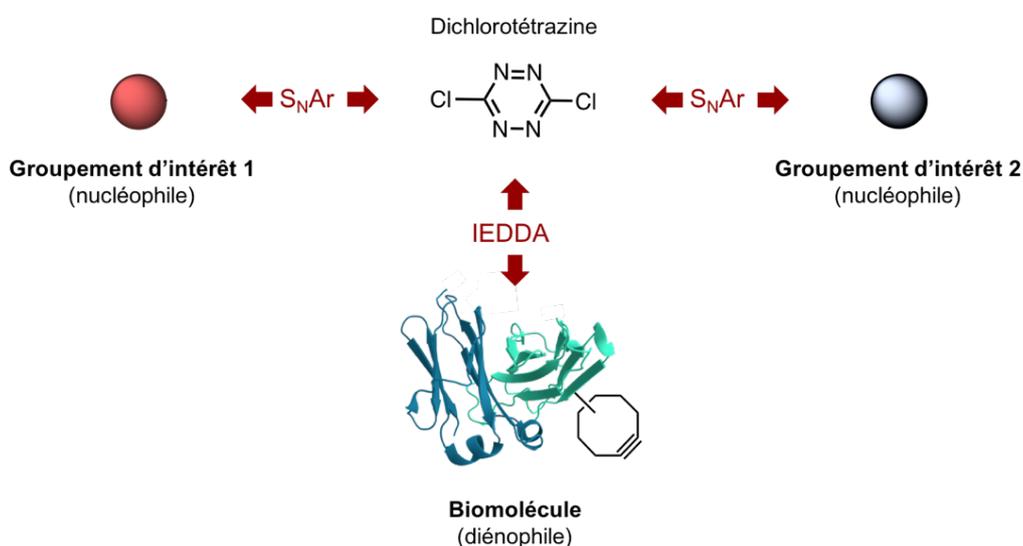


Figure 75. Schéma général présentant les trois fonctionnalisations successives de la plateforme dichlorotétrazine.

Celle-ci fait intervenir trois étapes que nous avons étudiées séquentiellement. Le choix des fonctions nucléophiles engagées et les conditions réactionnelles utilisées pour les trois fonctionnalisations successives ont été optimisés dans l'optique d'obtenir un agent imageant bimodal vectorisé.

II.1. Mise au point des conditions des deux réactions de S_NAr

Au regard de la littérature, les alcools nous ont semblés trop peu nucléophiles pour permettre une double substitution rapide et efficace. Au contraire, les thiols paraissent trop réactifs, le produit de monosubstitution pouvant s'avérer difficile à isoler en raison de la substitution spontanée du second atome de chlore. Pour ces raisons et afin de faciliter au maximum la synthèse des précurseurs, nous avons décidé de réaliser la première S_NAr par un nucléophile de type amine. En effet, les sondes imageantes (et plus généralement les groupements d'intérêt) fonctionnalisées par une amine sont couramment utilisées et sont donc assez souvent disponibles commercialement.

La première fonctionnalisation de la dichlorotétrazine a donc été réalisée par des chélateurs macrocycliques fonctionnalisés par des groupements amines primaires, commercialement disponibles auprès de la société CheMatech : le DOTAGA-NH₂ et le (*R*)-NODAGA-NH₂ (**schéma 3**). Le macrocycle DOTAGA est un dérivé bifonctionnel de l'acide 1,4,7,10-tétra-azacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique, également appelé DOTA. Il est capable de complexer très efficacement différents radiométaux tels que l'indium-111 pour l'imagerie TEMP, l'yttrium-86 pour l'imagerie TEP, le lutétium-177 et l'yttrium-90 pour des applications en radiothérapie. Le NODAGA est un dérivé

bifonctionnel de l'acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique, également appelé NOTA. Ce macrocycle est adapté à la complexation du cuivre-64 et du gallium-68 pour l'imagerie TEP, ou du gallium-67 pour la TEMP. La faible solubilité des composés macrocycliques dans les solvants organiques nous a amenés à réaliser la réaction dans un mélange tampon borate 0.5 M à pH 8 / MeCN (80 : 20, v/v) afin de solubiliser les deux réactifs. Les composés **1** et **2** ont été obtenus sans difficulté en quelques heures à température ambiante.

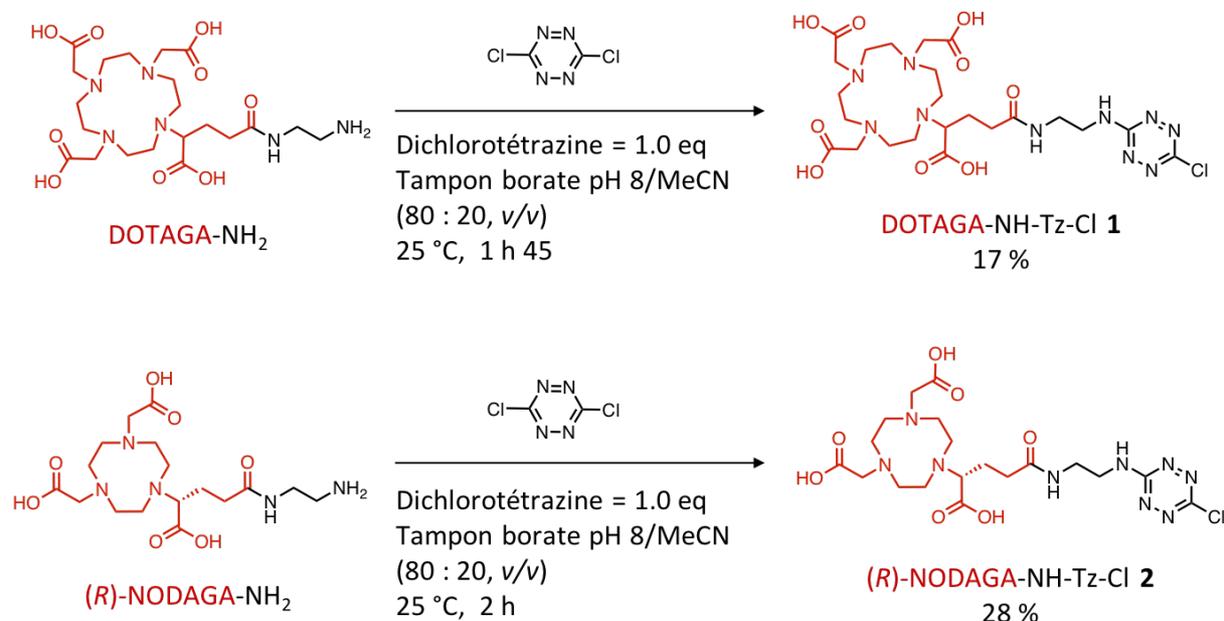


Schéma 3. Schéma réactionnel de la réaction de S_NAr du premier atome de chlore de la dichlorotétrazine par les macrocycles DOTAGA-NH₂ et (R)-NODAGA-NH₂.

Dans le but d'obtenir un agent imageant bimodal nucléaire/optique nous avons tenté d'effectuer la substitution du second atome de chlore par un agent fluorescent émettant dans le proche infrarouge. La rhodamine B, un fluorophore très peu coûteux émettant dans le visible aux alentours de 550 nm, a été utilisée pour réaliser les tests préliminaires et déterminer le nucléophile le plus approprié pour cette étape. Des dérivés nucléophiles, amine (**3**) et thiol (**4**), de la rhodamine B ont été synthétisés par couplage peptidique de l'éthylènediamine ou de la cystéamine (**schéma 4. A**).

Les composés **3** et **4** ont ensuite été mis en présence de la tétrazine monosubstituée par le DOTAGA (**1** ; **schéma 4. B**). Comme attendu, la seconde S_NAr par un nucléophile de type amine s'est avérée difficile et n'a pu être accomplie en conditions douces. Le chauffage du milieu réactionnel pendant plusieurs heures, à 120 °C, a permis la formation du composé désiré (détecté par analyse RP-HPLC-LRMS du mélange réactionnel) mais au vu de la proportion considérable de produits de dégradation formés, nous avons rapidement abandonné cette approche.

La seconde substitution a par contre pu être effectuée en 3 h à 75 °C par le composé soufré Rhodamine B-SH, plus nucléophile. La tétrazine disubstituée correspondante **5** a été isolée par RP-HPLC avec un rendement de 51 %.

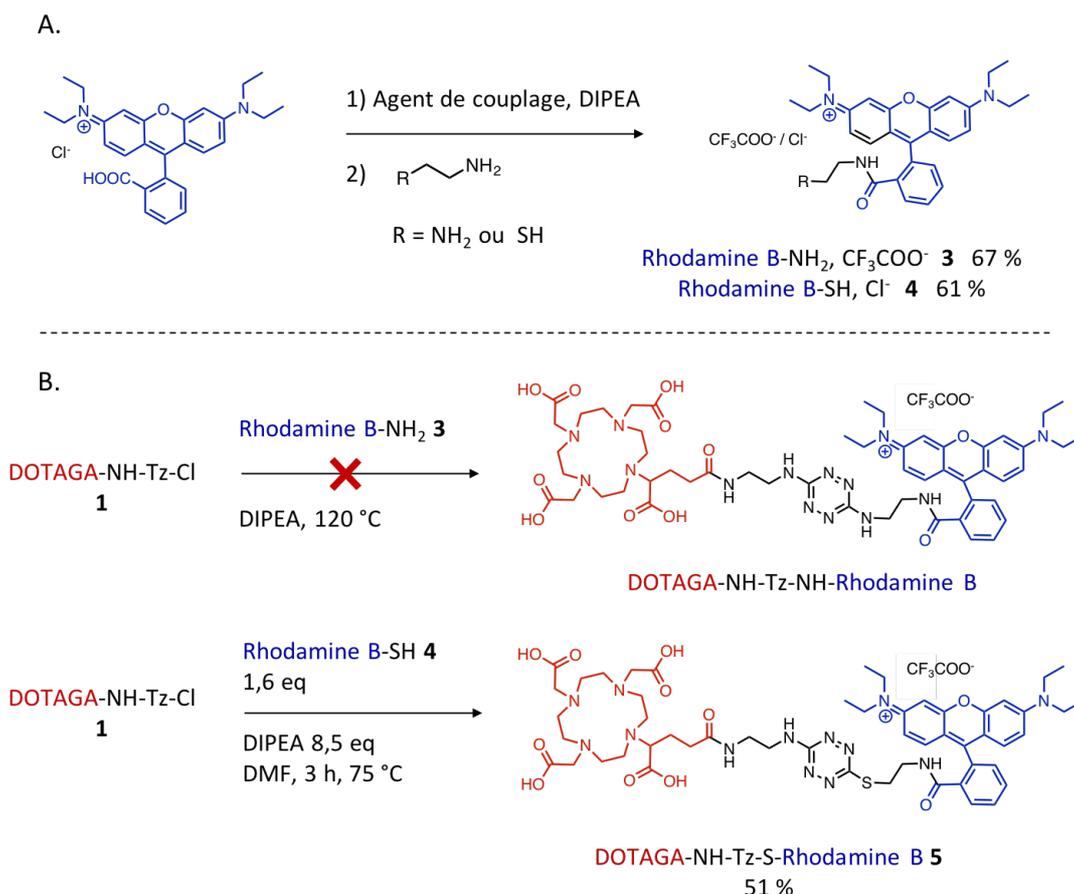


Schéma 4. A. Fonctionnalisation de la rhodamine B par l'éthylènediamine et la cystéamine ; B. Substitution de l'atome de chlore de la tétrazine monosubstituée **1** par les dérivés de rhodamine B (**3** et **4**)

II.2. Synthèse d'une série de tétrazines bifonctionnalisées

Afin d'évaluer la versatilité de la stratégie, nous avons synthétisé, en plus de **4**, des dérivés thiol (**6**, **7** et **8**) à partir de diverses molécules fluorescentes incluant un composé de la famille des bore-dipyrométhènes (BODIPY) et deux cyanines 5.0 portant, ou non, des groupements sulfonates hydrosolubilisants (**figure 76**). Les couplages peptidiques ont été réalisés *via* l'activation de l'acide carboxylique par les agents de couplage TSTU, HATU ou CDI. Un second protocole, basé sur le couplage de la cystamine suivi de la réduction du pont disulfure, a également été testé et a permis d'obtenir la cyanine 5.0 disulfonatée-SH **8** avec un meilleur rendement que *via* l'utilisation de la cystéamine.

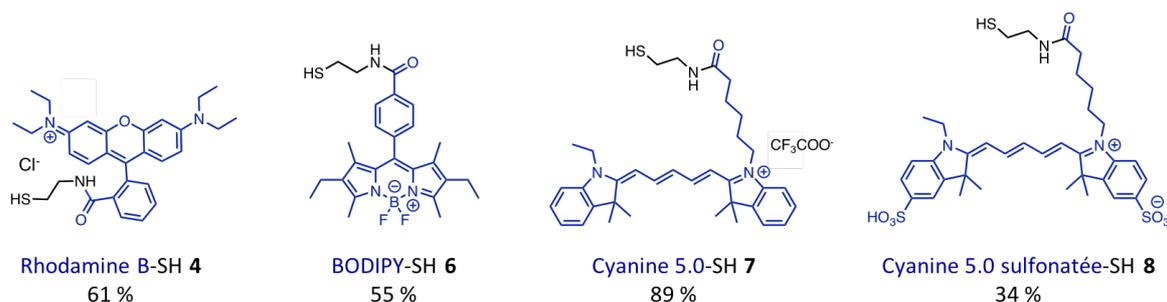


Figure 76. Structures et rendements de synthèse des dérivés thiol de fluorophores, synthétisés en vue de la seconde S_NAr de la dichlorotétrazine.

Cinq exemples de tétrazines bifonctionnalisées (**5**, **9**, **10**, **11** et **12**) ont ainsi pu être obtenues à partir de l'introduction en deux étapes successives de deux sondes imageantes sur la dichlorotétrazine (**figure 77**). Les fluorophores ayant une forte valeur ajoutée, les quantités de précurseurs engagés étaient assez restreintes et les rendements pourraient sans aucun doute être améliorés en augmentant l'échelle de la réaction.

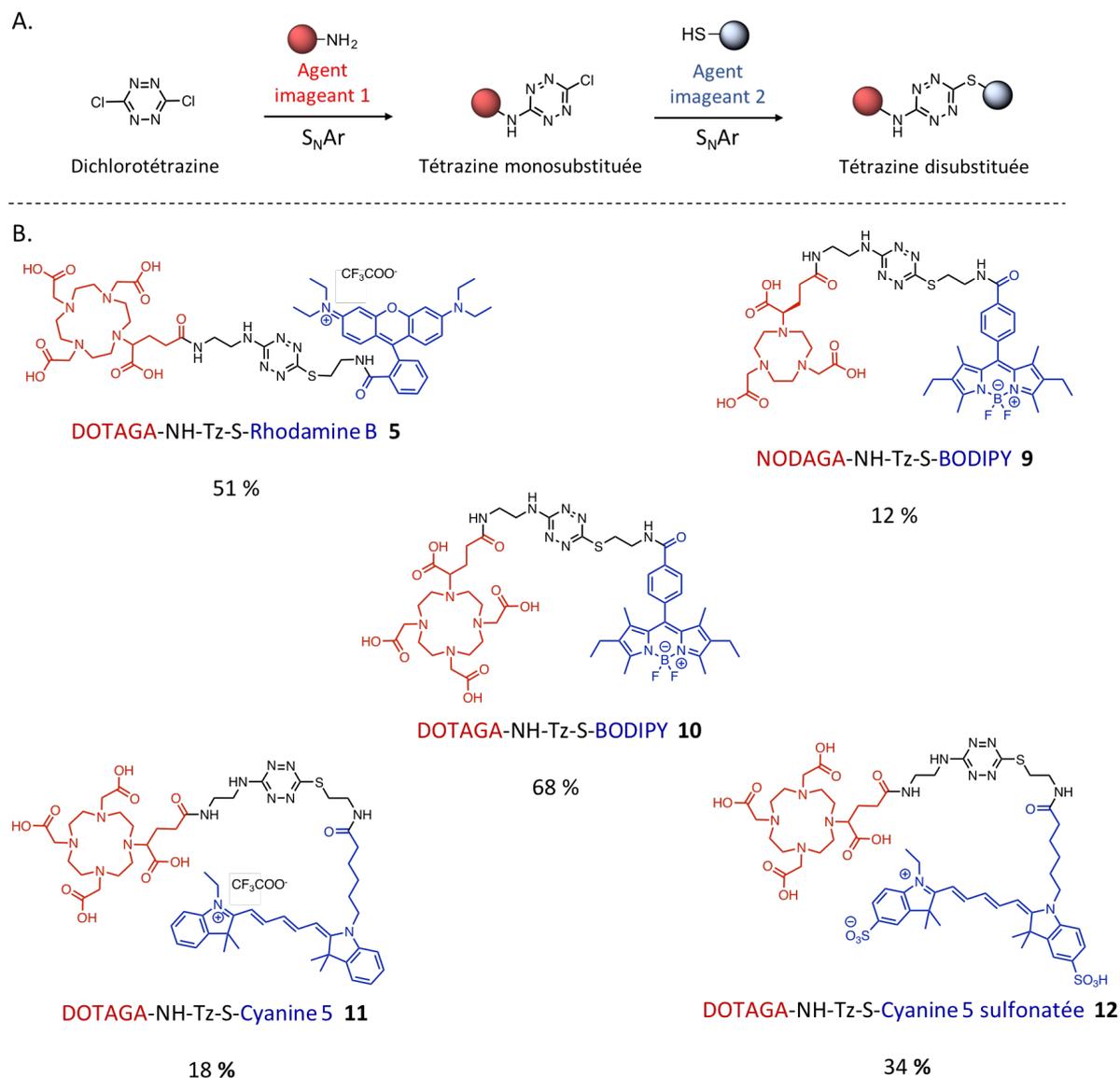


Figure 77. A. Schéma présentant les deux $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, successives et orthogonales, qui permettent la disubstitution de la tétrazine ; **B.** Structure des différentes tétrazines disubstituées obtenues et rendements correspondants.

La tétrazine bifonctionnée **12** constituée du macrocycle DOTAGA et de la cyanine 5 disulfonagée, a été sélectionnée pour la poursuite de l'étude. En effet, le DOTAGA permet la complexation de l'indium-111, un isotope possédant un temps de demi-vie assez long (2,8 jours). Ce macrocycle est donc tout à fait approprié pour le ciblage de tumeurs par des agents imageant possédant des pharmacocinétiques lentes, tels que les sondes vectorisées par un anticorps. Le fluorophore quant à lui, a été choisi pour ses propriétés spectrales attractives (maxima d'excitation et d'émission aux

alentours de 650 nm). La présence des groupements sulfonates est également un atout non négligeable pour faciliter l'étape de bioconjugaison, éviter l'agrégation du conjugué et augmenter son hydrosolubilité.

Avant d'entreprendre l'étape de bioconjugaison, nous avons décidé d'évaluer la stabilité de **12** dans l'eau pure. La proportion de composé intact a été mesurée par intégration du chromatogramme RP-HPLC à la longueur d'onde de détection de 214 nm. La tétrazine disubstituée s'est avérée être relativement stable, avec 80 % du composé intact après une nuit d'incubation à température ambiante. Cette étude préliminaire nous a permis d'évaluer la faisabilité de l'étape de bioconjugaison et nous avons conclu que la légère dégradation observée devrait pouvoir être compensée par la mise en jeu d'un excès de tétrazine disubstituée lors de la bioconjugaison.

II.3. Bioconjugaison régiospécifique à la protéine vectrice

La protéine choisie pour évaluer la faisabilité de l'étape de bioconjugaison est l'anticorps trastuzumab. Cet anticorps monoclonal possède une très forte affinité pour l'antigène HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) surexprimé par certaines lignées de cellules cancéreuses mammaires. Cette immunoglobuline G1 (IgG1) est actuellement utilisée en clinique pour traiter le cancer du sein.⁴⁹ Le trastuzumab est également reconnu pour son efficacité en tant qu'agent de diagnostic.⁵⁰

Afin d'obtenir une protéine capable de réagir avec la tétrazine par IEDDA, nous avons introduit une fonction bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) sur le trastuzumab. Pour ce faire, le trastuzumab a été mis en présence de 4 équivalents du composé commercial BCN-NHS. Après 1 h 45 d'incubation à 25 °C, l'excès de BCN-NHS a été éliminé par ultrafiltration sur une membrane de cellulose poreuse présentant un seuil de coupure à 30 kDa. L'analyse de l'anticorps modifié **13** par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de calculer un degré de modification (DOL) approximatif de 3,3 (**schéma 5**).

Paradoxalement, l'introduction de la fonction de *click* a été obtenue *via* le marquage aléatoire des fonctions amines du trastuzumab. Cependant, le but étant de montrer la faisabilité de la bioconjugaison par IEDDA, la non-régiospécificité de cette première étape n'est donc pas un problème. De plus, il a été montré que l'introduction de fonctions cliquables (telles que les *trans*-cyclooctènes ou les azotures) par marquage aléatoire des amines de l'anticorps, diminue très peu les propriétés ciblantes de ce dernier, même à des hauts degrés de modification.⁵¹

⁴⁹ Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 2012, 743193

⁵⁰ Dijkers, E. C.; Oude Munnink, T. H.; Kosterink, J. G.; Brouwers, A. H.; Jager, P. L.; de Jong, J. R.; van Dongen, G. A.; Schröder, C. P.; Lub-de Hooge, M. N.; de Vries, E. G. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, 87, 586–592

⁵¹ Rahim, M. K.; Kota, R.; Haun, J. B. *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 352–360

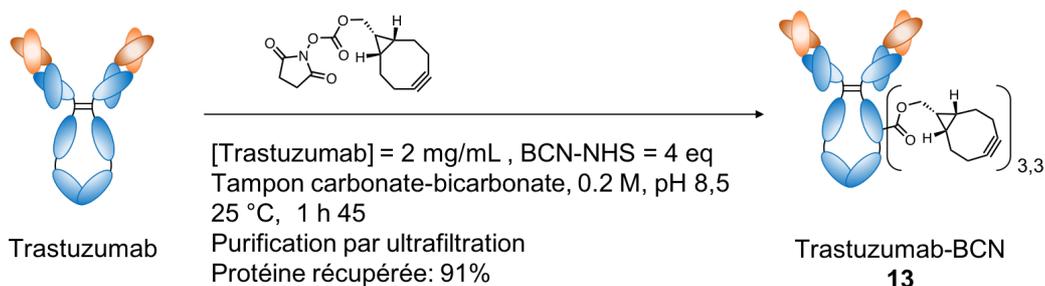


Schéma 5. Modification du trastuzumab par le BCN par greffage aléatoire sur les résidus lysines.

La double modification de l'anticorps a été réalisée en une étape par addition de 10 équivalents (par rapport au nombre de moles de BCN) de tétrazine disubstituée **12** sur le trastuzumab modifié **13** (**schéma 6**). Comme mentionné précédemment, l'introduction des hétéroatomes azote et soufre enrichit électroniquement l'hétérocycle tétrazine et diminue sa réactivité vis-à-vis de la *click*. Le greffage de notre sonde bimodale sur l'anticorps était donc assez lent et afin d'augmenter la cinétique de réaction, celle-ci a été conduite sur la nuit à 37 °C. L'élimination de l'excès de **12** par ultrafiltration n'a pas été possible due à la présence de fluorophores. En effet, les cyanines étant très apolaires, elles provoquent la fixation des anticorps marqués aux membranes du filtre, diminuant considérablement le rendement de la bioconjugaison. De façon logique, l'aptitude à l'adhérence des conjugués est d'autant plus forte pour les anticorps portant un grand nombre de cyanine greffées. L'étape d'ultrafiltration génère donc une diminution artificielle du degré de greffage. Pour éviter ces problèmes, l'anticorps doublement modifié **14** a été purifié par FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) sur une colonne de dessalage. L'éluant utilisé est le tampon AcONH_4 , 0,1 M, pH 5,8 au lieu du tampon phosphate car il a été observé précédemment que la présence d'ions phosphates pouvait générer la formation de colloïdes lors de l'étape de radiomarquage.^{52, 53}

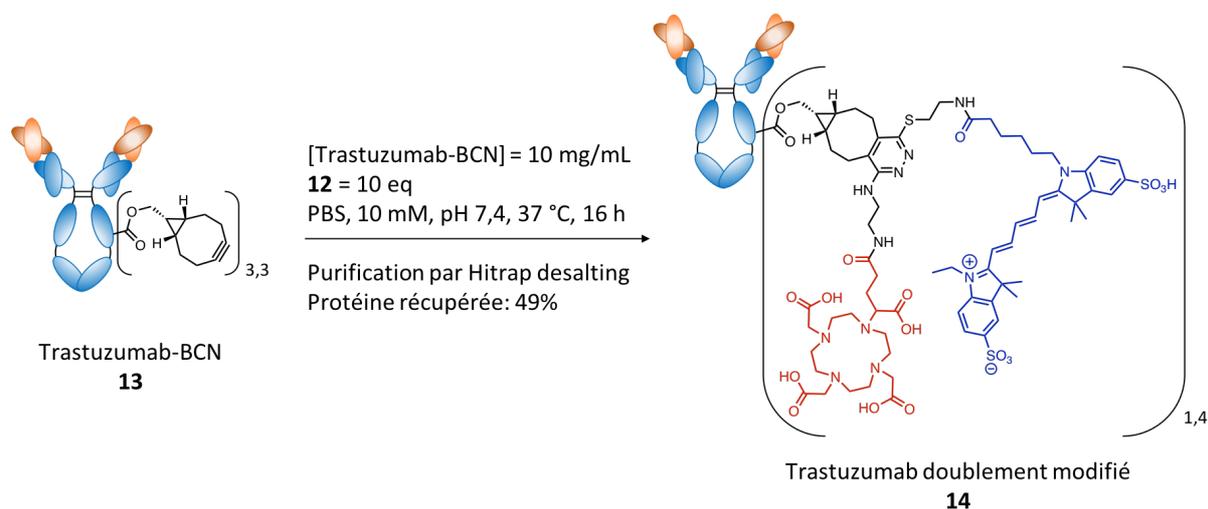


Schéma 6. Greffage régiospécifique de la tétrazine disubstituée **12** sur l'anticorps **13** par réaction de IEDDA.

Le spectre de masse par MALDI-TOF n'a pas permis le calcul précis du degré de greffage mais nous avons pu observer la présence de trois pics correspondant au trastuzumab marqué par zéro, une et deux tétrazines (**figure 78. A**). Cependant, grâce à l'absorbance du fluorophore, le taux de greffage a

⁵² Alvarez, J.; Arriaga, C. J. *Radioanal. Chem.* **1978**, 43, 295–300

⁵³ Sahu, S. K.; Kassis, A. I.; Makrigiorgos, G. M.; Baranowska-Kortylewicz, J.; Adelstein, S. J. *Radiat. Res.* **1995**, 141, 193–198

pu être calculé à partir du spectre UV-Visible du composé et correspondait à l'addition de 1,4 tétrazines (**figure 78. B**). Ces différentes analyses ont montré que moins de la moitié des groupements bicyclo[6.1.0]nonynes introduits sur l'anticorps avait effectivement réagi. Comme on l'a vu précédemment, la réactivité des tétrazines est sensible à l'encombrement stérique. Ainsi, suivant le site d'introduction du BCN sur la protéine, celui est plus ou moins accessible et donc plus ou moins susceptible de réagir avec la tétrazine.⁵¹

Le composé a également été évalué par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (**figure 78. C**). L'analyse du gel par fluorescence a montré l'absence de signal correspondant à la cyanine libre, ce qui prouve le caractère covalent de la liaison entre l'anticorps et la sonde fluorescente. Il s'agit d'un paramètre qu'il nous a semblé important de vérifier car les sondes fluorescentes proche-infrarouge sont connues pour leur capacité à s'adsorber fortement sur les protéines de façon non spécifique.⁵⁴ Enfin, la stabilité du conjugué a été évaluée après incubation à 37 °C dans du plasma humain. Des échantillons ont été prélevés à différents temps et analysés par SDS-PAGE. L'absence de relargage de fluorophore libre a montré que le composé était stable jusqu'à 48 h dans ces conditions (**figure 78. D**).

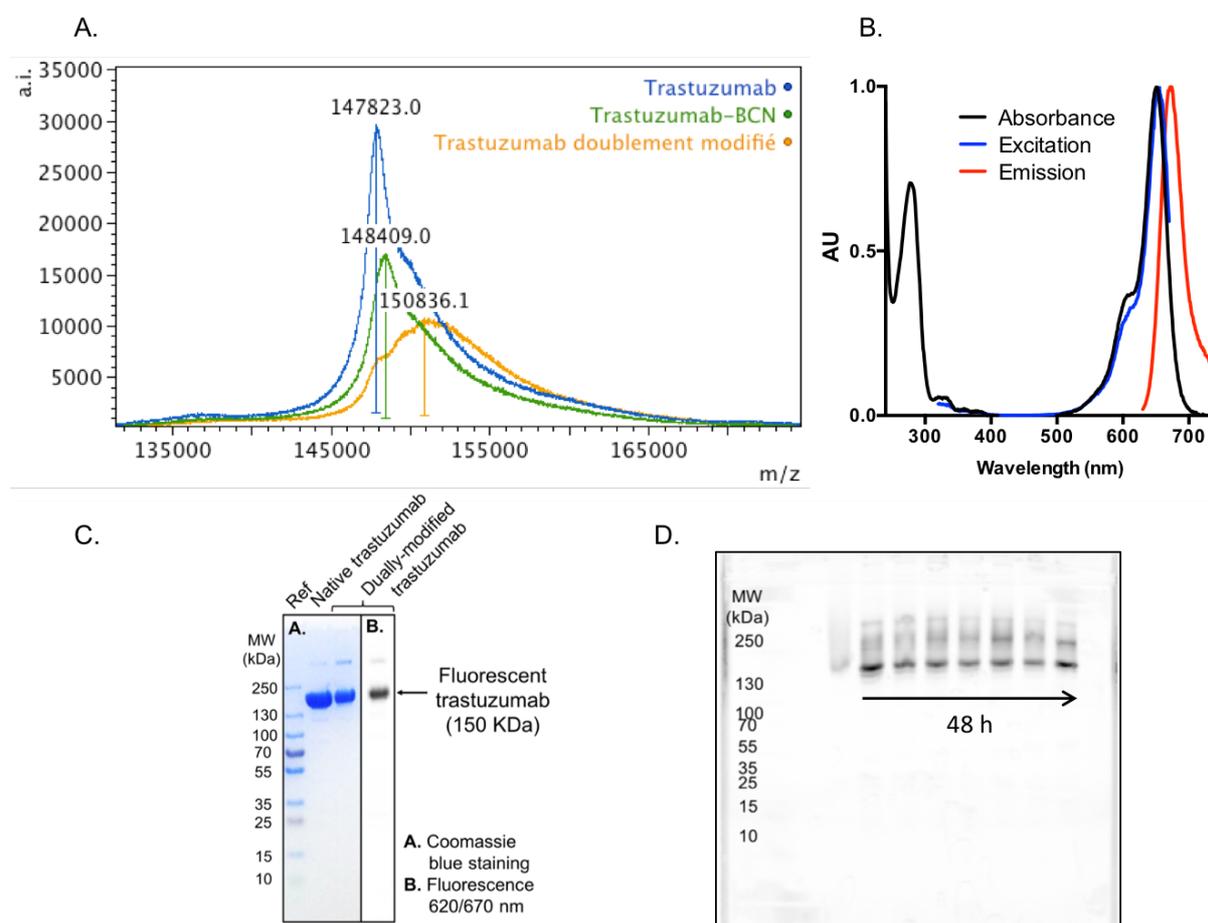


Figure 78. A. Spectre de masse MALDI-TOF du trastuzumab natif, du trastuzumab modifié par le BCN **13** et du trastuzumab doublement modifié **14** ; **B.** Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission du composé **14** à 25 °C. Le spectre d'émission a été mesuré de 630 à 740 nm avec un λ d'excitation à 600 nm (bande passante de 10 nm), et le spectre d'excitation a été mesuré de 320 à 670 nm avec un λ d'émission à 700 nm (bande passante de 10 nm) ; **C.** Analyse par SDS-PAGE du trastuzumab natif et de **14**, par révélation au bleu de Coomassie et par acquisition de la fluorescence ; **D.** Analyse par SDS-PAGE du conjugué **14** après incubation dans du plasma humain à 37 °C pendant 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h et 48 h.

⁵⁴ Zhou, Y.; Kim, Y.-S.; Milenic, D. E.; Baidoo, K. E.; Brechbiel, M. W. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1801–1810

II.4. Optimisation des conditions de radiomarquage du bioconjugué

Le conjugué **14** a été marqué à l'indium-111 selon un protocole classiquement utilisé au laboratoire et qui a déjà fait ses preuves pour le marquage à l'indium-111 de macrocycles de type DOTAGA greffés à une protéine.^{55, 56} Avant d'envisager le radiomarquage d'une quantité de composé suffisamment importante pour réaliser des images *in vivo*, les conditions ont été validées sur une quinzaine de µg du composé **14** (**figure 79. A**). Le chlorure d'indium-111, en solution dans l'HCl à 0,05 M, a été ajouté pour obtenir une proportion de 600 MBq par mg du composé **14**. Le pH très acide de la solution d'¹¹¹InCl₃ a été compensé par ajout de tampon AcONH₄ 0,1 M à pH 7,1 (un dixième du volume d'¹¹¹InCl₃). L'avancée de la réaction de radiomarquage a été évalué à 45 min, 1 h 30 et 3 h, par analyse ITLC (*instant thin layer chromatography*) d'un échantillon de 1 µL de milieu réactionnel traité au préalable par un excès d'EDTA afin de complexer l'indium libre et/ou fixé de façon non spécifique à l'anticorps (**figure 79. B**). La proportion d'indium-111 complexé par rapport à la quantité d'indium-111 totale atteignait 79 % après 3 h et le reste de la réaction a alors été traité par ajout d'un excès d'EDTA. Après purification par ultrafiltration, le conjugué radiomarqué **15** a pu être obtenu avec une pureté radiochimique supérieure à 99 % (**figure 79. C**) et une activité spécifique de 496 MBq/mg.

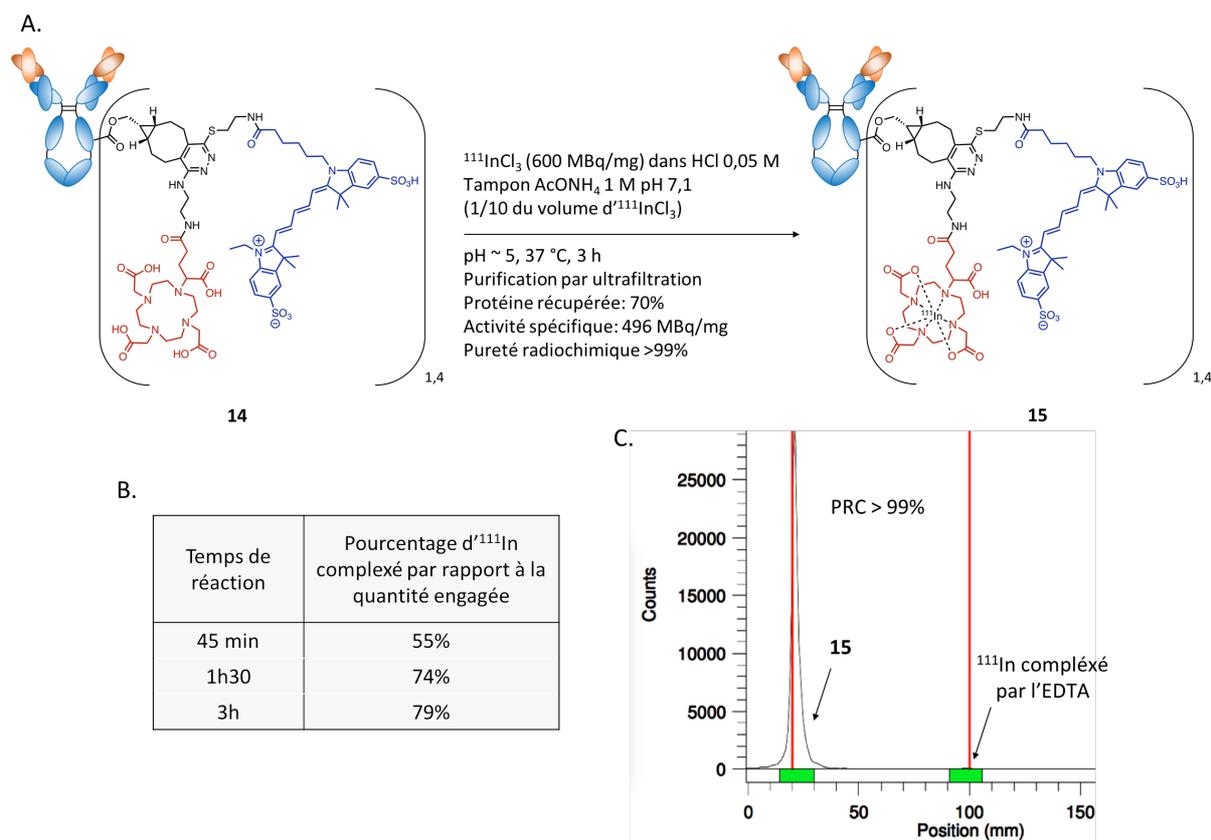


Figure 79. A. Conditions utilisées pour le radiomarquage sur petite quantité ; **B.** Evolution de la proportion d'indium-111 complexé au cours du temps ; **C.** Radiochromatogramme ITLC du composé **15**. PRC : pureté radiochimique.

⁵⁵ Moreau, M.; Raguin, O.; Vrigneaud, J.-M.; Collin, B.; Bernhard, C.; Tizon, X.; Boschetti, F.; Duchamp, O.; Brunotte, F.; Denat, F. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1181–1188

⁵⁶ Duheron, V.; Moreau, M.; Collin, B.; Sali, W.; Bernhard, C.; Goze, C.; Gautier, T.; Pais de Barros, J.-P.; Deckert, V.; Brunotte, F.; Lagrost, L.; Denat, F. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 656–662

II.5. Evaluation *in vivo* par imagerie bimodale TEMP-CT/fluorescence

Afin d'effectuer l'évaluation complète de la stratégie proposée, nous avons étudié les propriétés de ciblage du conjugué **15** par injection du composé à des souris BALB/c nude porteuses de tumeurs mammaires humaines greffées par injection de cellules BT-474 en sous-cutané. Les souris BALB/c nude sont issues d'une souche de souris albinos ayant subi une mutation du gène *Foxn1*, ce qui induit la disparition du thymus. Privées de cet organe, les souris sont incapables de produire les lymphocytes T et sont donc immunodéficientes ce qui permet d'éviter le rejet des greffes. Les cellules BT-474 sont des cellules humaines d'adénocarcinome du sein qui surexpriment l'antigène HER2/*neu* à leur surface. La préparation des cellules tumorales, la greffe des tumeurs sur les souris ainsi que le suivi de la croissance tumorale ont été intégralement effectués par l'équipe du Dr. B. Collin au CGFL.

A l'exception du temps de réaction qui, pour des raisons pratiques, a été diminué à 1 h, les conditions de radiomarquage mises au point sur petite quantité ont été appliquées telles quelles pour la complexation de ^{111}In par le composé **14**. 310 μg de composé **15** ont ainsi été isolés avec une pureté radiochimique de 99 % et une activité spécifique de 366 MBq/mg. Un premier groupe de quatre souris (groupe 1) a subi l'injection d'environ 24 μg (8,7 MBq) du composé **15** par souris et un second groupe de trois souris (groupe 2) a été utilisé pour effectuer une expérience de blocage. Les expériences de blocage permettent de vérifier la spécificité de la liaison du bioconjugué à sa cible *in vivo*. Elles ont été réalisées par co-injection d'environ 20 μg (6,9 MBq) du composé **15** et de 100 équivalents de trastuzumab natif par souris. Des images des souris vivantes ont été réalisées 24 h p.i. grâce aux deux modalités (TEMP-CT et fluorescence). Les souris ont ensuite été euthanasiées et la biodistribution du composé **15** a été mesurée par acquisition de la fluorescence puis comptage gamma des différents organes prélevés (tumeur, foie, sang, reins, muscle, rate, intestin et urine).

Les images corps-entier obtenues 24 h p.i. *via* les deux modalités d'imagerie ont montré un très bon ratio tumeur/bruit de fond et l'expérience de blocage a permis de vérifier la spécificité du ciblage tumoral (**figure 80. A et D**). La mesure du signal fluorescent et radioactif *ex vivo* a confirmé une forte accumulation du composé dans les tissus tumoraux (**figure 80. B et E**). Les ratios tumeur/muscle et tumeur/sang ont été calculés par comptage gamma et ont atteint des valeurs tout à fait correctes de 28,6 et 3,1 respectivement. La valeur de ratio tumeur/sang semble néanmoins indiquer que le conjugué était encore en circulation dans le système sanguin après 24 h. Le ratio tumeur/sang pourrait probablement être amélioré par la mesure de la biodistribution à un temps supérieur (48 h). Par ailleurs, le ratio tumeur groupe 1 /tumeur groupe 2 de 3,0 a montré que l'accumulation observée dans la tumeur était bien due à un ciblage spécifique. La biodistribution a également été calculée à partir des images de fluorescence (**figure 80. C**). Cependant, ces données sont à prendre avec précautions car le signal fluorescent est difficilement quantifiable, du fait de sa forte dépendance à divers phénomènes tels que la diffusion, l'atténuation et l'autofluorescence des tissus. Il est donc préférable de réserver l'emploi des données de fluorescence à des études qualitatives.

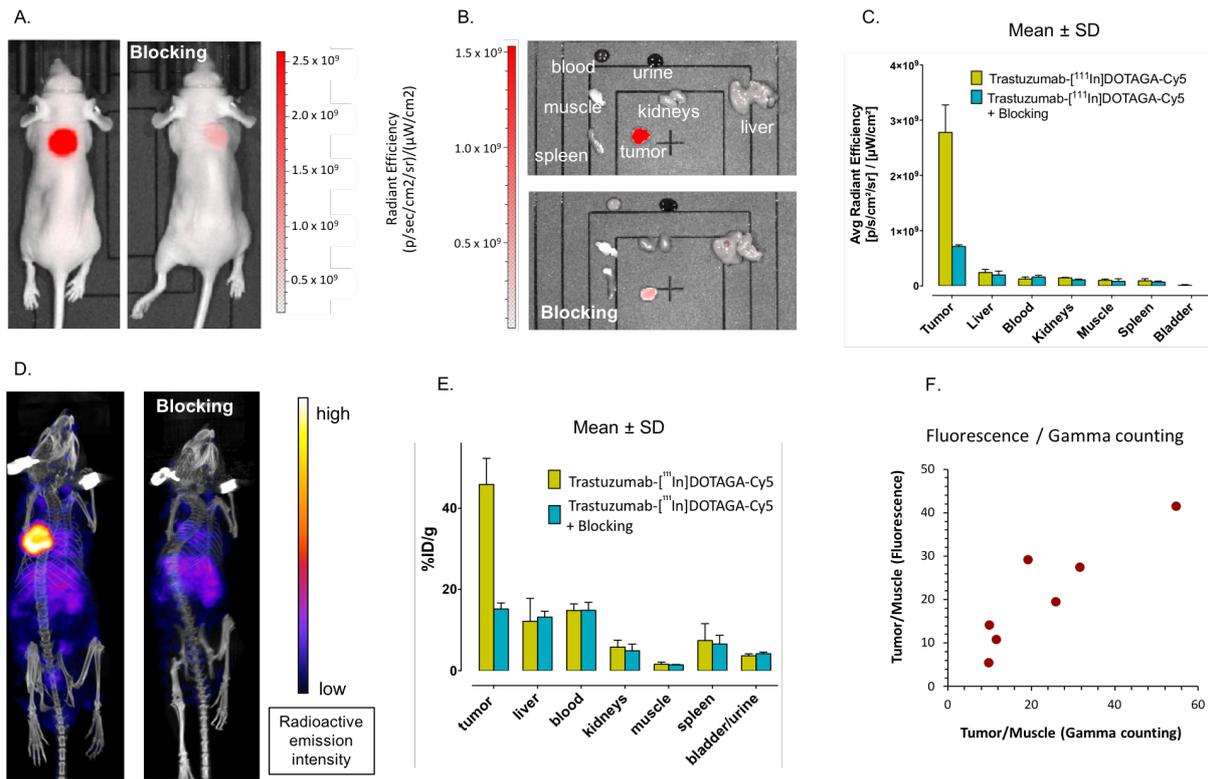


Figure 80. Résultats de l'évaluation des propriétés diagnostic *in vivo* du composé **15** par imagerie multimodale TEMP-CT/fluorescence ; **A.** Acquisition de la fluorescence à 24 h p.i., pour les souris n°4 et 7, le signal fluorescent est superposé aux images réalisées en lumière blanche ; **B.** Acquisition de la fluorescence *ex vivo* des organes des souris n°4 et 7 ; **C.** Résultats de biodistribution obtenus par quantification de l'intensité fluorescente dans chacun des organes grâce à la fonction ROI (*region of interest*) du logiciel Living Image® ; **D.** Images reconstruites à partir des projections tomographiques TEMP-CT à 24 h p.i. pour les souris n°4 et 7. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) ; **E.** Résultats de biodistribution obtenus par comptage gamma ; **F.** Corrélation entre les ratios tumeur sur muscle calculés à partir des valeurs obtenues en comptage gamma et celles obtenues en fluorescence pour chacune des 7 souris.

Ces résultats prouvent que l'affinité du trastuzumab pour l'antigène HER2 a bien été conservée malgré l'introduction d'une molécule organique de taille relativement importante (**12**). De plus la concordance entre les biodistributions observées suivant les deux modalités d'imagerie (comptage gamma et fluorescence) montre que le composé **15** est suffisamment stable et que les liaisons permettant la combinaison des deux sondes imageantes avec l'anticorps ne sont pas rompues lors de la distribution de l'agent imageant *in vivo* (**figure 80. F**). Cette étude préclinique a ainsi permis d'attester de la viabilité de notre stratégie de bioconjugaison pour des applications de diagnostic sur petit animal.

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une technologie de bioconjugaison permettant l'obtention de biomolécules doublement modifiées *via* un greffage site-spécifique faisant intervenir une réaction bioorthogonale a été mise au point.

L'approche est basée sur l'utilisation de la dichlorotétrazine comme plateforme trifonctionnelle. Les deux premières fonctionnalisations correspondent à l'introduction des deux groupements d'intérêt par substitution nucléophile des deux atomes de chlore de la plateforme. Le choix des nucléophiles impliqués dans ces deux réactions est primordial et nous avons pu identifier la combinaison de nucléophiles qui semble la meilleure (i.e. l'utilisation d'une amine pour la première étape et d'un thiol pour la seconde). La faisabilité de notre approche a été démontrée *via* la synthèse d'une série de tétrazines disubstituées par des groupements pour la chélation de radiométaux d'une part, et par des fluorophores organiques d'autre part. L'une des tétrazines bifonctionnalisées a ensuite été greffée chimiosélectivement à un anticorps modifié par un groupement bicyclo[6.1.0]nonyne *via* la réaction de IEDDA. Notre approche a ainsi été exemplifiée par l'élaboration d'un agent imageant bimodal nucléaire/optique vectorisé. L'évaluation préclinique de ce composé a mis en évidence une pharmacocinétique adéquate, permettant la réalisation d'images diagnostic *in vivo*.

Lors de ces travaux, l'introduction de la fonction de *click*, en l'occurrence le bicyclo[6.1.0]nonyne, sur la protéine a été effectuée grâce à une étape de marquage aléatoire des amines. Afin de bénéficier pleinement des avantages de la spécificité de la bioconjugaison, il serait important d'appliquer cette stratégie à une biomolécule dont la fonction *click* aurait été introduite par ingénierie génétique ou par d'autres méthodes régiosélectives. Par ce moyen, le nombre et la position des groupements greffés pourraient être complètement contrôlés et les propriétés biologiques de la biomolécule moins altérées.

La transposition de la stratégie à des champs d'applications autres que l'imagerie bimodale est une perspective très intéressante et nécessaire pour démontrer la versatilité de la technique. En particulier, l'utilisation de la dichlorotétrazine pourrait faciliter le *design* d'agents théranostiques (*via* l'introduction sur une protéine d'un groupement imageant et d'un composé cytotoxique).

Par ailleurs, nous avons envisagé d'utiliser la stratégie pour réaliser des expériences de *pretargeting*. Cependant, l'évaluation préliminaire de la stabilité de la tétrazine disubstituée **12** dans le sérum de veau fœtal a montré une dégradation assez rapide du composé (voir Partie expérimentale). La dégradation pourrait éventuellement être ralentie par l'introduction de groupements encombrants qui pourraient diminuer l'accessibilité des liaisons sensibles à la dégradation.

- CHAPITRE II -

*Double modification cystéine-
spécifique de protéines grâce à la
dichlorotétrazine*

- CHAPITRE II - Double modification cystéine-spécifique de protéines grâce à la dichlorotétrazine	110
I. INTRODUCTION.....	114
I.1. La bioconjugaison cystéine-spécifique grâce aux maléimides	114
a. La fonction maléimide	114
b. Stabilité du lien thioéther de succinimide	116
I.2. Les fonctions de bioconjugaison alternatives au maléimide.....	118
a. Les haloacétamides	118
b. Les disulfures activés.....	119
c. Les vinyles sulfones	120
d. Les 2-cyanobenzothiazoles.....	121
e. Les sulfonyles	122
I.3. Modification site-spécifique des ponts disulfure	123
I.4. Double modification sélective des résidus cystéines : quelles solutions ?.....	126
a. Double modification par introduction d'une molécule hybride.....	127
b. Les différentes plateformes disponibles	128
I.5. Présentation du projet	131
II. RESULTATS ET DISCUSSION	134
II.1. Evaluation préliminaire de la stratégie sur un peptide modèle	134
a. Synthèse de chlorotétrazine monofonctionalisée par un groupe thiol.....	134
b. Choix du peptide modèle	135
c. Bioconjugaison de la tétrazine monosubstituée : étude de la spécificité pour les cystéines.....	136
d. Evaluation de la stabilité du peptide modifié.....	138
e. Evaluation de la réaction d'IEDDA sur le peptide modèle.....	138
II.2. Synthèse des différents intermédiaires.....	140
II.3. Double modification cystéine-spécifique de l'albumine de sérum bovin	141
a. Propriétés biologiques et caractérisation de l'albumine.....	141
b. Double modification séquentielle de la BSA : conditions réactionnelles	143
II.4. Evaluation <i>in vivo</i> de l'agent de ciblage 30 par imagerie optique	146
II.5. Application de la stratégie à la préparation d'un agent théranostique	147
a. Présentation du projet	147
b. Elaboration d'un agent théranostique par double modification de 7D12	149
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	153

I. INTRODUCTION

Comme brièvement décrit dans l'introduction générale, l'utilisation des groupements thiols des résidus cystéines comme point d'accroche pour la bioconjugaison est une stratégie très attractive permettant le contrôle des sites de greffage. Une large variété de fonctions de bioconjugaison, spécifiques des résidus cystéines, a ainsi été développée. Celles-ci permettent un marquage rapide et sélectif des cystéines dans des conditions biocompatibles. Ces méthodes ont fait l'objet d'articles de revue récents.^{1, 2} Une liste non exhaustive de ces différentes fonctions de bioconjugaison est présentée ci-après, accompagnée de quelques exemples représentatifs pour chacune d'entre elles. [Note : bien que l'espèce réactive soit généralement la forme basique « thiolate », pour des raisons pratiques, il sera fait mention de la fonction « thiol » dans le texte et dans les schémas réactionnels.]

I.1. La bioconjugaison cystéine-spécifique grâce aux maléimides

a. La fonction maléimide

La fonction réactive sélective des thiols la plus couramment utilisée est le maléimide, un accepteur de Michael qui génère la formation de thioéthers de succinimide, par réaction avec les groupements sulfhydriles des résidus cystéines (**schéma 7**).

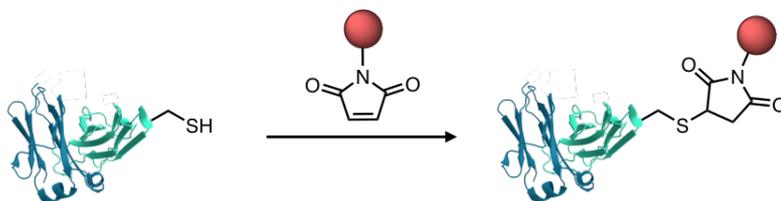


Schéma 7. Schéma général de la modification cystéine-spécifique de protéines par un groupement d'intérêt fonctionnalisé par un maléimide.

Il existe un très grand nombre de travaux décrivant la modification spécifique de biomolécules par des dérivés de maléimide et il est difficile de tous les citer.³ Le premier d'entre eux, publié en 1956 par Moore et Ward, décrit la conjugaison de deux protéines, l'albumine et la kératine, *via* l'utilisation d'un réactif *bis*-maléimide.⁴ Depuis, plusieurs agents pharmaceutiques construits grâce à cette fonction de greffage ont été approuvés par la FDA.^{5, 6, 7}

¹ Gunnoo, S. B.; Madder, A. *ChemBioChem*. **2016**, *17*, 529–553

² Adumeau, P.; Sharma, S. K.; Brent, C.; Zeglis, B. M. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18*, 1–17

³ Sabot, C.; Renard, P.-Y.; Renault, K.; Fredy, J. W. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2497–2513

⁴ Moore, J. E.; Ward, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2414–2418

⁵ Junutula, J. R.; Flagella, K. M.; Graham, R. A.; Parsons, K. L.; Ha, E.; Raab, H.; Bhakta, S.; Nguyen, T.; Dugger, D. L.; Li, G.; Mai, E.; Phillips, G. D. L.; Hilaragi, H.; Fuji, R. N.; Tibbitts, J.; Vandlen, R.; Spencer, S. D.; Scheller, R. H.; Polakis, P.; Sliwkowski, M. X. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4769–4778

⁶ Goel, N.; Stephens, S. *mAbs*. **2010**, *2*, 137–147

⁷ Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315–337

Les maléimides ont ainsi permis la modification spécifique de diverses protéines vectrices présentant des cystéines natives (anticorps monoclonaux, fragments Fab'), ou incorporées dans la séquence protéique par manipulation génétique (ThiomAbs, ThioFabs, scFvs, di-scFvs, *diabodies*, VHHs camélidés, ...). Les groupements introduits sont tout aussi variés (**figure 81**) et l'on recense notamment des molécules imageantes telles que des fluorophores (Alexa 488,⁸ IRDye 800CW,⁹ ...), des ligands pour la complexation de radiométaux (EDTA,¹⁰ DOTA,^{11, 12} DTPA,^{13, 14} DFO,¹⁵ ...) ou encore des molécules marquées de façon covalente par des radioéléments ([¹²⁵I]-iodotyrosine,¹⁶ chaîne PEG fluorée au ¹⁸F,¹⁷ ...). Plusieurs molécules cytotoxiques ont également été bioconjuguées par cette technique (MMAE,¹⁸ maytansine,⁵ ...). La plupart de ces agents pharmaceutiques ont été évalués *in vivo* et ont montré de bons résultats. D'autre part, la fonction maléimide a également été utilisée *in vitro* pour réaliser la modification de protéines membranaires portant des thiols.^{19, 20}

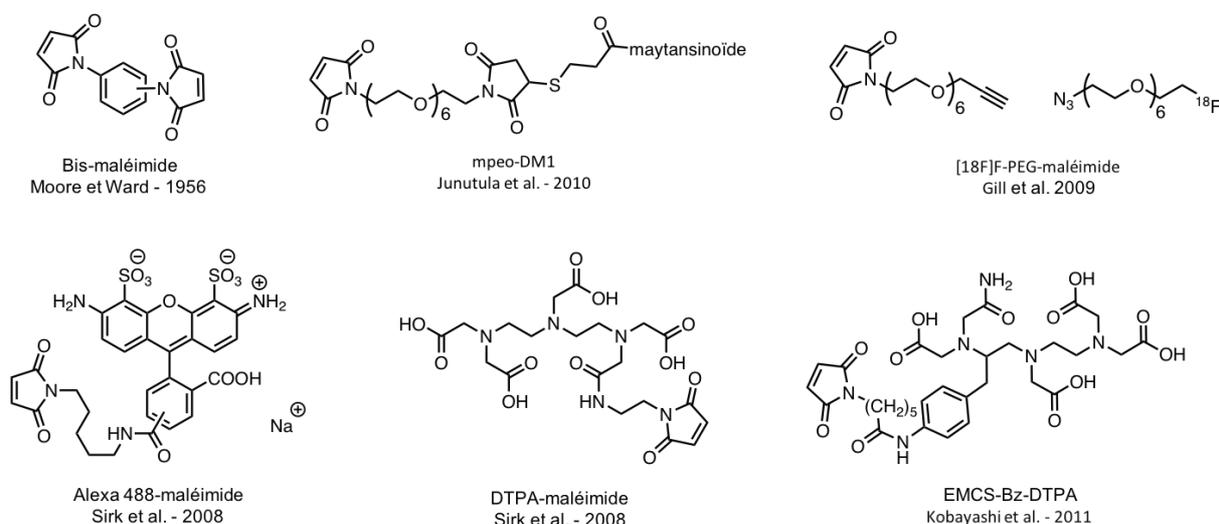


Figure 81. Exemples de différents composés utilisés pour la modification de biomolécules grâce à la fonction maléimide.

⁸ Sirk, S. J.; Olafsen, T.; Barat, B.; Bauer, K. B.; Wu, A. M. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2527–2534

⁹ Kijanka, M.; Warnders, F.-J.; El Khattabi, M.; Lub-de Hooge, M.; van Dam, G. M.; Ntziachristos, V.; de Vries, L.; Oliveira, S.; van Bergen En Henegouwen, P. M. P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2013**, *40*, 1718–1729

¹⁰ Sato, M.; Toyozaki, T.; Odaka, K.; Uehara, T.; Arano, Y.; Hasegawa, H.; Yoshida, K.; Imanaka-Yoshida, K.; Yoshida, T.; Hiroe, M.; Tadokoro, H.; Irie, T.; Tanada, S.; Komuro, I. *Circulation.* **2002**, *106*, 1397–1402

¹¹ Albrecht, H.; Denardo, G. L.; Denardo, S. J. Q. *J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2007**, *51*, 304–313

¹² Tavaré, R.; Wu, W. H.; Zettlitz, K. A.; Salazar, F. B.; McCabe, K. E.; Marks, J. D.; Wu, A. M. *Protein Eng. Des. Sel.* **2014**, *27*, 317–324

¹³ Massa, S.; Xavier, C.; De Vos, J.; Cavellers, V.; Lahoutte, T.; Muyldermans, S.; Devoogdt, N. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 979–988

¹⁴ Kobayashi, N.; Odaka, K.; Uehara, T.; Imanaka-Yoshida, K.; Kato, Y.; Oyama, H.; Tadokoro, H.; Akizawa, H.; Tanada, S.; Hiroe, M.; Fukumura, T.; Komuro, I.; Arano, Y.; Yoshida, T.; Irie, T. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9123–9130

¹⁵ Tinianow, J. N.; Gill, H. S.; Ogasawara, A.; Flores, J. E.; Vanderbilt, A. N.; Luis, E.; Vandlen, R.; Darwish, M.; Junutula, J. R.; Williams, S.-P.; Marik, J. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 289–297

¹⁶ Boswell, C. A.; Marik, J.; Elowson, M. J.; Reyes, N. A.; Ulufatu, S.; Bumbaca, D.; Yip, V.; Mundo, E. E.; Majidy, N.; Van Hoy, M.; Goriparthi, S. N.; Trias, A.; Gill, H. S.; Williams, S. P.; Junutula, J. R.; Fielder, P. J.; Khawli, L. A. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9418–9426

¹⁷ Gill, H. S.; Tinianow, J. N.; Ogasawara, A.; Flores, J. E.; Vanderbilt, A. N.; Raab, H.; Scheer, J. M.; Vandlen, R.; Williams, S.-P.; Marik, J. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5816–5825

¹⁸ Sun, M. M. C.; Beam, K. S.; Cerveny, C. G.; Hamblett, K. J.; Blackmore, R. S.; Torgov, M. Y.; Handley, F. G. M.; Ihle, N. C.; Senter, P. D.; Alley, S. C. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1282–1290

¹⁹ Li, T.; Takeoka, S. *Int. J. Nanomedicine.* **2013**, *8*, 3855–3866

²⁰ Takeoka, S.; Li, T. *Int. J. Nanomedicine.* **2014**, *9*, 2849–2861

Tous ces exemples rapportent une haute spécificité de la réactivité du maléimide en faveur des cystéines. Cependant, cette fonction est tout de même assez réactive et les conditions de réactions doivent être contrôlées soigneusement. En particulier, l'augmentation du pH peut générer la modification non spécifique des amines de la protéine.^{21,22} Il a aussi été montré qu'une stœchiométrie au-delà de 40 équivalents de composé maléimide par rapport aux thiols disponibles sur la protéine à modifier pouvait induire une perte de la sélectivité.²³ La bioconjugaison est généralement effectuée en une à deux heures, à température ambiante ou à 37 °C, et à un pH proche de la neutralité. La réaction peut également être réalisée sur la nuit, mais la température doit alors être abaissée à 4 °C afin d'éviter la modification des fonctions amines.²⁴

b. Stabilité du lien thioéther de succinimide

La principale limitation de l'emploi de maléimide pour l'obtention contrôlée de conjugués est l'instabilité de la liaison thioéther. En effet, le vecteur peut être séparé du groupement d'intérêt par une réaction de rétro-Michael régénérant ainsi le composé maléimide initial.²⁵ Les composants plasmatiques portant des fonctions thiols, tels que les cystéines libres, l'albumine et le glutathion sous sa forme réduite (GSH), peuvent alors réagir avec le maléimide (**figure 82. A**). La cinétique de ce transfert est dépendante de l'accessibilité aux solvants du site de bioconjugaison.²⁶ Ainsi, la nature de la protéine vectrice et la position de la cystéine modifiée influencent la vitesse de dégradation du conjugué. L'étude de la stabilité plasmatique d'anticorps marqués par des fluorophores *via* un lien succinimide a mis en évidence un transfert de la fluorescence de l'anticorps à l'albumine.^{27,28} A titre d'exemple, 38 % du fluorophore TAMRA était transféré du trastuzumab vers l'albumine de sérum humain (HSA) après 5 jours d'incubation dans le plasma (**figure 82. B**),²⁸ et le temps de demi-vie *in vivo* de l'ADC composé d'un anticorps 1F6-C4v2 et de l'agent cytotoxique MMAF était d'environ 7 jours.²⁹

²¹ Smyth, D. G.; Blumenfeld, O. O.; Konigsberg, W. *Biochem. J.* **1964**, 91, 589–595

²² Brewer, C. F.; Riehm, J. P. *Anal. Biochem.* **1967**, 18, 248–255

²³ Tyagarajan, K.; Pretzer, E.; Wiktorowicz, J. E. *Electrophoresis.* **2003**, 24, 2348–2358

²⁴ Kijanka, M.; Warnders, F.-J.; El Khattabi, M.; Lub-de Hooge, M.; van Dam, G. M.; Ntziachristos, V.; de Vries, L.; Oliveira, S.; van Bergen En Henegouwen, P. M. P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2013**, 40, 1718–1729

²⁵ Baldwin, A. D.; Kiick, K. L. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 1946–1953

²⁶ Shen, B.-Q.; Xu, K.; Liu, L.; Raab, H.; Bhakta, S.; Kenrick, M.; Parsons-Reponte, K. L.; Tien, J.; Yu, S.-F.; Mai, E.; Li, D.; Tibbitts, J.; Baudys, J.; Saad, O. M.; Scales, S. J.; McDonald, P. J.; Hass, P. E.; Eigenbrot, C.; Nguyen, T.; Solis, W. A.; Fujii, R. N.; Flagella, K. M.; Patel, D.; Spencer, S. D.; Khawli, L. A.; Ebens, A.; Wong, W. L.; Vandlen, R.; Kaur, S.; Sliwkowski, M. X.; Scheller, R. H.; Polakis, P.; Junutula, J. R. *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 184–189

²⁷ Patterson, J. T.; Asano, S.; Li, X.; Rader, C.; Barbas, C. F. *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1402–1407

²⁸ Dovgan, I.; Kolodych, S.; Koniev, O.; Wagner, A. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 30835–30840

²⁹ Alley, S. C.; Benjamin, D. R.; Jeffrey, S. C.; Okeley, N. M.; Meyer, D. L.; Sanderson, R. J.; Senter, P. D. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 759–765

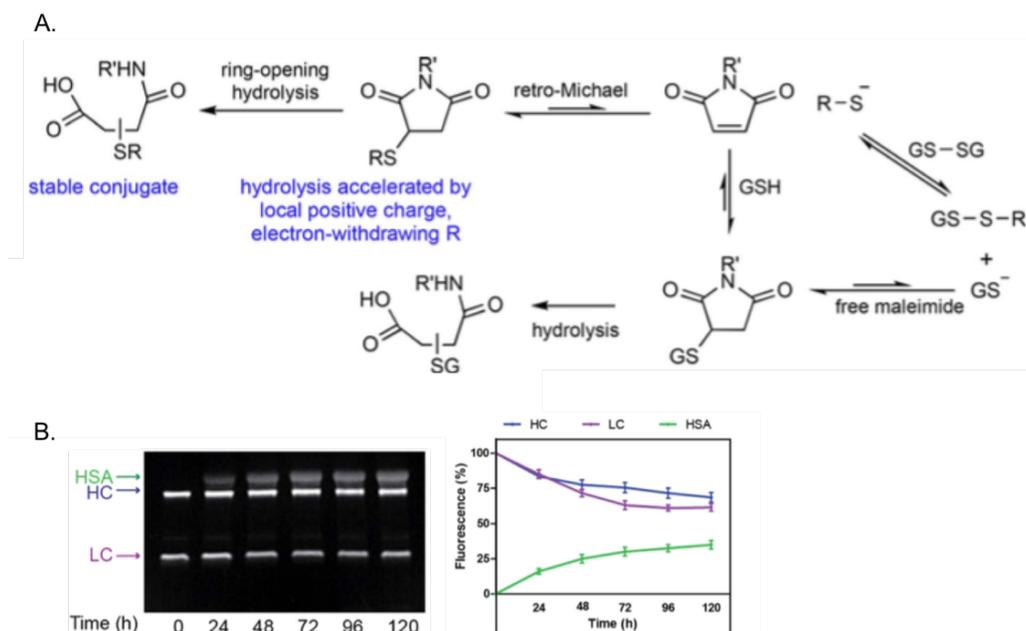


Figure 82. A. Ouverture du cycle thioéther de succinimide par hydrolyse et équilibres réactionnels induisant le transfert du groupement succinimide d'un thiol à un autre. Le glutathion (GSH) est utilisé ici comme exemple de thiol endogène ; figure adaptée de revue ;¹ **B.** Gauche : Analyse SDS-PAGE, en conditions réductrices, d'un anticorps modifié par un fluorophore *via* un lien thioéther de succinimide, après incubation dans le plasma humain. HC : chaîne lourde, LC : chaîne légère, HSA : albumine de sérum humain. L'image est obtenue par acquisition du signal de fluorescence de la sonde TAMRA ; droite : analyse quantitative du SDS-PAGE ; figure adaptée d'article.²⁸

Par ailleurs, une autre réaction « post-bioconjugaison » peut également avoir lieu. En effet, l'hétérocycle succinimide peut subir une réaction d'hydrolyse qui va entraîner l'ouverture du cycle (**figure 82. A**). L'hydrolyse est accélérée en milieu basique,^{30, 31} et/ou lorsque les acides aminés environnants sont chargés positivement.²⁶ Le succinamate ainsi obtenu possède une charge négative supplémentaire par rapport au succinimide initial, ce qui peut compromettre l'internalisation cellulaire du conjugué.^{32, 33} De plus, étant donné que les molécules d'eau peuvent attaquer l'un ou l'autre des deux carbones du groupement imide, deux isomères d'acides succinamiques peuvent être générés. Les composés obtenus par la stratégie maléimide sont donc constitués d'un mélange d'espèces, dont le ratio varie en fonction du temps, ce qui peut fausser l'interprétation des résultats expérimentaux.³¹

Il est à noter cependant, que l'ouverture du cycle empêche le mécanisme d'échange du thiol. Favoriser la réaction d'hydrolyse est ainsi devenu une stratégie adéquate pour éviter la dégradation du conjugué.^{34, 35, 28, 36}

³⁰ Khan, M. N.; Khan, A. A. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1793–1794

³¹ Kalia, J.; Raines, R. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6286–6289

³² Fuchs, S. M.; Raines, R. T. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1819–1822

³³ Johnson, R. J.; Chao, T.-Y.; Lavis, L. D.; Raines, R. T. *Biochemistry.* **2007**, *46*, 10308–10316

³⁴ Lyon, R. P.; Setter, J. R.; Bovee, T. D.; Doronina, S. O.; Hunter, J. H.; Anderson, M. E.; Balasubramanian, C. L.; Duniho, S. M.; Leiske, C. I.; Li, F.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1059–1062

³⁵ Fontaine, S. D.; Reid, R.; Robinson, L.; Ashley, G. W.; Santi, D. V. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 145–152

³⁶ Tobaldi, E.; Dovgan, I.; Mosser, M.; Becht, J.-M.; Wagner, A. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 9305–9310

I.2. Les fonctions de bioconjugaison alternatives au maléimide

a. Les haloacétamides

Dans l'optique d'augmenter la stabilité de la liaison entre le groupement d'intérêt et le bio-vecteur, de nombreuses autres fonctions de greffage ont été testées. Parmi elles, les agents alkylants de type haloalkyle sont particulièrement intéressants. Ils permettent le marquage spécifique des cystéines par simple substitution nucléophile (S_N2 ; **schéma 8**). Les fonctions les plus couramment utilisées sont les dérivés de bromoacétamide (BAM) et de iodoacétamide (IAM). La stabilité de l'adduit acétamide obtenu est apparemment meilleure comparée à celle du lien succinimide et aucune dégradation n'est observée *in vivo* jusqu'à 14 jours.²⁹

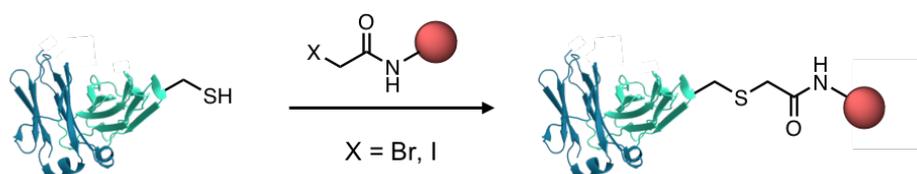


Schéma 8. Schéma général de la modification d'une cystéine par une fonction haloacétamide.

A titre d'exemple, le réactif iodoacétamide non fonctionnalisé est très classiquement utilisé pour empêcher l'oxydation des cystéines libres, et notamment la dimérisation des protéines, *via* le blocage des cystéines.^{37, 38, 39} Les deux versions bromo- et iodoacétamide ont pleinement montré leur efficacité pour l'introduction de divers groupements spécifiquement sur les cystéines.^{40, 41, 42, 43} Par exemple, un anticorps anti-HER2 marqué au ⁸⁹Zr a pu être obtenu par modification spécifique des cystéines préalablement introduites par mutation génétique sur l'anticorps trastuzumab. Pour cela, des dérivés BAM et IAM de la desferrioxamine B (DFO) (**figure 83**) ont été synthétisés et ajoutés à un ThiomAb de trastuzumab. Les conjugués radiomarqués ont montré un comportement *in vivo* intéressant avec une forte accumulation (20 %ID/g) dans la tumeur après 96 h p.i.¹⁵

³⁷ Chan, L. J.; Ascher, D. B.; Yadav, R.; Bulitta, J. B.; Williams, C. C.; Porter, C. J. H.; Landersdorfer, C. B.; Kaminskas, L. M. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1229–1241

³⁸ Selis, F.; Focà, G.; Sandomenico, A.; Marra, C.; Di Mauro, C.; Sacconi Jotti, G.; Scaramuzza, S.; Politano, A.; Sanna, R.; Ruvo, M.; Tonon, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 491–505

³⁹ Kirley, T. L.; Greis, K. D.; Norman, A. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *480*, 752–757

⁴⁰ Stimmel, J. B.; Merrill, B. M.; Kuyper, L. F.; Moxham, C. P.; Hutchins, J. T.; Fling, M. E.; Kull, F. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30445–30450

⁴¹ Li, L.; Olafsen, T.; Anderson, A.-L.; Wu, A.; Raubitschek, A. A.; Shively, J. E. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 985–995

⁴² Li, J.; Wang, X.; Wang, X.; Chen, Z. *Acta Pharmacol. Sin.* **2006**, *27*, 237–241

⁴³ Puthenveetil, S.; Musto, S.; Loganzo, F.; Tumeay, L. N.; O'Donnell, C. J.; Graziani, E. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1030–1039

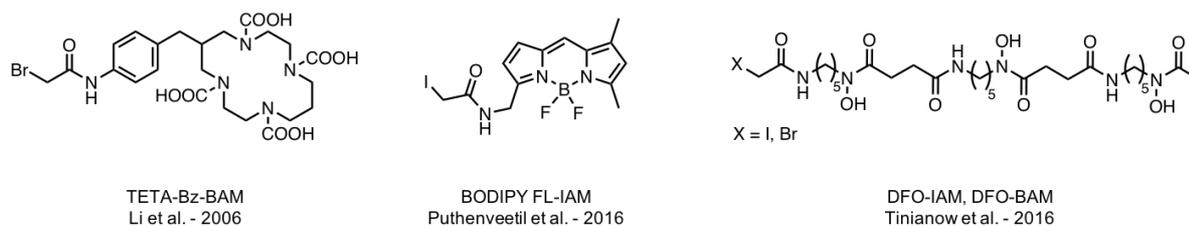


Figure 83. Exemples de différents composés utilisés pour la modification de biomolécules grâce aux fonctions iodoacétamide et bromoacétamide.

Cette famille d'électrophiles est légèrement moins réactive que les dérivés de maléimide et la bioconjugaison nécessite des conditions plus basiques (pH 8 à 9) et un temps de réaction plus long (de quelques heures à une nuit).^{15, 43}

Les inconvénients majeurs limitant le développement de ces agents de bioconjugaison sont leur sensibilité à l'hydrolyse et leur manque de sélectivité.¹ En effet, il a été démontré dans plusieurs travaux que l'alkylation des acides aminés portant des groupements fonctionnels polaires pouvait avoir lieu. Par exemple, les lysines présentes en quantité importantes dans les protéines peuvent altérer la sélectivité de la bioconjugaison.²³ Peuvent interférer également, les amines *N*-terminales (qui présentent une acidité légèrement plus forte que les amines des lysines),^{44, 45} les histidines,^{46, 44} les tyrosines,²³ les méthionines,^{46,47,48} et même les acides carboxyliques C-terminaux.⁴⁵

b. Les disulfures activés

L'obtention de conjugués par formation de ponts disulfure entre une cystéine et un groupement d'intérêt est une stratégie également assez utilisée (**figure 84**). Le test d'Ellman, qui permet la quantification des cystéines réduites des protéines par formation de ponts disulfure à partir du réactif acide dithio-5,5'-bis(nitro-2-benzoïque) (DTNB), a montré la grande spécificité de ce type de réactions.^{49, 50} Le plus souvent, les réactifs utilisés pour effectuer les bioconjugaisons sont constitués d'un pont disulfure activé par un groupement électroattracteur, tel que l'hétérocycle pyridyle.^{51, 52} Les dérivés de type thiosulfonate sont aussi largement employés.^{53, 54}

⁴⁴ Boja, E. S.; Fales, H. M. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3576–3582

⁴⁵ Yang, Z.; Attygalle, A. B. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, 233–243

⁴⁶ Lundell, N.; Schreitmüller, T. *Anal. Biochem.* **1999**, 266, 31–47

⁴⁷ Fruchter, R. G.; Crestfield, A. M. *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 5807–5812

⁴⁸ Lapko, V. N.; Smith, D. L.; Smith, J. B. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 572–575

⁴⁹ Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, 70–77

⁵⁰ Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. *Anal. Biochem.* **1979**, 94, 75–81

⁵¹ Carlsson, J.; Drevin, H.; Axén, R. *Biochem. J.* **1978**, 173, 723–737

⁵² Woghiren, C.; Sharma, B.; Stein, S. *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 314–318

⁵³ Zhao, Y.-J.; Zhai, Y.; Su, Z.-G.; Ma, G.-H. *Polym. Adv. Technol.* **2009**, 21, 867–873

⁵⁴ Carter, J. D.; Mathias, J. D.; Gomez, E. F.; Ran, Y.; Xu, F.; Galiano, L.; Tran, N. Q.; D'Amore, P. W.; Wright, C. S.; Chakravorty, D. K.; Fanucci, G. E. *J. Phys. Chem. B.* **2014**, 118, 10607–10617

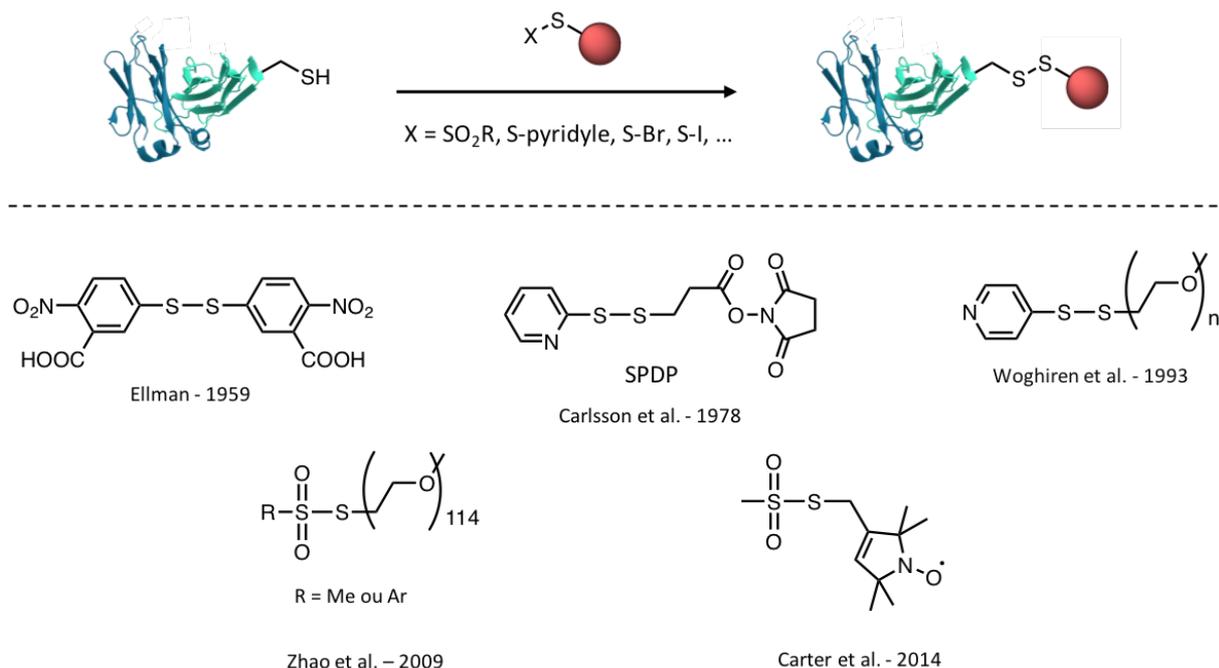


Figure 84. Haut. Schéma général de la modification d'une cystéine par formation de pont disulfure ; Bas. Structures du réactif d'Ellman, de l'acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-dibenzoïque, et de quelques exemples de dérivés dithiopyridyles et thiosulfonates utilisés pour la modification de biomolécules.

Les conjugués obtenus par cette stratégie sont malheureusement peu stables et des études ont montré que leur temps de demi-vie dans l'organisme n'excédait pas un ou deux jours.^{55, 56} Le lien disulfure est en effet sujet à la réduction et peut être aisément clivé par les thiols présents dans le plasma. Dans certains cas, cette sensibilité aux variations redox peut être mise à contribution pour générer des systèmes permettant le relargage contrôlé de principes actifs.^{57, 58}

c. Les vinyles sulfones

Les dérivés vinyle sulfone constituent une autre classe de réactifs spécifiques des cystéines. Comme pour les maléimides, la conjugaison est basée sur une addition de Michael (**figure 85. A**). Le premier exemple de bioconjugaison réalisée grâce à cette approche date de 1988 et consistait en l'introduction de méthyle et d'éthyle vinyle sulfone sur la cystéine de l'albumine de sérum bovin et de la kératine.⁵⁹ Depuis, d'autres exemples d'applications de ce réactif en bioconjugaison ont été rapportés (**figure 85. B**).^{41, 60, 61} Les travaux de Morales-Sanfrutos ont cependant mis en évidence le

⁵⁵ Thorpe, P. E.; Wallace, P. M.; Knowles, P. P.; Relf, M. G.; Brown, A. N. F.; Watson, G. J.; Blakey, D. C.; Newell, D. R. *Cancer Res.* **1988**, 48, 6396–6403

⁵⁶ Xie, H.; Audette, C.; Hoffee, M.; Lambert, J. M.; Blättler, W. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 308, 1073–1082

⁵⁷ Wender, P. A.; Goun, E. A.; Jones, L. R.; Pillow, T. H.; Rothbard, J. B.; Shinde, R.; Contag, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 10340–10345

⁵⁸ Sauer, A. M.; Schlossbauer, A.; Ruthardt, N.; Cauda, V.; Bein, T.; Bräuchle, C. *Nano Lett.* **2010**, 10, 3684–3691

⁵⁹ Masri, M. S.; Friedman, M. *J. Protein Chem.* **1988**, 7, 49–54

⁶⁰ Olafsen, T.; Cheung, C.; Yazaki, P. J.; Li, L.; Sundaresan, G.; Gambhir, S. S.; Sherman, M. A.; Williams, L. E.; Shively, J. E.; Raubitschek, A. A.; Wu, A. M. *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, 17, 21–27

⁶¹ Li, L.; Crow, D.; Turatti, F.; Bading, J. R.; Anderson, A.-L.; Poku, E.; Yazaki, P. J.; Carmichael, J.; Leong, D.; Wheatcroft, M. P.; Raubitschek, A. A.; Hudson, P. J.; Colcher, D.; Shively, J. E. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 709–716

manque de chimiosélectivité de cette fonction, par analyse MALDI-TOF et par diffraction des rayons X des conjugués cristallisés.⁶² Ainsi, il a démontré que les résidus lysines et histidines du lysozyme HEW étaient capables de réagir avec le dérivé vinyle sulfone de la rhodamine B. Dans certaines conditions (25 équivalents de réactif, 64 h à température ambiante) la modification des lysines est détectée alors que le milieu est acide (jusqu'à pH 5).

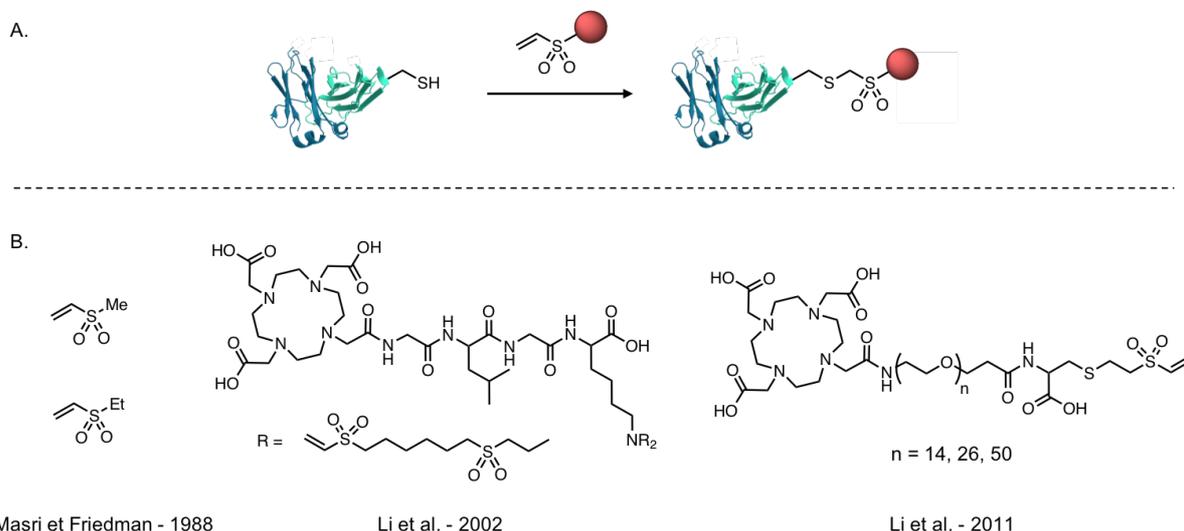


Figure 85. A. Schéma général de la modification d'une cystéine par la fonction vinyle sulfone ; B. Exemples de dérivés vinyle sulfone utilisés pour la modification de biomolécules.

d. Les 2-cyanobenzothiazoles

Bien que limité au marquage des cystéines en position *N*-terminale, le groupement 2-cyanobenzothiazole a été employé par différents groupes pour marquer sélectivement des peptides et des protéines (**figure 86**). De nombreuses molécules organiques,⁶³ telles que des fluorophores, la biotine, ou encore une chaîne éthyle marquée au ¹⁸F,⁶⁴ ont ainsi été fonctionnalisés par le 2-cyanobenzothiazole et introduits sélectivement à l'extrémité *N*-terminale de diverses protéines.

⁶² Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, J.; Ortega-Muñoz, M.; Megia-Fernandez, A.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 667–675

⁶³ Ren, H.; Xiao, F.; Zhan, K.; Kim, Y.-P.; Xie, H.; Xia, Z.; Rao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9658–9662

⁶⁴ Jeon, J.; Shen, B.; Xiong, L.; Miao, Z.; Lee, K. H.; Rao, J.; Chin, F. T. *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23, 1902–1908

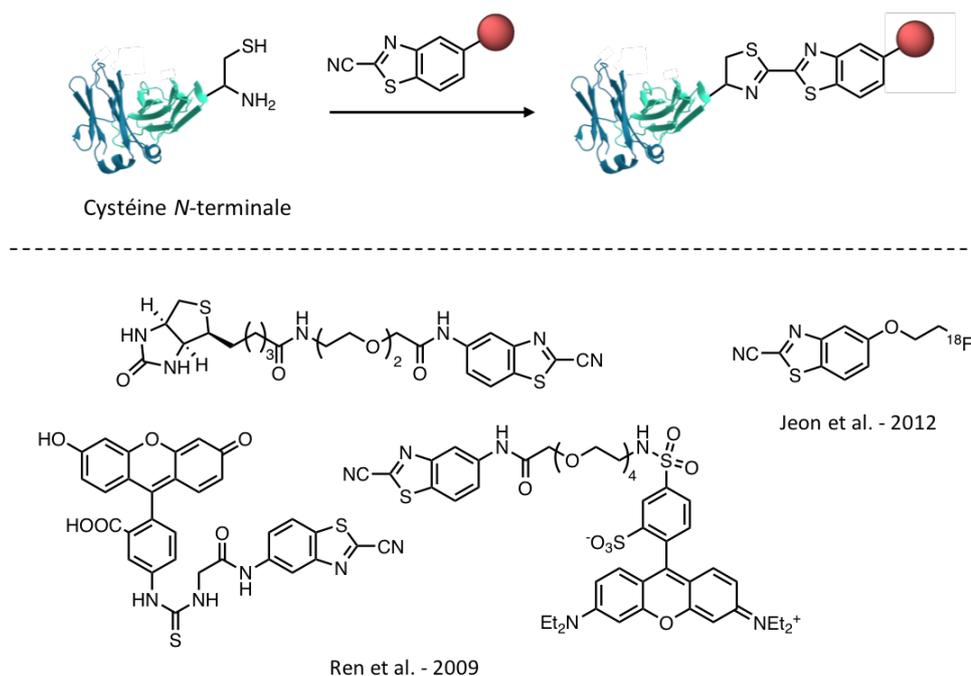


Figure 86. Haut. Schéma général de la modification d'une cystéine par la fonction 2-cyanobenzothiazole ; Bas. Exemples de dérivés 2-cyanobenzothiazoles utilisés pour la modification de biomolécules.

La spécificité des cyanobenzothiazoles pour les cystéines terminales peut se révéler un avantage dans certains cas, mais implique une étape de manipulation génétique pour modifier le résidu *N*-terminal qui est une méthionine pour la grande majorité des protéines. D'autre part, l'hydrophobie du lien bis-thiazole résultant peut déstabiliser la protéine et potentiellement modifier la biodistribution de l'agent pharmaceutique final.¹

e. Les sulfonyles

Les groupements tosyle et mésyle (et de nombreuses autres variations de la fonction sulfone) sont de bons groupes partants et sont considérés comme efficaces pour le greffage spécifique des cystéines (**figure 87**). Le réactif méthylsulfonylbenzothiazole,⁶⁵ et plus récemment la phényloxadiazole méthylsulfone,^{27, 66} semblent se démarquer des nombreux agents de greffage basés sur le motif sulfone.

⁶⁵ Zhang, D.; Devarie-Baez, N. O.; Li, Q.; Lancaster, J. R.; Xian, M. *Org. Lett.* **2012**, 14, 3396–3399

⁶⁶ Toda, N.; Asano, S.; Barbas, C. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12592–12596

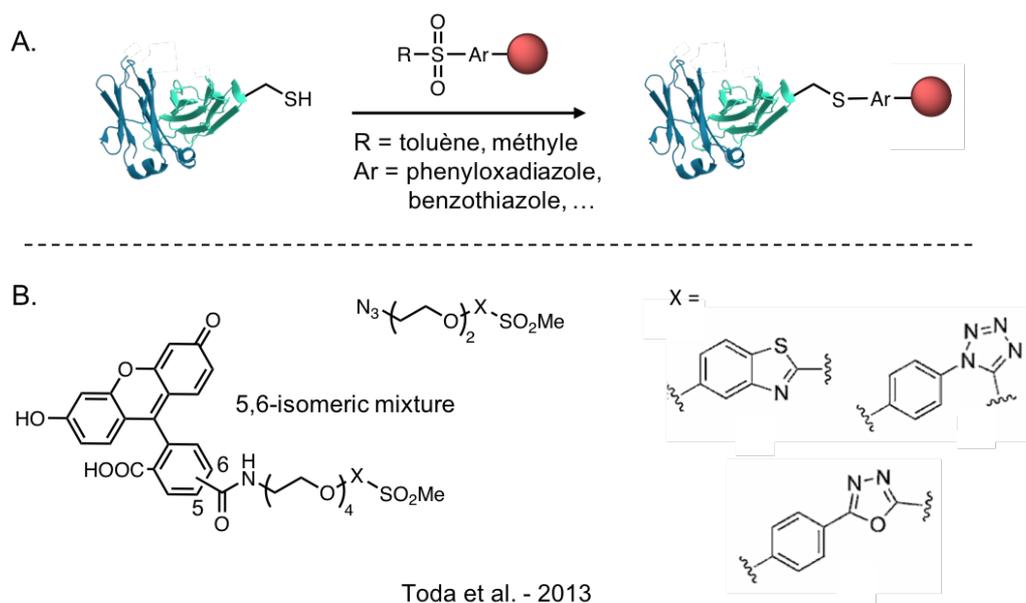


Figure 87. Haut. Schéma général de la modification d'une cystéine par la fonction sulfonyle ; Bas. Exemples de dérivés sulfonyles utilisés pour la modification de biomolécules.

Il existe aussi une variante de cette approche qui met en jeu un réactif plus complexe dont la sulfone en position β peut être éliminée *in situ* sous forme d'acide sulfonique (**figure 88**). La cétone α,β -insaturée générée peut ensuite réagir sélectivement avec les résidus cystéines selon une addition de Michael.⁶⁷

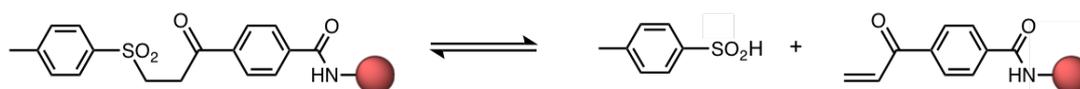


Figure 88. Equilibre réactionnel entre le dérivé tosyle, l'acide sulfonique et la cétone α,β -insaturée.

I.3. Modification site-spécifique des ponts disulfure

Comme on l'a vu précédemment, de nombreuses protéines, et notamment les anticorps, présentent des cystéines natives oxydées sous la forme de ponts disulfure. Ces liaisons disulfure peuvent être assez facilement réduites par voie chimique et sont par conséquent assez souvent utilisées comme points d'ancrage pour l'introduction de divers groupements. Malheureusement, cette méthode peut perturber la structure de la biomolécule et diminuer sa stabilité. Pour pallier ce problème, une stratégie innovante a récemment été développée. Elle consiste en l'utilisation de fonctions de greffage « bivalentes » capables de réagir avec deux cystéines voisines. Ces réactifs peuvent ainsi être insérés dans les ponts disulfure (préalablement réduits) des protéines. Cette approche à l'avantage, par rapport aux techniques classiques, de régénérer des mimes de ponts disulfure et de maintenir plus efficacement la structure tridimensionnelle native de la protéine (**figure 89**).

⁶⁷ Badescu, G.; Bryant, P.; Swierkosz, J.; Khayrzad, F.; Pawlisz, E.; Farys, M.; Cong, Y.; Muroli, M.; Rumpf, N.; Brocchini, S.; Godwin, A. *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 460–469

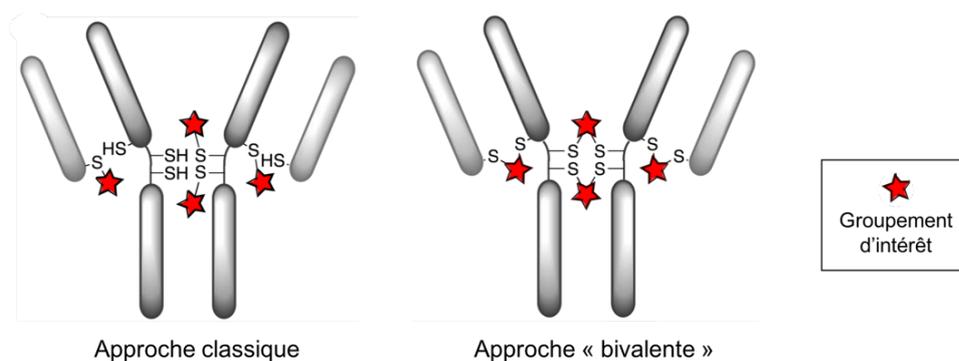


Figure 89. Représentation schématique d'anticorps modifiés sélectivement sur leurs cystéines natives selon l'approche standard et selon l'approche de conjugaison « bivalente » permettant la régénération des ponts intercaténaires.

Une nouvelle génération de maléimides C-substitués a ainsi été élaborée par l'équipe de Baker et Caddick.^{68, 69} Ces maléimides possèdent un ou deux atomes de brome sur chacun des carbones de l'hétérocycle ce qui permet l'introduction successive de deux thiols (**figure 90. A**). Le premier exemple de modification d'une protéine selon cette stratégie a été publié en 2012 par Jones *et al.* et décrivait l'introduction d'un polymère par modification de la liaison disulfure de la calcitonine grâce au dibromomaléimide.⁷⁰ Par la suite, des analogues de ces fonctions mono et dibromomaléimides ont été développées, comme par exemple les dithiophénylmaléimides, les phénoxy maléimides ou les dibromopyridazinediones (**figure 90. B et C**).^{71, 72, 73} La stratégie est particulièrement adaptée à la synthèse de conjugués à base d'anticorps et les exemples de modification d'anticorps et de fragments d'anticorps se sont multipliés rapidement, notamment dans le domaine des ADC.^{74, 75, 76, 77, 78, 79}

⁶⁸ Tedaldi, L. M.; Smith, M. E. B.; Nathani, R. I.; Baker, J. R. *Chem. Commun.* **2009**, 45, 6583–6585

⁶⁹ Smith, M. E. B.; Schumacher, F. F.; Ryan, C. P.; Tedaldi, L. M.; Papaioannou, D.; Waksman, G.; Caddick, S.; Baker, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1960–1965

⁷⁰ Jones, M. W.; Strickland, R. A.; Schumacher, F. F.; Caddick, S.; Baker, J. R.; Gibson, M. I.; Haddleton, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 1847–1852

⁷¹ Castañeda, L.; Wright, Z. V. F.; Marculescu, C.; Tran, T. M.; Chudasama, V.; Maruani, A.; Hull, E. A.; Nunes, J. P. M.; Fitzmaurice, R. J.; Smith, M. E. B.; Jones, L. H.; Caddick, S.; Baker, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 3493–3495

⁷² Marculescu, C.; Kossen, H.; Morgan, R. E.; Mayer, P.; Fletcher, S. A.; Tolner, B.; Chester, K. A.; Jones, L. H.; Baker, J. R. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7139–7142

⁷³ Maruani, A.; Smith, M. E. B.; Miranda, E.; Chester, K. A.; Chudasama, V.; Caddick, S. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 6645–6654

⁷⁴ Schumacher, F. F.; Sanchania, V. A.; Tolner, B.; Wright, Z. V. F.; Ryan, C. P.; Smith, M. E. B.; Ward, J. M.; Caddick, S.; Kay, C. W. M.; Aeppli, G.; Chester, K. A.; Baker, J. R. *Sci. Rep.* **2013**, 3, 1525–1532

⁷⁵ Schumacher, F. F.; Nunes, J. P. M.; Maruani, A.; Chudasama, V.; Smith, M. E. B.; Chester, K. A.; Baker, J. R.; Caddick, S. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 7261–7269

⁷⁶ Pye, H.; Butt, M. A.; Reinert, H. W.; Maruani, A.; Nunes, J. P. M.; Marklew, J. S.; Qurashi, M.; Funnell, L.; May, A.; Stamati, I.; Hamoudi, R.; Baker, J. R.; Smith, M. E. B.; Caddick, S.; Deonarain, M. P.; Yahioglu, G.; Chudasama, V.; Lovat, L. B. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, 15, 1227–1238

⁷⁷ Joubert, N.; Viaud-Massuard, M.-C.; Respaud, R.; Novel antibody-drug conjugates and the use of same in therapy. U.S. Patent 20160151515A1, June 2, 2016

⁷⁸ Morais, M.; Nunes, J. P. M.; Karu, K.; Forte, N.; Benni, I.; Smith, M. E. B.; Caddick, S.; Chudasama, V.; Baker, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 2947–2952

⁷⁹ Hervé-Aubert, K.; Allard-Vannier, E.; Joubert, N.; Lakhri, Z.; Alric, C.; Martin, C.; Viaud-Massuard, M.-C.; Dimier-Poisson, I.; Aubrey, N.; Chourpa, I. *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29, 1553–1559

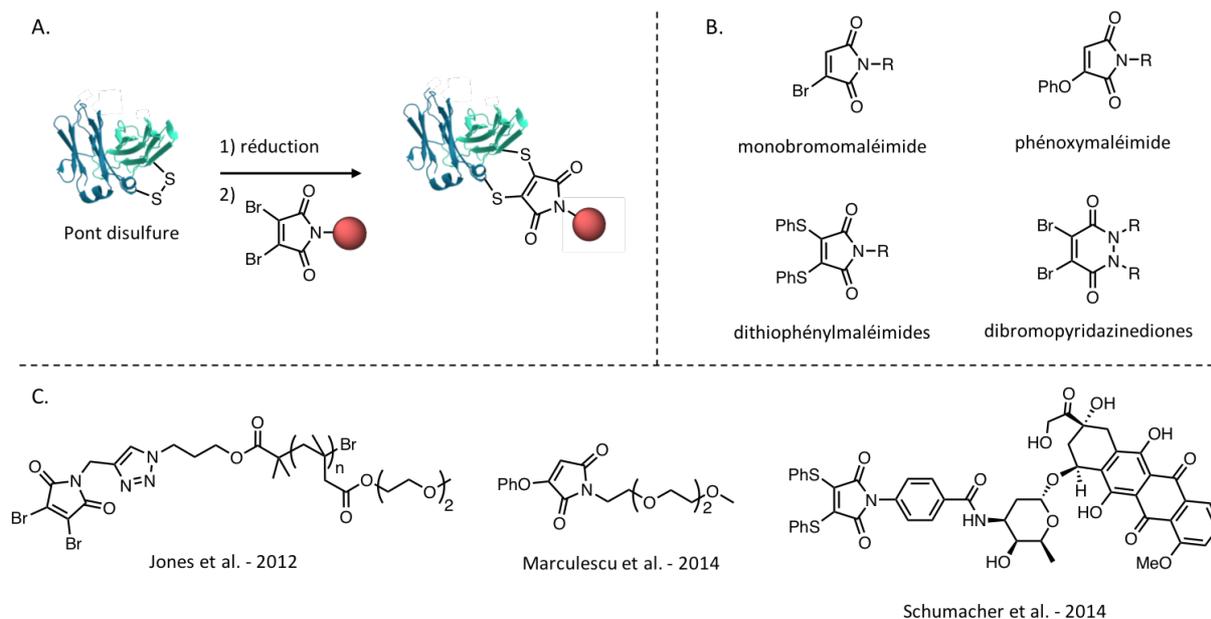


Figure 90. **A.** Schéma de la modification d'un pont disulfure par la fonction dibromomaléimide ; **B.** Autres fonctions développées permettant la modification des ponts disulfure ; **C.** Exemples de dérivés de maléimides C-substitués utilisés pour la modification de ponts disulfure.

Il existe d'autres fonctions un peu moins usuelles permettant la modification de protéines par régénération des ponts disulfure. Les *bis*-sulfones, variantes de la fonction sulfone présentée précédemment dans ce chapitre, ont ainsi permis, par deux libérations successives d'acide *para*-toluènesulfonique, la combinaison d'un fragment Fab de trastuzumab et d'une chaîne polyéthylène glycol (PEG) hydrosoluble (**figure 91. A**).⁸⁰ En 2016, Griebenow *et al.* ont décrit une méthode *one-pot* permettant la réduction de ponts disulfure de peptides cycliques et d'un fragment Fab, suivie de l'insertion d'une fonction alcyne par réaction thiol-yne (**figure 91. B**).⁸¹ Très récemment, il a été montré que la plateforme trifonctionnelle mésitylène pouvait être utilisée pour ce type d'applications (**figure 91. C**).⁸² Le fluorophore FITC a pu être introduit sur le 1,3,5-tris(bromométhyle)benzène *via* la substitution d'un premier atome de brome. Un anticorps a ensuite été conjugué par substitution des deux bromes restants. L'orthogonalité entre les substitutions successives fait cependant défaut et le produit de monosubstitution s'est révélé assez difficile à isoler.

⁸⁰ Khalili, H.; Godwin, A.; Choi, J.; Lever, R.; Brocchini, S. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2262–2277

⁸¹ Griebenow, N.; Dilmaç, A. M.; Greven, S.; Bräse, S. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 911–917

⁸² Ramos-Tomillero, I.; Perez-Chacon, G.; Somovilla-Crespo, B.; Sanchez-Madrid, F.; Domínguez, J. M.; Cuevas, C.; Zapata, J. M.; Rodríguez, H.; Albericio, F. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1199–1208

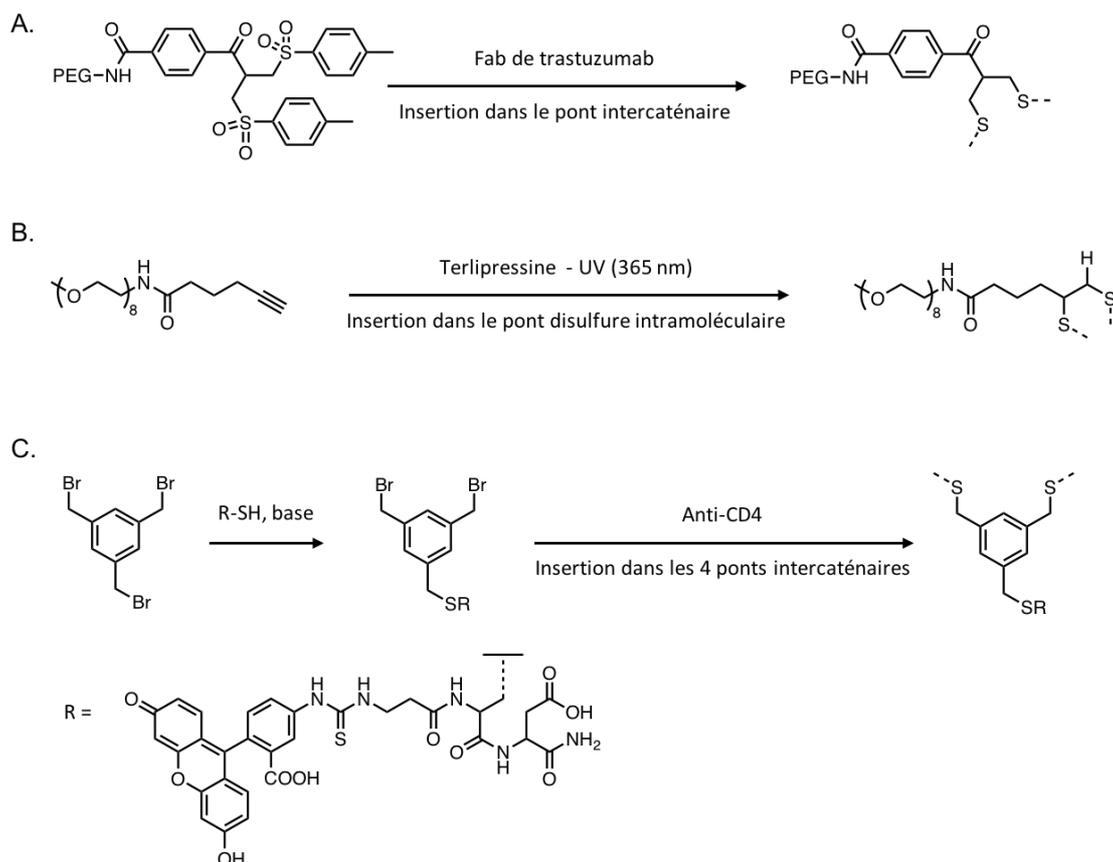


Figure 91. Modification de biomolécules par insertion d'une fonction *bis*-sulfone (A.),⁸⁰ d'une fonction alcyne (B.)⁸¹ et d'un bis-(bromométhyle)benzène (C.)⁸² entre les cystéines constituant leur(s) pont(s) disulfure(s). La terlipressine est un analogue de la vasopressine utilisé comme médicament vasoactif dans la gestion de l'hypotension

I.4. Double modification sélective des résidus cystéines : quelles solutions ?

Tous les réactifs de bioconjugaison présentés auparavant ont démontré leur efficacité pour la modification régiosélective de protéines et ont permis l'élaboration d'agents de ciblage très performants pour l'imagerie médicale et la thérapie. Cependant, la modification de protéines par deux groupements d'intérêt peut s'avérer très utile dans de nombreux domaines et les fonctions sélectives des cystéines capables de réaliser simplement une telle double modification sont finalement assez rares.

L'article de Pye *et al.* précédemment cité⁷⁶ illustre bien le manque de stratégies efficaces pour résoudre ce problème. En effet, l'étude décrit la synthèse d'un agent théranostique combinant un marqueur pour l'imagerie par fluorescence et un photosensibilisateur. L'emploi du dibromomaléimide permet l'introduction site-spécifique du fluorophore proche infrarouge IRDye 800CW au niveau d'un pont disulfure. Cependant le photosensibilisateur chlorine e6 est lui conjugué à la protéine par une réaction non spécifique avec les résidus lysines et l'on perd alors l'intérêt de la spécificité de la première modification.

Comme on l'a vu dans l'introduction générale, il est possible d'introduire séquentiellement les deux groupements d'intérêt par deux greffages régiospécifiques successifs (voir Introduction, Partie IV. 2.). Cependant, cette approche peut générer des problèmes d'hétérogénéité, si les étapes de

conjugaison ne sont pas quantitatives. De plus, il est préférable de limiter au maximum le nombre de sites de bioconjugaison, afin de préserver les propriétés de ciblage de la protéine.

Néanmoins, un exemple intéressant de double modification impliquant l'ajout successif de deux réactifs sélectifs des cystéines a été publié par Marculescu.⁷² L'approche est basée sur l'emploi de phénoxy-maléimide, réactif présenté précédemment, capable de s'insérer dans un pont disulfure pour former un lien dithiosuccinimide. Cette étude a montré que la fonction thiol disponible de l'intermédiaire monothiomaléimide (en équilibre avec le dérivé dithiosuccinimide) était capable de réagir avec un bromomaléimide permettant ainsi l'introduction de deux groupements distincts sur la protéine (**schéma 9**). Cette stratégie a été exemplifiée par l'introduction d'une chaîne PEG et d'une fluorescéine sur les deux cystéines réduites de la somatostatine. Néanmoins, cette méthode n'est pas applicable à toutes les protéines. En effet, les auteurs ont constaté que dans le cas de fragments scFv, la forte interaction intermoléculaire entre les deux chaînes protéiques favorisait la forme dithiosuccinimide, empêchant ainsi une seconde fonctionnalisation. Par ailleurs, comme nous l'avons précédemment mentionné, la rupture du pont disulfure peut altérer la structure tridimensionnelle de la protéine.

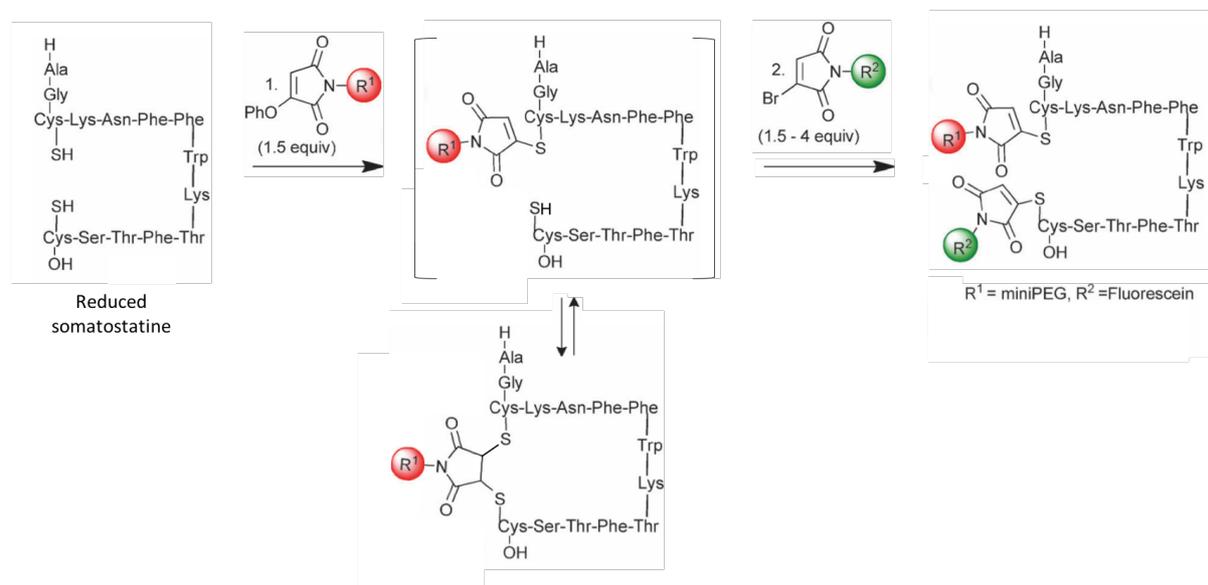


Schéma 9. Double modification de la somatostatine par réduction du pont disulfure suivie de la fonctionnalisation successive de chacune des cystéines au moyen de maléimides C-substitués ; schéma adapté d'article.⁷²

a. Double modification par introduction d'une molécule hybride

Il est préférable d'utiliser une unique molécule réunissant à la fois une fonction de greffage sélective des cystéines et les deux groupements d'intérêt à introduire sur la biomolécule. Cette stratégie a été mise en œuvre avec succès par différentes équipes. Par exemple, Boswell *et al.* ont réalisé la double modification de plusieurs ThiomAbs grâce à un maléimide fonctionnalisé par une tyrosine marquée à l'iode-125 et par un chélateur macrocyclique DO3A (**figure 92**).¹⁶ Dans cette étude le macrocycle sert à moduler la pharmacocinétique du conjugué. En effet, de par sa forte polarité, il permet l'augmentation du temps de résidence du composé iodé dans les cellules tumorales. L'utilisation de ce conjugué en tant que théranostique ou agent imageant bimodal, *via* la complexation de radiométaux par le macrocycle, est également abordée dans les perspectives de l'article. La synthèse

de la molécule organique trifonctionnelle est cependant assez complexe et peu adaptable à d'autres applications.

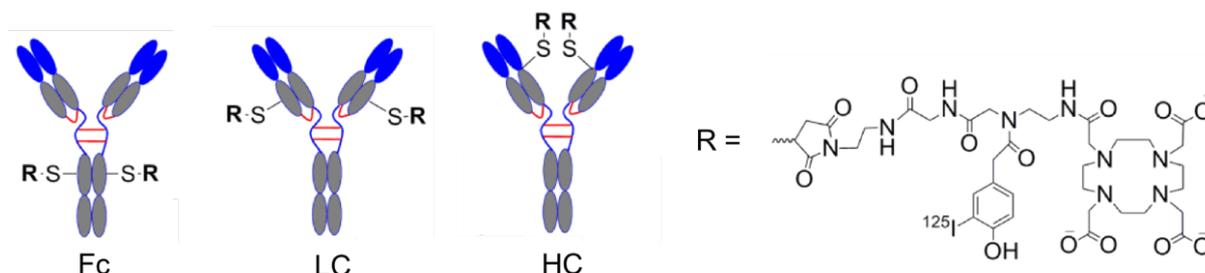


Figure 92. Introduction du dérivé de DOTA fonctionnalisé par le $[^{125}\text{I}]4\text{-hydroxy-3-iodophényl}$ sur trois différents ThiomAbs présentant des cystéines génétiquement introduites sur la fraction constante (Fc), sur la chaîne lourde (HC) ou sur la chaîne légère (LC) ; figure adaptée d'article.¹⁶

b. Les différentes plateformes disponibles

Il existe quelques exemples de plateformes versatiles facilitant l'agencement des deux groupements d'intérêt et de la fonction de bioconjugaison. Dans cette optique, Rashidian *et al.* ont décrit une stratégie basée sur la prénylation de protéines, portant la séquence d'acides aminés CVIA en position C-terminale, par la protéine farnésyltransférase (PFTase ; schéma 10).⁸³ Grâce à cette réaction enzymatique, un isoprénoïde fonctionnalisé par des groupements alcynes et aldéhyde a pu être introduit sélectivement sur la protéine CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*). Le composé fluorescent azido-TAMRA et une chaîne aminooxy-PEG ont ensuite été ajoutés par une réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre et une ligation oxime, respectivement. Cette approche est élégante mais implique l'ajout du motif CaaX sur la protéine à modifier, ce qui complique la stratégie et diminue sa modularité.

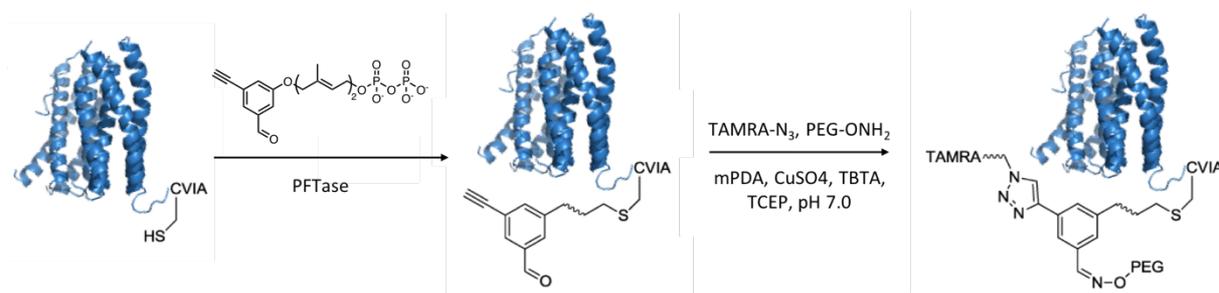


Schéma 10. Introduction cystéine-spécifique d'un isoprénoïde sur la protéine CNTF par réaction enzymatique, puis addition du fluorophore TAMRA par cycloaddition de Huisgen et de l'agent solubilisant PEG par ligation oxime ; schéma adapté d'article.⁸³

Plusieurs groupes fonctionnels initialement conçus pour le marquage des ponts disulfure (voir Chapitre II, Partie I. 3.) ont été appliqués à la thématique de la double modification site-sélective des

⁸³ Rashidian, M.; Kumarapperuma, S. C.; Gabrielse, K.; Fegan, A.; Wagner, C. R.; Distefano, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 16388–16396

cystéines. Par exemple, le dibromomaléimide peut potentiellement être utilisé comme plateforme trivalente pour la combinaison de deux groupements d'intérêt et d'une biomolécule. En effet, au lieu des deux cystéines réduites d'un pont disulfure, deux molécules distinctes portant chacune une fonction thiol peuvent être introduites par substitution nucléophile des deux atomes de brome. La faisabilité de cette approche a été prouvée par les travaux du groupe de Caddick,⁸⁴ qui décrit la conjugaison de deux protéines fluorescentes (GFP) et du fluorophore rhodamine grâce à l'utilisation du dibromomaléimide comme plateforme (**schéma 11**).

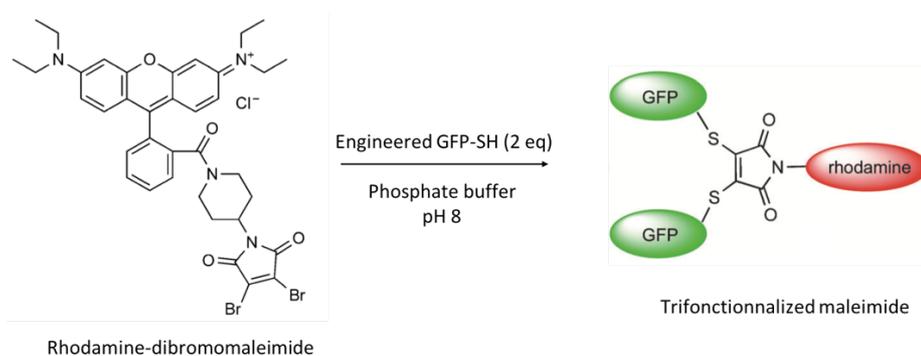


Schéma 11. Combinaison de la rhodamine avec deux protéines fluorescentes grâce à l'utilisation d'un dibromomaléimide, figure adaptée d'article ; schéma adapté d'article.⁸⁴

De même, la dibromopyridazinedione, rapidement évoquée pour la stratégie de régénération des disulfures, a été fonctionnalisée sur chacun de ses atomes d'azote par des groupements permettant des réactions de chimie *click* orthogonales.⁷³ Le composé obtenu (**figure 93. A**) a ensuite été inséré dans les ponts intercaténaire d'anticorps et de fragments Fab d'anticorps, générant ainsi une fonction d'ancrage pour la double modification. La stratégie a montré son efficacité et sa versatilité par l'obtention d'un anticorps avec des propriétés thérapeutiques ainsi qu'un Fab modifié par une chaîne PEG et par la doxorubicine (**figure 93. B**).

⁸⁴ Moody, P.; Smith, M. E. B.; Ryan, C. P.; Chudasama, V.; Baker, J. R.; Molloy, J.; Caddick, S. *ChemBioChem*. **2011**, 13, 39–41

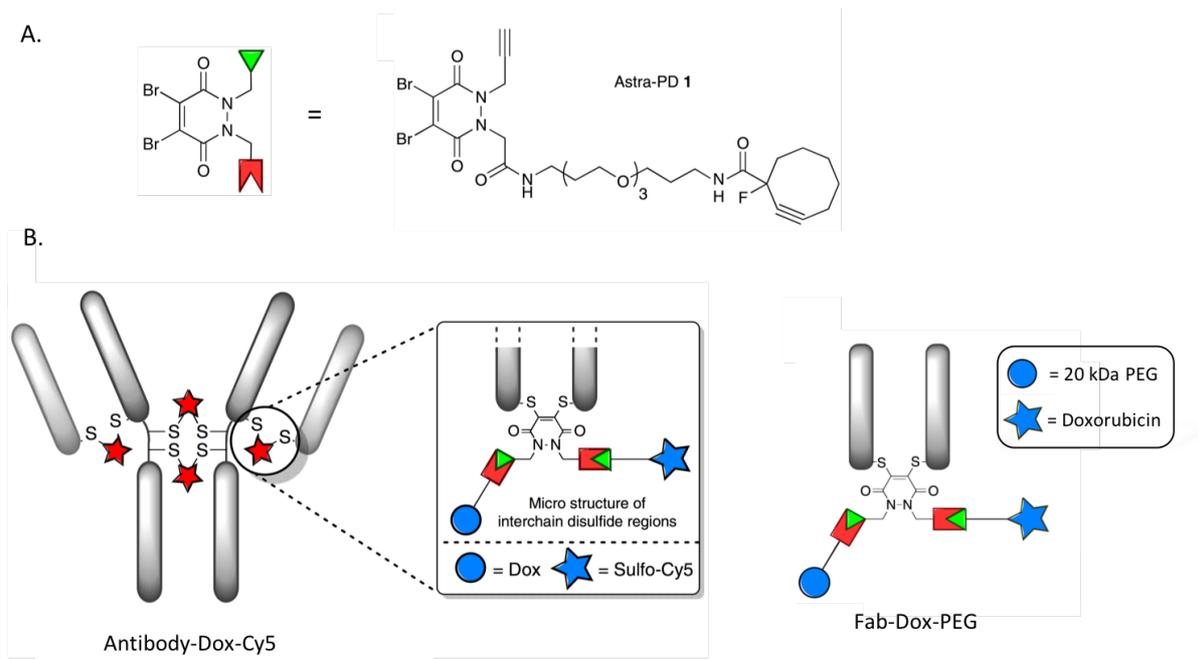


Figure 93. A. Dibromopyridazinedione fonctionnalisée par un alcyne pour une réaction de CuAAC et par un alcyne contraint pour une réaction de SPAAC ; B. Anticorps et fragment Fab doublement modifiés obtenus grâce au composé dibromopyridazinedione ; figure adaptée d'article.⁷³

Les allylsulfones peuvent également être utilisées en tant que plateformes trifonctionnelles pour l'élaboration de protéines doublement modifiées. Ce réactif a ainsi permis l'obtention d'une protéine GFP fonctionnalisée par une biotine et par un fluorophore, sélectivement sur son unique résidu cystéine.⁸⁵ La rhodamine B a été introduite sur l'allylsulfone par estérification, puis le dérivé thiol de la biotine a été greffé par addition de Michael. L'ester α,β -insaturé est alors régénéré par libération spontanée de l'anion sulfinate. Enfin, le composé portant les deux groupements a été conjugué à la cystéine de la protéine. L'orthogonalité entre les deux additions de Michael successives est assurée par l'ajustement du pH, à 6 pour la première et 8 pour la seconde (**schéma 12**).

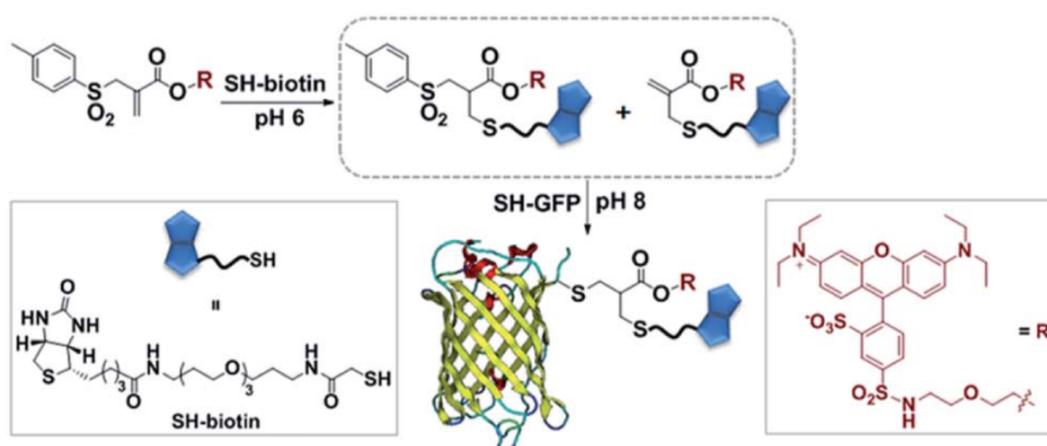


Schéma 12. Double modification de la GFP par la biotine-SH et par la rhodamine B grâce à l'utilisation d'une plateforme trivalente de type allylsulfone ; schéma adapté d'article.⁸⁵

⁸⁵ Wang, T.; Riegger, A.; Lamla, M.; Wiese, S.; Oeckl, P.; Otto, M.; Wu, Y.; Fischer, S.; Barth, H.; Kuan, S. L.; Weil, T. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3234–3239

Récemment, une nouvelle plateforme permettant deux fonctionnalisations séquentielles d'une même cystéine a été évaluée par le groupe de Chiba et Xing.⁸⁶ Un composé de la famille des 2-azidoacrylates s'est montré très prometteur et a permis l'obtention de différents peptides et d'albumine de sérum bovin modifiés sélectivement sur leur résidu cystéine par deux fonctionnalités différentes (**schéma 13**).

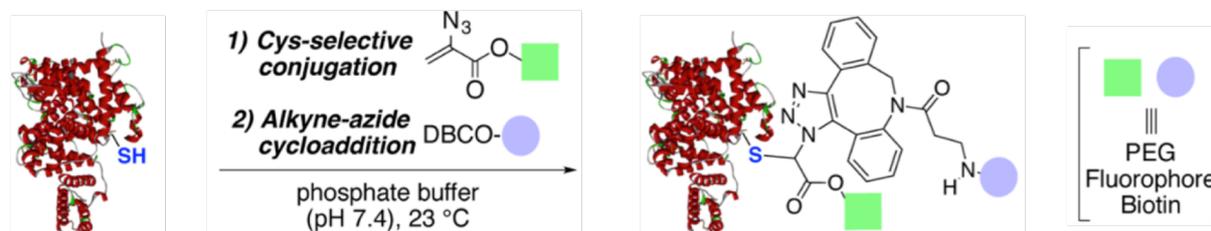


Schéma 13. Double modification séquentielle de l'albumine par deux groupements d'intérêt grâce à la plateforme trifonctionnelle 2-azidoacrylate ; schéma extrait d'article.⁸⁶

Il existe d'autres exemples de modifications multiples de protéines faisant intervenir une plateforme portant une fonction spécifique des cystéines. Notamment, la peroxydase de raifort a pu être doublement modifiée par une biotine et un fluorophore au moyen d'une plateforme de type PEG dont l'une des fonctionnalités était une fonction vinyle sulfone sélective des cystéines.⁸⁷ Dans un autre exemple, une plateforme tétravalente peptidique a permis l'introduction, *via* deux déprotections successives, d'une chaîne PEG et de deux molécules cytotoxiques différentes sur les cystéines réduites d'un anticorps.⁸⁸

Un aspect plus négatif, limitant le développement de ces différentes stratégies, réside dans le fait que les plateformes utilisées ne sont généralement pas commerciales et leur synthèse peut se révéler parfois difficile et coûteuse.

I.5. Présentation du projet

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à nouveau à la dichlorotétrazine. En effet, cette molécule a été employée par plusieurs équipes pour effectuer le pontage intramoléculaire de peptides et de protéines.^{89, 90} De façon analogue au dibromomaléimide, la dichlorotétrazine peut être insérée au sein d'un pont disulfure par substitution nucléophile aromatique de ses deux atomes de chlore (**figure 94. A**). Un fluorophore a ainsi été greffé par réaction d'IEDDA sur une tétrazine insérée dans le pont disulfure de la thiorédoxine (**figure 94. B**).⁹⁰ Les auteurs ont également montré que la tétrazine peut être rompue sous irradiation lumineuse, induisant ainsi des changements

⁸⁶ Ariyasu, S.; Hayashi, H.; Xing, B.; Chiba, S. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 897–902

⁸⁷ Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, F. J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4039–4047

⁸⁸ Levensgood, M. R.; Zhang, X.; Hunter, J. H.; Emmerton, K. K.; Miyamoto, J. B.; Lewis, T. S.; Senter, P. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 733–737

⁸⁹ Tucker, M. J.; Courter, J. R.; Chen, J.; Atasoylu, O.; Smith, A. B.; Hochstrasser, R. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3612–3616

⁹⁰ Brown, S. P.; Smith, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4034–4037

conformationnels au sein de la protéine. Ces études ont éveillé notre intérêt car elles laissent à penser que la dichlorotétrazine présente une certaine sélectivité vis-à-vis des cystéines, suscitant ainsi des perspectives attrayantes pour cette molécule.

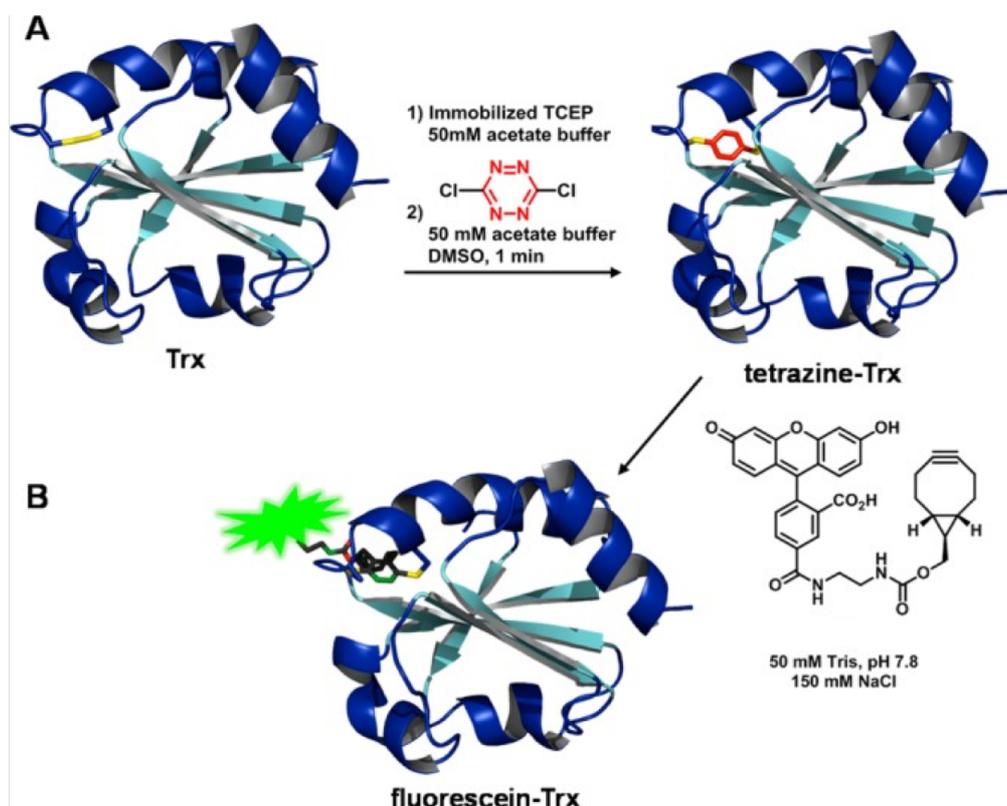


Figure 94. A. Insertion d'une dichlorotétrazine dans le pont disulfure, préalablement réduit, de la thiorédoxine ; B. Addition de la fluorescéine-BCN par réaction IEDDA ; figure extraite d'article.⁹⁰

Les travaux effectués en vue de la mise au point de la stratégie de bioconjugaison présentée dans le premier chapitre ont mis en évidence le potentiel de la dichlorotétrazine comme plateforme trifonctionnelle. Par ailleurs, les tests réalisés ont permis de mieux cerner les propriétés réactives de la dichlorotétrazine. Il a notamment été montré que cette molécule possède deux sites électrophiles dont la réactivité est très modulable et peut être modifiée par variation de la densité électronique de l'hétérocycle tétrazine (voir Chapitre I).

Forts de ces observations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'un des sites électrophiles de la dichlorotétrazine pourrait réagir sélectivement avec des nucléophiles de type thiol et permettre ainsi la double modification régiospécifique de protéines contenant un ou plusieurs résidus cystéines.

Pour ce faire, la stratégie envisagée consiste à introduire d'abord l'un des groupements d'intérêt sur la dichlorotétrazine selon une première réaction de S_NAr . Le nucléophile utilisé doit alors être judicieusement choisi pour que la tétrazine monosubstituée obtenue soit sélective des thiols. Dans un second temps, la tétrazine monosubstituée est conjuguée sélectivement aux résidus cystéines de la protéine *via* une seconde S_NAr . Enfin, le second agent d'intérêt est ajouté par réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (**figure 95**).

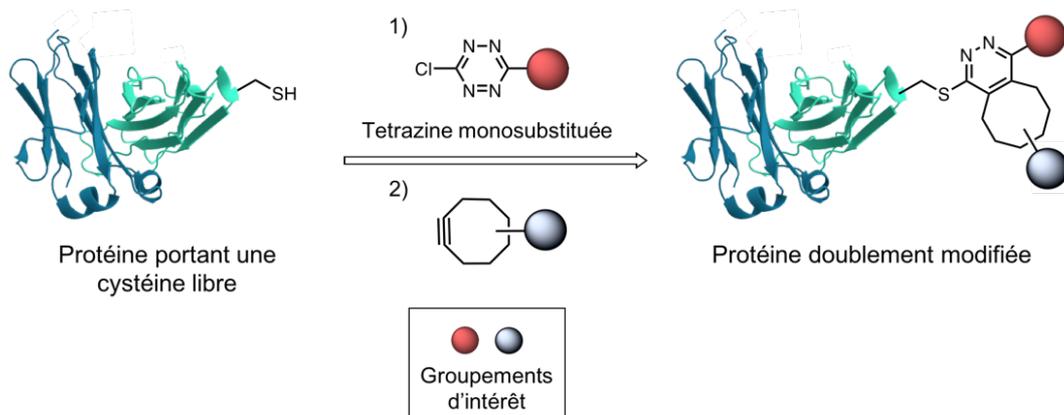


Figure 95. Double modification séquentielle d'un résidu cystéine d'une protéine par additions successives d'une chlorotétrazine et d'un diénophile.

Comme la stratégie développée dans le chapitre I, cette approche est avantageuse en termes de simplicité, modularité et coût. Par rapport à la première stratégie, l'agencement des trois fonctionnalités autour de la dichlorotétrazine se fait selon un schéma légèrement différent. La bioconjugaison est effectuée par marquage spécifique des cystéines libres, ce qui autorise la mise en application de notre stratégie aux nombreuses biomolécules qui présentent une ou plusieurs cystéines (natives ou introduites par génie génétique).

II. RESULTATS ET DISCUSSION

Afin d'évaluer le potentiel de la stratégie présentée (**figure 96**), nous avons tout d'abord cherché à résoudre les points les plus délicats, à savoir le choix du premier nucléophile, la sélectivité de la deuxième S_NAr pour les fonctions thiols et la faisabilité de la réaction d'IEDDA sur la tétrazine résultante. Dans un souci d'efficacité et de rapidité, nous avons donc examiné la viabilité de notre stratégie à l'aide d'un peptide modèle simple et les expériences mettant en jeu des protéines n'ont été envisagées que plus tard.

Comme pour l'approche développée dans le chapitre I, nous avons d'abord appliqué cette seconde stratégie à l'élaboration d'agents imageants bimodaux nucléaire/optique. La démarche a ensuite été étendue au domaine de la thérapie *via* la synthèse d'un agent théranostique vectorisé.

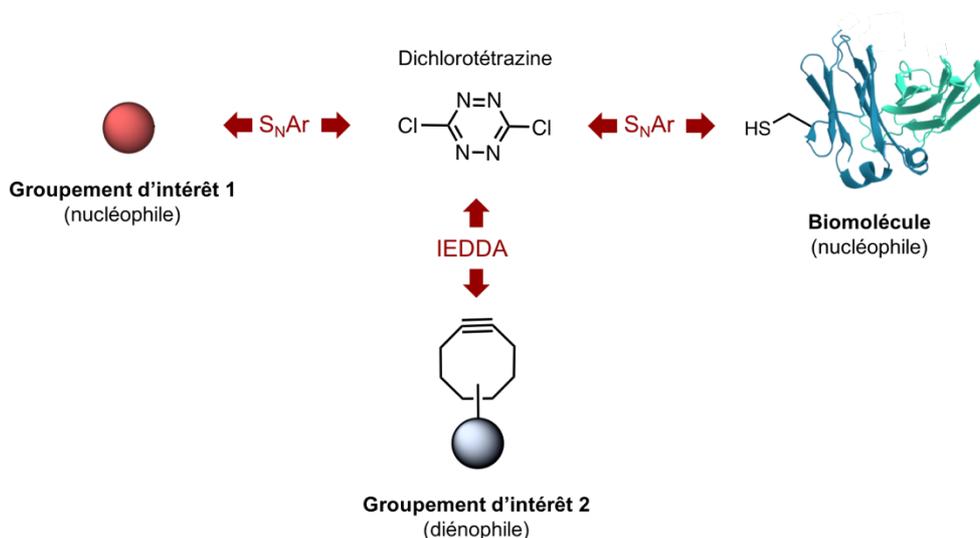


Figure 96. Schéma général de la seconde stratégie basée sur l'utilisation de la dichlorotétrazine en tant que plateforme trifonctionnelle.

II.1. Evaluation préliminaire de la stratégie sur un peptide modèle

a. Synthèse de chlorotétrazine monofonctionnalisée par un groupe thiol

Les résultats de tests préliminaires nous ont permis de constater que l'atome de chlore d'une tétrazine monosubstituée par un thiol pouvait être assez facilement substitué par un second nucléophile de type thiol. En revanche, l'ajout d'une amine ne donnait lieu à aucune réaction. Il nous a donc semblé intéressant d'approfondir nos recherches dans cette direction et d'évaluer précisément la sélectivité de ces tétrazines monosubstituées vis-à-vis des résidus cystéines.

Dans ce but, nous avons synthétisé un dérivé soufré du (*R*)-NODAGA pour effectuer la S_NAr d'un des atomes de chlore de la dichlorotétrazine (**schéma 14**).

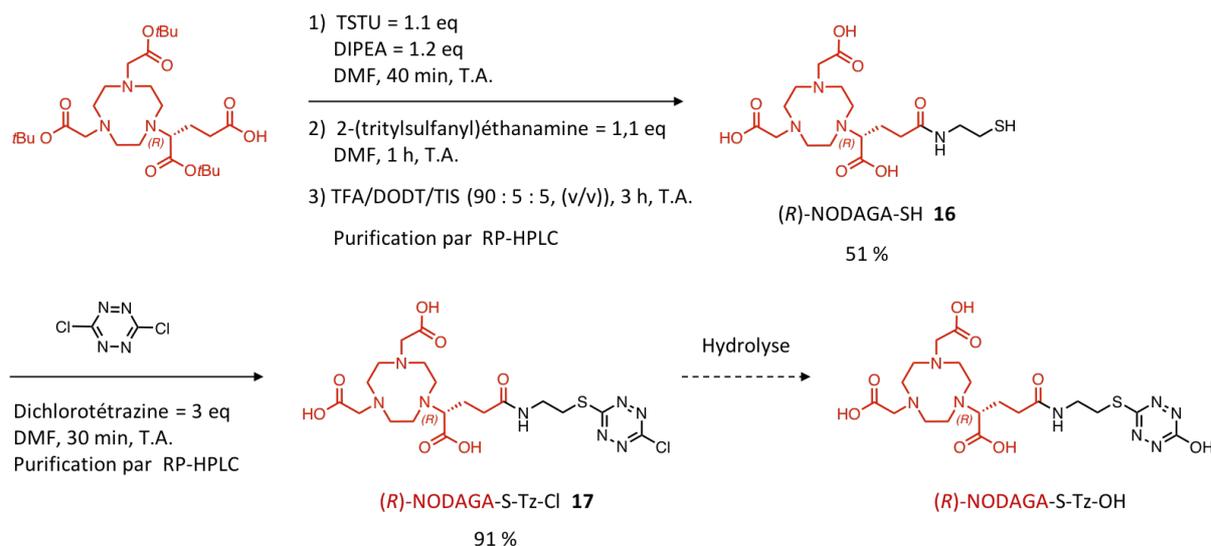


Schéma 14. Synthèse de l'intermédiaire (R)-NODAGA-SH **16**, réaction de S_NAr d'un des atomes de chlore de la dichlorotétrazine pour former le composé (R)-NODAGA-S-Tz-Cl **17** et structure du composé **17** après hydrolyse.

Le composé 2-(tritylsulfanyl)éthanamine, synthétisé à partir de la cystéamine et du chlorure de trityle selon un protocole précédemment publié,⁹¹ a été introduit sur la fonction acide carboxylique du (R)-NODAGA(tBu)₃ par formation d'une liaison amide grâce à l'agent de couplage TSTU. Les groupements protecteurs *tert*-butyles et trityle ont été clivés par une solution d'acide trifluoroacétique, en présence de « scavengers ». Le composé (R)-NODAGA-SH **16** a été obtenu après purification par RP-HPLC semi-préparative avec un rendement de 51 %.

La substitution d'un des deux atomes de chlore de la dichlorotétrazine a pu être réalisée très facilement en présence de (R)-NODAGA-SH dans le DMF. L'ajout de base n'est pas nécessaire pour cette réaction et les premiers essais de substitution ont montré au contraire que l'ajout de DIPEA provoque la dégradation de la tétrazine. La dichlorotétrazine a été introduite en excès pour éviter la formation du produit de disubstitution. La tétrazine monosubstituée (R)-NODAGA-S-Tz-Cl **17** a ainsi été obtenue avec un rendement de 91 %. Ce composé s'est avéré être assez sensible à l'hydrolyse et la formation de (R)-NODAGA-S-Tz-OH a été observée pour les lots les plus anciens synthétisés au laboratoire (**schéma 14**).

b. Choix du peptide modèle

Le peptide choisi pour valider notre stratégie a été le nonapeptide Ac-CKYWGRGDS-NH₂. Il est constitué des principaux acides aminés naturels présentant des chaînes latérales nucléophiles, sujettes à l'alkylation. Le peptide contient donc un résidu cystéine mais également une lysine (amine primaire), une tyrosine (phénol), un tryptophane (indole), une arginine (guanidine), un aspartate (carboxylate) et une sérine (alcool primaire) (**figure 97**). Ce peptide a été précédemment décrit par l'équipe de Potik dans un article présentant l'élaboration d'une nouvelle fonction de bioconjugaison

⁹¹ Chang, W.-Y.; Kao, H.-W.; Wang, H.-E.; Chen, J.-T.; Lin, W.-J.; Wang, S.-J.; Chen, C.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 6486–6491

sélective des cystéines.⁹² En effet, accompagné d'un contrôle négatif (*i.e.* une variante du peptide dans lequel la cystéine est remplacée par une méthionine (**figure 97**)), ce peptide permet de prouver la spécificité d'un greffage sur le résidu cystéine.

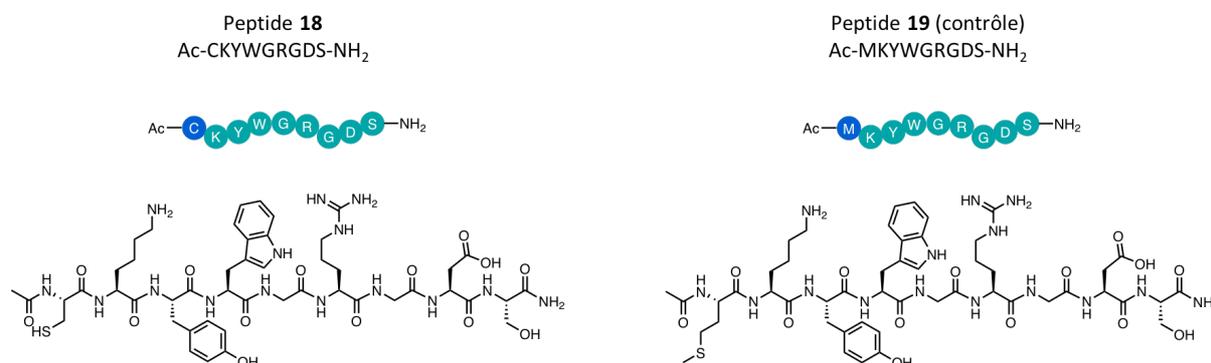


Figure 97. Structure du peptide modèle **18** et du peptide contrôle **19**.

Cette technique nous a paru efficace et élégante et nous l'avons mise en œuvre pour évaluer la cinétique et la sélectivité de la bioconjugaison de notre tétrazine monosubstituée **17**. Par ailleurs, le faible poids moléculaire de ces peptides a permis le suivi de leur modification par simple analyse RP-HPLC-LRMS *via* un détecteur de masse basse résolution, ce qui n'aurait pas été possible pour une biomolécule de type protéine. Les peptides Ac-CKYWGRGDS-NH₂ **18** et Ac-MKYWGRGDS-NH₂ **19** ont été synthétisés par synthèse peptidique en phase solide automatisée.⁹² Plusieurs dizaines de mg de chaque peptide ont pu être obtenus. Ainsi, l'utilisation de ces peptides pour les premières expériences nous a permis de travailler dans des conditions confortables.

c. Bioconjugaison de la tétrazine monosubstituée : étude de la spécificité pour les cystéines

La réactivité du composé (*R*)-NODAGA-S-Tz-Cl **17** a été testée en présence de 2,5 équivalents du peptide Ac-CKYWGRGDS-NH₂ **18** en solution dans le tampon phosphate à pH 7,1 (**schéma 15**). Après 1 min, 3 min et 30 min à 20 °C, la réaction a été stoppée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 M. L'analyse du milieu réactionnel après 1 min par RP-HPLC-LRMS basse résolution a montré la disparition complète du peptide initial et la formation d'un unique produit dont la masse correspondait au conjugué Ac-C(Tz-S-(*R*)-NODAGA)KYWGRGDS-NH₂ **20**. L'expérience a également été menée avec le peptide contrôle **19** et aucun nouveau produit n'a été observé après 30 min (**schéma 15**). Après 3 h de réaction, nous avons tout de même détecté la formation d'une très faible quantité (~ 1 %) d'un nouveau produit probablement généré par la modification de la lysine du peptide. Au premier abord, il apparaît donc que la substitution du chlore de la tétrazine monosubstituée **17** peut être effectuée par le groupement thiol des cystéines, avec une cinétique et une sélectivité très intéressantes.

⁹² Arumugam, S.; Guo, J.; Mbuja, N. E.; Friscourt, F.; Lin, N.; Nekongo, E.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1591–1598

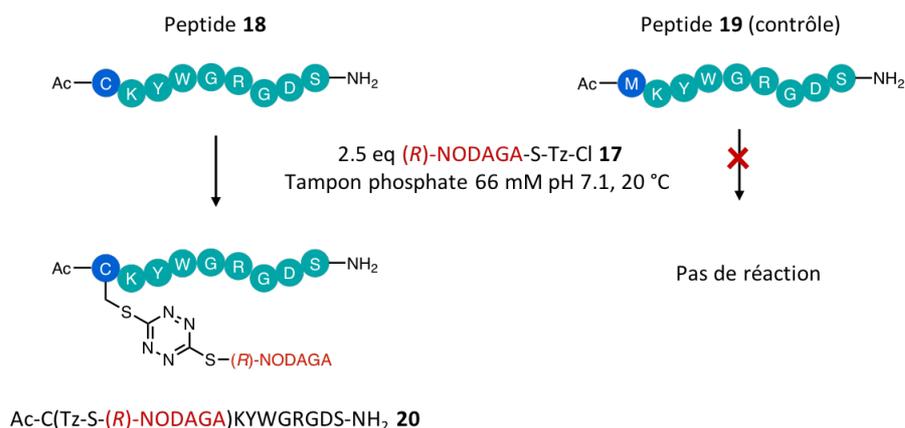


Schéma 15. Modification du peptide modèle **18** par réaction de la chlorotétrazine **17** avec la cystéine. Aucune réaction n'a lieu avec le peptide contrôle **19** dans les mêmes conditions.

Par la suite, la cinétique de la bioconjugaison de **17** avec le peptide **18** a été évaluée pour toute une gamme de pH allant de pH 6,3 jusqu'à pH 3,4 (**figure 98**). Le suivi a été effectué selon le protocole décrit pour l'expérience à pH 7,1. Comme attendu, la réaction de substitution nucléophile aromatique est ralentie à pH plus acide. Cependant, la conversion est totale après 30 min, même à pH 3,4. Pour le peptide contrôle, le pH a également été diminué jusqu'à pH 5,2 ce qui a permis de supprimer la très faible proportion de produit de bioconjugaison formé après 3 h. Ces expériences ont montré que la sélectivité de la réaction peut être modulée par le contrôle du pH. Ceci nous a paru intéressant car dans le cas des protéines, les lysines sont généralement plus nombreuses et accessibles que les cystéines, et la diminution du pH permettrait alors le maintien de la sélectivité. Par ailleurs, comparativement au cas des peptides, les cystéines (et plus généralement, les sites de bioconjugaison) au sein des protéines sont souvent moins accessibles et leur modification nécessite parfois l'ajout de quantités importantes de réactifs. Ainsi nous avons cherché à évaluer la sélectivité de la bioconjugaison lors de l'ajout de 25 équivalents de **17** au peptide contrôle **19**. La proportion de conjugué formée est alors plus importante mais ne dépasse pas les 15 % à pH 7,1 après 3 h. À nouveau, la modification des lysines peut être minimisée en abaissant le pH. Ce test nous a donc indiqué que même en présence d'un large excès de chlorotétrazine, la substitution de l'atome de chlore est sélective des cystéines.

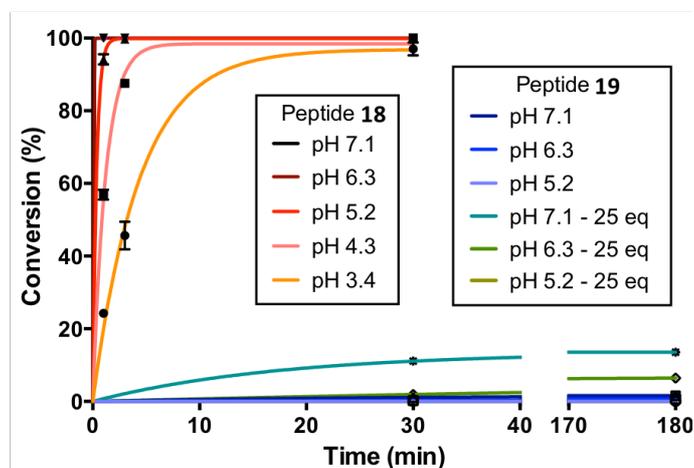


Figure 98. Suivi par RP-HPLC-LRMS (intégration à 214 nm) de la conversion des peptides **18** et **19** en présence de (R)-NODAGA-S-Tz-Cl **17**.

d. Evaluation de la stabilité du peptide modifié

Afin d'étudier la stabilité de la tétrazine substituée par deux groupements thiol, nous avons à nouveau réalisé la conjugaison de **17** et **18** au départ de quantités de réactifs plus importantes et le conjugué **20** a pu être isolé. Nous avons ainsi obtenu une quantité suffisante du conjugué **20** (quelques milligrammes) pour évaluer sa stabilité dans le sérum de veau fœtal (FBS). Le composé a été incubé à 37 °C dans le FBS à 25 % (v/v) dans le milieu de culture RPMI. Après 5 min, 1 h, 2 h, 4 h et 9 h, un échantillon a été prélevé et analysé par RP-HPLC-LRMS. La proportion de conjugué intact a été mesurée par intégration du chromatogramme obtenu à 280 nm. Comme le montre le graphe de la **figure 99**, le conjugué se dégrade rapidement dans ces conditions, avec un temps de demi-vie indicatif d'environ 30 min. Le produit de dégradation majoritaire a pu être identifié et correspond au produit d'hydrolyse Ac-C(Tz-OH)KYWGRGDS-NH₂.

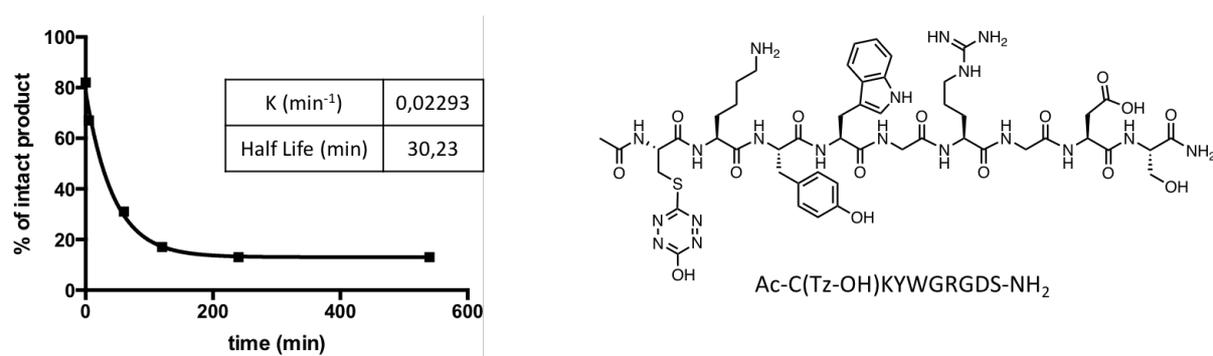


Figure 99. Cinétique de dégradation de la tétrazine disubstituée **20** (courbe de régression non linéaire modélisée selon une cinétique de type *one phase decay* grâce au logiciel Prism 6 Graph Pad) et structure du produit majoritaire formé par hydrolyse.

Bien que les produits d'hydrolyse NODAGA-S-Tz-OH et Ac-CKYWGRGDS-NH₂ n'ont pu être clairement identifiés, il est probable que la liaison thioéther entre le peptide et la tétrazine substitué par le NODAGA soit également sensible à l'hydrolyse. Par comparaison à la tétrazine disubstituée par un nucléophile amine et un nucléophile thiol utilisée dans la stratégie présentée dans le chapitre I, la tétrazine disubstituée **20** est bien moins stable. Ceci n'est pas surprenant, compte tenu du fait que l'hétérocycle tétrazine fonctionnalisé par deux thiols est plus appauvri en électrons et donc plus réactif que lorsqu'il est fonctionnalisé par un thiol et une amine. La conservation des tétrazines disubstituées par deux thiols est donc délicate et il est préférable de les engager rapidement dans l'étape suivante pour former une (dihydro-)pyridazine stable.

e. Evaluation de la réaction d'IEDDA sur le peptide modèle

Nous avons poursuivi la validation de la stratégie par l'étude de la réaction d'IEDDA entre le conjugué **20** et un diénophile. Le diénophile bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) ayant donné de bons résultats lors des expériences de chimie *click* décrites dans le premier chapitre, nous avons décidé de l'utiliser à nouveau dans cette étude. Le dérivé NODAGA-BCN, fourni par la société CheMatech, a été ajouté au conjugué Ac-C(Tz-S-(R)-NODAGA)KYWGRGDS-NH₂ en solution dans du PBS pour obtenir le composé **21** dont la structure est présentée dans la **figure 100. A**. Il est à noter que ce premier essai ne reflète pas complètement l'objectif final. En effet, au lieu d'introduire conjointement une sonde

fluorescente et un chélateur sur le peptide, nous avons introduit deux NODAGA. Néanmoins, la disponibilité immédiate du NODAGA-BCN nous a permis de valider rapidement la stratégie.

L'introduction d'une tétrazine non symétrique sur un bicyclononyne génère la formation d'un centre de chiralité. Ici, et comme dans la plupart des cas, les composés mis en jeu présentaient d'autres centres de chiralité. Le composé **21** résultant de la réaction de IEDDA était donc constitué d'un mélange de diastéréoisomères. Dans la **figure 100. A**, la présence des deux diastéréoisomères a été mise en évidence par des liaisons en pointillé ; par la suite, seul l'un des deux diastéréoisomères formés (choisi arbitrairement) sera représenté.

La cinétique de la cycloaddition a pu être évaluée par un suivi par spectrométrie UV-visible (**figure 100. B, C et D**). En effet, la tétrazine **20** présente deux bandes d'absorption caractéristiques avec des maxima à 416 et 515 nm et l'intensité de ces bandes d'absorption diminue lors de la réaction d'IEDDA avec le BCN. La cinétique de la réaction s'est avérée très rapide et nous avons pu déterminer un temps de demi-vie de 3 minutes dans les conditions de l'expérience.

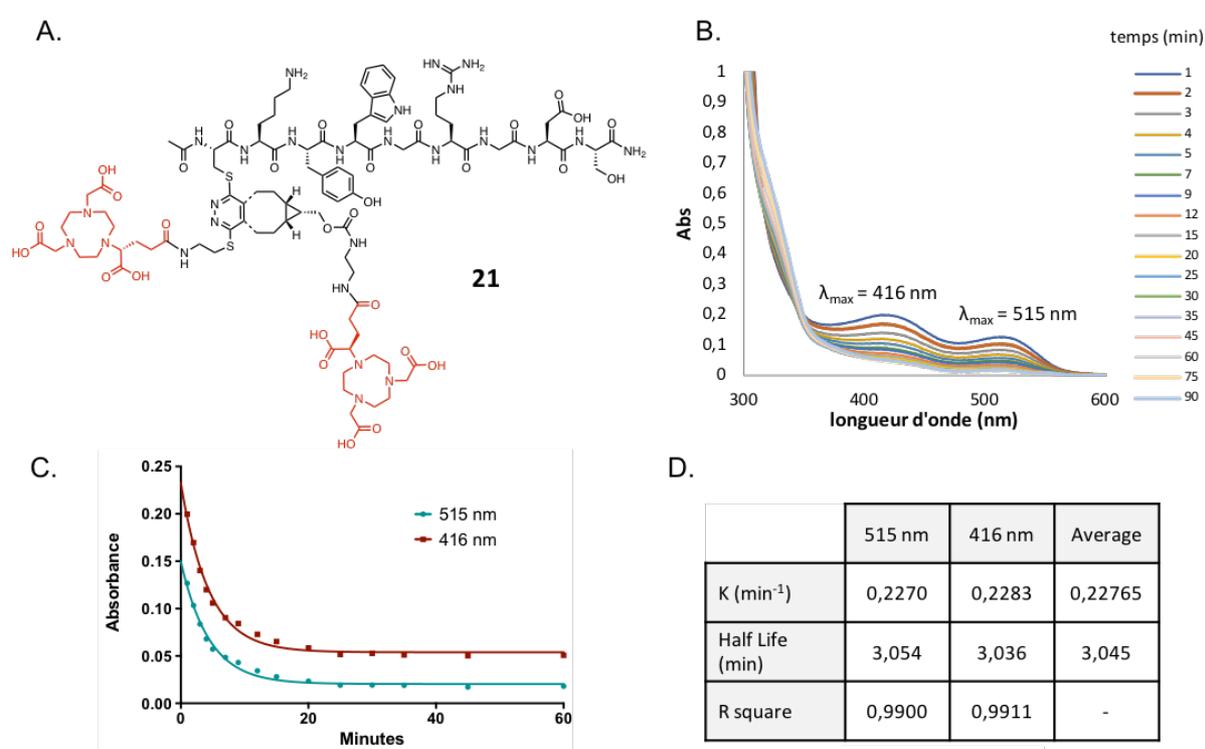


Figure 100. Etude de la réaction de cycloaddition entre les composés **20** et le NODAGA-BCN ; **A.** Structure du composé **21** ; **B.** Evolution de l'absorbance du milieu réactionnel au cours du temps sur la gamme de longueur d'onde 300 - 600 nm ; **C.** Variation de l'absorbance à 416 et 515 nm en fonction du temps de réaction (courbes de régression non linéaire modélisées selon une cinétique de type *one phase decay* grâce au logiciel Graph Pad Prism 6) ; **D.** Valeurs des constantes de vitesse et des demi-vies de la réaction.

Les quantités disponibles de réactifs n'ont pas permis d'isoler le composé **21**. Cependant, les différentes expériences réalisées nous ont paru suffisamment convaincantes pour envisager l'application de notre stratégie à une protéine.

II.2. Synthèse des différents intermédiaires

Nous avons cherché à mettre en évidence la versatilité de la stratégie *via* l'introduction de divers précurseurs sur la plateforme dichlorotétrazine. Pour cela, plusieurs sondes imageantes soufrées ont été préparées en plus du NODAGA-SH (**figure 101**). Le DOTAGA-SH **22** a été obtenu à partir du DOTAGA(*t*Bu)₄ et de la 2-(tritylsulfanyl)éthanamine selon une voie de synthèse similaire à celle du NODAGA-SH. Les synthèses de la Rhodamine B-SH **4** et du BODIPY-SH **6** ont déjà été présentées dans le chapitre I. De façon analogue au composé **17**, les composés **23**, **24** et **25** ont été préparé sans difficulté majeure, par substitution d'un des atomes de chlore de la dichlorotétrazine. L'obtention de cette série de tétrazines monosubstituées montre que la plateforme dichlorotétrazine est modulable et qu'il est possible d'introduire aussi bien des macrocycles chélateurs que des fluorophores.

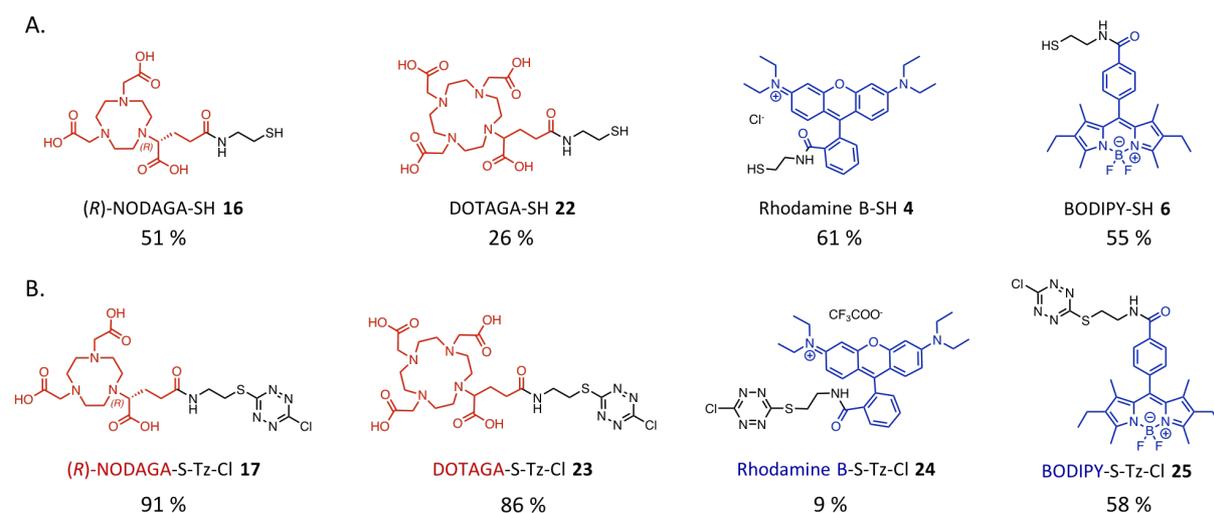


Figure 101. Structures des différents agents imageants dérivés par une fonction thiol (A.) et par une chlorotétrazine (B.).

En complément du NODAGA-BCN mis à disposition par Chematech, nous avons synthétisé deux dérivés BCN fluorescents (**schéma 16**). Les formes acides carboxyliques de deux cyanines 5.0, sulfonatée et non sulfonatée, ont été fonctionnalisées par un groupement éthylènediamine. Le couplage peptidique a été réalisé *via* la formation d'un ester de *N*-hydroxysuccinimidyle intermédiaire grâce au TSTU, puis un excès d'amine a été introduit. Les composés **26** et **27** ont pu être isolés après une étape de purification par RP-HPLC semi-préparative. Le BCN-NHS a ensuite été introduit et les composés **28** et **29** ont été obtenus avec succès. Les conditions réactionnelles ont d'abord été testées sur la cyanine non sulfonatée et les rendements obtenus pour chacune des deux étapes sont corrects. En revanche, les rendements obtenus au départ de la cyanine sulfonatée sont beaucoup plus faibles (8 % et 12 %, pour la première et la seconde étape, respectivement). Ces rendements médiocres peuvent s'expliquer par la faible quantité de cyanine disponible et par la présence des groupements sulfonates réputés pour compliquer les purifications par chromatographie en phase inverse.

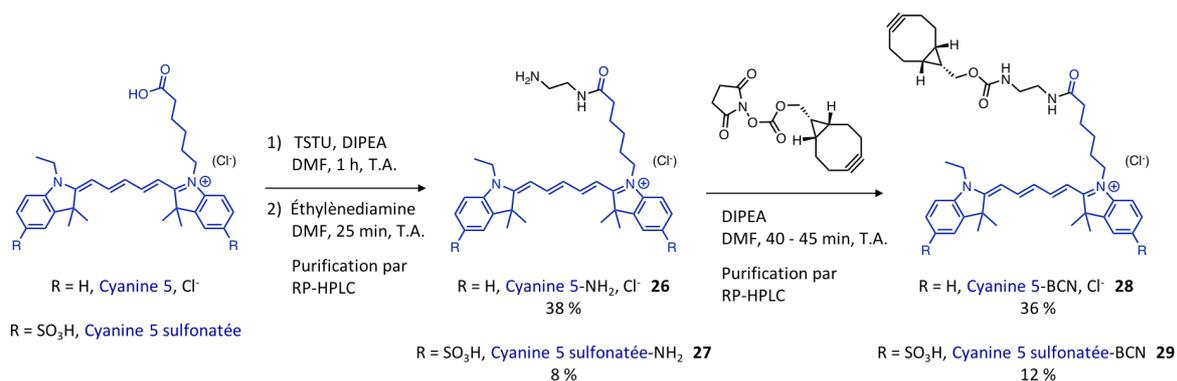


Schéma 16. Schéma réactionnel de la synthèse en deux étapes des dérivés BCN des cyanines 5 sulfonaté et non sulfonaté.

Après avoir préparé l'ensemble de ces précurseurs, nous avons pu évaluer notre stratégie de double modification des protéines sur les résidus cystéines sur une protéine modèle, l'albumine.

II.3. Double modification cystéine-spécifique de l'albumine de sérum bovin

a. Propriétés biologiques et caractérisation de l'albumine

L'albumine est une protéine plasmatique d'environ 66 kDa. Sa concentration dans le plasma est très élevée (35-50 g/L chez l'homme) et elle permet notamment le maintien de la pression oncotique dans le réseau sanguin. Chez l'homme, la demi-vie de l'albumine dans l'organisme est d'une vingtaine de jours. Il a été montré par plusieurs études que cette protéine est capable de s'accumuler dans les tissus tumoraux par effet EPR (voir Introduction, Partie II. 1.). Le diamètre de 7.2 nm de l'albumine limite son évacuation hors de la tumeur et le temps nécessaire à la clairance tumorale de cette protéine peut être triplée voir quadruplée par rapport à des tissus sains.^{93, 94, 95} Depuis ces études, de nombreuses publications ont rapporté le développement et l'évaluation de conjugués basés sur une protéine d'albumine modifiée par des émetteurs radioactifs ou fluorescents.^{96, 97} Grâce au ciblage passif induit par l'albumine, la proportion de composé accumulé dans la tumeur peut atteindre 7 à 8 % de la dose administrée chez des souris ddY portant des xénogreffes de cellules de sarcome 180.⁹³ Comme le présente en détail une revue de F. Kratz, il a aussi été montré que l'albumine peut être utilisée pour la vectorisation d'agents cytotoxiques.⁹⁸ Il faut cependant remarquer qu'en dépit des résultats prometteurs observés sur les modèles murins, ceux-ci se sont rarement concrétisés chez l'homme lors des études cliniques. L'efficacité du ciblage tumoral par effet EPR chez l'homme fait aujourd'hui débat.^{99, 100, 101}

⁹³ Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1986**, 46, 6387–6392

⁹⁴ Nagamitsu, A.; Greish, K.; Maeda, H. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2009**, 39, 756–766

⁹⁵ Maeda, H. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 797–802

⁹⁶ Heneweer, C.; Holland, J. P.; Divilov, V.; Carlin, S.; Lewis, J. S. *J. Nucl. Med.* **2011**, 52, 625–633

⁹⁷ Vasquez, K. O.; Casavant, C.; Peterson, J. D. *PLoS One.* **2011**, 6, e20594

⁹⁸ Kratz, F. *J. Control. Release.* **2008**, 132, 171–183

⁹⁹ Danhier, F. *J. Control. Release.* **2016**, 244, 108–121

¹⁰⁰ Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. *J. Control. Release.* **2012**, 161, 175–187

¹⁰¹ Hare, J. I.; Lammers, T.; Ashford, M. B.; Puri, S.; Storm, G.; Barry, S. T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 108, 25–38

Outre ses propriétés de ciblage, l'albumine fait preuve d'une grande robustesse et résiste à une gamme de pH allant de 4,0 à 9,0 et une température de 60 °C pendant 10 h. D'autre part, cette protéine est particulièrement intéressante dans notre cas car l'une de ses 35 cystéines est naturellement sous sa forme réduite. Pour toutes ces raisons, l'albumine constitue un modèle idéal pour la validation de stratégies de greffage sélectives des cystéines.

Nous avons choisi d'utiliser l'albumine de sérum bovin (BSA) dans notre étude car son prix est très attractif (10 €/g chez Sigma Aldrich). Tout d'abord, nous avons quantifié les sulfhydryles libres et accessibles par le test d'Ellman. Pour ce faire, un excès de dithio-5,5'-bis(nitro-2-benzoate de sodium) (DTNB²⁻) a été ajouté à la BSA en solution dans un tampon borate à pH 8,0 (**schéma 17**). Dans ces conditions, les fonctions thiols sont sous leur forme anionique et la rupture de la liaison soufre-soufre du DTNB²⁻ est rapidement effectuée, libérant ainsi un anion 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB²⁻). La proportion de TNB²⁻ générée peut être mesurée par mesure de l'absorbance à 412 nm. A partir de la concentration de BSA initialement introduite, il est ainsi possible de quantifier les cystéines sous forme libre (non oxydée) par molécule de BSA. Pour plus de fiabilité, les valeurs d'absorbance enregistrées ont été corrélées à celles obtenues pour une solution de cystéine dont la concentration était connue et nous avons ainsi pu déterminer un ratio de 0,5 thiol libre par molécule d'albumine. Cette valeur s'explique par le fait que le résidu cystéine de la protéine peut subir des transformations post-traductionnelles telles qu'une cystéinylation (formation d'un pont disulfure avec une molécule de cystéine libre).¹⁰²

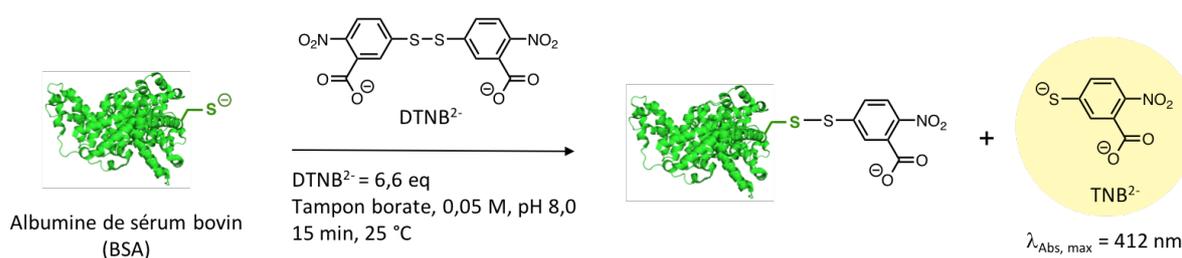


Schéma 17. Réaction mise en jeu lors de l'expérience de quantification des cystéines libres de la BSA par le test d'Ellman.

A la différence de l'anticorps trastuzumab utilisé précédemment (Chapitre I.), l'albumine ainsi que les différents conjugués synthétisés à partir de cette protéine ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse haute résolution. En effet, leur poids moléculaire est compris dans une gamme suffisamment basse pour permettre leur caractérisation grâce au système de spectrométrie de masse haute résolution disponible au laboratoire (LTQ Orbitrap XL). Cette technique d'analyse étant plus précise et efficace que la spectrométrie de masse par MALDI-TOF, nous l'avons utilisée pour la caractérisation des conjugués présentés ci-après. Par ailleurs, le spectromètre Orbitrap est couplé à un système HPLC équipé d'une colonne analytique à phase inverse, permettant de séparer l'albumine des molécules organiques présentes dans le brut réactionnel. Ce système RP-HPLC-HRMS a ainsi grandement facilité nos travaux. Les différents chromatogrammes HPLC (**figure 102. A**) ainsi que le spectre de masse (**figure 102. B**) de la BSA native sont présentés ci-après.

¹⁰² Lee, P.; Wu, X. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21, 1862–1865

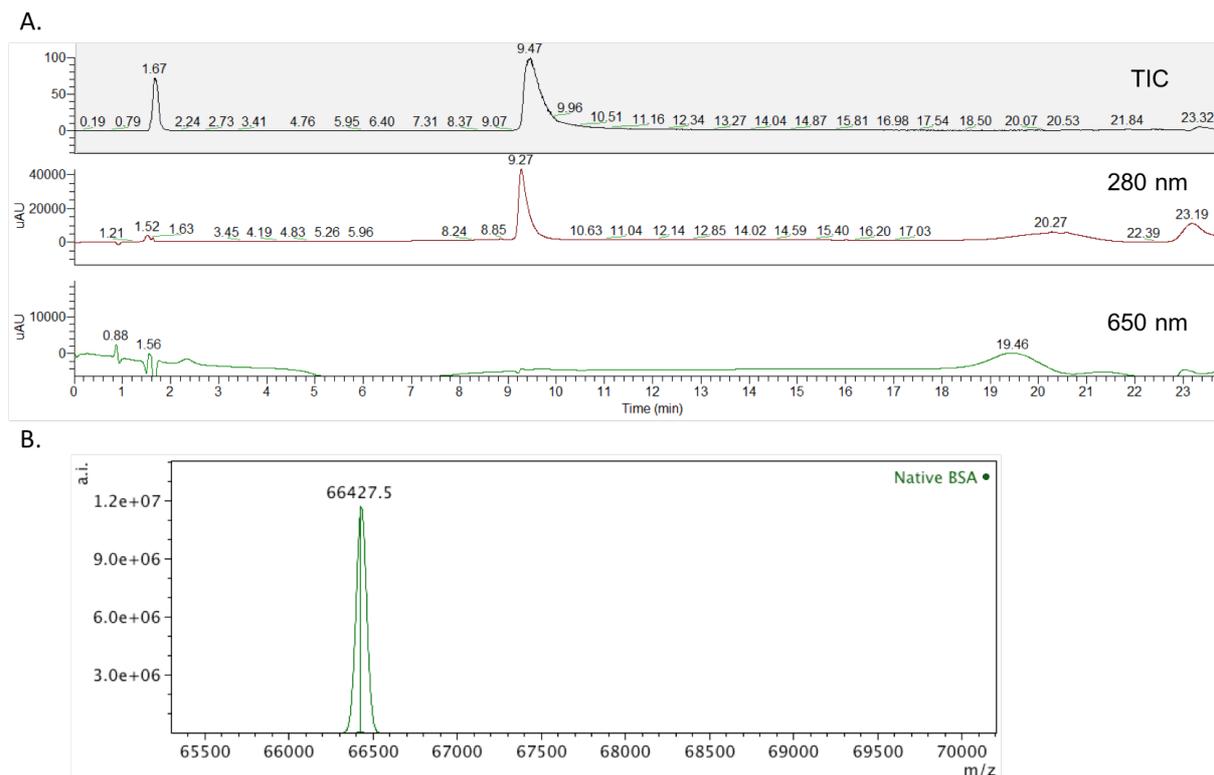


Figure 102. Analyse RP-HPLC-HRMS de la BSA native ; **A.** Chromatogrammes RP-HPLC correspondants à la somme d'ions détectés par spectrométrie de masse (haut) et à l'intensité de l'absorbance détectée aux longueurs d'onde 280 nm (milieu) et 650 nm (bas) ; **B.** Spectre de masse obtenu après déconvolution du spectre de masse total.

b. Double modification séquentielle de la BSA : conditions réactionnelles

Parmi les différents précurseurs synthétisés, nous avons choisi de modifier la BSA par le NODAGA-S-Tz-Cl (**17**) et la cyanine 5 sulfonagée-BCN **29**. Le macrocycle NODAGA permet la complexation du cuivre-64 dont la demi-vie est de 12,7 h. Ce choix nous a semblé en accord avec la pharmacocinétique de l'albumine.⁹³ Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la présence de molécules fluorescentes lipophiles peut compliquer les purifications et diminuer les rendements. Pour cette raison, nous avons préféré introduire le fluorophore lors de la seconde étape, *via* la réaction d'IEDDA plutôt que *via* la S_NAr . Il est à noter que cette situation, qui nécessitait la modification de l'ordre d'introduction des précurseurs, constitue un exemple concret où la versatilité de notre approche est très appréciable.

Des tests préliminaires ont montré que l'addition de NODAGA-S-Tz-Cl **17** n'est pas complètement sélective des cystéines lorsque le pH est aux alentours de 7. La réaction de S_NAr a donc été effectuée à pH 5,2 par ajout de 10 équivalents de tétrazine monosubstituée (**schéma 18**). Après 1 h 30 de réaction, l'excès de **17** a été éliminé par ultrafiltration (seuil de coupure à 30 kDa). La solution obtenue a ensuite été analysée par RP-HPLC-HRMS et nous avons pu constater l'apparition d'un nouveau signal à 67003 Da correspondant au composé BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA (**figure 103**). La proportion d'albumine native présentant une cystéine disponible étant de 50 %, le signal correspondant à la masse molaire de l'albumine (66430 Da) est toujours visible. Aucun signal

correspondant à une albumine marquée par plus d'une sonde NODAGA n'a été observé et nous avons ainsi pu confirmer la spécificité de la bioconjugaison.

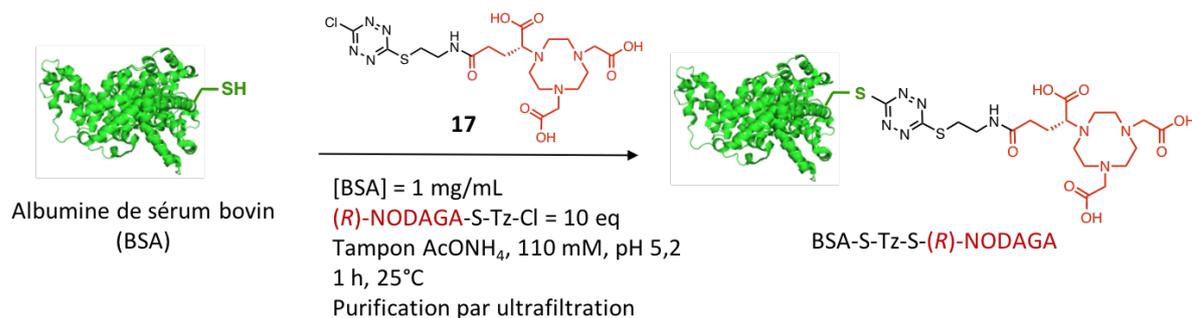


Schéma 18. Préparation de l'intermédiaire BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA par introduction du NODAGA-S-Tz-Cl sur la cystéine de la BSA.

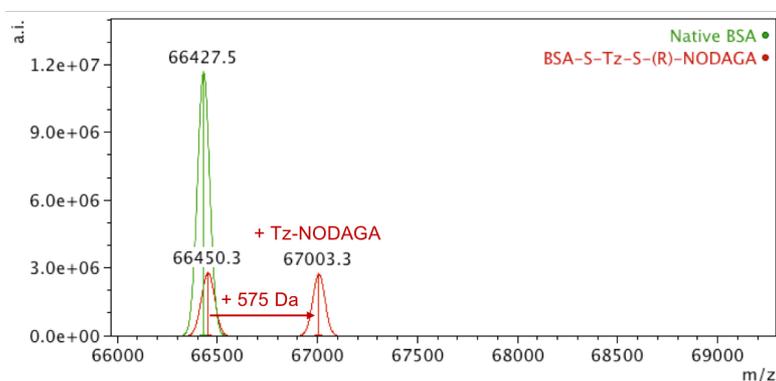


Figure 103. Spectres de masse HRMS Orbitrap déconvolués de la BSA native et de BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA.

Comme l'a montré l'étude de la stabilité du peptide conjugué **20**, la tétrazine disubstituée par deux fonctions thiols est assez instable et pour éviter une dégradation trop importante, le dérivé BCN **29** a été ajouté rapidement après la purification de l'intermédiaire BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA. La réaction d'IEDDA a été effectuée à 37 °C, en présence de 10 équivalents du dérivé BCN (par rapport au nombre de moles d'albumine) (**schéma 19**).

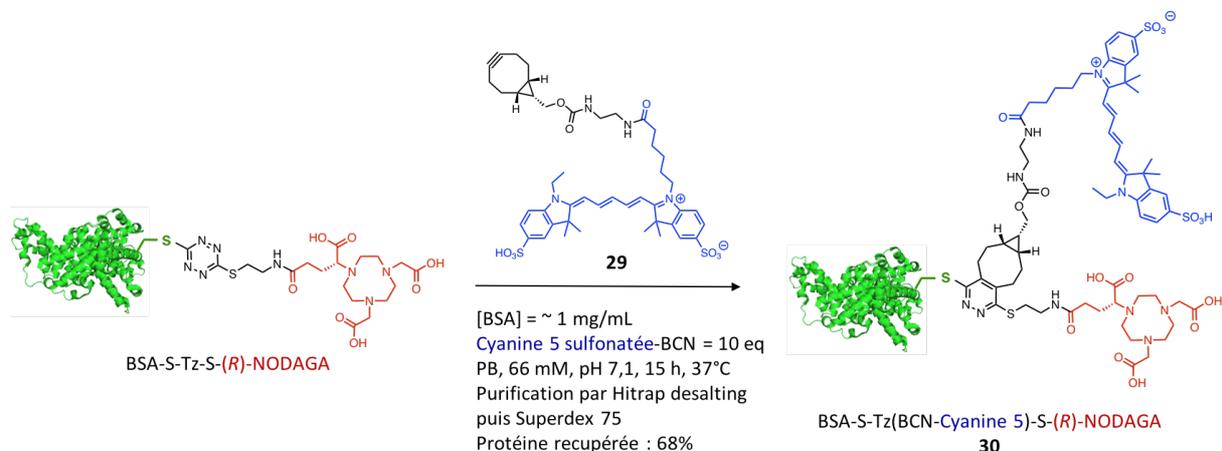


Schéma 19. Préparation du conjugué final BSA-S-Tz(BCN-Cyanine 5)-S-(R)-NODAGA par introduction de la cyanine 5 sulfonatée-BCN *via* la réaction d'IEDDA.

En raison d'un encombrement stérique accru, la réaction de *click* sur la tétrazine greffée à l'albumine a été beaucoup plus lente que lors de l'expérience réalisée avec le peptide. Après une nuit de réaction, une analyse RP-HPLC-HRMS a été effectuée. La détection d'un nouveau signal au temps de rétention de 9,4 min sur le chromatogramme RP-HPLC à 650 nm (voir Partie expérimentale) ainsi que l'apparition d'un pic à 67852 Da (**figure 104. A**) ont permis de confirmer la présence du conjugué résultant de la réaction d'IEDDA (**30**). Nous avons également envisagé de suivre l'avancement de la réaction par spectrophotométrie UV-visible comme nous l'avons fait pour l'expérience de bioconjugaison avec le peptide. Malheureusement, la mesure de la diminution de l'intensité des bandes spectrales caractéristiques de la tétrazine n'a pas été possible lors de cette expérience car la concentration molaire en tétrazine était alors beaucoup plus faible. En outre, l'absorbance de la cyanine introduite aurait complètement dissimulé la faible variation d'intensité recherchée.

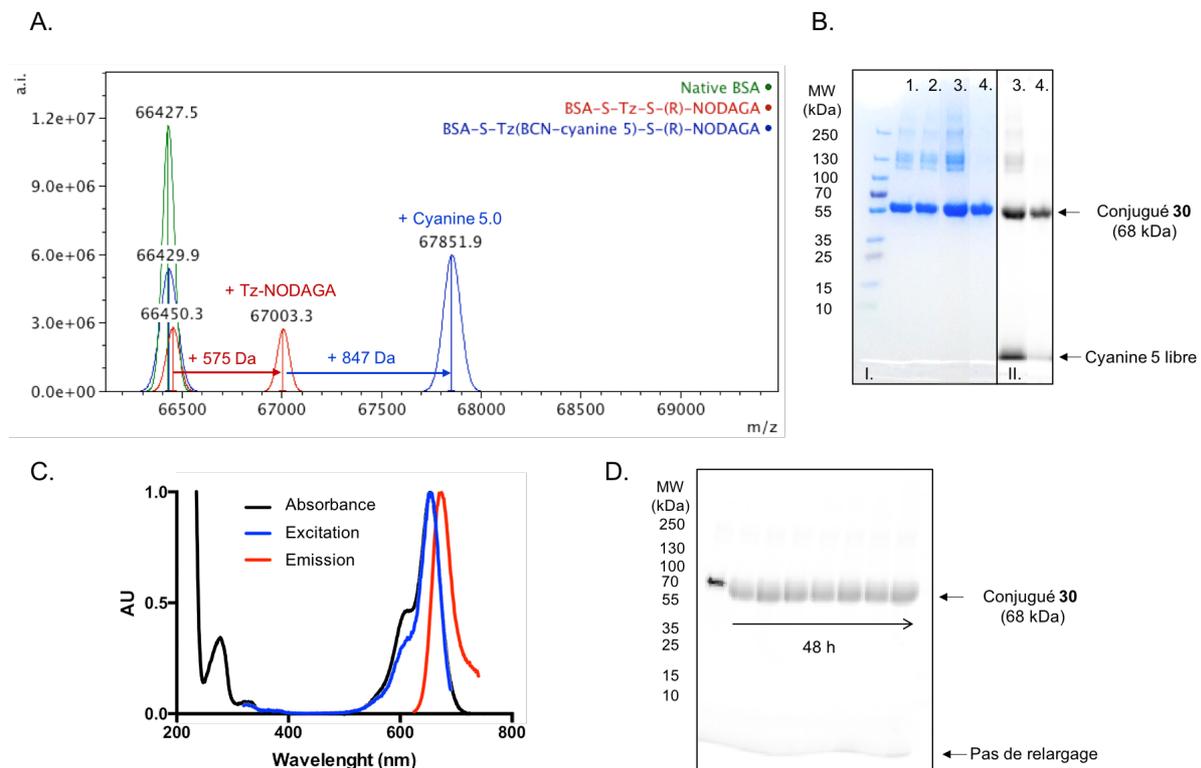


Figure 104. A. Spectres de masse HRMS Orbitrap déconvolués de la BSA native, de l'intermédiaire BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA et du conjugué **30** ; **B.** Analyse par SDS-PAGE en conditions dénaturantes, I. : révélation au bleu de Coomassie, II. : acquisition du signal fluorescent (paire de filtres : 620 nm / 670 nm), 1. : BSA native, 2. : intermédiaire BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA, 3. : **30** purifié par colonne de dessalage, 4. : **30** purifié par Superdex 75 ; **C.** Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de **30** pur à 25 °C. Le spectre d'émission a été mesuré de 625 à 740 nm avec un λ d'excitation à 600 nm (bande passante de 10 nm), et le spectre d'excitation a été mesuré de 320 à 690 nm avec un λ d'émission à 715 nm (bande passante de 10 nm) ; **D.** Analyse par SDS-PAGE de **30** après incubation dans du plasma humain à 37 °C pendant 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h et 48 h.

Le conjugué **30** a été purifié dans un premier temps sur une colonne de dessalage. Malheureusement, l'analyse par gel d'électrophorèse du produit isolé a mis en évidence l'échec de la séparation. En effet, on peut voir sur la **figure 104. B** qu'une quantité non négligeable de cyanine liée de façon non covalente à l'albumine est présente dans la solution récupérée après purification. Ce phénomène avait pu être évité lors de la modification du trastuzumab (voir Chapitre I), mais

l'albumine s'est avérée plus encline à former des liaisons non spécifiques avec les fluorophores. Au vu des nombreuses études rapportant l'utilisation de l'albumine comme transporteur *in vivo* via la formation de complexes supramoléculaires,^{103, 104} cette observation n'est finalement pas surprenante. Il a donc été nécessaire de purifier une seconde fois le conjugué **30**. Pour ce faire, la solution a été injectée sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique haute performance de type Superdex 75. Cette étape de purification a permis d'éliminer la majorité du fluorophore libre, bien qu'une faible quantité soit tout de même visible sur le gel d'électrophorèse (**figure 104. B**).

L'analyse par spectrophotométrie UV-visible de la solution de conjugué **30** a permis de calculer un pourcentage de protéine récupérée de 68 % et un taux de greffage de 0,5 sonde fluorescente par molécule de BSA, ce qui correspond au ratio de thiols disponibles mesuré par le test d'Ellman (**figure 104. C**). Nous avons évalué la stabilité du conjugué dans le plasma humain à 37 °C selon la procédure décrite dans le premier chapitre (**figure 104. D**). L'acquisition du signal fluorescent du gel d'électrophorèse obtenu a montré un signal constant et aucun relargage de fluorophore libre jusqu'à 48 h d'incubation.

II.4. Evaluation *in vivo* de l'agent de ciblage **30** par imagerie optique

Les propriétés du conjugué **30** en tant qu'agent imageant ont été évaluées sur un lot de trois souris BALB/c nude porteuses de xénogreffes de tumeurs BT474. Les expériences d'imagerie nucléaire étant très coûteuses et assez compliquées à mettre en place, nous nous sommes limités à l'acquisition des images de biodistribution par fluorescence. Le NODAGA présent au sein de la structure du composé injecté ne contenait donc aucun métal. En théorie, sa pharmacocinétique pourrait donc être légèrement différente de celle du conjugué radiométallé. Par exemple, pour des conjugués à base de vecteurs de petite taille, il a été observé que la pharmacocinétique et l'affinité peuvent différer selon la nature du métal complexé.¹⁰⁵ Néanmoins, dans notre cas, le vecteur est une protéine de taille importante et nous avons donc considéré ce phénomène comme négligeable.

Chacune des trois souris a reçu une dose de 90 µg de composé, injecté par voie intraveineuse, et l'acquisition du signal fluorescent a été effectuée 1 h, 4 h et 24 h après l'injection (**figure 105. A**). Après le dernier temps d'imagerie, les souris ont été sacrifiées et des images de fluorescence ont été réalisées sur les différents organes prélevés (tumeur, foie, sang, reins, muscle, rate, intestin et vessie ; **figure 105. B**). Les images sur corps entier montrent un très bon contraste entre la tumeur et les tissus sains, notamment pour le point à 24 h p.i., probablement dû à une accumulation passive du composé dans la tumeur par effet EPR. La quantification du signal fluorescent dans chacun des organes (**figure 105. C**) a permis de calculer un ratio tumeur/muscle de 10, mettant en évidence les propriétés de ciblage très intéressantes de notre conjugué **30**. Cette étude préliminaire atteste également de la stabilité *in vivo* du lien entre la cyanine et l'albumine.

¹⁰³ Vander Elst, L.; Chapelle, F.; Laurent, S.; Muller, R. N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, 196–200

¹⁰⁴ Caravan, P.; Cloutier, N. J.; Greenfield, M. T.; McDermid, S. A.; Dunham, S. U.; Bulte, J. W. M.; Amedio, John C.; Looby, R. J.; Supkowski, R. M.; Horrocks, William DeW.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3152–3162

¹⁰⁵ Gourni, E.; Canovas, C.; Goncalves, V.; Denat, F.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R. *PLoS One.* **2015**, 10, e0145755

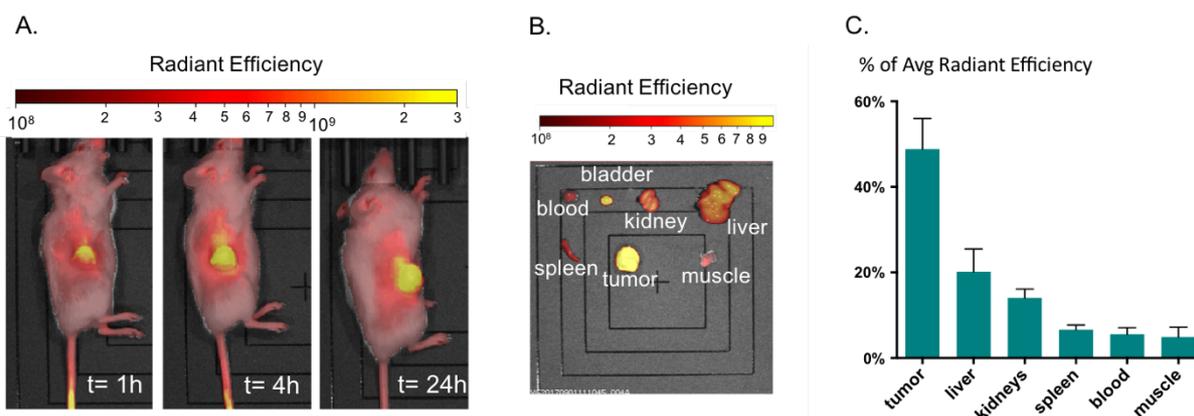


Figure 105. Données d'imagerie par fluorescence obtenues après injection du conjugué **30** chez des souris BALB/c nude porteuses de xéno greffes de tumeurs BT474 ; **A.** Acquisition de la fluorescence à 1 h, 4 h et 24 h p.i., pour la souris n°3 ; le signal fluorescent est superposé aux images obtenues en lumière blanche ; **B.** Acquisition de la fluorescence *ex vivo* des organes de la souris n°3 ; **C.** Résultats de biodistribution obtenus par quantification de l'intensité fluorescente dans chacun des organes grâce à la fonction ROI (*region of interest*) du logiciel Living Image® (Perkin Elmer).

II.5. Application de la stratégie à la préparation d'un agent théranostique

a. Présentation du projet

Pour ce projet, nous avons travaillé en collaboration avec le Dr. Sandra Heskamp, dont l'équipe de recherche au *Radboud University Medical Centre* de Nimègue aux Pays-Bas est très active dans le domaine de la médecine nucléaire.^{106, 107} S. Heskamp et son groupe se sont montrés intéressés par l'application de notre stratégie de bioconjugaison à l'une de leurs thématiques de recherche, à savoir le traitement de cancers par thérapie photodynamique (PDT) ciblée.^{108, 109} L'objectif est la synthèse d'un agent théranostique *via* la combinaison d'une protéine vectrice, d'un photosensibilisateur et d'un agent imageant grâce à la plateforme dichlorotétrazine. Ce projet nous semble très intéressant car il nous permet de varier les exemples d'application de notre stratégie.

La protéine vectrice est un inhibiteur anti-EGFR de type *nanobody*, appelé 7D12. 7D12 est une protéine recombinante d'environ 18 kDa constituée d'un unique domaine variable de chaîne lourde (VHH) (**figure 106. A**).¹¹⁰ Le *nanobody* 7D12 est capable de se lier au domaine III de la protéine EGFR avec une haute spécificité et une constante de dissociation (K_d) de l'ordre du nanomolaire. Son utilisation en immunothérapie ainsi qu'en imagerie médicale a fourni de bons résultats.¹¹¹ Cette protéine possède les avantages associés aux protéines de la famille des VHHs : elle est assez stable, présente une bonne pénétration tumorale et est éliminée rapidement par voie rénale.

¹⁰⁶ Huizing, F.; Hoeben, B. A. W.; Franssen, G.; Boerman, O.; Heskamp, S.; Bussink, J. *Radiother. Oncol.* **2018**, 127, S134–S135

¹⁰⁷ Heskamp, S.; Hernandez, R.; Molkenboer-Kuennen, J. D. M.; Essler, M.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Steenberg, E. J.; Cai, W.; Seidl, C.; McBride, W. J.; Goldenberg, D. M.; Boerman, O. C. *J. Nucl. Med.* **2017**, 58, 926–933

¹⁰⁸ Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. *Nat. Rev. Cancer.* **2003**, 3, 380–387

¹⁰⁹ Shirasu, N.; Yamada, H.; Shibaguchi, H.; Kuroki, M.; Kuroki, M. *Int. J. Cancer.* **2014**, 135, 2697–2710

¹¹⁰ Allegra, A.; Innao, V.; Gerace, D.; Vaddinelli, D.; Allegra, A. G.; Musolino, C. *Cancer Invest.* **2018**, 36, 221–237

¹¹¹ Schmitz, K. R.; Bagchi, A.; Roovers, R. C.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; Ferguson, K. M. *Structure.* **2013**, 21, 1214–1224

Le groupe avec lequel nous avons collaboré a publié différents travaux basés sur la modification de biovecteur par un photosensibilisateur de type phtalocyanine pour des applications de PDT ciblée.^{112, 113, 114} Ainsi en 2016, ils ont modifié le *nanobody* 7D12 au moyen d'un marquage statistique des lysines par l'ester de *N*-hydroxysuccinimide de la phtalocyanine de silicium IRDye® 700DX^{115, 116} dont la structure est représentée dans la **figure 106. B**.¹¹² Le conjugué obtenu a ensuite été injecté à des souris portant des greffes orthotopiques de tumeurs de la langue. Comme on peut le voir sur la **figure 106. C**, le composé s'accumule préférentiellement dans les ganglions lymphatiques et dans la tumeur, avec un ratio signal de la tumeur/bruit de fond de 16 après 24 h. L'irradiation lumineuse des tumeurs a provoqué 80 à 90 % de nécrose.

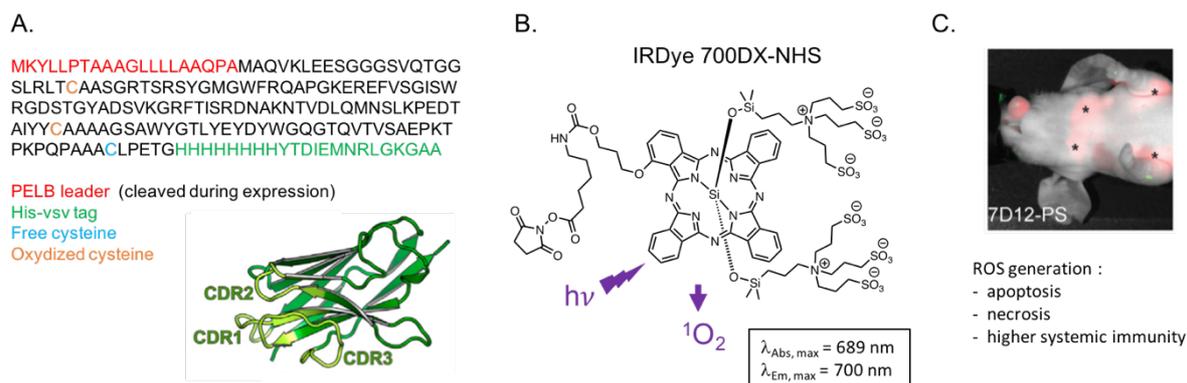


Figure 106. A. Séquence et structure tridimensionnelle¹¹¹ de la protéine 7D12 ; **B.** Structure et maxima d'absorption et d'émission du photosensibilisateur ; **C.** Imagerie optique d'une souris portant une tumeur orthotopique de la langue 1 h après l'injection du conjugué 7D12-IRDye 700DX (les astérisques (*) indiquent les ganglions lymphatiques ; figure extraite d'article¹¹²) et activités cytotoxiques induites par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par le processus de photosensibilisation.

Même si le signal fluorescent de l'IRDye 700DX peut éventuellement être utilisé pour visualiser la biodistribution du composé après son injection, l'introduction d'une sonde imageante nucléaire peut s'avérer très utile.¹¹³ En effet, il serait ainsi possible d'étudier la pharmacocinétique de l'agent théranostique grâce à une technique d'imagerie quantifiable telle que la TEMP ou la TEP. Par ailleurs, il est possible d'introduire une cystéine en position C-terminale du VHH 7D12 lors de sa synthèse. Notre technique basée sur la plateforme dichlorotétrazine apparaît donc comme une solution adéquate pour permettre le marquage spécifique du VHH par le photosensibilisateur IRDye 700DX et un groupement pour l'imagerie nucléaire. Dans l'optique de synthétiser un agent thérapeutique traçable par imagerie TEMP, nous avons choisi d'introduire le macrocycle DOTAGA qui est très efficace pour la complexation de l'indium-111. Le schéma global de la modification séquentielle de la protéine 7D12 est présenté dans la **figure 107**.

¹¹² van Driel, P. B. A. A.; Boonstra, M. C.; Slooter, M. D.; Heukers, R.; Stammes, M. A.; Snoeks, T. J. A.; de Bruijn, H. S.; van Diest, P. J.; Vahrmeijer, A. L.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; van de Velde, C. J. H.; Löwik, C. W. G. M.; Robinson, D. J.; Oliveira, S. J. *Controlled Release*. **2016**, *229*, 93–105

¹¹³ Lutje, S.; Heskamp, S.; Franssen, G.; Hekman, M.; Fracasso, G.; Rijpkema, M.; Gotthardt, M.; Herrmann, K.; Boerman, O. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 7–7

¹¹⁴ van Lith, S. A. M.; van den Brand, D.; Wallbrecher, R.; Wübbecke, L.; van Duijnhoven, S. M. J.; Mäkinen, P. I.; Hoogstad-van Evert, J. S.; Massuger, L.; Ylä-Herttuala, S.; Brock, R.; Leenders, W. P. J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *124*, 63–72

¹¹⁵ Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1685–1691

¹¹⁶ Peng, X.; Draney, D. R.; Volcheck, W. M.; Bashford, G. R.; Lamb, D. T.; Grone, D. L.; Zhang, Y.; Johnson, C. M. *J. Int. Soc. Opt. Photonics*. **2006**, 6097, 60970E

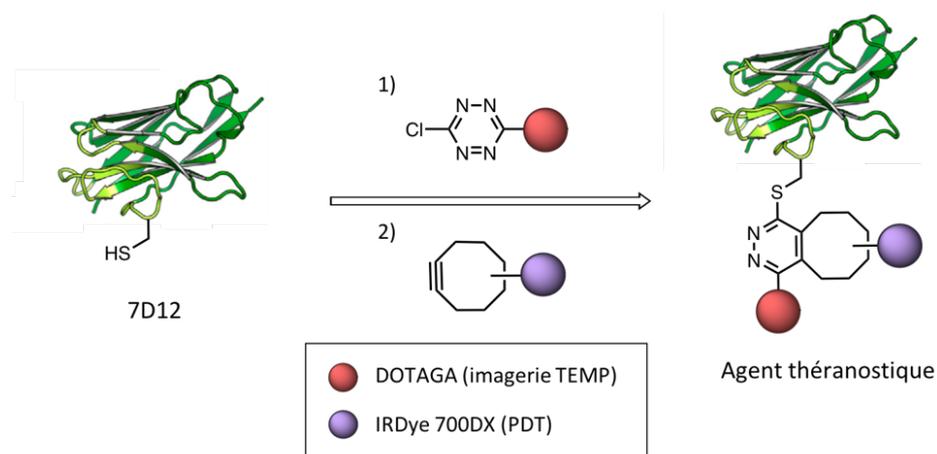


Figure 107. Élaboration d'un agent théranostique par double modification cystéine-spécifique de 7D12 *via* notre stratégie.

b. Elaboration d'un agent théranostique par double modification de 7D12

Afin d'obtenir un photosensibilisateur cliquable, nous avons fonctionnalisé la phtalocyanine IRDye 700DX par un groupement bicyclo[6.1.0]nonyne. Pour ce faire, le composé **31**, synthétisé à partir du carbonate de *para*-nitrophénol du bicyclononyne et de l'éthylènediamine, a été mis en présence du composé IRDye 700DX NHS disponible commercialement (**schéma 20**). En raison des nombreux groupements sulfonates présents sur le photosensibilisateur, la purification par RP-HPLC du composé IRDye700DX-BCN **32** a dû être effectuée avec un tampon bicarbonate de triéthylammonium (TEAB) à pH 7.5-8.0 comme phase mobile aqueuse.

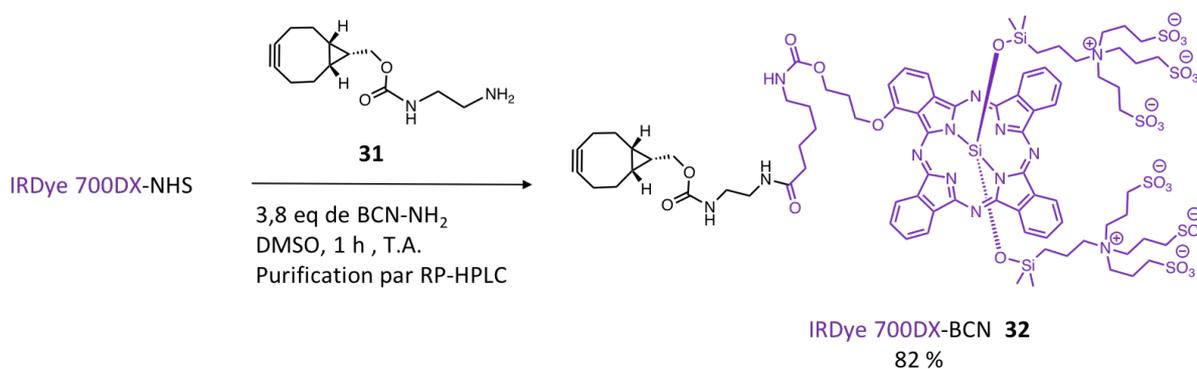


Schéma 20. Conditions réactionnelles de l'introduction du bicyclononyne **31** sur le photosensibilisateur IRDye 700DX.

Avant d'envisager l'introduction des différents groupements sur la cystéine de 7D12, il nous a fallu effectuer une étape de réduction pour libérer les fonctions thiols. En effet, comme l'ont montré Massa et al.,¹³ les protéines présentant des cystéines non appariées ont tendance à former, lors de leur production, des ponts disulfure avec les thiols présents dans le système d'expression bactérien tels que le glutathion sous sa forme réduite ou un acide aminé cystéine isolé. Il a également été observé que des ponts disulfure intermoléculaires pouvaient se former entre deux protéines générant ainsi des dimères. L'analyse par RP-HPLC-HRMS de la solution de 7D12 a montré que les trois quarts du VHH avaient subi une oxydation sous la forme d'un adduit du glutathion et que le quart restant était sous la forme de dimère.

La réduction a été réalisée par l'ajout de 100 équivalent de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP). Après 45 minutes à température ambiante, l'excès de TCEP ainsi que l'oxyde de phosphine formé ont été éliminés par ultrafiltration (seuil de coupure à 10 kDa). Le tampon PBS a été échangé par un tampon phosphate contenant 5 mM d'EDTA pour complexer les traces de métaux potentiellement présents dans le milieu et susceptibles d'avoir un effet oxydant, afin de prévenir la formation de dimère de 7D12. Le VHH sous sa forme réduite a pu être conservé à -20 °C pendant plusieurs jours sans observer de réoxydation.

Les deux modifications successives du VHH réduit ont été réalisées suivant le protocole précédemment décrit (**schéma 21**). L'intermédiaire 7D12-S-Tz-S-DOTAGA a été obtenu *via* l'introduction du DOTAGA-S-Tz-Cl **23**. A la différence de la modification de la BSA qui a pu être effectuée par l'addition de 10 équivalents de chlorotétrazine, la modification du VHH s'est avérée plus difficile et a nécessité 48 équivalents du composé **23**. Pour cette protéine, il n'a pas été nécessaire de se placer à pH 5,2 car la réaction de S_NAr a été spécifique de la cystéine à pH 7,3. Après purification de l'intermédiaire 7D12-S-Tz-S-DOTAGA par ultrafiltration (seuil de coupure à 10 kDa), 23 équivalents de photosensibilisateur **32** ont été introduits. Des tests préliminaires effectués précédemment sur de petites quantités avaient révélé la formation de produits de dégradation au cours du temps. La réaction a donc été stoppée après 1 h, bien que la conversion soit encore incomplète à ce stade. Le composé final 7D12-S-Tz(BCN-IRDye 700DX)-S-DOTAGA **33** a été purifié sur une colonne d'exclusion stérique Superdex 75.

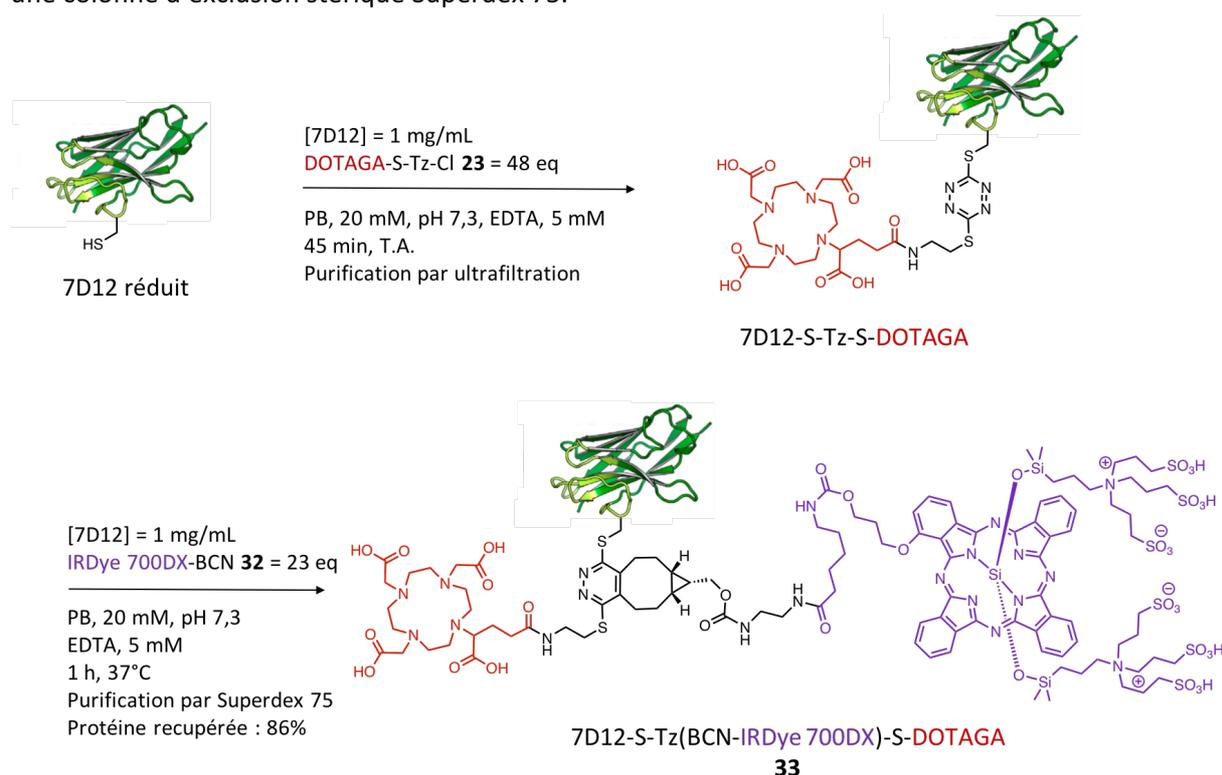


Schéma 21. Conditions réactionnelles des deux modifications successives du 7D12 réduit, par le chélateur DOTAGA et le photosensibilisateur IRDye 700DX.

L'analyse RP-HPLC-HRMS nous a permis d'identifier le pic moléculaire du conjugué à 20397 Da, accompagné de deux autres pics correspondant certainement aux produits de fragmentation générés par la perte des groupements axiaux de la phtalocyanine lors de l'étape d'ionisation dans le

spectromètre de masse (**figure 108. A**). L'intégration du chromatogramme RP-HPLC à 280 nm a révélé une proportion de seulement 68 % pour le pic correspondant au conjugué 7D12-S-Tz(BCN-IRDye 700DX)-S-DOTAGA ($t_R = 7,8$ min) (**figure 108. B**). Cette pureté assez faible est due à la présence de 11 % d'intermédiaire 7D12-S-Tz-S-DOTAGA ($t_R = 7,2$ min) et de 20 % d'un sous-produit non identifié que nous n'avons pas pu éliminer lors de la purification ($t_R = 8,3$ min). Les spectres d'absorption, d'excitation et d'émission du conjugué **33** sont présentés dans la **figure 108. C**. Le taux de greffage calculé à partir du spectre d'absorption est supérieur à la valeur attendue (1,3 au lieu de 1). Ceci a pu être expliqué grâce à l'analyse du composé par SDS-PAGE qui a révélé la présence d'une proportion assez importante (39 %) de phtalocyanine greffée au VHH de façon non spécifique (**figure 108. D**). Une étape de purification complémentaire aurait pu être envisagée, mais par manque de temps et du fait des faibles quantités de protéine disponibles, le composé a été utilisé tel quel pour la suite de l'étude.

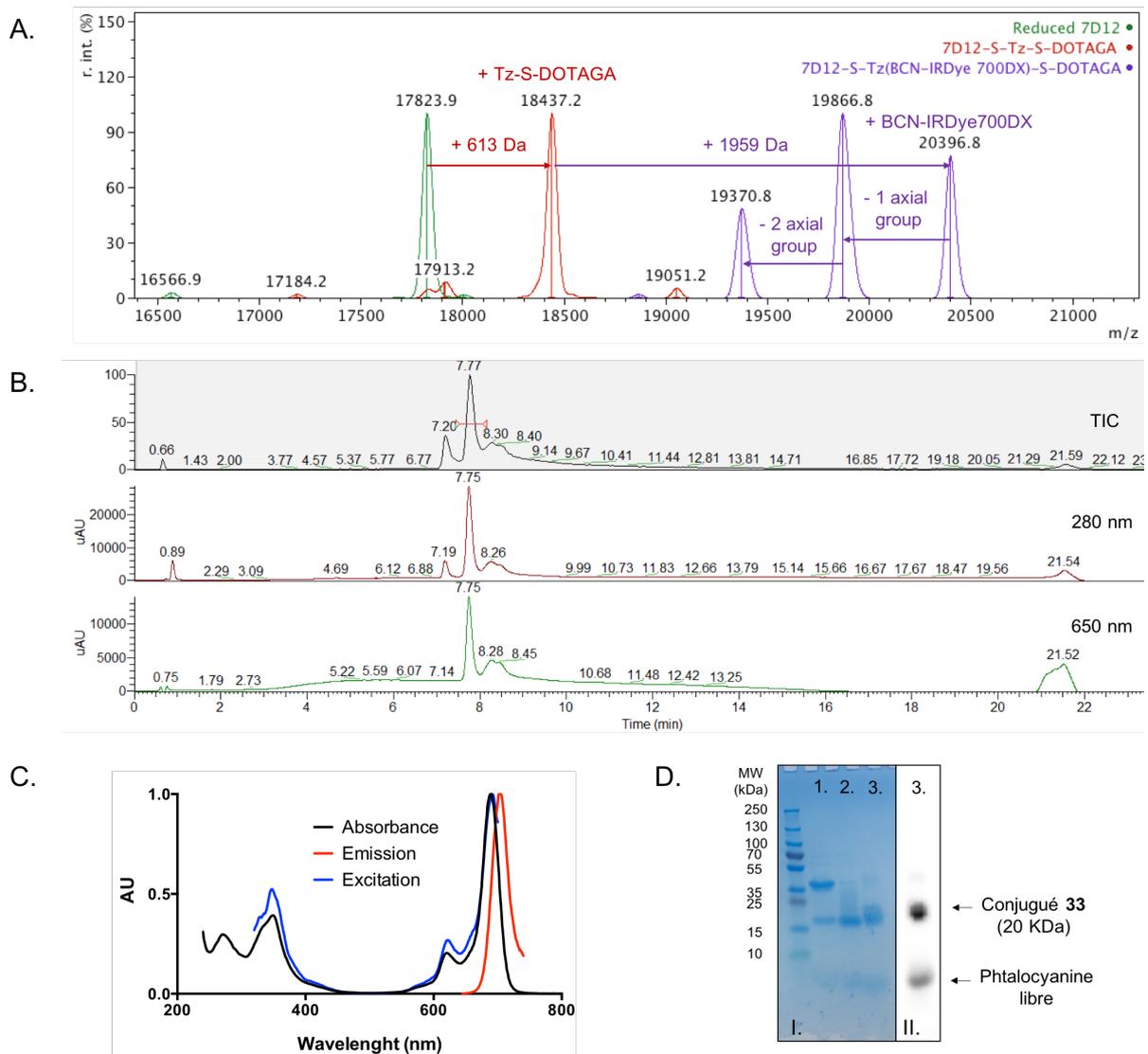


Figure 108. A. Spectres de masse HRMS Orbitrap déconvolués du 7D12 réduit, de l'intermédiaire 7D12-S-Tz-S-DOTAGA et du conjugué **33** ; **B.** Chromatogrammes RP-HPLC (*total ion chromatogram*, 280 et 650 nm) du conjugué **33** après purification ; **C.** Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission du conjugué **33** à 25 °C. Le spectre d'émission a été mesuré de 645 à 740 nm avec un λ d'excitation à 620 nm (bande passante de 10 nm) et le spectre d'excitation a été mesuré de 320 à 700 nm avec un λ d'émission à 725 nm (bande passante de 10 nm) ; **D.** Analyse par SDS-PAGE en conditions

dénaturantes, I. : révélation au bleu de Coomassie, II. : acquisition du signal fluorescent (paire de filtres : 620 nm / 670 nm) pour 1. : 7D12 avant réduction, 2. : 7D12 réduit, 3. : conjugué **33**.

L'agent théranostique **33** a été envoyé à l'équipe du Dr. Sandra Heskamp et des essais de métallation par l'indium-111 sont actuellement en cours. L'évaluation *in vitro* de l'affinité de 7D12 pour EGFR et des expériences d'imagerie TEMP et de PDT *in vivo* sont également prévues.

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différentes expériences effectuées ont permis le développement d'une stratégie élégante permettant le double marquage séquentiel de protéines sélectivement sur leur résidu cystéine. La faisabilité de la stratégie a d'abord été évaluée sur un modèle de type peptidique, puis sur l'albumine et enfin sur un *nanobody*. Une gamme variée de précurseurs à base de chlorotétrazine a été préparée avec succès. Les tests sur le peptide modèle ont mis en évidence les cinétiques rapides des réactions de S_NAr et d'IEDDA permettant les deux bioconjugaisons successives. La sélectivité de la réaction de S_NAr s'est avérée très concluante pour les expériences réalisées sur le peptide comme sur les protéines. Nous avons observé que la sélectivité de la réaction à un pH donné variait en fonction de la nature de la protéine. Ceci peut s'expliquer par le fait que la cystéine au sein de la protéine est plus ou moins accessible selon sa position au sein de la protéine. De plus, le pKa des fonctions amines peut être assez variable suivant leur microenvironnement, et certaines amines peuvent s'avérer nucléophiles, même à pH neutre. Il est donc important d'optimiser les conditions de réaction, et notamment le pH, pour chaque nouvelle protéine testée.

Un agent imageant bimodal nucléaire/fluorescent a pu être élaboré grâce à notre stratégie. L'évaluation par imagerie optique de la biodistribution du composé chez des souris portant des tumeurs a révélé un comportement *in vivo* adéquat. La validation préclinique du conjugué par imagerie bimodale pourrait être une validation complémentaire importante pour vérifier la concordance des deux modalités d'imagerie et s'assurer de la solidité du lien pyridazine réunissant les deux agents imageants et la biomolécule.

Enfin, la stratégie a été appliquée avec succès à l'élaboration d'un agent théranostique constitué du VHH 7D12, du chélateur macrocyclique DOTAGA et du photosensibilisateur IRDye 700DX. L'évaluation des propriétés imageante et thérapeutique du composé est en cours. L'optimisation des conditions réactionnelles et de purification n'a pu être effectuée du fait des faibles quantités de protéine disponibles. Néanmoins, nous sommes convaincus qu'en optimisant la technique de purification, il serait possible d'obtenir des protéines doublement modifiées parfaitement définies. Par ailleurs, comme l'approche repose sur des réactions chimiques très simples, il est envisageable de transposer la technique à l'échelle industrielle.

La force de cette stratégie réside avant tout dans sa versatilité. En effet, l'utilisation de la plateforme dichlorotétrazine a permis de facilement introduire, dans l'ordre souhaité, divers groupements d'intérêt (fluorescents, nucléaires, photosensibilisants) sur plusieurs biomolécules différentes. L'approche permet ainsi, à partir des précurseurs (commerciaux ou facilement synthétisables), de doublement modifier une protéine en seulement deux étapes.

- CHAPITRE III -

*Marquage cystéine-spécifique de
protéines par le fluorophore proche
infrarouge IR783*

- CHAPITRE III - Marquage cystéine-spécifique de protéines par le fluorophore proche infrarouge IR783.....	156
I. INTRODUCTION.....	160
I.1. Structure et propriétés spectrales du fluorophore IR783	160
I.2. Applications du fluorophore IR783 <i>in vivo</i>	161
I.3. Fonctionnalisation du cyclohexyle : impact sur les propriétés spectrales de IR783	163
I.4. Stratégies classiquement utilisées pour la vectorisation de IR783	165
I.5. Limitations des méthodes actuelles et introduction à la stratégie développée.....	167
II. RESULTATS ET DISCUSSION	169
II.1. Validation de l'approche sur un peptide modèle	169
II.2. Evaluation de la stratégie par greffage de IR783 sur un fragment Fab' d'anticorps	171
a. Production du fragment Fab' de pertuzumab	172
b. Conjugaison de IR783 au fragment Fab'	175
II.3. Marquage fluorescent de l'albumine par IR783	177
II.4. Validation de la stratégie <i>in vivo</i>	179
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	181

I. INTRODUCTION

I.1. Structure et propriétés spectrales du fluorophore IR783

Les cyanines sont des fluorophores organiques qui possèdent des propriétés spectrales très appréciées pour l'imagerie médicale. En effet, ces molécules de type polyméthine présentent généralement un coefficient d'extinction molaire très élevé (allant de 100 000 à 250 000 M⁻¹.cm⁻¹ selon la cyanine et le solvant) et une longueur d'onde d'émission assez facilement modulable par des modifications structurales.^{1,2} Les heptaméthines cyanines (ou cyanines 7), notamment, sont constituées d'une chaîne polyméthine à sept atomes de carbone qui leur confère une conjugaison électronique particulièrement étendue et une longueur d'onde d'émission allant de 775 nm pour les cyanines 7 classiques jusqu'à 810 nm pour les cyanines 7.5. Par exemple, le vert d'indocyanine (ICG) est un fluorophore de la famille des cyanines 7.5 approuvé par la FDA depuis près de 60 ans (**figure 109**). Ses propriétés de fluorescence sont utilisées pour la réalisation d'angiographies rétinienne, pour l'exploration du débit sanguin hépatique, et l'exploration fonctionnelle en cardiologie.^{3,4,5}

Malheureusement, la photostabilité des cyanines a tendance à diminuer avec la longueur de la chaîne conjuguée. Par conséquent, les cyanines 7 sont généralement plus sensibles au photoblanchiment que leurs homologues possédant des chaînes plus courtes. En 1992, Patonay *et al.* ont synthétisé des heptaméthines cyanines possédant un groupement cyclohexyle au centre de la chaîne polyméthine.⁶ Ce groupement supplémentaire rigidifie la structure et ainsi augmente considérablement sa photostabilité et le rendement quantique de fluorescence.

Le fluorophore IR783 a été décrit pour la première fois en 2004, par la même équipe (**Figure 109**).⁷ IR783 est un exemple intéressant de cyanine portant un groupe chlorocyclohexène intercalé dans la chaîne conjuguée. Ses propriétés spectrales sont adéquates pour une utilisation *in vivo* avec un haut coefficient d'absorption molaire ($\epsilon = 261\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le méthanol, $120\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le PBS à pH 7,4), une longueur d'onde d'émission maximale dans la fenêtre thérapeutique ($\lambda_{\text{Em}} = 810\text{ nm}$ dans le méthanol, 797 nm dans le PBS à pH 7,4) et un rendement quantique tout à fait acceptable pour cette famille de fluorophores ($\Phi_{\text{Fl}} = 8,4\%$ dans le méthanol et $6,5\%$ dans le PBS pH 7,4, valeurs corrélées au standard de référence ICG). Les valeurs d' ϵ , de λ_{Em} et de Φ_{Fl} dans le méthanol ont été extraites de l'article de N. James,⁸ tandis que celles dans le PBS à pH 7,4 proviennent de l'article de L.

¹ Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105–111

² Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 356–362

³ Licha, K.; Riefke, B.; Ntziachristos, V.; Becker, A.; Chance, B.; Semmler, W. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 392–398

⁴ Alander, J. T.; Kaartinen, I.; Laakso, A.; Pättilä, T.; Spillmann, T.; Tuchin, V. V.; Venermo, M.; Välisuo, P. *Int. J. Biomed. Imaging.* **2012**, *2012*, 940585

⁵ Liberale, G.; Vankerckhove, S.; Galdon, M. G.; Donckier, V.; Larsimont, D.; Bourgeois, P. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2015**, *41*, 1256–1260

⁶ Strekowski, L.; Lipowska, M.; Patonay, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4578–4580

⁷ Patonay, G.; Salon, J.; Sowell, J.; Strekowski, L. *Molecules.* **2004**, *9*, 40–49

⁸ James, N. S.; Chen, Y.; Joshi, P.; Ohulchanskyy, T. Y.; Ethirajan, M.; Henary, M.; Strekowski, L.; Pandey, R. K. *Theranostics.* **2013**, *3*, 692–702

Wang.⁹ De plus, les atomes d'azotes des deux groupes indoles sont substitués par des chaînes *n*-butyles terminées par des groupements sulfonates. Ces fonctions chargées négativement apportent une meilleure solubilité du fluorophore dans l'eau, limitent son agrégation et accélèrent sa clairance *in vivo*.

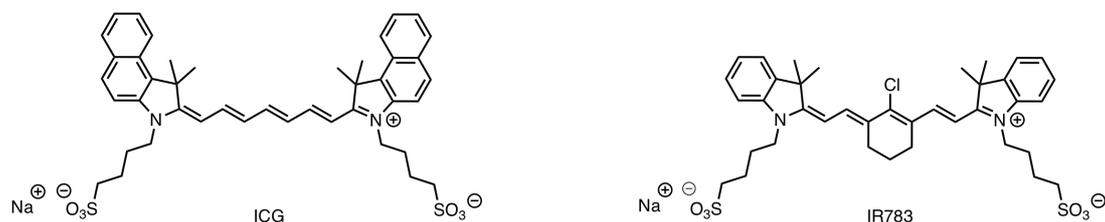


Figure 109. Deux exemples d'heptaméthines cyanines, le vert d'indocyanine (ICG) et IR783.

I.2. Applications du fluorophore IR783 *in vivo*

La sonde fluorescente proche infrarouge IR783 a d'ores et déjà fait ses preuves *in vivo*. En 2010, Leland W.K. Chung a évalué sa pharmacocinétique après injection à des souris saines.¹⁰ L'acquisition du signal de fluorescence sur souris vivantes, ainsi que sur organes isolés, a mis en évidence une forte accumulation du fluorophore dans le foie révélant une élimination par voie hépatique. Grâce aux groupements sulfonates, la molécule organique présente une clairance relativement rapide, par comparaison à des fluorophores sans fonction hydrosolubilisante, et 80 h après l'injection, aucun signal fluorescent n'est détecté dans les organes vitaux.

Dans cette même étude,¹⁰ la biodistribution de IR783 a été évaluée chez des souris immunodéprimées porteuses de tumeurs humaines de la vessie (T-24, s.c.), du pancréas (MIA PaCa-2, s.c.), de la prostate (ARCaP_M, s.c.) et du rein (SN12C, i.o.). Pour chacun de ces types de cancer, IR783 s'est accumulé préférentiellement dans la tumeur. A titre d'exemple, nous avons réunis dans la **figure 110**, les données d'imagerie obtenues pour les souris porteuses de tumeur de la prostate. La rétention de IR783 par les cellules cancéreuses a aussi permis la visualisation de métastases, de tumeurs spontanées sur des souris transgéniques, de tumeurs au premier stade de développement (adénomes) et également la détection dans du sang humain de cellules cancéreuses circulantes. Il est à noter que l'évaluation de la toxicité de ce fluorophore, réalisée dans cette même étude, n'a mis en évidence aucune toxicité systémique chez la souris, et ce, pour des doses allant jusqu'à 37,5 mg/kg/jour pendant 1 mois.

⁹ Wang, L.; Jin, J.; Chen, X.; Fan, H.-H.; Li, B. K. F.; Cheah, K.-W.; Ding, N.; Ju, S.; Wong, W.-T.; Li, C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5366–5370

¹⁰ Yang, X.; Shi, C.; Tong, R.; Qian, W.; Zhau, H. E.; Wang, R.; Zhu, G.; Cheng, J.; Yang, V. W.; Cheng, T.; Henary, M.; Strekowski, L.; Chung, L. W. K. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2833–2844

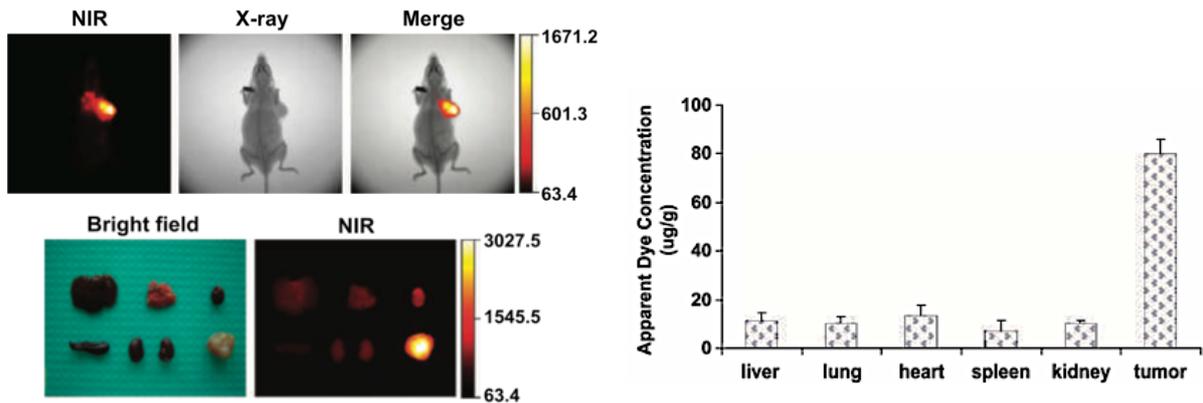


Figure 110. Résultat d'une étude d'imagerie proche infrarouge chez des souris porteuses de tumeur ARCaP_M en sous-cutané après injection intrapéritonéale d'une dose de 10 nmol d'IR783 ; Gauche : Images corps-entier 24 h p.i. et images *ex vivo* des tissus disséqués ; Droite : Concentration apparente en fluorophore (µg/g) dans les différents organes isolés et dans la tumeur (n = 3, moyenne ± SEM) ; figure adaptée d'article.¹⁰

Depuis cette première étude préclinique, de nouvelles études *in vivo* ont été réalisées, notamment sur des souris porteuses de xélogreffes de cellules tumorales du colon (CT26⁸ et HT-29 CT¹¹). Les images obtenues ont montré, dans chaque cas, une forte affinité de la sonde IR783 pour la tumeur, et ce sans vectorisation particulière. Dans une nouvelle étude publiée en 2015,¹² Leland W.K. Chung a utilisé les propriétés ciblantes de l'IR783 pour transporter un agent de chimiothérapie, la gemcitabine, au travers de la barrière hémato-encéphalique. Les images de fluorescence après 1 h et 24 h montrent que le conjugué fluorophore-agent cytotoxique était capable d'atteindre des gliomes intracrâniens ainsi que des métastases de tumeur de la prostate dans le cerveau (**figure 111**). De plus, le traitement a inhibé significativement la croissance des tumeurs et ainsi prolongé la survie des souris.

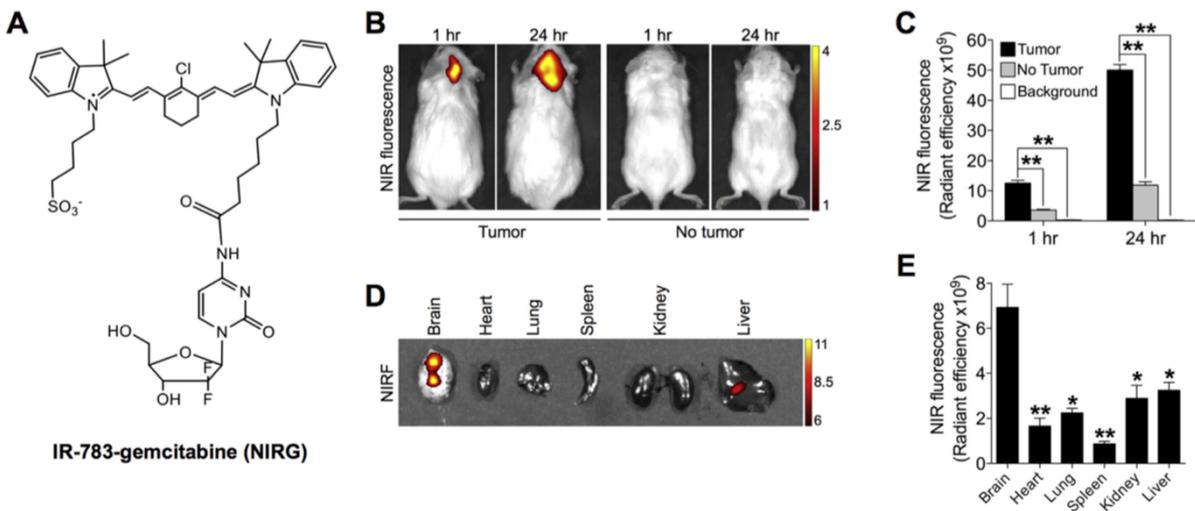


Figure 111. Résultats des expériences d'imagerie par fluorescence sur des souris xélogreffées en intracrânien avec des cellules de glioblastome humaines (U87) après injection du composé en intrapéritonéal (50 nmol / souris) ; figure adaptée d'article ;¹² **A.** structure chimique du composé injecté (IR783-gemcitabine) ; **B.** imagerie par fluorescence 1 h et 24 h post-injection ; **C.** analyse quantitative de l'intensité du signal fluorescent (n = 3, moyenne ± SEM, **p < 0.01) ; **D.** acquisition de

¹¹ Semenenko, I.; Portnoy, E.; Aboukaoud, M.; Guzy, S.; Shmuel, M.; Itzhak, G.; Eyal, S. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 426

¹² Wu, J. B.; Shi, C.; Chu, G. C.-Y.; Xu, Q.; Zhang, Y.; Li, Q.; Yu, J. S.; Zhau, H. E.; Chung, L. W. K. *Biomaterials.* **2015**, *67*, 1–10

la fluorescence sur organes isolés, 24 h après injection ; E. Analyse quantitative de l'intensité du signal dans les différents organes (n = 3, moyenne ± SEM, *p < 0.05, **p < 0.01 par comparaison avec la valeur déterminée pour le cerveau).

L'équipe de Leland W.K. Chung a également pu identifier le mécanisme permettant d'expliquer l'affinité particulière du fluorophore IR783 pour les tissus tumoraux. L'accumulation dans les cellules tumorales serait due à un processus biologique actif médié par des protéines « transporteurs », membres de la famille des OATP (*organic anion-transporting polypeptide*).¹⁰ En effet, l'accumulation préférentielle de IR783 dans la tumeur n'est pas observée lorsque l'expérience est réalisée en présence de bromosulfophtaléine, un inhibiteur permettant le blocage des transporteurs OATP. De plus, le type ainsi que le taux d'expression de ces transporteurs OATP diffèrent chez les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, ce qui pourrait expliquer la spécificité du fluorophore pour les tissus tumoraux. Le comportement pharmacocinétique particulier de IR783 pourrait aussi être dû à l'interaction non covalente entre IR783 et l'albumine plasmatique. En effet, de nombreux travaux montrent l'utilisation de l'albumine comme agent de vectorisation de cyanines 7.5 pour le ciblage de tumeurs *in vivo*, par accumulation passive grâce à l'effet EPR.¹³

Ces études prouvent que IR783 constitue un fluorophore efficace *in vivo* et depuis, des études plus complexes ont pu tirer profit de ses propriétés. Ce fluorophore a notamment été conjugué à des biomolécules, afin de permettre une vectorisation vers la zone tumorale plus efficace. Différents agents de vectorisation ont été introduits, tels que des peptides,¹⁴ des dérivés de glucose,^{15,16} des anticorps monoclonaux,¹⁷ et même des bactériophages.¹⁸

I.3. Fonctionnalisation du cyclohexyle : impact sur les propriétés spectrales de IR783

L'approche couramment utilisée pour la bioconjugaison de IR783 à une biomolécule consiste en la substitution nucléophile de l'atome de chlore du groupement cyclohexyle. Ainsi, en 1992, Strekowski *et al.* ont introduit le 4-aminothiophénol sur le cyclohexyle (position *méso*) d'une heptaméthine cyanine par une substitution nucléophile aromatique mettant en jeu un mécanisme radicalaire (S_{RN}1). Après un traitement au thiophosgène, ils ont pu introduire une fonction isothiocyanate pour la bioconjugaison.⁶ La substitution du chlore peut être effectuée par différents nucléophiles tels que les thiols, les amines ou les alcools, laissant ainsi une certaine liberté quant aux groupements introduits sur la position centrale de la chaîne méthine de la cyanine 7.

Il faut tout de même prendre en compte que le carbone sp² modifié participe à la conjugaison de la cyanine. Par conséquent, la densité de charge électronique de la fonction introduite peut fortement perturber les propriétés spectrales de la cyanine.¹⁹ Par exemple, la substitution du chlore par une

¹³ Onoe, S.; Temma, T.; Shimizu, Y.; Ono, M.; Saji, H. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 775–786

¹⁴ Guan, G.; Lu, Y.; Zhu, X.; Liu, L.; Chen, J.; Ma, Q.; Zhang, Y.; Wen, Y.; Yang, L.; Liu, T.; Wang, W.; Ran, H.; Qiu, X.; Ke, S.; Zhou, Y. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15244–15252

¹⁵ Sharma, R.; Wang, W.; Rasmussen, J. C.; Joshi, A.; Houston, J. P.; Adams, K. E.; Cameron, A.; Ke, S.; Kwon, S.; Mawad, M. E.; Sevcik-Muraca, E. M. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H3109–H3118

¹⁶ Li, C.; Greenwood, T. R.; Glunde, K. *Neoplasia N. Y. N.* **2008**, *10*, 389–398

¹⁷ Feng, F.; Zhang, H.; Zhu, Z.; Li, C.; Shi, Y.; Zhang, Z. *Luminescence.* **2014**, *29*, 614–620

¹⁸ Hilderbrand, S. A.; Kelly, K. A.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1275–1281

¹⁹ Kiyose, K.; Aizawa, S.; Sasaki, E.; Kojima, H.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Urano, Y.; Nagano, T. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 9191–9200

amine génère un déplacement hypsochrome très important du maximum du spectre d'absorption. La longueur d'onde maximale d'émission est également décalée vers des longueurs d'onde plus faibles mais dans une moindre mesure. Le déplacement de Stokes de ces cyanines est donc très large (jusqu'à 155 nm dans certains cas ; **figure 112**)²⁰ ce qui peut se révéler un atout pour éviter les problèmes habituellement rencontrés avec les cyanines plus classiques (*auto-quenching* et perte de sensibilité). Ce phénomène est dû à un transfert de charge intramoléculaire (ICT) induit par la présence de l'amine au centre de la cyanine.²⁰

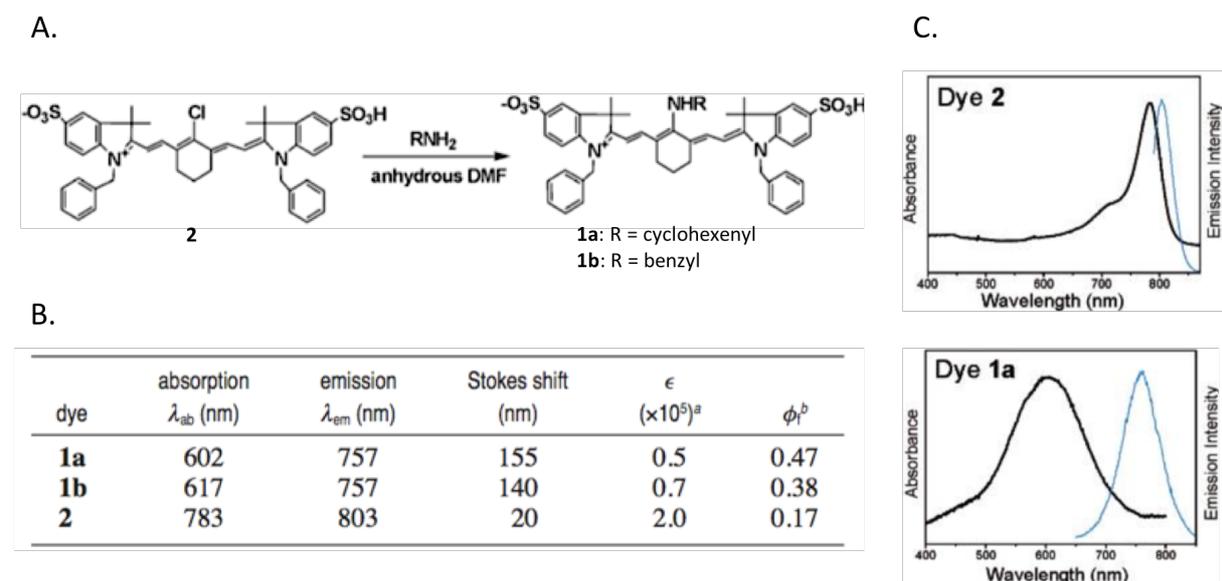


Figure 112. A. Schéma de la réaction de substitution du chlore en position *méso* d'une cyanine 7 par différentes amines ; B. Caractéristiques photophysiques des cyanines (dans l'eau, ^b hormis pour les rendements quantiques qui ont été mesurés dans le méthanol), ^a les ϵ sont donnés en $M^{-1}.cm^{-1}$; C. Spectres d'absorption et d'émission correspondants ; figure adaptée d'article.²⁰

Lors de la substitution du chlore par un nucléophile de type thiol la variation des caractéristiques spectrales du fluorophore est moins importante. On observe généralement une augmentation des longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission, ainsi qu'une faible diminution de la photostabilité du fluorophore. Pour les nucléophiles de type alcool ou phénol, les maxima d'absorption et d'émission de la cyanine 7 modifiée subissent un léger déplacement hypsochrome, mais les propriétés spectrales sont globalement peu modifiées.^{21,18,19} Il est à noter que la nature de la molécule portant le nucléophile est également importante. Ainsi, la présence d'une amine en position para du groupement phénylthioéther introduit en position *méso* de la cyanine diminue par cinq le rendement quantique de fluorescence par rapport à un groupement acide carboxylique en position méta.⁸

²⁰ Peng, X.; Song, F.; Lu, E.; Wang, Y.; Zhou, W.; Fan, J.; Gao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4170–4171

²¹ Song, F.; Peng, X.; Lu, E.; Zhang, R.; Chen, X.; Song, B. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2004**, *168*, 53–57

I.4. Stratégies classiquement utilisées pour la vectorisation de IR783

Différentes biomolécules ont ainsi pu être introduites sur cette position. L'introduction de l'acide 3-mercaptopropionique suivie de l'activation de l'acide carboxylique sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimidyle a permis le marquage de bactériophages par IR783 pour le ciblage des récepteurs de surface VCAM-1 (*vascular cellular adhesion molecule-1*) (**figure 113**).¹⁸ Cette même approche a été utilisée par Zhiyong Zhang *et al.* pour greffer IR783 sur un anticorps monoclonal anti-ESAT-6 *via* un marquage aléatoire des fonctions amines. Ce bioconjugué a été utilisé avec succès pour la détection *in vivo* de tissus tuberculeux chez la souris.¹⁷

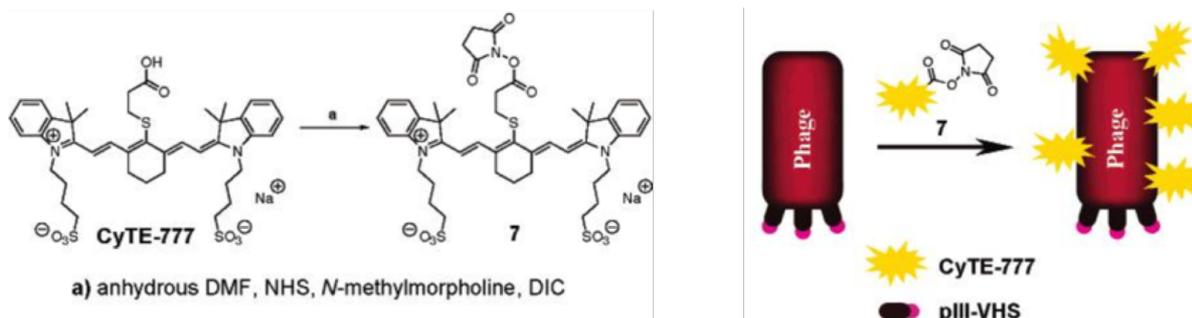


Figure 113. Gauche : Structure de la cyanine 7 après substitution du chlore en position *méso* et activation de l'acide carboxylique ; Droite : Représentation schématique de l'introduction de la cyanine 7 sur le phage ; figure adaptée d'article.¹⁸

Il existe d'autres exemples de composés bifonctionnels permettant l'introduction d'IR783 sur une biomolécule. L'acide 4-mercaptopropionique, par exemple, a été utilisé comme lien pour réaliser le marquage fluorescent d'acide hyaluronique, un ligand du récepteur LYVE-1 (*lymph vascular endothelial receptor-1*), pour l'imagerie de la vascularisation lymphatique.¹⁵ Cette même molécule a également permis le greffage de IR783 sur un peptide ciblant le récepteur CXCR4 pour la visualisation de métastases d'ostéosarcome.¹⁴ Récemment, l'équipe de P. Low a couplé la cyanine S 0456²² au résidu cystéine d'une petite protéine de 10 kDa.²³ Cette protéine, appelée centyrin, se lie sélectivement aux récepteurs EGFR et permet la localisation de tumeurs *in vivo*. Pour ce faire, ils ont substitué l'atome de chlore de la cyanine par le groupe phénol de l'acide 3-(4-hydroxyphényl)propionique, puis introduit par un couplage peptidique une fonction maléimide afin de conjuguer spécifiquement le fluorophore sur la cystéine de la protéine (**figure 114**).

²² Kularatne, S. A.; Mahalingam, S. M.; Low, P. S.; Synthesis and composition of amino acid linking groups conjugated to compounds used for the targeted imaging of tumors. U.S. Patent 20140271476 A1, March 12, 2014

²³ Mahalingam, S. M.; Dudkin, V. Y.; Goldberg, S.; Klein, D.; Yi, F.; Singhal, S.; O'Neil, K. T.; Low, P. S. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2865–2873

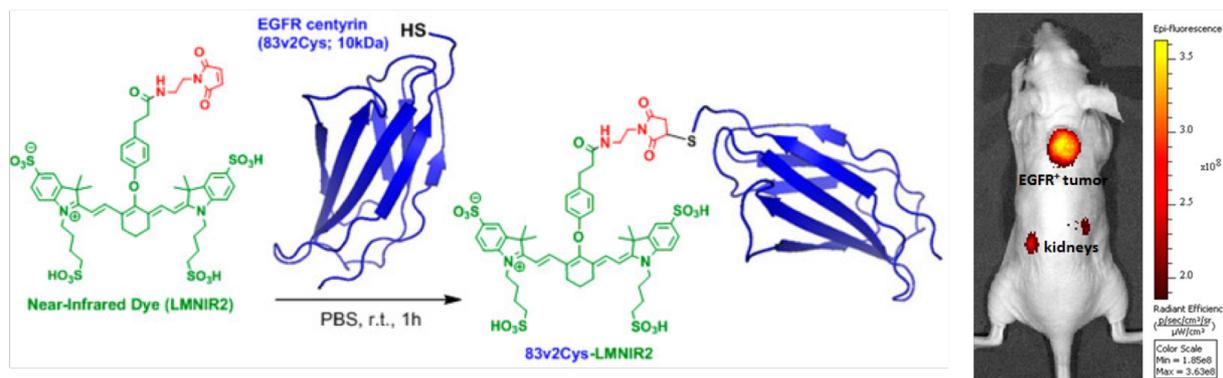


Figure 114. Gauche : Réaction de bioconjugaison de la cyanine S0456 fonctionnalisée par un groupement maléimide avec l'acide aminé cystéine de la protéine centyrin ; droite : acquisition de la fluorescence sur une souris portant des cellules tumorales HCC827, 48 h après l'injection de 10 nmol de conjugué dans la veine caudale ; figure adaptée d'article.²³

Toutes ces études décrivent des bioconjugués fluorescents possédant des propriétés de ciblage et des comportements pharmacocinétiques très prometteurs. Cependant, la stratégie de bioconjugaison utilisée nécessite toujours l'utilisation d'une molécule tierce qui joue le rôle de *linker*. Cette approche peut s'avérer limitée puisqu'elle multiplie les réactions (substitution du chlore en *méso* et introduction de la fonction réactive pour la bioconjugaison), diminuant ainsi le rendement et l'efficacité du greffage. Il serait donc avantageux d'établir une méthode plus directe pour vectoriser les fluorophores de type cyanine 7.

Dans cette optique, des travaux très intéressants ont été publiés en 2011 par l'équipe de Wolfbeis.²⁴ Ils décrivent la conjugaison de IR783 avec des protéines telles que l'albumine humaine ou un anticorps IgG, sans aucune molécule intermédiaire. Le marquage de la protéine est réalisé par simple substitution du chlore en *méso* par les fonctions amines terminales ou en ϵ des lysines. Cette étude est d'autant plus élégante qu'elle exploite la sensibilité des propriétés spectroscopiques de la cyanine vis-à-vis de sa position *méso*. L'introduction de l'amine de la protéine diminuant fortement le maximum d'absorption, l'avancement de la réaction est ainsi visible à l'œil nu et peut être quantifié précisément, sans purification préalable, par spectrophotométrie (**figure 115**).

La principale limitation de cette méthode de bioconjugaison est la cinétique assez lente de la substitution du chlore par l'amine. En effet, l'introduction de petites molécules organiques *via* cette réaction est généralement réalisée aux alentours de 75 °C et nécessite plusieurs heures.^{19,20,21} Ces conditions drastiques n'étant pas compatibles avec les protéines, le marquage a été effectué à 37 °C seulement et la conversion a été par conséquent beaucoup plus lente. Pour l'albumine comme pour l'anticorps, à peine 20 % de la quantité initiale de protéine a été modifiée par le fluorophore après 60 h d'incubation. L'étude montre que la cinétique de bioconjugaison est plus rapide avec un analogue de l'IR783 possédant un cycle central à 5 atomes de carbone, S 0378. Avec ce fluorophore, la cinétique de la substitution du chlore reste assez lente, mais le temps de demi-réaction a tout de même pu être calculé ($t_{1/2} = 10$ h pour l'anticorps et 18 h pour l'albumine).

²⁴ Gorris, H. H.; Saleh, S. M.; Groegel, D. B. M.; Ernst, S.; Reiner, K.; Muströph, H.; Wolfbeis, O. S. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1433–1437

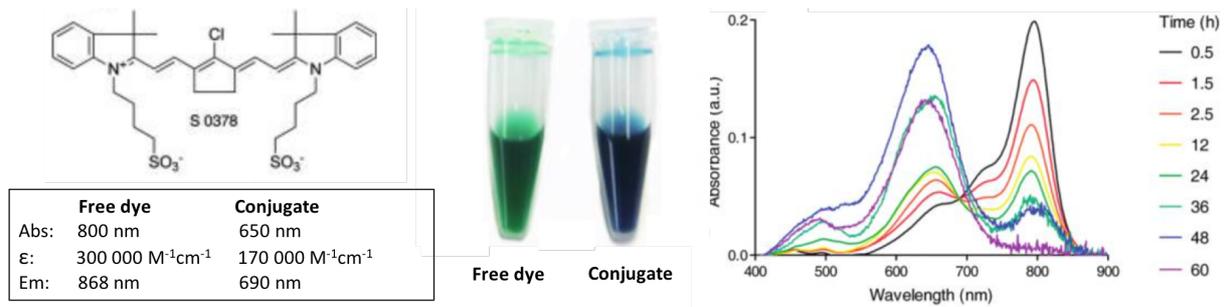


Figure 115. Gauche : structure du fluorophore S 0378 et propriétés photophysiques de la cyanine avant et après sa bioconjugaison ; milieu : photographie du changement de couleur lors du greffage de S 0378 sur l'albumine ; Droite : évolution du spectre d'absorption en fonction du temps de réaction avec l'albumine à 37°C ; figure adaptée d'article.²⁴

I.5. Limitations des méthodes actuelles et introduction à la stratégie développée

Malgré tous ces efforts, les techniques de vectorisation des fluorophores de type cyanine 7 peuvent encore être améliorées. La plupart des essais réalisés mettent en jeu un marquage aléatoire des amines de la protéine vectrice. Le contrôle du nombre de fluorophores greffés et de leur position sur la séquence protéique est par conséquent difficile. Dans le prolongement des recherches effectuées durant ma thèse pour mettre au point de nouvelles stratégies de bioconjugaison site-spécifiques (voir Chapitres I et II), nous avons mis en évidence une technique très simple pour réaliser le marquage de biomolécules par IR783 en contrôlant le site de bioconjugaison.

Comme dans l'étude de Wolfbeis *et al.*,²⁴ la conjugaison entre la cyanine et la protéine se fait directement, grâce à la substitution du chlore en *méso* par une fonction nucléophile présente sur la protéine. Mais à la différence de Wolfbeis, nous avons cherché à marquer les thiols des cystéines au lieu des amines afin de pouvoir contrôler le nombre de sonde introduite (**figure 116**). En effet, la réaction de substitution du chlore en *méso* étant plus rapide avec les thiols qu'avec les amines, nous avons fait l'hypothèse qu'en choisissant judicieusement les conditions de bioconjugaison (pH, nombre d'équivalents), nous pourrions obtenir un greffage spécifique des cystéines.

En plus d'être site-spécifique, cette stratégie de bioconjugaison présente plusieurs avantages par rapport à celle de Wolbeis. Tout d'abord, la cinétique de bioconjugaison devrait être augmentée par rapport à un greffage sur les amines. Ensuite, l'introduction d'un thiol ne devrait pas trop altérer les caractéristiques photophysiques de IR783 et le maximum d'émission aux alentours de 810 nm, idéalement situé dans la région NIR-I, serait donc conservé.

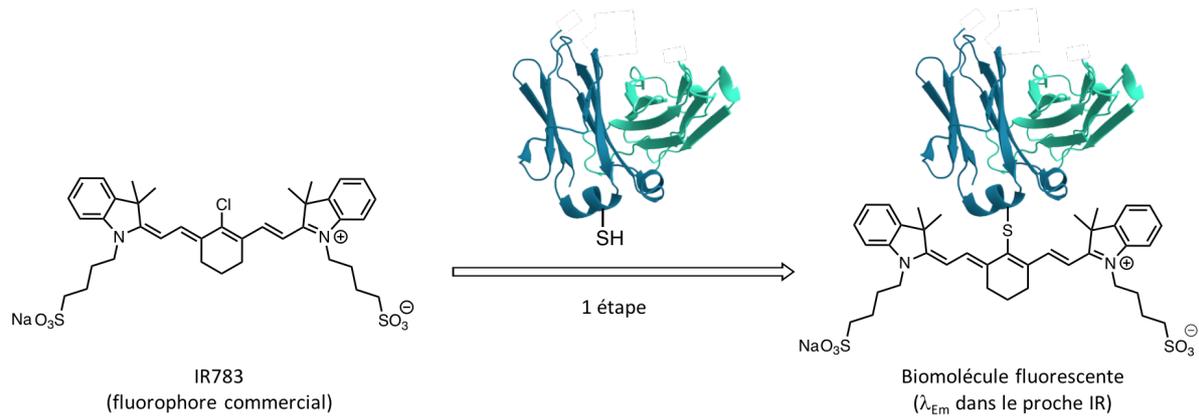
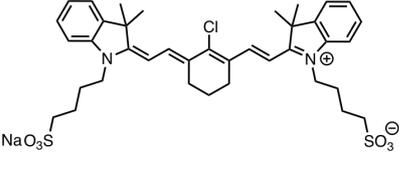
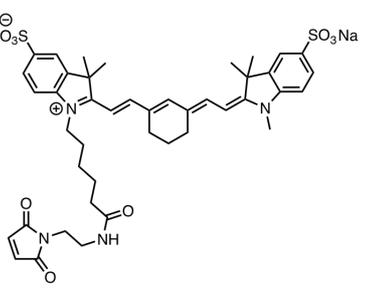
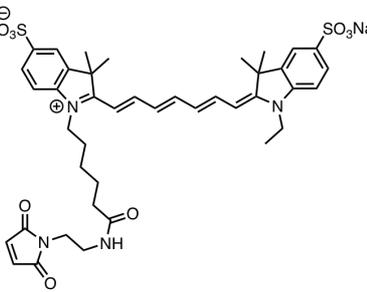
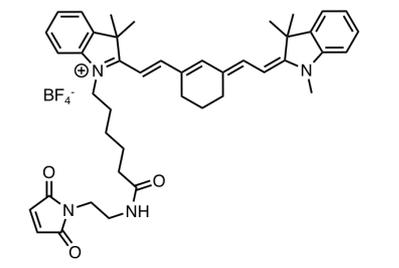
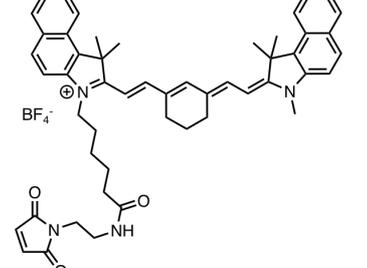
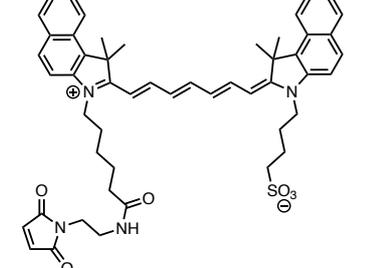


Figure 116. Schéma de la stratégie permettant la synthèse d'un agent imageant proche infrarouge biovectorisé grâce à l'introduction spécifique de IR783 sur le résidu cystéine de la protéine vectrice.

Plus généralement, notre approche est particulièrement avantageuse d'un point de vue économique. En effet, IR783 est l'un des rares fluorophores de la famille des cyanines 7 actuellement commercialisé à un prix abordable. On peut trouver ce fluorophore chez Sigma Aldrich à 44 € / 100 mg, tandis que les cyanines 7 portant une fonction maléimide pour un greffage sur les cystéines sont bien plus coûteuses, comme indiqué dans le **tableau 3**. Cette technique simple et très bon marché, comparée aux méthodes classiques, permettrait ainsi l'obtention, en une étape, de sondes fluorescentes vectorisées émettant dans la fenêtre thérapeutique.

Tableau 3. Aperçu des différentes cyanines commerciales possédant des propriétés spectrales comparables à IR783. Les prix les plus avantageux répertoriés sont indiqués en dessous des molécules correspondantes (prix donnés pour 100 mg).

<p>IR783</p>  <p>44 € (Sigma Aldrich)</p>	 <p>1880 € (Lumiprobe)</p>	 <p>16 000 \$ (Tenova) 24 500 € (AAT Bioquest)</p>
 <p>1090 € (Lumiprobe)</p>	 <p>1090 € (Lumiprobe)</p>	 <p>29 500€ (AAT Bioquest) 6125 € (BioActs)</p>

II. RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Validation de l'approche sur un peptide modèle

Comme pour la seconde stratégie basée sur la plateforme dichlorotétrazine (i.e. chapitre II), l'approche a d'abord été validée par l'introduction de IR783 sur la cystéine d'un nonapeptide modèle (Ac-CKYWGRGDS-NH₂) (**figure 117**).²⁵ La réaction de bioconjugaison a été effectuée par addition de 2,5 équivalents de cyanine IR783 sur le peptide, à 37 °C, à pH 7,13. La formation du conjugué Ac-C(IR783)KYWGRGDS-NH₂ **34** a été suivie par RP-HPLC-LRMS et nous avons ainsi pu vérifier, grâce à l'analyse par spectrométrie de masse, qu'une seule cyanine est greffée au peptide. La cinétique de substitution est assez rapide : en 5 min, 55 % du peptide est marqué par la sonde et après 280 min, la conversion est quantitative (> 99 %).

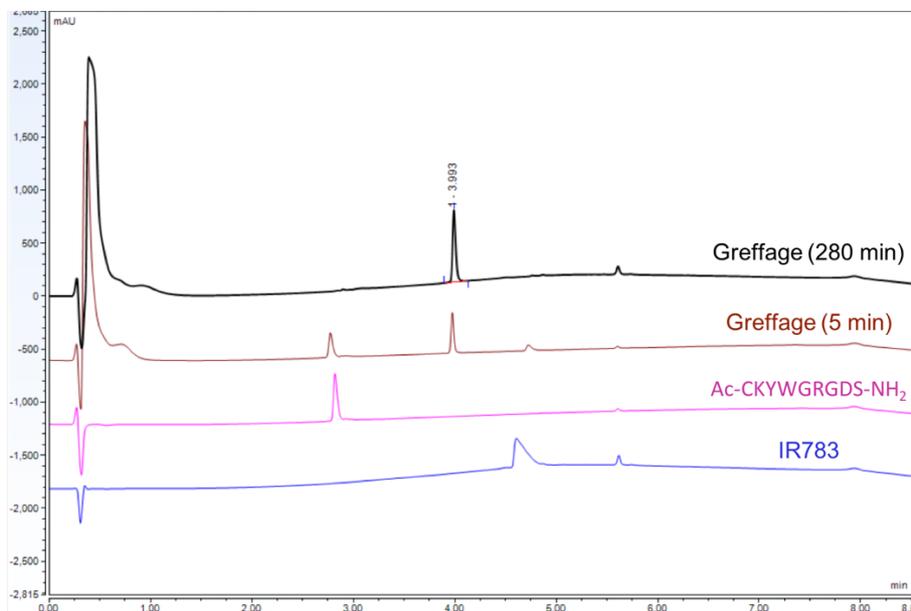
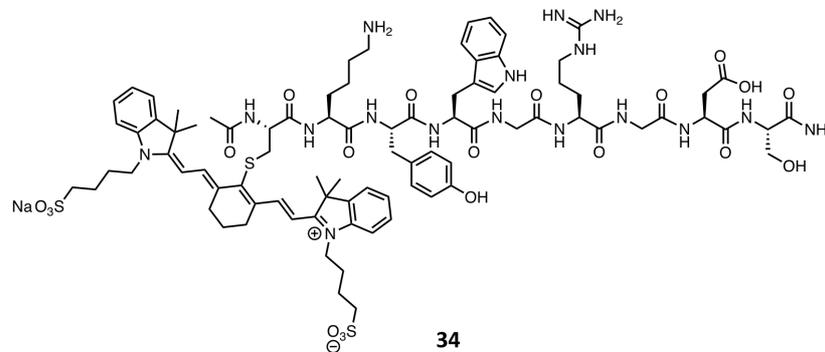


Figure 117. Haut : Structure du conjugué **34** obtenu par greffage de IR783 sur la cystéine du peptide Ac-CKYWGRGDS-NH₂ **18** ; Bas : Chromatogrammes RP-HPLC montrant l'évolution au cours du temps du greffage de IR783 sur le peptide Ac-CKYWGRGDS-NH₂ (**34** : t_R = 4.0 min).

²⁵ Arumugam, S.; Guo, J.; Mbu, N. E.; Friscourt, F.; Lin, N.; Nekongo, E.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1591–1598

L'étude des propriétés spectrales du conjugué a permis d'attester que l'amine de la lysine n'avait pas réagi. En effet, les maxima d'absorption, d'émission et d'excitation ont subi un déplacement bathochrome par rapport au fluorophore libre, ce qui correspond à l'introduction d'une fonction thiol (**figure 118**).¹⁸ Une expérience similaire a été réalisée avec un excès plus important d'IR783 (25 équivalents), pour mettre en évidence la sélectivité de la réaction dans ces conditions. Nous avons pu confirmer qu'après une heure de réaction, seul le conjugué généré par la substitution du chlore par le thiol est visible (voir Partie expérimentale).

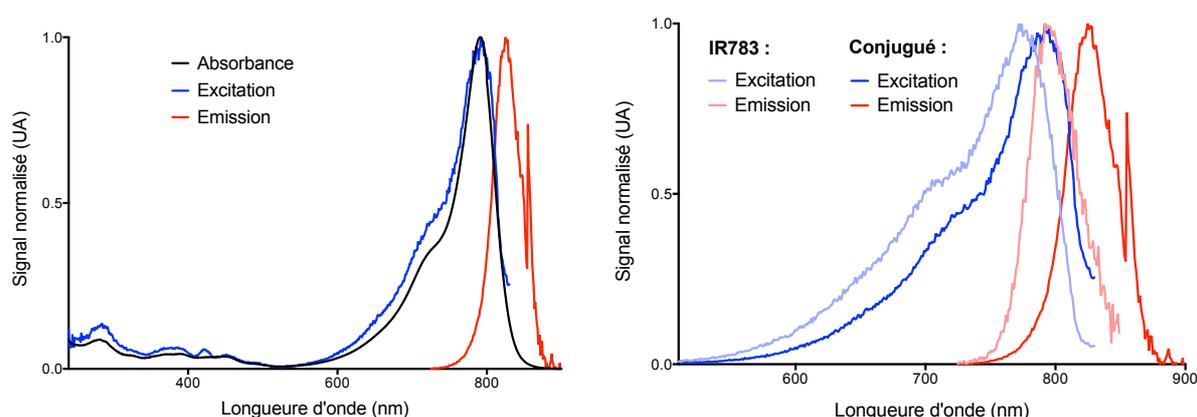


Figure 118. Gauche : Spectres d'absorption, d'émission et d'excitation du conjugué **34** dans le PBS à pH 7,4, à 25 °C. Le spectre d'émission a été mesuré de 725 à 900 nm avec un λ d'excitation à 710 nm (bande passante de 5 nm), et le spectre d'excitation a été mesuré de 240 à 830 nm avec un λ d'émission à 840 nm (bande passante de 12 nm et 5 nm respectivement). $\lambda_{\text{Ex, max}} = 792$ nm, $\lambda_{\text{Em, max}} = 825$ nm ; Droite : Spectres d'émission et d'excitation de IR783 libre et conjugué au peptide (déplacement bathochrome de 20 nm pour l'excitation et de 33 nm pour l'émission). Les spectres d'émission n'ont pas pu être corrigés dans la gamme 850-900 nm, ce qui explique l'artefact observé à 850 nm.

Comme le montrent différentes études,^{26, 27, 28} le groupement en position centrale de la cyanine peut potentiellement être substitué par les nucléophiles présents dans les milieux biologiques, tel que les cystéines libres ou encore le glutathion qui est en concentration assez élevée dans le plasma sanguin et dans les cellules (de l'ordre du mM).²⁹

Afin d'évaluer la résistance du lien thioéther, nous avons soumis notre conjugué **34** à différentes études de stabilité (**figure 119**). Le conjugué s'est révélé être relativement stable dans le sérum de veau fœtal (FBS, 25 % v/v dans le milieu de culture RPMI) à 37°C avec 98 % de composé intact après 24 h et 79 % après 6 jours. La dégradation a été plus rapide en présence de glutathion à 0,3 mM, à 25 °C : 97 % de composé était intact au bout de 21 h et 30 % après 6 jours. Sans surprise, les impuretés majoritairement formées correspondent au produit de substitution du peptide en position *méso* de la cyanine par le glutathion et au produit obtenu par la formation d'un pont disulfure entre la cystéine du peptide et celle du glutathion. La liaison thioéther semble néanmoins suffisamment stable pour résister à un environnement biologique pendant la durée nécessaire à l'étude de la biodistribution dans les différents organes et à l'acquisition des images de fluorescence. En notre faveur, les composés organiques bioconjugués sont généralement plus stables vis-à-vis des milieux

²⁶ Wang, X.; Lv, J.; Yao, X.; Li, Y.; Huang, F.; Li, M.; Yang, J.; Ruan, X.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 15439–15442

²⁷ Lim, S.-Y.; Hong, K.-H.; Kim, D. I.; Kwon, H.; Kim, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 7018–7025

²⁸ Nani, R. R.; Shaum, J. B.; Gorka, A. P.; Schnermann, M. J. *Org. Lett.* **2015**, 17, 302–305

²⁹ Richie, J. P.; Skowronski, L.; Abraham, P.; Leutzinger, Y. *Clin. Chem.* **1996**, 42, 64–70

biologiques que leur homologue libre. En effet, la protéine forme une enveloppe hydrophobe qui les protège.³⁰ La stabilité de la liaison entre notre cyanine IR783 et la biomolécule devrait donc être améliorée si la biomolécule est une protéine.

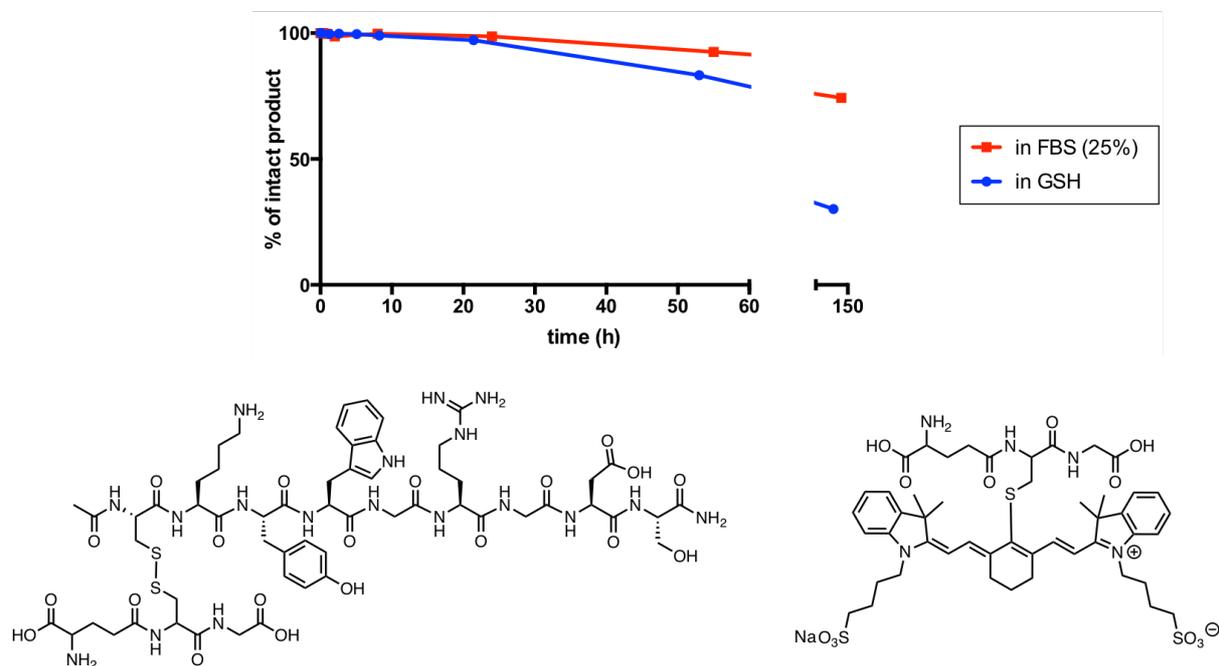


Figure 119. Haut : Évaluation de la stabilité du conjugué Ac-C(IR783)KYWGRGDS-NH₂ **34** dans du FBS et en présence de glutathion (GSH) ; Bas : Produits de dégradation formés en présence de GSH.

II.2. Evaluation de la stratégie par greffage de IR783 sur un fragment Fab' d'anticorps

Encouragés par ces résultats, nous avons cherché à reproduire le greffage de IR783 sur une protéine permettant la reconnaissance d'un récepteur *in vivo* et possédant des cystéines disponibles pour la bioconjugaison. Notre choix s'est porté sur un fragment Fab' d'anticorps monoclonal. Les propriétés *in vivo* des Fab' sont comparables à celle des Fab, cependant la voie de production de ces deux fragments diffère. Les Fab sont produits par clivage enzymatique de la région charnière de l'IgG au-dessus des ponts disulfure, tandis que les Fab' sont formés par digestion enzymatique du fragment cristallisable Fc suivie de la réduction sélective des ponts disulfure de la région charnière (**figure 120**).³¹

³⁰ Rahim, M. K.; Kota, R.; Haun, J. B. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 352–360

³¹ Rader, C. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2009**, *55*, 6.9.1-6.9.14

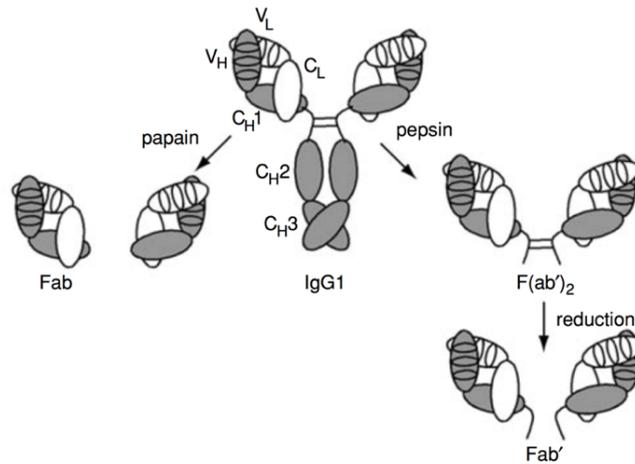


Figure 120. Voies de production des fragments Fab, F(ab')₂ et Fab' à partir d'un anticorps de type IgG1 ; figure adaptée de revue.³¹

Les Fab', tout comme les Fab, conservent une affinité comparable à leur homologue anticorps entier car le site de reconnaissance de l'antigène reste inchangé.^{32, 33} De par leur petite taille (~ 50 kDa), ces fragments possèdent une pharmacocinétique plus rapide que celle des anticorps entiers et la pénétration des tissus tumoraux est facilitée. Les Fab et Fab' ont également d'autres intérêts : l'absence de fragment Fc permet de réduire l'immunogénicité et leur caractère monovalent empêche la formation d'immunocomplexes, par réticulation, qui peuvent déclencher un choc anaphylactique.³¹ Ces fragments d'anticorps sont traditionnellement obtenus par digestion enzymatique mais ils peuvent également être exprimés par des systèmes procaryotes, tels que la bactérie *Escherichia coli*, ce qui n'est pas le cas des anticorps entiers. Leur synthèse est donc moins coûteuse et beaucoup plus rapide.^{34, 35, 36, 37} De plus, des mutations peuvent être introduites pour améliorer la solubilité, la stabilité et l'affinité ou pour générer un site de bioconjugaison unique. La présence de cystéines réduites à la base des Fab' est un atout supplémentaire puisque ces thiols libres constituent un site de bioconjugaison idéal pour un marquage régiospécifique des fragments, sans risque d'interférence avec le site de reconnaissance.^{38, 39, 40}

a. Production du fragment Fab' de pertuzumab

L'anticorps choisi pour cette étude est le pertuzumab, un anticorps monoclonal anti-HER2, utilisé pour le diagnostic et le traitement du cancer du sein. Les fragments F(ab')₂ et Fab' correspondants ont été synthétisés au laboratoire à partir de l'anticorps entier par digestion enzymatique et réduction des ponts disulfure intercaténaux de la région charnière. La formation du F(ab')₂ **35** a été

³² Califf, R. M.; and investigators of the EPIC. *N. Engl. J. Med.* **1994**, 330, 956–961

³³ Qi, J.; Ye, X.; Ren, G.; Kan, F.; Zhang, Y.; Guo, M.; Zhang, Z.; Li, D. *Mol. Immunol.* **2014**, 57, 59–65

³⁴ Wlad, H.; Ballagi, A.; Bouakaz, L.; Gu, Z.; Janson, J.-C. *Protein Expr. Purif.* **2001**, 22, 325–329

³⁵ Andersen, D. C.; Reilly, D. E. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 456–462

³⁶ Arbabi-Ghahroudi, M.; Tanha, J.; MacKenzie, R. *Cancer Metastasis Rev.* **2005**, 24, 501–519

³⁷ Rodríguez-Carmona, E.; Cano-Garrido, O.; Dragosits, M.; Maurer, M.; Mader, A.; Kunert, R.; Mattanovich, D.; Villaverde, A.; Vázquez, F. *Process Biochem.* **2012**, 47, 446–452

³⁸ Behr, T.; Becker, W.; Hannappel, E.; Goldenberg, D. M.; Wolf, F. *Cancer Res.* **1995**, 55, 5777s–5785s

³⁹ Humphreys, D. P.; Heywood, S. P.; Henry, A.; Ait-Lhadj, L.; Antoniwi, P.; Palframan, R.; Greenslade, K. J.; Carrington, B.; Reeks, D. G.; Bowering, L. C.; West, S.; Brand, H. A. *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, 20, 227–234

⁴⁰ Goel, N.; Stephens, S. *mAbs.* **2010**, 2, 137–147

effectuée selon une procédure classique à partir de 10 mg de pertuzumab (**Figure 121**).⁴¹ Un ratio en masse de 1 : 20 (pepsine : IgG) a été utilisé pour minimiser l'endommagement du site de reconnaissance par la protéase. Les fragments générés par la digestion de la partie Fc ainsi que l'anticorps intact restant ont été éliminés respectivement par purification d'affinité sur protéine L et par exclusion stérique. Le fragment F(ab')₂ **35** a été caractérisé par RP-HPLC-HRMS (Orbitrap) et gel d'électrophorèse.

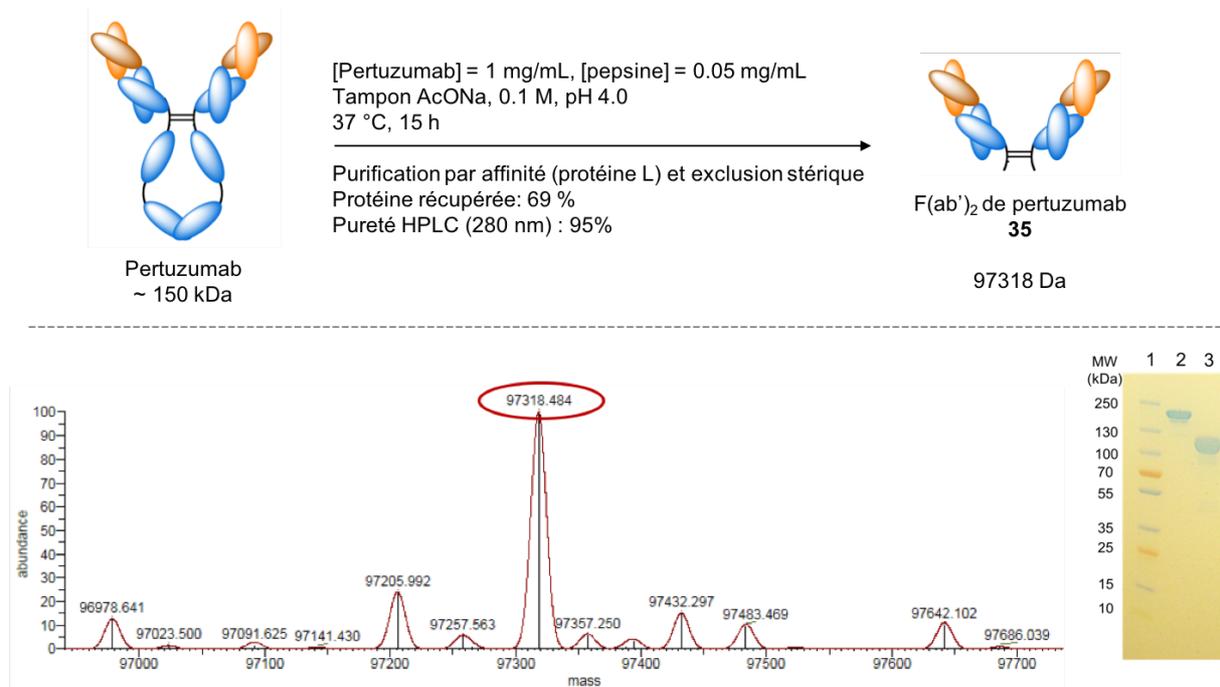


Figure 121. Haut : Synthèse du F(ab')₂ **35** par digestion enzymatique du pertuzumab ; Bas : Spectre de masse ESI-HRMS (Orbitrap) déconvolué et révélation au bleu de Coomassie de l'analyse par SDS-PAGE en conditions dénaturantes, 1 : échelle de référence, 2 : pertuzumab, 3 : F(ab')₂ **35**.

L'étape de réduction des ponts disulfure du F(ab')₂ pour obtenir le Fab' a été plus difficile à mettre au point. Différents agents de réduction sont disponibles pour effectuer cette réaction : la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP), le dithiothréitol (DTT), la β -mercaptoéthylamine (β -MEA), le β -mercaptoéthanol (β -ME), la dithiobutylamine (DTBA) et le glutathion sous sa forme réduite (GSH). Plusieurs études ont tenté de déterminer le réducteur le plus adéquat permettant la réduction sélective des ponts disulfure de la région charnière tout en évitant une sur-réduction entraînant la formation parasite de chaînes légères et de fragments de chaînes lourdes.^{39,41,42} Ces études donnent de bonnes indications, cependant les fonctions disulfure sont très sensibles et de nombreux paramètres peuvent intervenir (nature et concentration de l'anticorps, température, durée, pH, nombre d'équivalents de réducteur). Les réducteurs à base de thiol sont doux et sont généralement assez efficaces pour réaliser une réduction sélective.⁴¹ Cependant, il peut se former des adduits entre ces réducteurs et les cystéines du Fab' qui peuvent être problématiques par la suite.⁴³ Les réducteurs de la famille des phosphines sont plus puissants mais permettent d'éviter la formation d'adduits

⁴¹ Zhou, Z.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Ma, G.; Su, Z. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 238–246

⁴² Crivianu-Gaita, V.; Romaschin, A.; Thompson, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *2*, 23–28

⁴³ Begg, G.; Speicher, D. *J. Biomol. Tech.* **1999**, *10*, 17–20

inactifs. Ainsi, la TCEP, une phosphine hydrosoluble et sans odeur, a été largement utilisée pour effectuer la réduction de $F(ab')_2$ en Fab' .^{39, 44, 45, 46}

La réduction de notre $F(ab')_2$ de pertuzumab a donc été réalisée grâce au TCEP à une concentration assez faible de 25 μ M (**figure 122**). Nous avons pu obtenir, après 2 h à 25 °C, un mélange de différents fragments constitué de 26 % de Fab' (déterminé par intégration du chromatogramme RP-HPLC à 280 nm ; **figure 122 et 123**). Après purification par chromatographie d'exclusion stérique, le Fab' **36** a été isolé avec une pureté de 77 %. Celui-ci peut être conservé au congélateur à condition que sa concentration ne soit pas trop élevée (risque de réoxydation en $F(ab')_2$ lorsque la concentration est supérieure à 2 mg/mL).

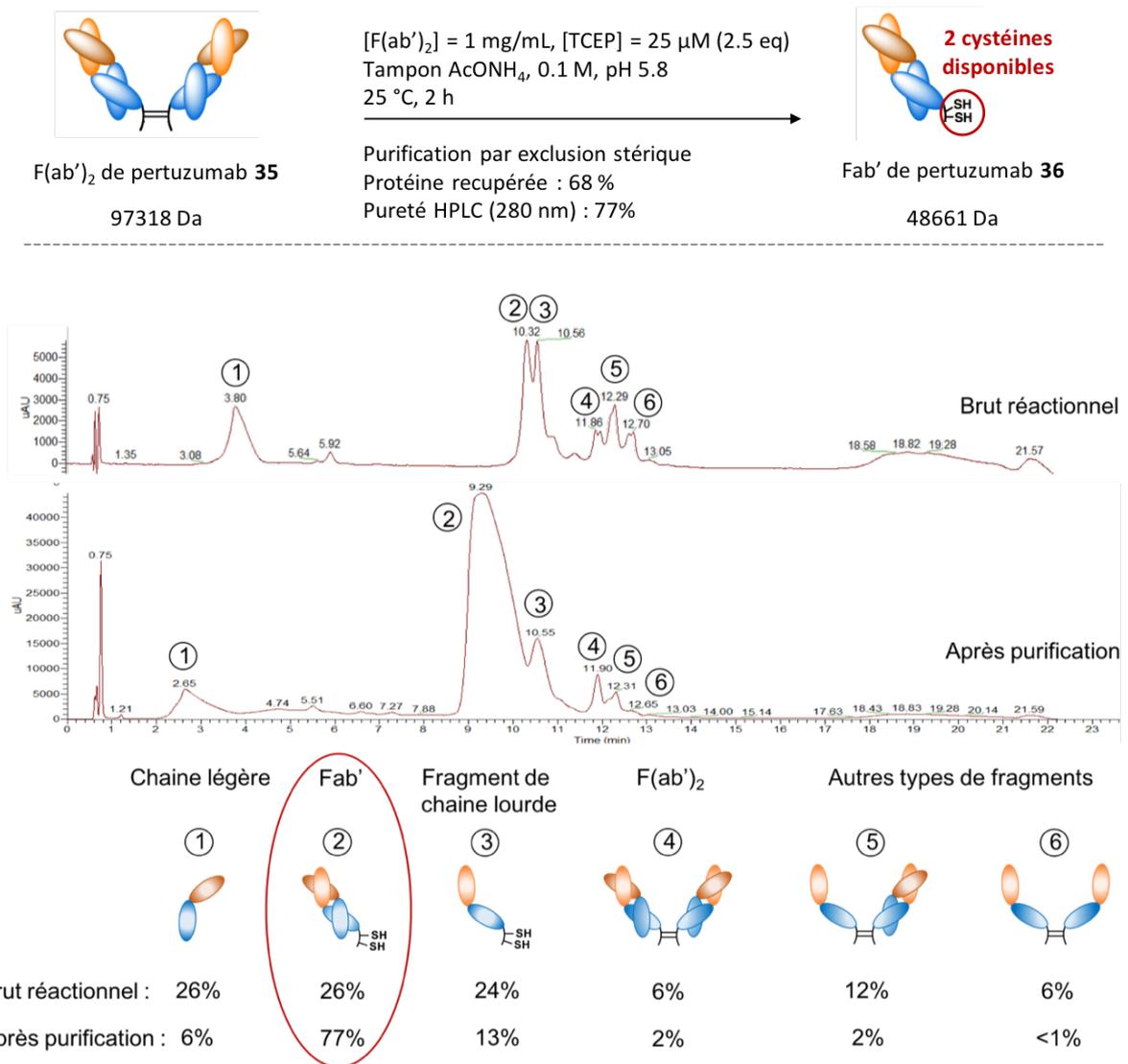


Figure 122. Haut : Synthèse du Fab' par réduction des ponts disulfure du $F(ab')_2$; Bas : Chromatogrammes RP-HPLC à la longueur d'onde de détection de 280 nm du brut réactionnel après 2 h de réaction et du Fab' isolé par chromatographie d'exclusion stérique ; le fragment correspondant à chacun des signaux du chromatogramme a été identifié.

⁴⁴ Scheer, J. M.; Sandoval, W.; Elliott, J. M.; Shao, L.; Luis, E.; Lewin-Koh, S.-C.; Schaefer, G.; Vandlen, R. *PLoS One*. **2012**, 7, e51817

⁴⁵ Chan, L. J.; Ascher, D. B.; Yadav, R.; Bulitta, J. B.; Williams, C. C.; Porter, C. J. H.; Landersdorfer, C. B.; Kaminskas, L. M. *Mol. Pharm.* **2016**, 13, 1229–1241

⁴⁶ Kirley, T. L.; Greis, K. D.; Norman, A. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 480, 752–757

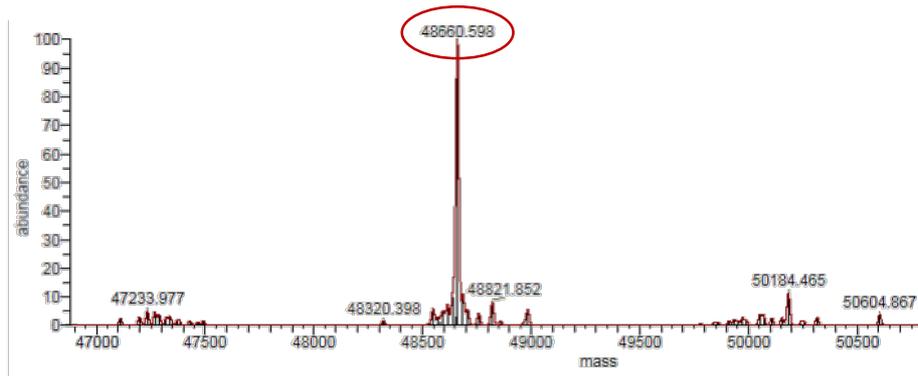


Figure 123. Spectre de masse ESI-HRMS (Orbitrap) déconvolué correspondant au signal du Fab' **36** au temps de rétention de 9,3 min en RP-HPLC.

b. Conjugaison de IR783 au fragment Fab'

Une fois la synthèse du Fab' optimisée, nous avons pu tester la bioconjugaison de IR783 par substitution du chlore en position centrale par les thiols des deux cystéines libres du fragment Fab' (**schéma 22**). La réaction de bioconjugaison a été suivie par analyse RP-HPLC-HRMS (Orbitrap). Avec un ajout de 25 équivalents de sonde, et dès 1 h de réaction, un nouveau signal est apparu à un temps de rétention de 13 min, correspondant au Fab' marqué par deux fluorophores IR783 (**37**) comme l'indique le spectre de masse déconvolué (**figure 124**). Le chromatogramme RP-HPLC obtenu avec une détection à 650 nm a confirmé le greffage covalent de la sonde sur le Fab'. Le greffage du fluorophore sur les résidus de chaîne légère (7,7 min) et de fragments de chaîne lourde (16,1 min) a également été observé. Le marquage du Fab' a augmenté au cours du temps (de 23 % de conversion après 1 h jusqu'à 70 % de conversion après 26 h). Malheureusement, la proportion de chaîne légère et de fragment de chaîne lourde a augmenté aussi avec le temps. Nous avons tenté de limiter ce phénomène en doublant le nombre d'équivalents de sonde ajoutés plutôt qu'en augmentant le temps de réaction. Le greffage a alors été plus rapide (65 % de conversion après 1 h) mais le taux de conversion n'a pas dépassé 70 %, même après 24 h.

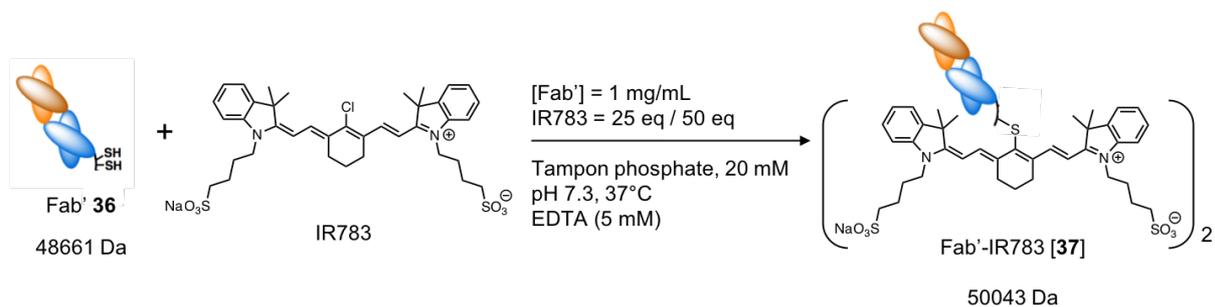


Schéma 22. Greffage de IR783 sur les cystéines du Fab' de pertuzumab.

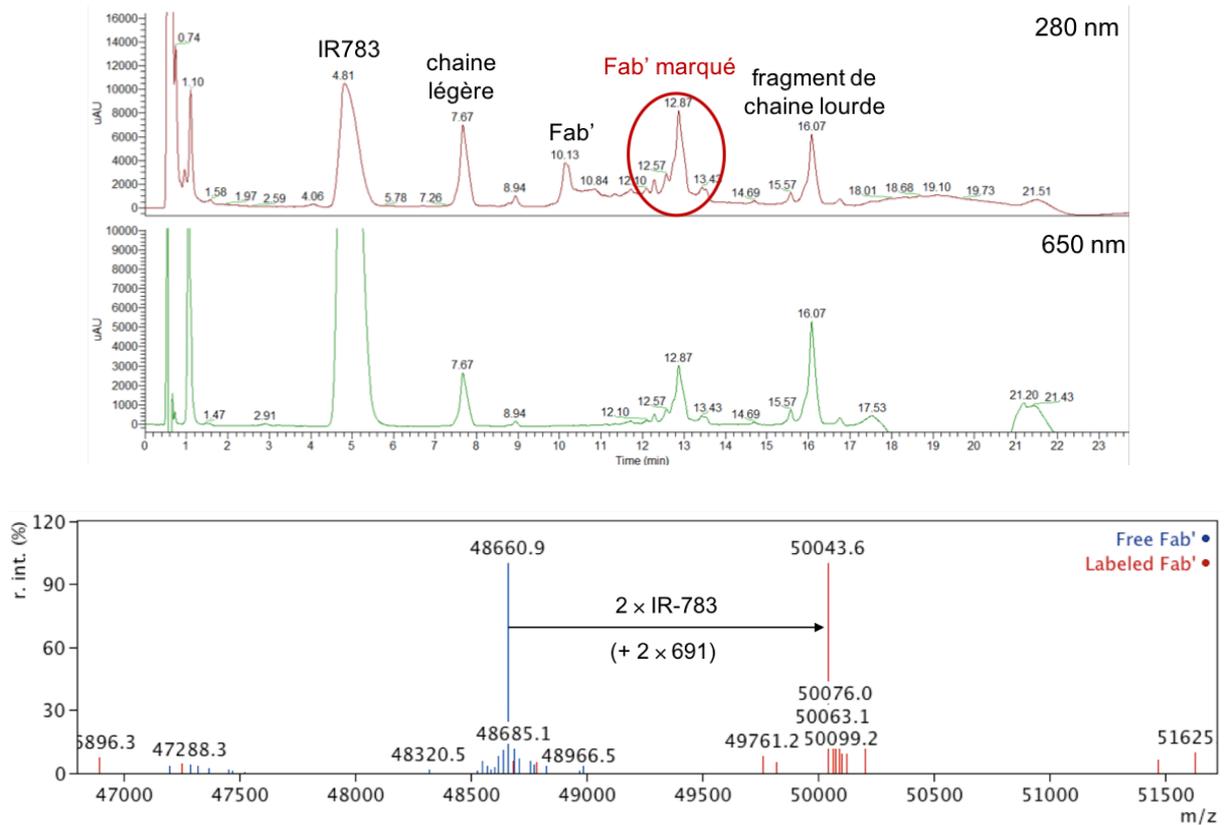


Figure 124. Haut : Chromatogrammes RP-HPLC (détection à 280 et 650 nm) du brut réactionnel après 26 h de réaction en présence de 25 équivalents de IR783 ; Bas : Spectres de masse HRMS Orbitrap déconvolués de Fab', et du conjugué Fab'-IR783 **37**.

La spécificité de la conjugaison a été vérifiée par une expérience contrôle avec un Fab' dont les cystéines avaient été préalablement bloquées par alkylation au iodoacétamide.^{45, 46, 47} Aucun greffage n'a été observé dans les conditions de bioconjugaison précédemment décrites (25 équivalents de IR783, 37°C, 24 h ; voir Partie expérimentale). Nous avons finalement cherché à savoir si l'efficacité et la spécificité de notre approche étaient comparables à la technologie maléimide. Pour cela, nous avons évalué le greffage de notre Fab' par une cyanine 7 maléimide commerciale, la DiSulfo-CY_{anine7} - Maleimide (**figure 125**). Les premiers tests effectués ont montré que le maléimide était plus réactif que IR783. En effet, il a permis la modification d'une plus grande proportion de Fab' (90 % en 1 h) avec moins de sonde introduite (15 eq). Cependant, la fonction de greffage maléimide s'est avérée moins sélective car une quantité non négligeable de Fab' marqué par 3 cyanines (au lieu de 2) a été observée, ce qui révèle un greffage sur les fonctions amines.

⁴⁷ Selis, F.; Focà, G.; Sandomenico, A.; Marra, C.; Di Mauro, C.; Saccani Jotti, G.; Scaramuzza, S.; Politano, A.; Sanna, R.; Ruvo, M.; Tonon, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 491–505

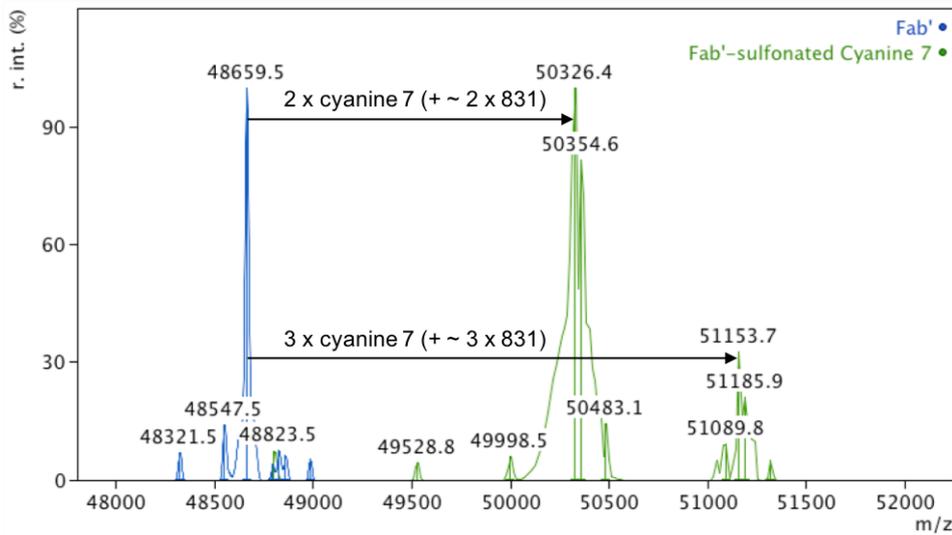
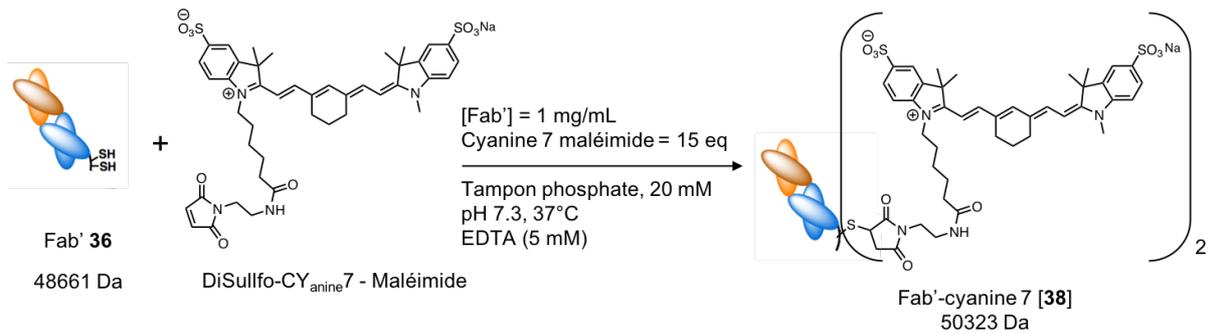


Figure 125. Haut : Greffage de la cyanine 7 maléimide sur les cystéines du fragment Fab' de pertuzumab ; Bas : Spectres de masse HRMS Orbitrap déconvolués du fragment Fab', et du conjugué Fab'-cyanine 7 **38** thioéther de succinimide.

Ces différentes expériences montrent la faisabilité de notre stratégie sur des protéines complexes telles que des fragments d'anticorps. Malheureusement les essais de purification effectués pour tenter d'isoler le conjugué Fab'-IR783 **37** des différentes espèces constituant le brut réactionnel se sont avérés infructueux. L'excès d'IR783 a pu être éliminé par colonne de dessalage au prix d'une perte importante de Fab' marqué. Il a été envisagé d'éliminer le fragment de chaîne lourde par chromatographie d'affinité sur protéine L mais la présence de chaîne légère restait un problème. Malgré les efforts déployés, nous n'avons pas pu obtenir un composé suffisamment pur pour poursuivre l'étude, et avons donc décidé d'utiliser une protéine vectrice plus simple et plus robuste : l'albumine.

II.3. Marquage fluorescent de l'albumine par IR783

Nous avons entrepris le greffage de IR783 *via* la substitution de l'atome de chlore central par la cystéine-34 de l'albumine (**schéma 23**). Dix équivalents de sonde fluorescente ont été ajoutés à une solution de BSA à 2 mg/mL dans le tampon phosphate à pH 7,13, à température ambiante. Le greffage de la sonde a été suivi par analyse RP-HPLC-HRMS (Orbitrap). Après seulement 1 h de réaction, 95 % de l'albumine avait été modifiée par la sonde IR783. Après 5 h de réaction l'excès de sonde fluorescente a pu être éliminé par chromatographie d'exclusion stérique, sans entraîner une perte trop importante de conjugué (**figure 126. A**). Comme précédemment, la spécificité de la

réaction a été vérifiée par spectrométrie de masse et spectroscopie d'absorbance et de fluorescence (**figure 126. B et C**). Le caractère covalent de la liaison entre le fluorophore et l'albumine a été confirmé par analyse SDS-PAGE (**figure 126. D**). La stabilité du conjugué a été évaluée par l'analyse SDS-PAGE du conjugué après incubation dans le plasma humain à 37 °C (voir Partie expérimentale). L'absence de relargage de fluorophore libre a montré que la liaison thioéther entre IR783 et l'albumine n'était pas rompue après 48 h d'incubation.

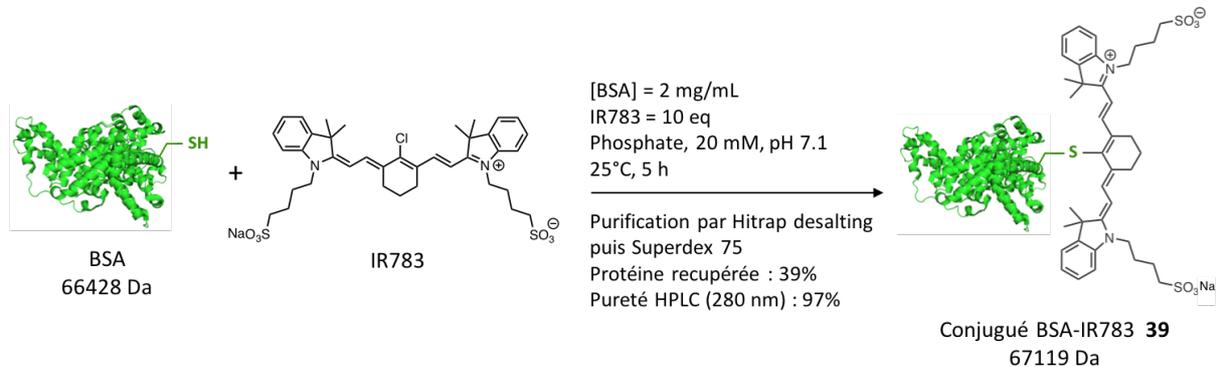


Schéma 23. Greffage du fluorophore IR783 sur la cystéine de la BSA.

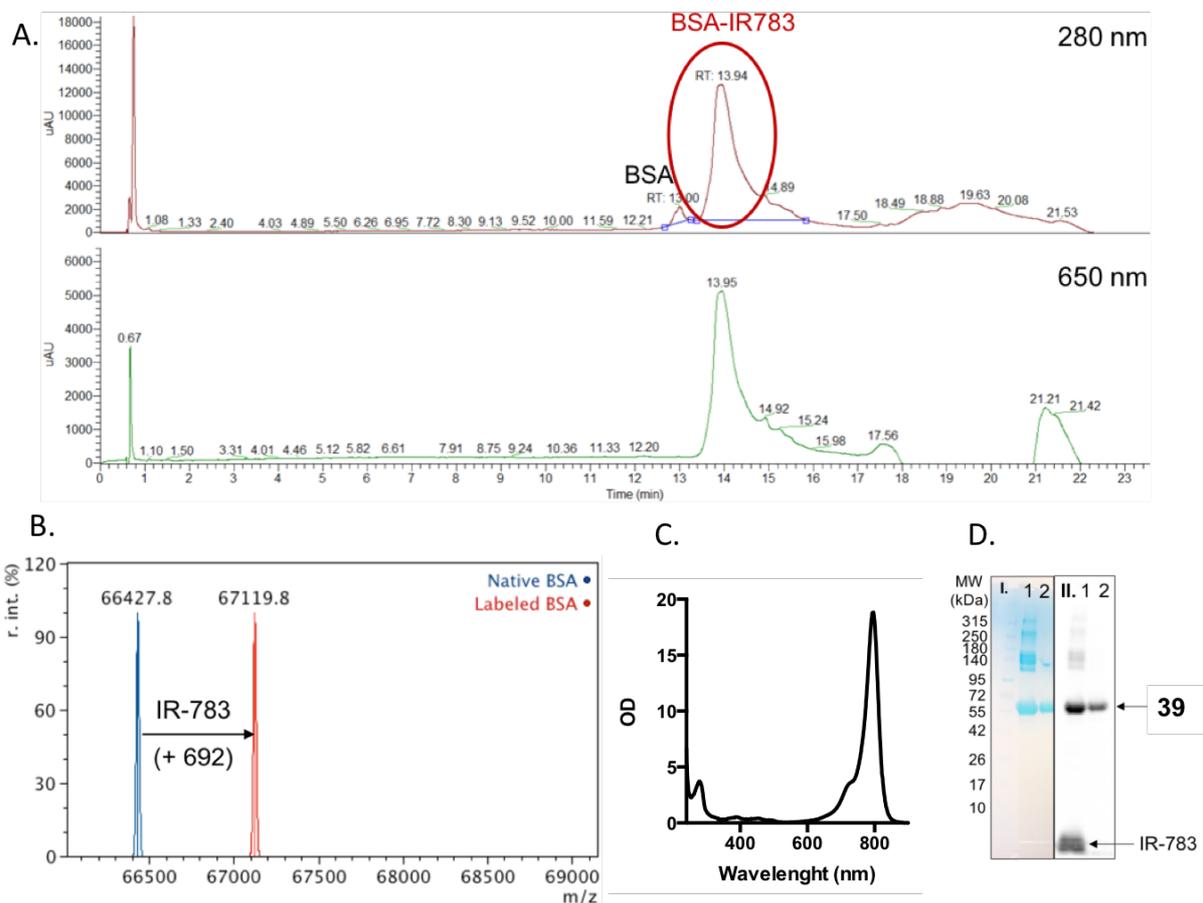


Figure 126. A. Chromatogrammes RP-HPLC (détection à 280 et 650 nm) du conjugué BSA-IR783 après purification par chromatographie d'exclusion stérique ; **B.** Spectres de masse Orbitrap déconvolués de la BSA native, et du conjugué **39** ; **C.** Spectre d'absorption du conjugué **39** ; **D.** Analyse par SDS-PAGE en conditions dénaturantes du conjugué **39** avec I. : révélation au bleu de Coomassie et II. : acquisition du signal fluorescent (paire de filtres : 740 nm / 790 nm) ; 1 : brut réactionnel, 2 : conjugué **39** purifié par chromatographie d'exclusion stérique.

II.4. Validation de la stratégie *in vivo*

Le conjugué BSA-IR783 **39** et ses performances de ciblage par effet EPR (*enhanced permeability and retention*) ont été évalués *in vivo* sur deux groupes de souris BALB/c nude : un premier groupe de quatre souris saines et un second groupe de cinq souris portant des cellules tumorales syngéniques du cancer du côlon CT26 greffées sur leur flanc. Des acquisitions de la fluorescence ont été réalisées 1 h, 4 h et 24 h après l'injection du composé (dose de 30 µg/souris).

Les images obtenues ont montré une accumulation du composé dans la tumeur due à l'effet EPR (**figure 127. A**). 1 h et 4 h après l'injection, le composé était encore circulant et les organes fortement irrigués (museau, oreilles, pattes) apparaissaient donc fluorescents. Cependant, après 24 h le contraste entre le signal de la tumeur et le bruit de fond était bien meilleur. Les souris ont ensuite été euthanasiées et disséquées, et la biodistribution du composé dans les principaux organes a pu être évaluée (**figure 127. B et C**).

Nous avons constaté une très forte rétention du composé dans les poumons des souris. Ce signal, pourtant très élevé, n'était pas visible en imagerie corps-entier à cause de la faible pénétrabilité de la lumière proche infrarouge. L'accumulation de l'albumine dans les poumons a déjà été observée dans différentes études,^{48,49} et est probablement due à l'interaction des arginines de la BSA avec les micro-vaisseaux de l'endothélium pulmonaire.^{50, 51, 52} Le composé a été éliminé assez lentement par voie hépatique, comme l'indique la fluorescence émise par le foie. L'accumulation dans la tumeur est moins évidente sur organes isolés mais le ratio tumeur/muscle de 1,5 a permis d'attester de l'efficacité de notre conjugué BSA-IR783 et de la viabilité *in vivo* de notre stratégie de marquage.

⁴⁸ Vasquez, K. O.; Casavant, C.; Peterson, J. D. *PLoS One*. **2011**, 6, e20594

⁴⁹ Basuli, F.; Li, C.; Xu, B.; Williams, M.; Wong, K.; Coble, V. L.; Vasalatiy, O.; Seidel, J.; Green, M. V.; Griffiths, G. L.; Choyke, P. L.; Jagoda, E. M. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, 42, 219–225

⁵⁰ Michel, C. C.; Phillips, M. E.; Turner, M. R. *J. Physiol.* **1985**, 360, 333–346

⁵¹ Mason, R. J.; Broaddus, V. C.; Martin, T. R.; King, T. E.; Schraufnagel, D.; Murray, J. F.; Nadel, J. A., *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine E-Book: 2-Volume Set* [Online]; Elsevier Health Sciences, **2010**. <https://books.google.fr/books?id=-BHi9cT6JJMC> (accessed May 31, 2018)

⁵² Powers, M. R.; Blumenstock, F. A.; Cooper, J. A.; Malik, A. B. *J. Cell. Physiol.* **1989**, 141, 558–564

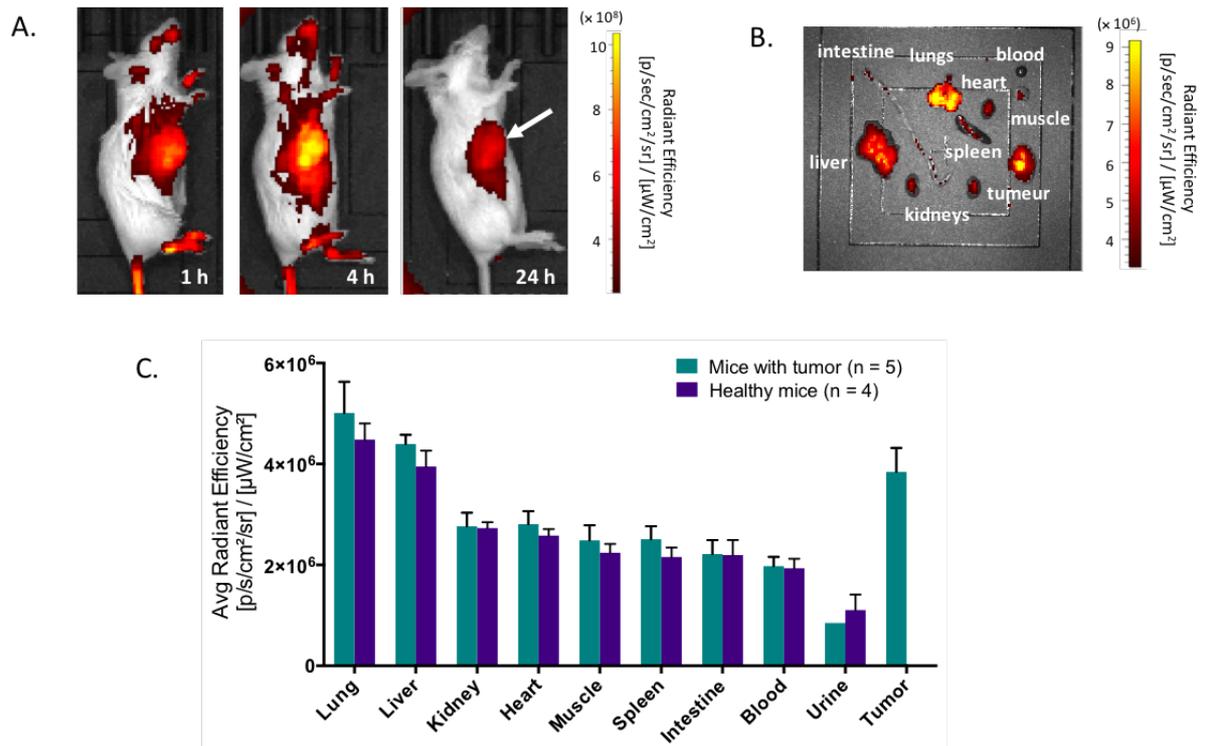


Figure 127. Résultats de l'évaluation *in vivo* du conjugué 39 par acquisition du signal fluorescent (paire de filtres : 760 nm / 845 nm) ; **A.** Images représentatives de la biodistribution du conjugué chez des souris porteuses de tumeur CT26, à 1 h, 4 h et 24 h p.i. ; **B.** Acquisition du signal fluorescent pour les organes isolés (tumeur, foie, reins, poumons, sang, muscle, urine, rate, cœur, intestin) après euthanasie des souris à 24 h p.i. ; **C.** Valeurs de biodistribution en "average radiant efficiency" ([p/s/cm²/sr] / [μ W/cm²]) pour les deux groupes de souris.

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'heptaméthine cyanine IR783 est un fluorophore proche infrarouge disponible commercialement, qui permet la modification en une seule étape de protéines, pour obtenir des agents de ciblage pour l'imagerie par fluorescence. A pH neutre, la substitution de l'atome de chlore en position *méso* se fait sélectivement par les thiols et permet le greffage de IR783 sur des biomolécules vectrices possédant un ou plusieurs résidus cystéines (présents naturellement dans la séquence protéique ou introduits artificiellement). De plus, la variation drastique des propriétés spectrales de la cyanine, observée lors de la substitution de l'atome de chlore central par une amine, permet de vérifier que le greffage est bien obtenu *via* la réaction spécifique des thiols.

L'efficacité de la stratégie a été démontrée par la modification d'un peptide modèle présentant divers acides aminés nucléophiles susceptibles de réagir avec IR783 et de nuire à la sélectivité de la bioconjugaison. Les expériences réalisées par la suite, pour modifier les deux cystéines d'un fragment Fab' de pertuzumab, ont montré la spécificité du greffage à l'échelle de la protéine. Et pour finir, la modification de l'albumine grâce à notre stratégie a permis l'obtention d'un agent imageant pour le ciblage de tumeur par effet EPR. Ce conjugué a été évalué sur modèle murin et a montré un comportement pharmacocinétique intéressant, avec une nette accumulation dans la tumeur.

Cette approche constitue une alternative intéressante aux méthodes habituellement utilisées et qui impliquent soit l'achat, à prix souvent exorbitant, de dérivés de cyanines 7 possédant une fonction de bioconjugaison, soit l'introduction de cette dernière sur le fluorophore par une ou plusieurs étapes supplémentaires. Il est à noter cependant que les conjugués obtenus *via* notre stratégie sont exempts d'espaceur entre la biomolécule et le fluorophore, ce qui peut s'avérer problématique dans certains cas.

Enfin, même si nous avons exclusivement utilisé le fluorophore IR783 pour mener à bien ces travaux, la stratégie est probablement applicable à toutes les cyanines portant un groupement chlorocyclohexyle central.

- CHAPITRE IV -

*Développement de radiotraceurs pour
le diagnostic du cancer de la prostate*

- CHAPITRE IV - Développement de radiotraceurs pour le diagnostic du cancer de la prostate	184
I. INTRODUCTION.....	188
I.1. Imageries du cancer de la prostate	188
a. Imageries structurales	188
b. Imageries fonctionnelles	189
I.2. La PSMA (<i>Prostate specific membrane antigen</i>).....	190
I.3. Les ligands spécifiques de la PSMA	192
a. Les anticorps.....	193
b. Les petites molécules	194
I.4. Les agents imageants spécifiques de la PSMA	195
I.5. L'emploi du cuivre-64 pour le diagnostic du cancer de la prostate.....	200
I.6. Présentation du projet	201
II. RESULTATS.....	202
II.1. Élaboration et évaluation d'un nouveau radiotraceur spécifique de la PSMA.....	202
a. Synthèse	202
b. Evaluation <i>in vitro</i>	205
c. Evaluation <i>in vivo</i>	207
II.2. Optimisation de l'espaceur	213
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	216

I. INTRODUCTION

D'après une étude statistique nord-américaine, le cancer de la prostate est le cancer le plus courant chez l'homme et l'un des plus mortels, avec les cancers du poumon et du colon.¹ Avec une incidence estimée à plus de 1,1 million par an et une mortalité d'environ 307 000 hommes par an, ce cancer est considéré comme l'un des plus répandus dans le monde.²

Le pronostic vital des patients atteints d'un cancer de la prostate est considérablement amélioré lorsque le cancer est détecté à un stade précoce. Cependant, les tumeurs prostatiques évoluent généralement lentement sans déclencher de symptômes pendant plusieurs années. Les cas de cancer de la prostate sont donc très difficiles à détecter lorsqu'ils pourraient être facilement traitables. Actuellement, le dépistage du cancer de la prostate est effectué par analyse sanguine puis examen physique. L'analyse sanguine consiste à mesurer le taux de *Prostate Specific Antigen* (PSA), un biomarqueur dont la concentration plasmatique est généralement supérieure chez les personnes atteintes du cancer de la prostate. Malheureusement, le taux de PSA est dépendant de la personne et peut augmenter en cas d'inflammation ou d'infection, ce qui génère un nombre important de faux-positifs et de faux-négatifs. L'examen par toucher rectal permet la détection de durcissements qui peuvent indiquer la présence de tumeurs prostatiques, cependant les tumeurs de trop petite taille ne sont pas détectables.³ Si à la suite de ces premières analyses, un cancer de la prostate est suspecté, des échantillons de tissus prostatiques sont prélevés au moyen d'une biopsie transrectale guidée par imagerie ultrasonore. L'analyse par microscopie des tissus révèle la présence de cellules cancéreuses et permet le calcul du score de Gleason. La méthode du score de Gleason apporte des informations primordiales et permet notamment de déterminer l'agressivité du cancer et ainsi de faciliter le choix de la thérapie.⁴ Malheureusement, ce test implique la réalisation de biopsies invasives.

I.1. Imageries du cancer de la prostate

a. Imageries structurelles

La prise en charge de patients atteints du cancer de la prostate fait intervenir plusieurs méthodes d'imagerie structurelle.⁵ L'imagerie par ultrasons est très utilisée pour assister le geste du praticien lorsqu'il pratique une biopsie (échographie transrectale). Du fait de sa faible résolution spatiale, la tomодensitométrie (CT) est peu adaptée au dépistage de la tumeur primaire et cette méthode est plutôt réservée à l'évaluation de cancers avancés.⁶ L'IRM est également recommandée pour

¹ Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. *CA. Cancer J. Clin.* **2015**, 65, 5–29

² Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. *CA. Cancer J. Clin.* **2015**, 65, 87–108

³ Carter, H. B.; Albertsen, P. C.; Barry, M. J.; Etzioni, R.; Freedland, S. J.; Greene, K. L.; Holmberg, L.; Kantoff, P.; Konety, B. R.; Murad, M. H.; Penson, D. F.; Zietman, A. L. *J. Urol.* **2013**, 190, 419–426

⁴ Humphrey, P. A. *Mod. Pathol.* **2004**, 17, 292–306

⁵ European Association of Urology - Guideline on Prostate Cancer. <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/> (accessed Sep 01, 2018)

⁶ Hricak, H.; Choyke, P. L.; Eberhardt, S. C.; Leibel, S. A.; Scardino, P. T. *Radiology.* **2007**, 243, 28–53

visualiser l'expansion de cancers à haut risque, récurrents ou métastatiques.⁷ Elle permet notamment de mettre en évidence l'extension dans les nœuds lymphatiques et de déterminer si la tumeur a infiltré les tissus environnants comme les vésicules séminales.⁸ Grâce à sa haute résolution, l'IRM peut aussi assister les biopsies transrectales en combinaison avec l'imagerie ultrasonore.⁹

Les informations morphologiques collectées grâce à ces différentes techniques restent cependant assez limitées en termes de diagnostic. Une analyse rétrospective de 24 études a montré que la détection par IRM ou CT des ganglions pelviens infectés n'était effective que pour environ 40 % des patients.¹⁰

b. *Imageries fonctionnelles*

Les techniques d'imagerie fonctionnelles, et en particulier l'imagerie nucléaire, génèrent un intérêt croissant pour le diagnostic du cancer de la prostate. Grâce à la spécificité des agents radiopharmaceutiques, il est possible de détecter l'apparition de métastases avec une plus grande sensibilité. L'évaluation précise de l'étendue du cancer facilite considérablement le choix du traitement (ablation de la prostate et éventuellement des ganglions pelviens, radiothérapie, chimiothérapie ou une combinaison de ces différents traitements). L'imagerie nucléaire est aussi utilisée pour évaluer le succès du traitement chez des patients ayant subi une prostatectomie curative. Dans le cas de cancers récurrents, il est ainsi possible de mettre en place une radiothérapie salvatrice suffisamment tôt pour qu'elle soit efficace.

Lorsque le cancer est à un stade assez avancé, il est recommandé de pratiquer un examen conventionnel de scintigraphie osseuse par injection de diphosphonates marqués au technétium-99m pour visualiser les métastases osseuses. Cependant, les éventuelles métastases ganglionnaires pelviennes, rétropéritonéales ou hépatiques ne sont pas détectables *via* cette technique. L'utilisation du [¹⁸F]-FDG peut être utile pour le diagnostic de cancers agressifs, ayant un score de Gleason élevé. Malheureusement, ce traceur est peu efficace lorsque la maladie reste confinée à la prostate car les tumeurs sont la plupart du temps peu vascularisées.¹¹

L'emploi de médicaments radiopharmaceutiques plus spécifiques connaît un intérêt croissant pour le diagnostic du cancer de la prostate. Actuellement, deux radiotraceurs PET développés pour le diagnostic du cancer de la prostate ont été approuvés par la FDA : une vitamine marquée au carbone-11 (la [¹¹C]-choline) et un analogue de la leucine marqué au fluor-18 (la [¹⁸F]-fluciclovine ou [¹⁸F]-FACBC pour *fluorocyclobutane-1-carboxylic acid*).¹² Bien qu'utilisée couramment, la choline n'est pas toujours capable d'identifier les récurrences locales, l'infection de ganglions lymphatiques ou les

⁷ Valerio, M.; Donaldson, I.; Emberton, M.; Ehdai, B.; Hadaschik, B. A.; Marks, L. S.; Mozer, P.; Rastinehad, A. R.; Ahmed, H. U. *Eur. Urol.* **2015**, 68, 8–19

⁸ Alonzi, R.; Padhani, A. R.; Allen, C. *Eur. J. Radiol.* **2007**, 63, 335–350

⁹ Baco, E.; Ukimura, O.; Rud, E.; Vlatkovic, L.; Svindland, A.; Aron, M.; Palmer, S.; Matsugasumi, T.; Marien, A.; Bernhard, J.-C.; Rewcastle, J. C.; Eggesbø, H. B.; Gill, I. S. *Eur. Urol.* **2015**, 67, 787–794

¹⁰ Hövels, A. M.; R. A. M. Heesakkers; Adang, E. M.; Jager, G. J.; Strum, S.; Hoogeveen, Y. L.; Severens, J. L.; Barentsz, J. O. *Clin. Radiol.* **2008**, 63, 387–395

¹¹ Jadvar, H. J. *Nucl. Med.* **2011**, 52, 81–89

¹² Evans, J. D.; Jethwa, K. R.; Ost, P.; Williams, S.; Kwon, E. D.; Lowe, V. J.; Davis, B. J. *Pract. Radiat. Oncol.* **2018**, 8, 28–39

métastases viscérales.^{13, 14} Le développement de la [¹⁸F]-FACBC est encore récent et les études concernant ce radiotracteur sont assez rares, mais ce composé semble déjà très prometteur.¹⁵

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Helmut Maecke du département de médecine nucléaire de l'hôpital universitaire de Fribourg en Allemagne, nous nous sommes intéressés à la conception de nouveaux radiotraceurs ciblant la protéine *Prostate specific membrane antigen* (PSMA). Comme le montre une étude comparative très récente, les agents basés sur le ciblage spécifique de la PSMA possèdent un très bon potentiel pour le diagnostic et l'évaluation du cancer de la prostate (**figure 128**).¹²

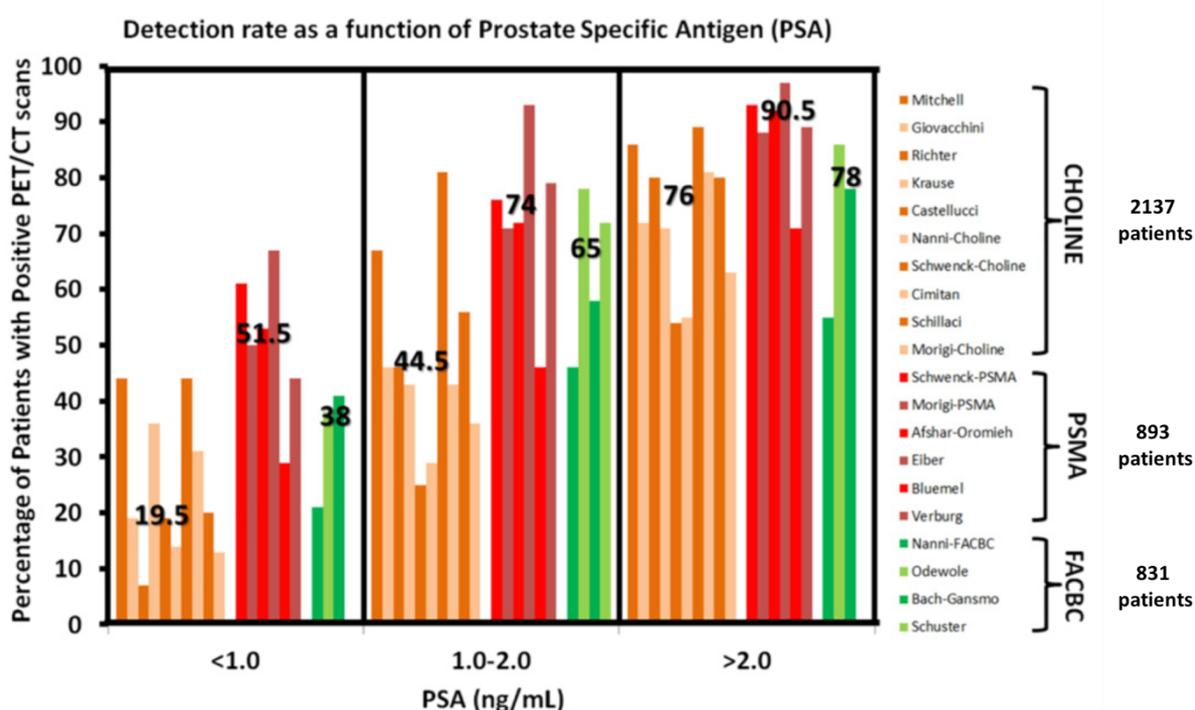


Figure 128. Analyse rétrospective évaluant les taux de détection du cancer de la prostate par imagerie TEP chez des patients présentant une récurrence du cancer après traitement par radiation ou chirurgie. Les résultats de 20 études cliniques concernant près de 4000 patients ont été analysés et classés en fonction de la nature du vecteur utilisé (choline en orange, PSMA en rouge et FACBC en vert) ainsi qu'en fonction du taux de PSA mesuré chez le patient ; figure extraite d'article.¹²

1.2. La PSMA (*Prostate specific membrane antigen*)

La PSMA est une glycoprotéine membranaire à activité enzymatique (EC 3.4.17.21), aussi appelée *N*-acétyl-(L)-aspartyl-(L)-glutamate peptidase I (NAALADase I) ou glutamate carboxypeptidase II (GCPII). C'est une métalloenzyme à zinc constituée de 750 acides aminés et d'un poids moléculaire de 84 kDa. Elle fut identifiée et clonée pour la première fois en 1993.¹⁶ Cette protéine possède un domaine amino-terminal cytosolique et un segment transmembranaire, mais la majeure partie (707 acides aminés) de la protéine se trouve dans le milieu extracellulaire. La PSMA contient deux ions Zn²⁺,

¹³ Yu, C. Y.; Desai, B.; Ji, L.; Groshen, S.; Jadvar, H. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2014**, *4*, 580–601

¹⁴ Evangelista, L.; Guttilla, A.; Zattoni, F.; Muzzio, P. C.; Zattoni, F. *Eur. Urol.* **2013**, *63*, 1040–1048

¹⁵ Savir-Baruch, B.; Zanon, L.; Schuster, D. M. *PET Clin.* **2017**, *12*, 145–157

¹⁶ Israeli, R. S.; Powell, C. T.; Fair, W. R.; Heston, W. D. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 227–230

situés au sein du site actif, qui jouent un rôle majeur dans l'activité protéase de la protéine. La PSMA possède également un ion Ca^{2+} éloigné du site actif qui stabilise la structure sous la forme d'un dimère (**figure 129. A**).¹⁷

La protéine PSMA est exprimée dans plusieurs tissus de l'organisme tels que le cerveau, le nerf sciatique, les intestins, les glandes surrénales, salivaires et lacrymales, les reins et la prostate.¹⁸ Elle est particulièrement présente dans le système nerveux central où elle réalise l'hydrolyse d'un neurotransmetteur, le *N*-acétylaspartylglutamate (NAAG) en glutamate (Glu) et en *N*-acétylaspartate (NAA) (**figure 129. B**).¹⁹ Elle est également présente dans la membrane de l'intestin grêle et permet, comme décrit dans la **figure 129. C**, l'adsorption des folates par déconjugaison des folates polyglutamates (non actifs dans l'organisme) en folates monoglutamates (vitamine B9, forme active de l'acide folique).²⁰

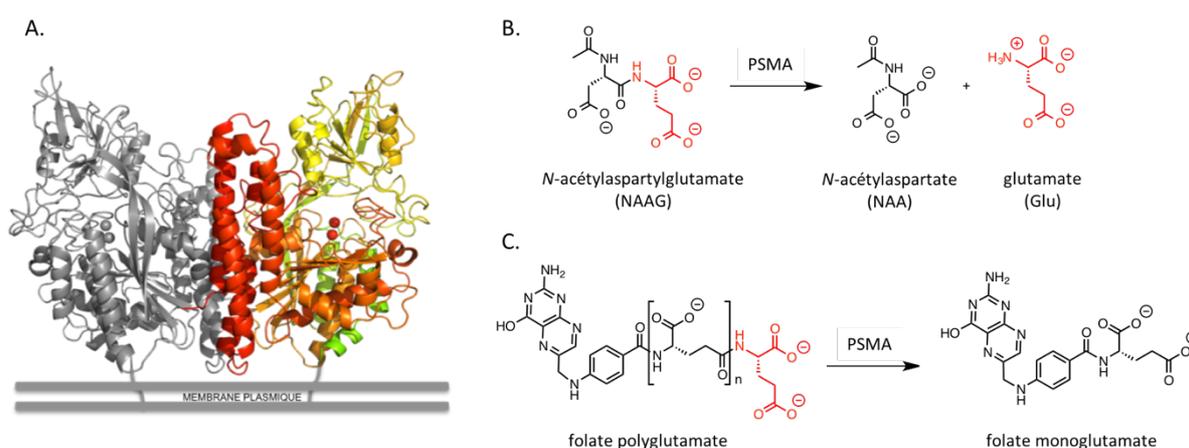


Figure 129. **A.** Structure cristallographique de la région extracellulaire de la PSMA sous forme de dimère (image obtenue grâce au logiciel PyMOL à partir de la structure PDB#1Z8L). Les atomes de zinc apparaissent sous la forme de sphères rouges, au cœur du monomère de droite ; **B.** Hydrolyse du NAAG catalysée par la PSMA ; **C.** Formation du folate monoglutamate par hydrolyse du folate polyglutamates par la PSMA.

La PSMA est ainsi capable de reconnaître plusieurs substrats différents. Cette reconnaissance substrat-enzyme est permise par l'agencement tridimensionnel des acides aminés qui forment le site actif. Le substrat est stabilisé et activé par des liaisons de coordination avec les deux atomes de zinc et par de nombreuses liaisons hydrogène et ioniques avec les acides aminés environnants (**schéma 24**). C'est l'ensemble de ces interactions qui permet à la réaction d'hydrolyse d'avoir lieu.^{21, 19}

¹⁷ Mesters, J. R.; Barinka, C.; Li, W.; Tsukamoto, T.; Majer, P.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J.; Hilgenfeld, R. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1375–1384

¹⁸ Silver, D. A.; Pellicer, I.; Fair, W. R.; Heston, W. D.; Cordon-Cardo, C. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 81–85

¹⁹ Robinson, M. B.; Blakely, R. D.; Couto, R.; Coyle, J. T. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 14498–14506

²⁰ Pinto, J. T.; Suffoletto, B. P.; Berzin, T. M.; Qiao, C. H.; Lin, S.; Tong, W. P.; May, F.; Mukherjee, B.; Heston, W. D. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 1445–1451

²¹ Davis, M. I.; Bennett, M. J.; Thomas, L. M.; Bjorkman, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 5981–5986

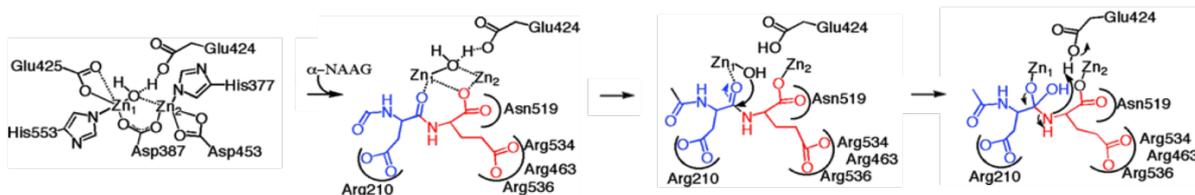


Schéma 24. Schéma simplifié du mécanisme d'hydrolyse de la liaison peptidique du NAAG au sein du site actif de la PSMA, figure adaptée d'article.²¹

La PSMA est connue comme étant un excellent marqueur du cancer de la prostate.²² En effet, elle est surexprimée à la surface des cellules cancéreuses pour la grande majorité des cancers de la prostate (~ 90 %), même lorsque le taux de PSA circulant est faible.^{18, 23} En particulier, dans les cancers avancés, métastatiques et/ou androgène-indépendants (réfractaires aux traitements hormonaux), l'expression de ce biomarqueur peut être augmentée d'un facteur 1000.^{24, 25, 26} Il s'agit donc d'un marqueur très intéressant car il permet à la fois de détecter les tumeurs prostatiques et les métastases PSMA-positives, et d'évaluer leur agressivité.²⁵ Par ailleurs, il a été montré que la PSMA permet l'internalisation de ces ligands *via* un mécanisme de recyclage endosomal, ce qui augmente l'accumulation des agents de traçage au sein des cellules cancéreuses.²⁷

I.3. Les ligands spécifiques de la PSMA

Il existe différentes familles de ligands de la PSMA dont l'efficacité pour l'imagerie du cancer de la prostate varie en fonction de leur nature, de leur taille et du site de greffage ciblé (**figure 130**).²²

²² Mease, R. C.; Foss, C. A.; Pomper, M. G. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, 13, 951–962

²³ Birtle, A. J.; Freeman, A.; Masters, J. R. W.; Payne, H. A.; Harland, S. J.; and contributors to the BAUS Section of Oncology Cancer Registry. *BJU Int.* **2005**, 96, 303–307

²⁴ Wright, G. L.; Mayer Grob, B.; Haley, C.; Grossman, K.; Newhall, K.; Petrylak, D.; Troyer, J.; Konchuba, A.; Schellhammer, P. F.; Moriarty, R. *Urology.* **1996**, 48, 326–334

²⁵ Perner, S.; Hofer, M. D.; Kim, R.; Shah, R. B.; Li, H.; Möller, P.; Hautmann, R. E.; Gschwend, J. E.; Kuefer, R.; Rubin, M. A. *Hum. Pathol.* **2007**, 38, 696–701

²⁶ Evans, M. J.; Smith-Jones, P. M.; Wongvipat, J.; Navarro, V.; Kim, S.; Bander, N. H.; Larson, S. M.; Sawyers, C. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 9578–9582

²⁷ Ghosh, A.; Heston, W. D. W. *J. Cell. Biochem.* **2004**, 91, 528–539

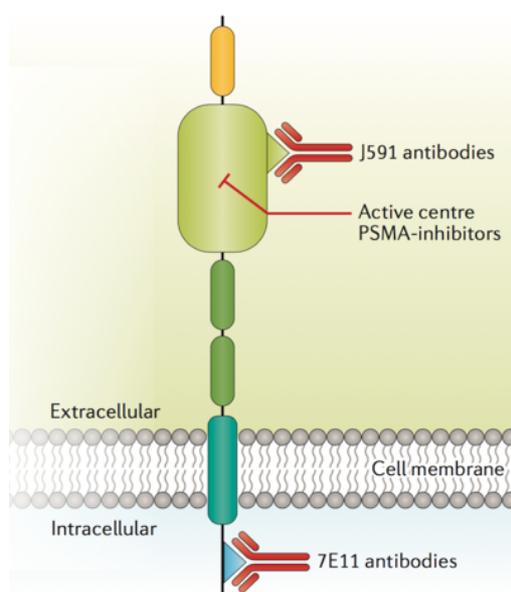


Figure 130. Représentation schématique de la PSMA et des différents sites de liaison impliqués dans les stratégies de ciblage ; figure extraite de revue.²⁸

a. Les anticorps

Le premier ligand de la PSMA à avoir été identifié est l'anticorps monoclonal 7E11-C5.3, aussi appelé capromab.²⁹ Depuis les années 1990, l'anticorps 7E11-C5.3 marqué à l'indium-111 grâce à un chélateur pendetide (GYK-DTPA) est utilisé en clinique sous le nom de Prostascint® pour le diagnostic du cancer de la prostate par imagerie TEMP.³⁰ A présent, l'intérêt pour ce ligand tend à décroître car il ne reconnaît que le site intracellulaire de la PSMA, accessible uniquement dans les zones nécrotiques de la tumeur.³¹

L'anticorps J591, qui se lie à un épitope accessible au milieu extracellulaire, a montré de très bons résultats en clinique à la fois en immunothérapie, en imagerie après marquage au ^{99m}Tc ou à l'¹¹¹In et en radiothérapie après radioméallation à l'⁹⁰Y ou au ¹⁷⁷Lu.³² Plusieurs autres anticorps ont été étudiés pour leur forte affinité avec la PSMA et les anticorps monoclonaux 3/A12, 3/F11 et 3/E7 ont montré des profils intéressants avec une forte affinité et une bonne spécificité pour les cellules exprimant la PSMA.³³ Néanmoins, leur évaluation est encore limitée au domaine préclinique,^{34,35} ou à des études immunohistochimiques sur des échantillons de tissus cancéreux humains.³⁶

²⁸ Maurer, T.; Eiber, M.; Schwaiger, M.; Gschwend, J. E. *Nat. Rev. Urol.* **2016**, *13*, 226–235

²⁹ Horoszewicz, J. S.; Kawinski, E.; Murphy, G. P. *Anticancer Res.* **1987**, *7*, 927–935

³⁰ Taneja, S. S. *Rev. Urol.* **2004**, *6*, S19–S28

³¹ Troyer, J. K.; Beckett, M. L.; Wright, G. L. *The Prostate.* **1997**, *30*, 232–242

³² Tagawa, S. T.; Beltran, H.; Vallabhajosula, S.; Goldsmith, S. J.; Osborne, J.; Matulich, D.; Petrillo, K.; Parmar, S.; Nanus, D. M.; Bander, N. H. *Cancer.* **2010**, *116*, 1075–1083

³³ Elsässer-Beile, U.; Wolf, P.; Gierschner, D.; Bühler, P.; Schultze-Seemann, W.; Wetterauer, U. *The Prostate.* **2006**, *66*, 1359–1370

³⁴ Alt, K.; Wiehr, S.; Ehrlichmann, W.; Reischl, G.; Wolf, P.; Pichler, B. J.; Elsässer-Beile, U.; Bühler, P. *The Prostate.* **2010**, *70*, 1413–1421

³⁵ Nováková, Z.; Foss, C. A.; Copeland, B. T.; Morath, V.; Baranová, P.; Havlínová, B.; Skerra, A.; Pomper, M. G.; Barinka, C. *The Prostate.* **2017**, *77*, 749–764

³⁶ Wolf, P.; Freudenberg, N.; Bühler, P.; Alt, K.; Schultze-Seemann, W.; Wetterauer, U.; Elsässer-Beile, U. *The Prostate.* **2010**, *70*, 562–569

Malgré leur forte affinité, l'efficacité de ces anticorps en imagerie du cancer de la prostate est diminuée par leur pharmacocinétique lente et leur faible capacité à pénétrer les tissus. Des études ont montré l'utilisation de radioémetteurs possédant une longue demi-vie, comme le zirconium-89, permettant de réaliser des images après plusieurs jours.^{37, 38} Cependant les difficultés pratiques engendrées sont importantes (voir Introduction, Partie I. 2. d.). Afin de pallier ce problème, des vecteurs de plus petite taille, spécifiques de la PSMA, ont été étudiés, tels que des fragments d'anticorps et des aptamères.^{39, 35, 40} Néanmoins, leur développement est encore peu avancé.

b. Les petites molécules

Depuis une dizaine d'années, un intérêt grandissant est accordé aux radiotraceurs basés sur des ligands de petite taille, possédant des pharmacocinétiques plus adéquates que celle des anticorps. En effet, les recherches effectuées pour développer des analogues du substrat de la PSMA ont donné naissance à différentes familles de petites molécules possédant une très haute affinité pour la PSMA, très souvent accompagnée d'une activité inhibitrice.⁴¹ Le site de reconnaissance de la PSMA est constitué de deux poches. L'une est très spécifique de l'acide aminé glutamate tandis que l'autre est moins sélective et est capable d'interagir avec différents motifs dont l'aspartate.⁴² Afin de correspondre à ce site de liaison, les molécules développées ont généralement une partie glutamate et une fonction mimant la liaison amide et bloquant l'activité peptidase telle qu'une urée⁴³ ou un groupement phosphonate.⁴⁴

La famille des acides phosphiniques est l'une des plus anciennement développées et l'acide 2-(phosphonométhyl)pentanedioïque (2-PMPA) (**figure 131. A**), qui possède une forte constante d'inhibition K_i de 0,3 nM, constitue un inhibiteur de référence pour les études *in vitro*.^{45, 46} Ces ligands à base de phosphore sont assez peu utilisés pour le ciblage du cancer de la prostate et sont généralement réservés aux traitements de troubles cérébraux, tels que la neuropathie périphérique.⁴⁷

Ici, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une famille d'inhibiteurs basée sur le motif urée, découverte en 2001 par A. Kozikowski *et al.* (**figure 131. B**).⁴⁸ Ces inhibiteurs ont l'avantage

³⁷ Ruggiero, A.; Holland, J. P.; Hudolin, T.; Shenker, L.; Koulova, A.; Bander, N. H.; Lewis, J. S.; Grimm, J. J. *Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1608–1615

³⁸ Holland, J. P.; Divilov, V.; Bander, N. H.; Smith-Jones, P. M.; Larson, S. M.; Lewis, J. S. *Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1293–1300

³⁹ Wiehr, S.; Bühler, P.; Gierschner, D.; Wolf, P.; Rolle, A.-M.; Kesenheimer, C.; Pichler, B. J.; Elsässer-Beile, U. *The Prostate*. **2014**, *74*, 743–755

⁴⁰ Javier, D. J.; Nitin, N.; Levy, M.; Ellington, A.; Richards-Kortum, R. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1309–1312

⁴¹ Zhou, J.; Neale, J. H.; Pomper, M. G.; Kozikowski, A. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 1015–1026

⁴² Bařinka, C.; Rovenska, M.; Mlcchova, P.; Hlouchova, K.; Plechanovova, A.; Majer, P.; Tsukamoto, T.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J.; Lubkowski, J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3267–3273

⁴³ Barinka, C.; Byun, Y.; Dusich, C. L.; Banerjee, S. R.; Chen, Y.; Castanares, M.; Kozikowski, A. P.; Mease, R. C.; Pomper, M. G.; Lubkowski, J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7737–7743

⁴⁴ Liu, T.; Toriyabe, Y.; Kazak, M.; Berkman, C. E. *Biochemistry*. **2008**, *47*, 12658–12660

⁴⁵ Jackson, P. F.; Cole, D. C.; Slusher, B. S.; Stetz, S. L.; Ross, L. E.; Donzanti, B. A.; Trainor, D. A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 619–622

⁴⁶ Jackson, P. F.; Slusher, B. S. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 949–957

⁴⁷ Jackson, P. F.; Tays, K. L.; Maclin, K. M.; Ko, Y.-S.; Li, W.; Vitharana, D.; Tsukamoto, T.; Stoermer, D.; Lu, X.-C. M.; Wozniak, K.; Slusher, B. S. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4170–4175

⁴⁸ Kozikowski, A. P.; Nan, F.; Conti, P.; Zhang, J.; Ramadan, E.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H.; Pshenichkin, S.; Wroblewski, J. T. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 298–301

d'être à la fois efficaces, avec des constantes d'inhibition de l'ordre du nanomolaire, et simples à synthétiser.⁴⁹ Ils constituent ainsi des vecteurs de choix pour le développement d'agents de ciblage radioactifs et comme nous le verrons par la suite, de très nombreuses études cliniques reposent sur ce type de ligands.

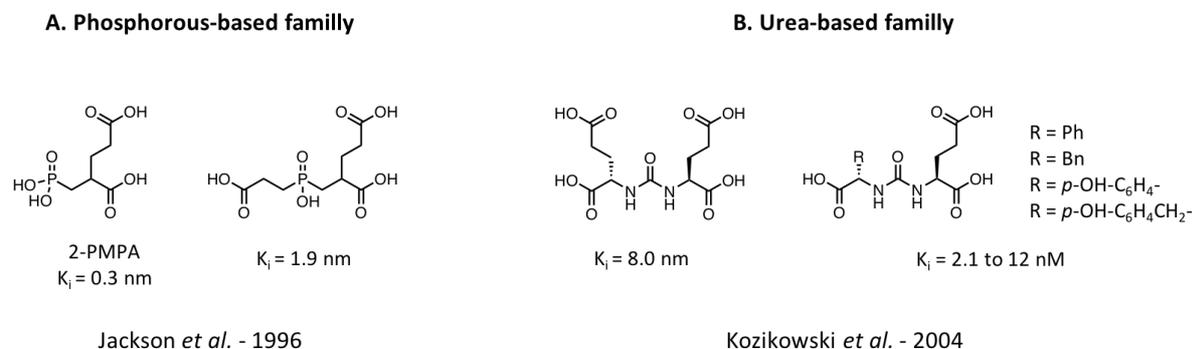


Figure 131. Quelques exemples d'inhibiteurs de la PSMA appartenant aux deux principales familles développées.

I.4. Les agents imageants spécifiques de la PSMA

Suite à l'identification du ligand urée-glutamate, de nombreux agents radiopharmaceutiques basés sur ce motif ont été développés. Quelques-uns ont montré des résultats très prometteurs pour le diagnostic du cancer de la prostate chez l'homme et plusieurs études cliniques ont également décrit des applications en radiothérapie ciblée (**tableau 4**).

Tableau 4. Principaux agents radiopharmaceutiques utilisés en clinique pour le ciblage de la PSMA ; tableau adapté d'article.⁵⁰

Compound	Class	Label
MIP-1095	Theranostic	¹²⁴ I, ¹³¹ I
MIP-1404	Diagnostic	^{99m} Tc
DCFBC	Diagnostic	¹⁸ F
DCFpyL	Diagnostic	¹⁸ F
PSMA I&T	Theranostic	⁶⁸ Ga, ¹⁷⁷ Lu
PSMA-11	Diagnostic	⁶⁸ Ga
PSMA-617	Theranostic	⁶⁸ Ga, ⁹⁰ Y, ¹⁷⁷ Lu, ²²⁵ Ac

Les premiers agents imageants radioactifs obtenus à partir du ligand urée-glutamate étaient basés sur l'utilisation de radioémetteurs non métalliques (¹¹C, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I ou ¹⁸F) ne nécessitant pas l'emploi de chélateurs intermédiaires. Plusieurs approches ont été développées et les motifs

⁴⁹ Kozikowski, A. P.; Zhang, J.; Nan, F.; Petukhov, P. A.; Grajkowska, E.; Wroblewski, J. T.; Yamamoto, T.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1729–1738

⁵⁰ Cardinale, J.; Schäfer, M.; Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Leotta, K.; Eder, M.; Neels, O. C.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L.; Kopka, K. *J. Nucl. Med.* **2017**, 58, 425–431

cystéine-urée-glutamate,^{51, 52} tyrosine-urée-glutamate⁵³ et lysine-urée-glutamate^{54, 55, 56} ont permis l'obtention de divers radiotraceurs. Parmi les différents traceurs synthétisés, certains ont été évalués en clinique, comme le [¹⁸F]-DCFBC,⁵⁷ le [¹⁸F]-DCFPyL,⁵⁸ ou encore le composé MIP-1095 qui peut être utilisé à des fins diagnostiques ou thérapeutiques selon l'isotope de l'iode introduit (**figure 132. A**).⁵⁹

Le technétium-99m est un radioémetteur TEMP très utilisé en imagerie nucléaire et son faible coût de production ainsi que sa demie vie (6 h) supérieure à celle du fluor peuvent se révéler très avantageux. Plusieurs radiotraceurs combinant le motif glutamate-urée et un chélateur pour la complexation du ^{99m}Tc ont ainsi été développés.^{60, 61, 62} En particulier, le composé nommé MIP-1404 s'est révélé très performant et a permis la détection de métastases aux niveaux des os et des ganglions lymphatiques chez six patients atteints du cancer de la prostate (**figure 132. B**).⁶³

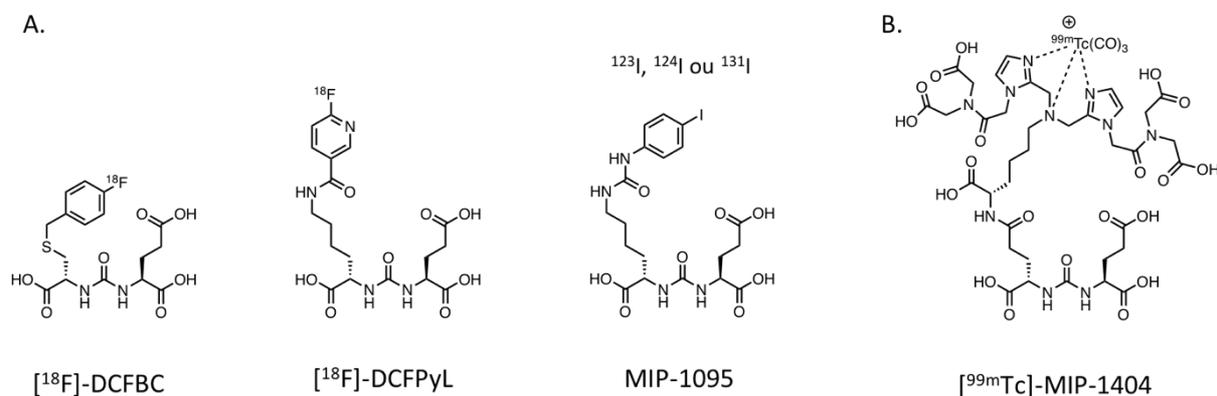


Figure 132. A. Structures des principaux radiotraceurs à base d'émetteurs non métalliques utilisés en clinique pour le ciblage de PSMA ; **B.** Structures du radiotraceur ^{99m}Tc-MIP-1404.

⁵¹ Pomper, M. G.; Musachio, J. L.; Zhang, J.; Scheffel, U.; Zhou, Y.; Hilton, J.; Maini, A.; Dannals, R. F.; Wong, D. F.; Kozikowski, A. P. *Mol. Imaging*. **2002**, *1*, 96–101

⁵² Mease, R. C.; Dusich, C. L.; Foss, C. A.; Ravert, H. T.; Dannals, R. F.; Seidel, J.; Prideaux, A.; Fox, J. J.; Sgouros, G.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3036–3043

⁵³ Foss, C. A.; Mease, R. C.; Fan, H.; Wang, Y.; Ravert, H. T.; Dannals, R. F.; Olszewski, R. T.; Heston, W. D.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 4022–4028

⁵⁴ Chen, Y.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Fox, J. J.; Castanares, M.; Lupold, S. E.; Babich, J. W.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7933–7943

⁵⁵ Maresca, K. P.; Hillier, S. M.; Femia, F. J.; Keith, D.; Barone, C.; Joyal, J. L.; Zimmerman, C. N.; Kozikowski, A. P.; Barrett, J. A.; Eckelman, W. C.; Babich, J. W. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 347–357

⁵⁶ Chen, Y.; Pullambhatla, M.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Senthambichelvan, S.; Sgouros, G.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 7645–7653

⁵⁷ Rowe, S. P.; Gage, K. L.; Faraj, S. F.; Macura, K. J.; Cornish, T. C.; Gonzalez-Roibon, N.; Guner, G.; Munari, E.; Partin, A. W.; Pavlovich, C. P.; Han, M.; Carter, H. B.; Bivalacqua, T. J.; Blackford, A.; Holt, D.; Dannals, R. F.; Netto, G. J.; Lodge, M. A.; Mease, R. C.; Pomper, M. G.; Cho, S. Y. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 1003–1010

⁵⁸ Rowe, S. P.; Macura, K. J.; Mena, E.; Blackford, A. L.; Nadal, R.; Antonarakis, E. S.; Eisenberger, M.; Carducci, M.; Fan, H.; Dannals, R. F.; Chen, Y.; Mease, R. C.; Szabo, Z.; Pomper, M. G.; Cho, S. Y. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18*, 411–419

⁵⁹ Zechmann, C. M.; Afshar-Oromieh, A.; Armor, T.; Stubbs, J. B.; Mier, W.; Hadaschik, B.; Joyal, J.; Kopka, K.; Debus, J.; Babich, J. W.; Haberkorn, U. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. **2014**, *41*, 1280–1292

⁶⁰ Banerjee, S. R.; Foss, C. A.; Castanares, M.; Mease, R. C.; Byun, Y.; Fox, J. J.; Hilton, J.; Lupold, S. E.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4504–4517

⁶¹ Kularatne, S. A.; Zhou, Z.; Yang, J.; Post, C. B.; Low, P. S. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 790–800

⁶² Hillier, S. M.; Maresca, K. P.; Lu, G.; Merkin, R. D.; Marquis, J. C.; Zimmerman, C. N.; Eckelman, W. C.; Joyal, J. L.; Babich, J. W. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 1369–1376

⁶³ Vallabhajosula, S.; Nikolopoulou, A.; Babich, J. W.; Osborne, J. R.; Tagawa, S. T.; Lipai, I.; Solnes, L.; Maresca, K. P.; Armor, T.; Joyal, J. L.; Crummett, R.; Stubbs, J. B.; Goldsmith, S. J. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 1791–1798

Le radiotracer $[^{68}\text{Ga}]\text{-HBED-CC-PSMA}$, également connu sous le nom de $[^{68}\text{Ga}]\text{-PSMA-11}$, a été synthétisé en 2012 par Eder *et al.*⁶⁴ Cet agent combine le ligand urée-glutamate et un chélateur linéaire HBED-CC, ces deux parties étant reliées entre elles par un espaceur acide 6-aminohéxanoïque (Ahx) (**figure 133. A**). L'avantage de cet agent imageant réside dans le fait qu'il est destiné à être marqué par le gallium-68 dont la production ne nécessite pas l'utilisation de cyclotron. En effet, cet émetteur de β^+ peut être produit simplement et à faible coût grâce à un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.⁶⁵ Parmi les agents radiotraçables utilisés en clinique pour la détection du cancer de la prostate par ciblage de la PSMA, $[^{68}\text{Ga}]\text{-HBED-CC-PSMA}$ est de loin le composé le plus étudié, et déjà plusieurs centaines de patients ont subi un examen par imagerie PET/CT au $[^{68}\text{Ga}]\text{-HBED-CC-PSMA}$.^{66, 67, 68, 69} Ces différentes études ont mis en évidence une nette plus-value quant à l'utilisation de $[^{68}\text{Ga}]\text{-PSMA-11}$ par rapport aux techniques traditionnelles comme la scintigraphie osseuse⁷⁰ (**figure 133. B**) ou l'examen par imagerie TEP après injection de $[^{11}\text{C}]\text{-choline}$ ⁷¹ (**figure 133. C**).

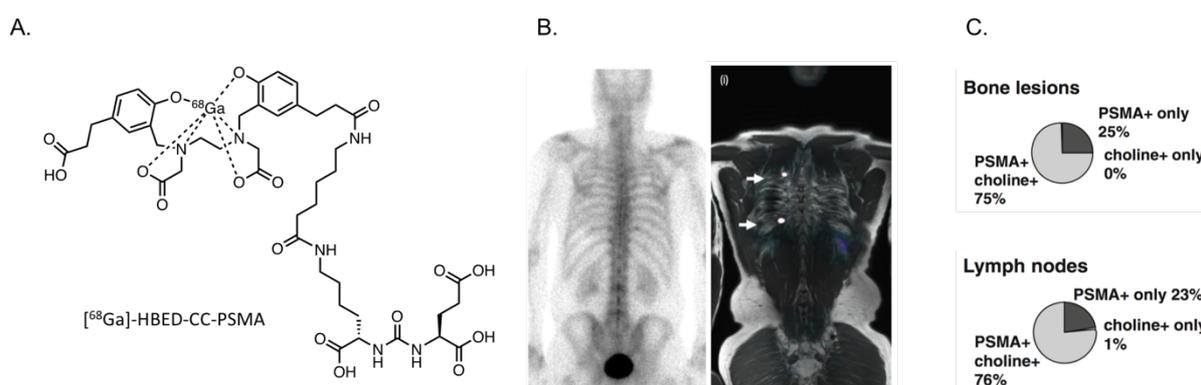


Figure 133. A. Structure du traceur $[^{68}\text{Ga}]\text{-HBED-CC-PSMA}$ ($[^{68}\text{Ga}]\text{-PSMA-11}$) ; **B.** Détection de métastases osseuses chez un patient atteint d'un cancer de la prostate ; la scintigraphie osseuse (à gauche) fournit un résultat négatif tandis que l'imagerie par TEP après injection de $[^{68}\text{Ga}]\text{-HBED-CC-PSMA}$, couplée à une imagerie morphologique par IRM (à droite), permet l'identification de deux lésions métastatiques ;⁷⁰ **C.** Comparaison des sensibilités de $[^{68}\text{Ga}]\text{-HBED-CC-PSMA}$ et de $[^{11}\text{C}]\text{-choline}$ pour la détection de métastases osseuses (haut, n = 27) et lymphatiques (bas, n = 83) chez des patients présentant une tumeur prostatique primaire.⁷¹

Quelques limitations à l'utilisation de HBED-CC-PSMA sont cependant à noter. Il a été montré que ce traceur était fortement retenu par les glandes lacrymales et salivaires, les reins et la vessie.⁷² Même si ces accumulations parasites ne gênent pas la détection des métastases, la plupart du temps

⁶⁴ Eder, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Hull, W.-E.; Wängler, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 688–697

⁶⁵ Pandey, M. K.; Byrne, J. F.; Jiang, H.; Packard, A. B.; DeGrado, T. R. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2014**, *4*, 303–310

⁶⁶ Afshar-Oromieh, A.; Avtzi, E.; Giesel, F. L.; Holland-Letz, T.; Linhart, H. G.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Boxler, S.; Hadaschik, B. A.; Kratochwil, C.; Weichert, W.; Kopka, K.; Debus, J.; Haberkorn, U. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2015**, *42*, 197–209

⁶⁷ Maurer, T.; Gschwend, J. E.; Rauscher, I.; Souvatzoglou, M.; Haller, B.; Weirich, G.; Wester, H.-J.; Heck, M.; Kübler, H.; Beer, A. J.; Schwaiger, M.; Eiber, M. *J. Urol.* **2016**, *195*, 1436–1443

⁶⁸ Eiber, M.; Maurer, T.; Souvatzoglou, M.; Beer, A. J.; Ruffani, A.; Haller, B.; Graner, F.-P.; Kübler, H.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Wester, H.-J.; Gschwend, J. E.; Schwaiger, M. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 668–674

⁶⁹ Verburg, F. A.; Pfister, D.; Heidenreich, A.; Vogg, A.; Drude, N. I.; Vöö, S.; Mottaghy, F. M.; Behrendt, F. F. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2016**, *43*, 397–403

⁷⁰ Maurer, T.; Beer, A. J.; Wester, H.-J.; Kübler, H.; Schwaiger, M.; Eiber, M. *Int. J. Urol.* **2014**, *21*, 1286–1288

⁷¹ Schwenck, J.; Rempp, H.; Reischl, G.; Kruck, S.; Stenzl, A.; Nikolaou, K.; Pfannenberger, C.; la Fougère, C. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2017**, *44*, 92–101

⁷² Afshar-Oromieh, A.; Malcher, A.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Linhart, H. G.; Hadaschik, B. A.; Holland-Letz, T.; Giesel, F. L.; Kratochwil, C.; Haufe, S.; Haberkorn, U.; Zechmann, C. M. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2012**, *40*, 486–495

localisées dans les tissus gras, lymphatiques ou les os, elles peuvent générer des problèmes de radiotoxicité. De plus, ce traceur est limité à l'imagerie au ^{68}Ga car le chélateur HBED-CC est spécifique de ce radionucléide. Ainsi, en parallèle des études cliniques effectuées sur ^{68}Ga -PSMA-11, plusieurs équipes ont travaillé au développement de nouveaux radiotraceurs optimisés, avec des espaceurs plus hydrophobes et des chélateurs plus versatiles.

Optimisation de l'espaceur

Le site actif de la PSMA est précédé d'un tunnel relativement étroit d'environ 20 \AA ⁷³ et il est donc préférable d'utiliser un espaceur entre le motif urée-glutamate et le chélateur d'une longueur supérieure à 20 \AA .⁶⁰ De nombreux espaceurs plus ou moins lipophiles ont été évalués et il a été montré que l'ajout de deux motifs phénylalanine augmente la rétention tumorale et améliore le contraste.⁶¹ La séquence phényl-phényl-lysine-subéroyle (FFK-subéroyle) s'est avérée particulièrement intéressante et une étude a mis en évidence que l'utilisation de la séquence ffk stéréoisomère de la précédente constituée d'acides aminés non naturels de série D, augmente la stabilité *in vivo* de l'espaceur et améliore considérablement la pharmacocinétique du traceur résultant (**figure 134**).⁷⁴

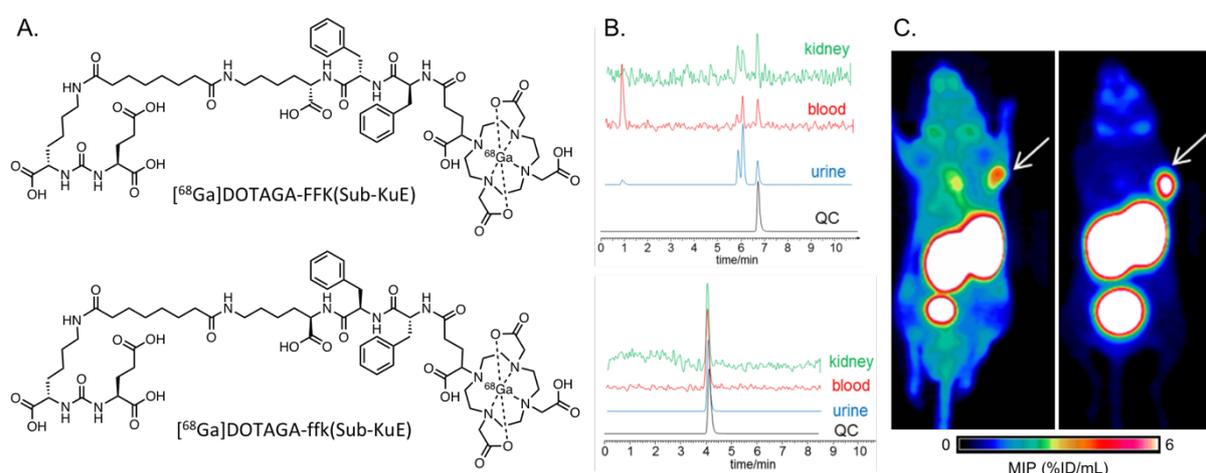


Figure 134. A. Structure du radiotraceur ^{68}Ga -DOTAGA-FFK(Sub-KuE) et de son analogue, le radiotraceur ^{68}Ga -DOTAGA-ffk(Sub-KuE), dont l'espaceur est composé d'acides aminés de configuration D ; B. Evaluation de la stabilité des conjugués *in vivo* chez des souris CD-1 nu/nu par radio-HPLC (analyses d'extraits de reins, de sang et d'urine collectés 30 min p.i. ; haut : ^{68}Ga -DOTAGA-FFK(Sub-KuE), bas : ^{68}Ga -DOTAGA-ffk(Sub-KuE)) ; C. Maxima d'intensité de projection (MIP) obtenus par imagerie TEP 1 h p.i. chez des souris portant des tumeurs LNCaP (gauche : ^{68}Ga -DOTAGA-FFK(Sub-KuE), droite : ^{68}Ga -DOTAGA-ffk(Sub-KuE)).

Optimisation du chélate

Le choix de l'agent chélatant est déterminant quant aux applications potentielles d'un agent radiopharmaceutique. En effet, certains chélateurs sont capables de former des complexes stables

⁷³ Mesters, J. R.; Barinka, C.; Li, W.; Tsukamoto, T.; Majer, P.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J.; Hilgenfeld, R. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1375–1384

⁷⁴ Weineisen, M.; Simecek, J.; Schottelius, M.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. *EJNMMI Res.* **2014**, *4*, 63

avec divers radioisotopes. C'est le cas notamment des chélateurs macrocycliques de type DOTA qui, contrairement à HBED-CC, peuvent être utilisés pour la complexation de l'émetteur gamma ^{111}In , de l'émetteur β^- ^{177}Lu , de la paire thérapeutique $^{90}\text{Y}/^{86}\text{Y}$ et de l'émetteur alpha ^{225}Ac , en plus du ^{68}Ga .⁷⁵ Les traceurs basés sur des chélateurs comme le DOTA sont ainsi très versatiles et peuvent être utilisés pour le diagnostic par imagerie TEP ou TEMP mais également pour la mise en place de traitements par radiothérapie et de chirurgies curatives radioguidées grâce à l'utilisation de sondes gamma.

Par exemple, le composé PSMA-617 constitué du motif lysine-urée-glutamate (KuE) combiné au chélateur DOTA (**figure 135. A**) peut être marqué au ^{68}Ga et il montre alors des propriétés de diagnostic comparables à celles de ^{68}Ga -PSMA-11.^{76, 77} La capacité du macrocycle DOTA à complexer le ^{177}Lu est une perspective très attractive et plusieurs études cliniques ont déjà montré l'efficacité de radiothérapies basées sur le composé ^{177}Lu -PSMA-617.^{78, 79} Par ailleurs, le composé PSMA-617 marqué avec l'émetteur α ^{225}Ac a été utilisé sur deux patients présentant des cancers avancés. L'un était réfractaire aux thérapies par le ^{177}Lu et l'autre présentait une diffusion des métastases au niveau de la moelle osseuse rouge, ce qui est considéré comme une contre-indication aux thérapies par émission β^- . L'injection répétée de ^{225}Ac -PSMA-617 a montré une impressionnante diminution du nombre de lésions chez les deux patients.⁸⁰

L'agent pharmaceutique DOTAGA-(I-y)fk-Sub-KuE, nommé également PSMA I&T, est composé du motif KuE, d'un espaceur dérivé de la séquence ffk-subéroyle dans lequel une (D)-phénylalanine est substituée par une 3-iodo-(D)-tyrosine, et du macrocycle DOTAGA (**figure 135. B**). Grâce à la versatilité du chélateur DOTAGA, PSMA I&T possède des propriétés théranostiques et peut ainsi être utilisé en diagnostic, mais également en radiothérapie ciblée *via* l'utilisation du ^{177}Lu .⁸¹ De plus, PSMA I&T marqué à ^{111}In a été utilisé avec succès pour le ciblage de métastases lors de chirurgies curatives radioguidées.^{82, 83} Le rapide développement de ces agents PSMA-617 et PSMA I&T montre bien l'importance de la versatilité du macrocycle utilisé.

⁷⁵ Price, E. W.; Orvig, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 43, 260–290

⁷⁶ Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kratochwil, C.; Benesova, M.; Eder, M.; Neels, O. C.; Eisenhut, M.; Kübler, W.; Holland-Letz, T.; Giesel, F. L.; Mier, W.; Kopka, K.; Haberkorn, U. *J. Nucl. Med.* **2015**, 56, 1697–1705

⁷⁷ Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. *J. Nucl. Med.* **2015**, 56, 914–920

⁷⁸ Ahmadzadehfar, H.; Rahbar, K.; Kürpig, S.; Bögemann, M.; Claesener, M.; Eppard, E.; Gärtner, F.; Rogenhofer, S.; Schäfers, M.; Essler, M. *EJNMMI Res.* **2015**, 5, 114

⁷⁹ Delker, A.; Fendler, W. P.; Kratochwil, C.; Brunegrab, A.; Gosewisch, A.; Gildehaus, F. J.; Tritschler, S.; Stief, C. G.; Kopka, K.; Haberkorn, U.; Bartenstein, P.; Böning, G. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2016**, 43, 42–51

⁸⁰ Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Giesel, F. L.; Weis, M.; Verburg, F. A.; Mottaghy, F.; Kopka, K.; Apostolidis, C.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. *J. Nucl. Med.* **2016**, 57, 1941–1944

⁸¹ Weineisen, M.; Schottelius, M.; Simecek, J.; Baum, R. P.; Yildiz, A.; Beykan, S.; Kulkarni, H. R.; Lassmann, M.; Klette, I.; Eiber, M.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. *J. Nucl. Med.* **2015**, 56, 1169–1176

⁸² Maurer, T.; Weirich, G.; Schottelius, M.; Weineisen, M.; Frisch, B.; Okur, A.; Kübler, H.; Thalgot, M.; Navab, N.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J.; Gschwend, J. E.; Eiber, M. *Eur. Urol.* **2015**, 68, 530–534

⁸³ Schottelius, M.; Wirtz, M.; Eiber, M.; Maurer, T.; Wester, H.-J. *EJNMMI Res.* **2015**, 5, 68

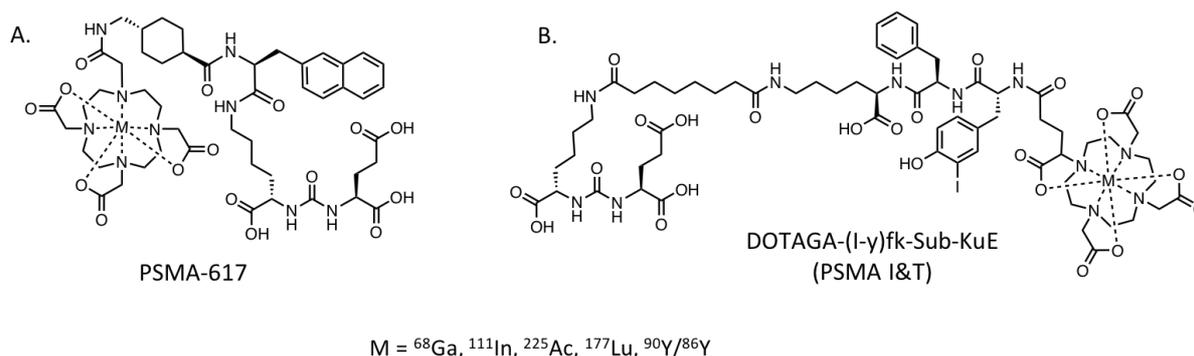


Figure 135. Structure des agents radiopharmaceutiques PSMA-617 (A.) et PSMA I&T (B.) ainsi que les différents radioisotopes potentiellement utilisables grâce à ces ligands versatiles.

1.5. L'emploi du cuivre-64 pour le diagnostic du cancer de la prostate

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de radiotraceurs spécifiques de la PSMA basés sur l'emploi de cuivre-64, un émetteur TEP dont les propriétés de décroissance (β^+ , 0.653 MeV [17.8 %] et β^- , 0.579 MeV [38.4 %]) sont très attractives.⁸⁴ En effet, les rayonnements β^+ sont émis avec une énergie relativement faible très favorable à l'imagerie TEP et l'émission de β^- peut potentiellement être utilisée pour la thérapie.⁸⁵ Sa demi-vie de 12,7 h permet l'acquisition d'images à des temps bien supérieurs par comparaison au ^{18}F ou au ^{68}Ga , ce qui peut améliorer le ratio tumeur/bruit de fond.⁸⁴

Par ailleurs, ce radioisotope peut être produit avec une activité spécifique élevée. Par ailleurs, grâce à sa décroissance lente, le cuivre-64 peut être produit par cyclotron en importantes quantités de façon centralisée puis redistribué aux hôpitaux, ce qui n'est pas possible pour le fluor-18. D'autre part, la paire thérapeutique $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ constitue un argument supplémentaire à l'utilisation de radiopharmaceutiques à base de cuivre. Bien que la production de cuivre-67 ait été limitée jusqu'à présent, la situation évolue rapidement, notamment grâce au développement de nouvelles méthodes de production de ce radioisotope.⁸⁶

Peu d'exemples relatent l'utilisation du cuivre-64 pour l'imagerie du cancer de la prostate. Le composé PSMA-617 marqué au cuivre-64 a été administré à une trentaine de patients et les examens par imagerie TEP ont révélé la présence de métastases avec un très bon contraste.⁸⁷ Cependant, PSMA-617 est peu adapté à la complexation du cuivre car le macrocycle DOTA présente une cavité trop vaste pour le cuivre et il a été montré qu'une décomplexation pouvait avoir lieu *in vivo* via des phénomènes de transchélation ou transmétallation.⁸⁸ De plus, bien que les complexes de cuivre II soient relativement stables, les variations de potentiel redox en milieux biologiques peuvent réduire

⁸⁴ Anderson, C. J.; Ferdani, R. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24*, 379–393

⁸⁵ Connett, J. M.; Anderson, C. J.; Guo, L. W.; Schwarz, S. W.; Zinn, K. R.; Rogers, B. E.; Siegel, B. A.; Philpott, G. W.; Welch, M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 6814–6818

⁸⁶ Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 957–980

⁸⁷ Grubmüller, B.; Baum, R. P.; Capasso, E.; Singh, A.; Ahmadi, Y.; Knoll, P.; Floth, A.; Righi, S.; Zandieh, S.; Meleddu, C.; Shariat, S. F.; Klingler, H. C.; Mirzaei, S. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2016**, *31*, 277–286

⁸⁸ Boswell, C. A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1465–1474

le cuivre II en cuivre I et entraîner sa décoordination.⁸⁹ Les macrocycles de type NOTA possèdent une cavité beaucoup plus adaptée à la coordination du cuivre.^{90, 91} En particulier, le chélateur bifonctionnel NODAGA permet la formation de complexes très stables d'un point de vue cinétique et également très résistants aux phénomènes de réduction du cuivre.⁹² Par ailleurs, les propriétés de coordination du gallium sont très similaires à celles du cuivre. En effet, il possède une taille assez petite et une coordinence de six et comme le cuivre, il peut être très efficacement chélaté par le NODAGA.⁹³

I.6. Présentation du projet

En se basant sur ces différents travaux, nous avons cherché à élaborer un agent traçable spécifique de la PSMA permettant le diagnostic efficace du cancer de la prostate par imagerie TEP au cuivre-64, mais qui serait également suffisamment versatile pour permettre la complexation d'autres radiométaux comme le gallium-68 ou l'indium-111. Pour ce faire, nous avons synthétisé un traceur combinant le ligand KuE et le macrocycle NODAGA. L'affinité du composé synthétisé a été évaluée au moyen d'un test enzymatique. Le composé a ensuite été radiomarqué au cuivre-64, au gallium-68 et à l'indium-111 et les radiotraceurs résultants ont été évalués *in vitro* et *in vivo*. Afin de faciliter l'interprétation des résultats obtenus, les expériences ont été effectuées en parallèle avec les traceurs [⁶⁸Ga]-PSMA-11 et [¹¹¹In]-PSMA-617, utilisés comme références.

Dans le même temps, nous avons travaillé à l'élaboration d'agents radiopharmaceutiques plus efficaces et dont la synthèse serait plus accessible. Pour cela, plusieurs traceurs basés sur différents bras espaceurs, avec des longueurs et des polarités variables, ont été synthétisés puis testés *in vitro* afin de déterminer leur affinité pour la PSMA.

⁸⁹ Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 2005, 4829–4833

⁹⁰ Wu, N.; Kang, C. S.; Sin, I.; Ren, S.; Liu, D.; Ruthengael, V. C.; Lewis, M. R.; Chong, H.-S. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 177–184

⁹¹ Ghosh, S. C.; Pinkston, K. L.; Robinson, H.; Harvey, B. R.; Wilganowski, N.; Gore, K.; Sevic-Muraca, E. M.; Azhdarinia, A. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, 42, 177–183

⁹² Fani, M.; Pozzo, L. D.; Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M. L.; Cescato, R.; Waser, B.; Weber, W. A.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R. *J. Nucl. Med.* **2011**, 52, 1110–1118

⁹³ Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. *Dalton Trans.* **2016**, 45, 15702–15724

II. RESULTATS

II.1. Élaboration et évaluation d'un nouveau radiotraceur spécifique de la PSMA

a. Synthèse

La molécule cible (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-*D*-Lys-subéroyl-Lys-urée-Glu, dont la structure est donnée dans le **figure 136**, est basée sur l'utilisation d'une version énantiomériquement pure du macrocycle NODAGA. En effet, dans le cas d'une synthèse où la stéréochimie n'est pas contrôlée, il est possible que les deux diastéréoisomères obtenus ne présentent pas la même affinité pour la PSMA, générant ainsi des résultats non homogènes. Le contrôle de la stéréochimie est par conséquent nécessaire pour envisager son évaluation dans le cadre d'études cliniques. Afin d'obtenir une pharmacocinétique optimale, nous avons choisi d'utiliser l'espaceur phénylalanine-phénylalanine-lysine-subéroyle précédemment décrit, néanmoins, pour diminuer le coût de la synthèse, seule la lysine a été remplacée par une lysine non naturelle de configuration *D*. Le traceur (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-*D*-Lys-subéroyl-Lys-urée-Glu **CC34** a pu être obtenu *via* une synthèse convergente faisant intervenir la synthèse des différents précurseurs *t*BuO-Lys-urée-Glu(*Ot*Bu)-*Ot*Bu et (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-*D*-Lys-OH, leur combinaison grâce au disuccinimidyl subérate, et enfin la déprotection des différents groupes fonctionnels (**figure 136**).

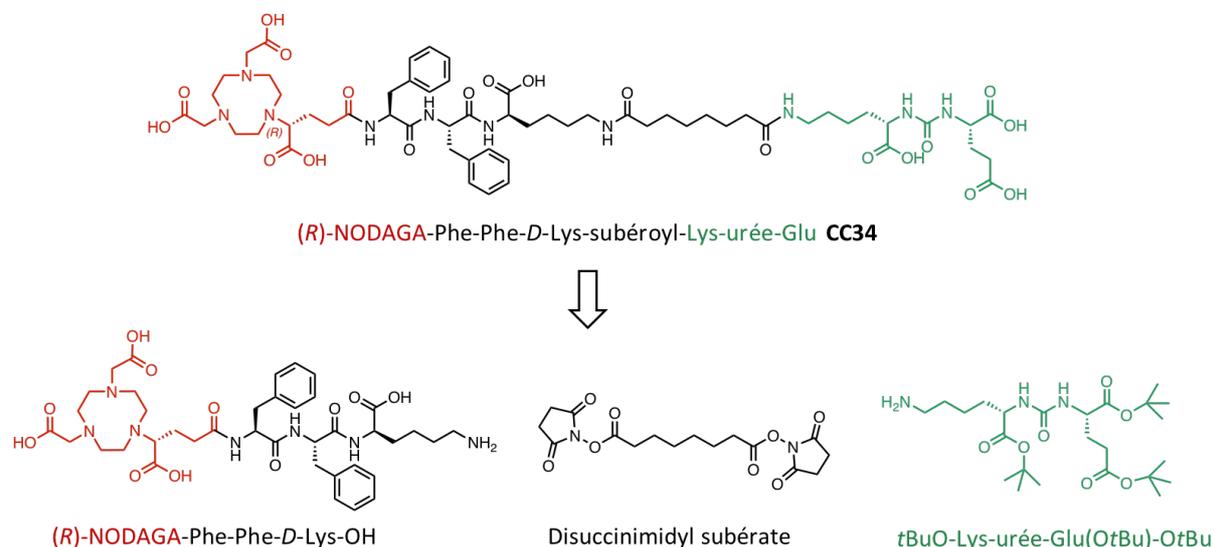


Figure 136. Structure du traceur (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-*D*-Lys-subéroyl-Lys-urée-Glu **CC34** et des différents synthons mis en jeu lors de sa synthèse.

Le précurseur *t*BuO-Lys-urée-Glu(*Ot*Bu)-*Ot*Bu a été synthétisé en trois étapes (**schéma 25**). Dans un premier temps, la fonction acide carboxylique de la lysine a été protégée sous forme d'ester *tert*-butylique par estérification de H-Lys(Cbz)-OH en présence d'acétate de *tert*-butyle pour obtenir H-

Lys(Cbz)-OtBu **40**.⁹⁴ Le motif Lys-urée-Glu **41** a ensuite été formé par réaction de **40** et H-Glu(OtBu)-OtBu avec le triphosgène.⁶⁰ Finalement, le groupement Cbz a été déprotégé par hydrogénation catalytique, permettant ainsi de libérer l'amine terminale.⁵⁵ Le précurseur tBuO-Lys-urée-Glu(OtBu)-OtBu **42** a été isolé avec un rendement global de 13 %.

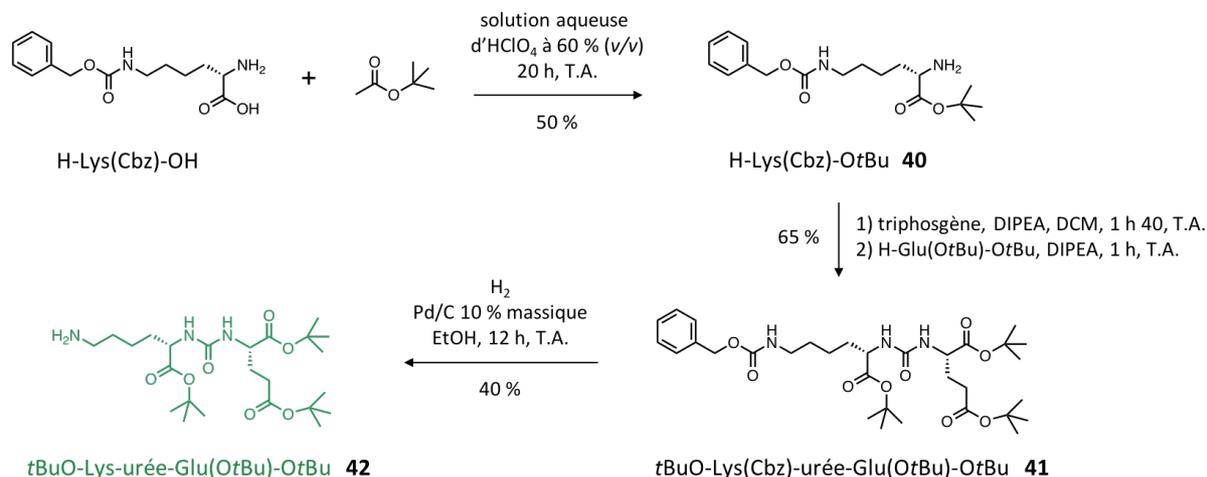


Schéma 25. Synthèse de tBuO-Lys-urée-Glu(OtBu)-OtBu **42** à partir des acides aminés lysine et glutamate protégés.

Le macrocycle (*R*)-NODAGA(*t*Bu₃) est un produit commercialisé par la société CheMatech. Le synthon peptidique, H-Phe-Phe-*D*-Lys(Boc)-résine, a été obtenu par synthèse peptidique automatisée en phase solide (SPPS) sur un synthétiseur de peptide fonctionnant sous activation micro-ondes (schéma 26). Celle-ci a été effectuée à partir d'une résine de type Wang, pré-chargée avec la lysine H-*D*-Lys(Boc)-OH. Les deux couplages peptidiques successifs ont été réalisés dans le DMF *via* l'activation de l'acide carboxylique par un mélange *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC)/OxymaPure. Après chacun des couplages, le groupement Fmoc a été déprotégé par une solution de pipéridine à 20 % dans le DMF. Le couplage du macrocycle (*R*)-NODAGA(*t*Bu)₃ sur le peptide H-Phe-Phe-*D*-Lys(Boc)-résine étant plus difficile, probablement en raison d'une gêne stérique, celui-ci a été réalisé manuellement, grâce à l'agent de couplage HATU. Finalement, le peptide a été déprotégé et clivé de la résine par ajout d'une solution de TFA/TIPS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5, v/v). La molécule (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-*D*-Lys-OH **43** a ainsi été obtenue avec un rendement global de 44 %.

⁹⁴ Hyun, S.-H.; Kim, H.; Kim, J.-M.; Thompson, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 17053–17055

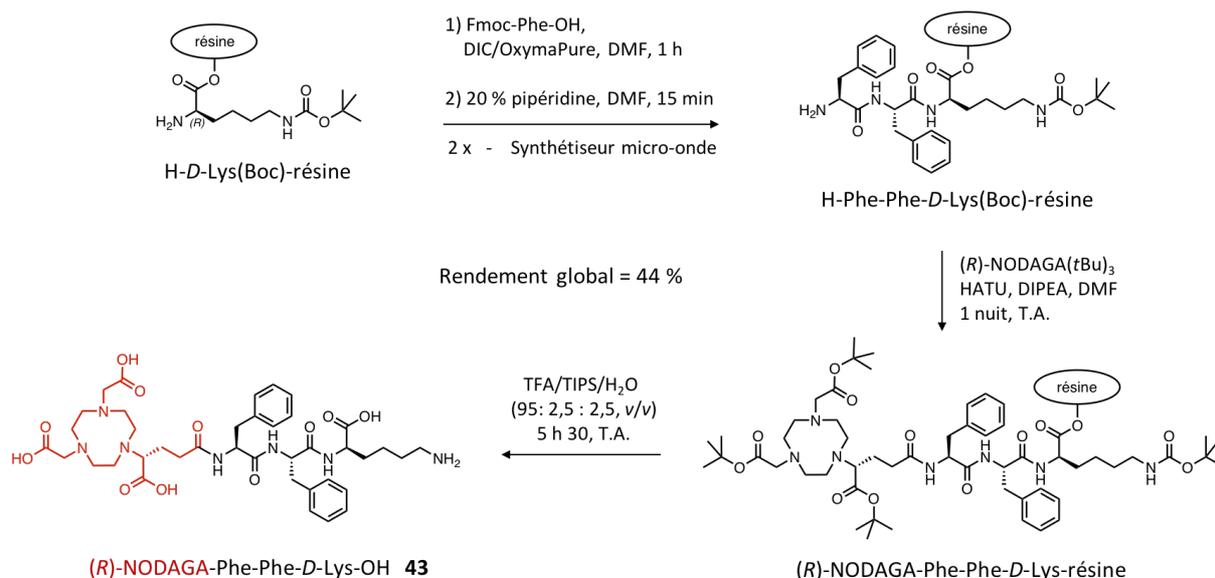


Schéma 26. Synthèse de (R)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-OH **43** par synthèse peptidique en phase solide.

La fixation du bras subéroyle sur le précurseur **42** s'est révélée être l'étape la plus délicate. Le composé **42** a été ajouté au disuccinimidyl subérate en excès, goutte à goutte, pour éviter la formation d'amide aux deux extrémités du subéroyle (schéma 27). Après 2 h, le composé **44** a été obtenu, après purification par RP-HPLC, avec un rendement de 34 %. La molécule cible **CC34** a finalement été formée par acylation de l'amine **43** par l'acide carboxylique activé **44**, en présence de triéthylamine, à température ambiante, pendant 4 h. La déprotection des esters *tert*-butyliques a été effectuée en milieu acide et le composé final **CC34** a été isolé avec un rendement calculé sur ces trois dernières étapes de 16 % et une pureté supérieure à 99 %.

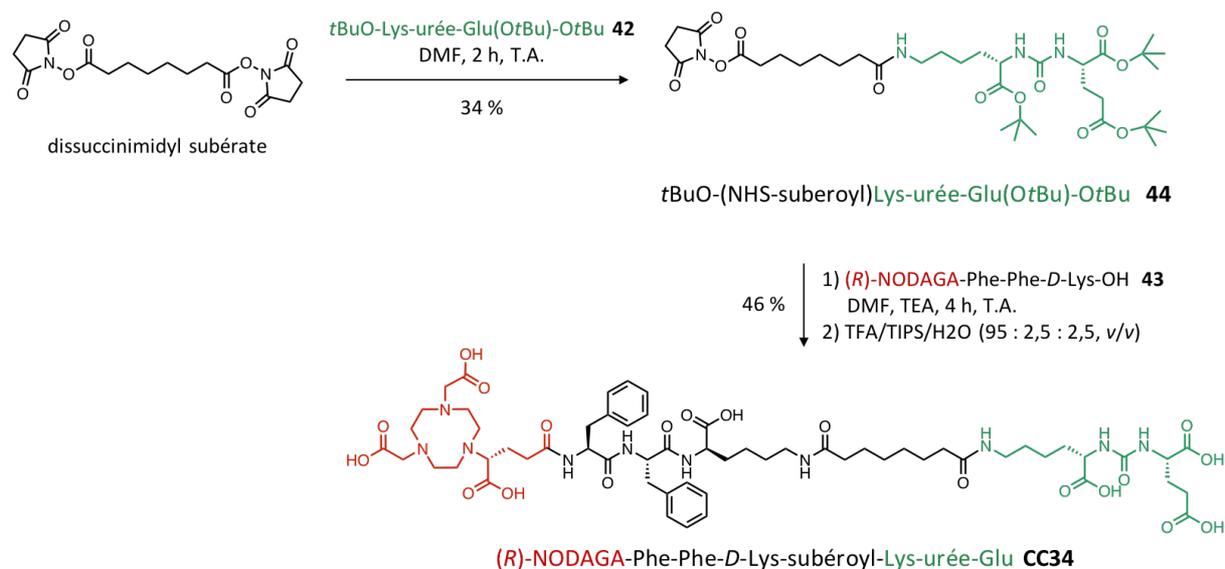


Schéma 27. Préparation de **CC34** par combinaison des synthons *t*BuO-Lys-urée-Glu(O*t*Bu)-O*t*Bu **42** et (R)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-OH **43** grâce au disuccinimidyl subérate.

b. Evaluation *in vitro*

La constante d'inhibition de **CC34** a été mesurée au sein de notre laboratoire, tandis que l'évaluation complète, incluant la radiométtallation au ^{68}Ga , au ^{64}Cu et à ^{111}In , les tests sur cellules et l'évaluation chez la souris, a été réalisée en Allemagne au Département de Médecine Nucléaire de l'Hôpital Universitaire de Freiburg par le Dr. Eleni Gourni, au sein de l'équipe du Pr. Helmut Maecke.

Test d'inhibition de la PSMA

Afin d'obtenir un premier aperçu de l'affinité du traceur (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-*D*-Lys-subéroyl-Lys-urée-Glu **CC34** pour sa cible, la constante d'inhibition a été mesurée grâce à un test *in vitro*. Le test est basé sur la mise en compétition du substrat naturel de la PSMA, le *N*-acétylaspartatylglutamate (NAAG), et de l'inhibiteur (**CC34**). Selon l'efficacité et la concentration de l'inhibiteur, une plus ou moins grande proportion de NAAG est hydrolysée en glutamate (Glu) et *N*-acétylaspartate (NAA) par la protéine (**figure 137. A**). Le glutamate libéré est alors détecté par une réaction fluorogénique, entre l'amine libre du glutamate et l'*o*-phthalaldéhyde (OPA), en présence de β -mercaptoéthanol et à pH 13 (**figure 137. B**).⁹⁵ Le signal fluorescent mesuré est ainsi proportionnel à l'activité peptidase de l'enzyme PSMA. À partir de la courbe du pourcentage d'activité enzymatique en fonction de la concentration en inhibiteur **CC34**, une constante d'inhibition de 0,64 nM a pu être mesurée (**figure 137. C**). Cette valeur confirme que notre composé possède une affinité, *in vitro*, similaire à la plupart des traceurs utilisés en clinique.

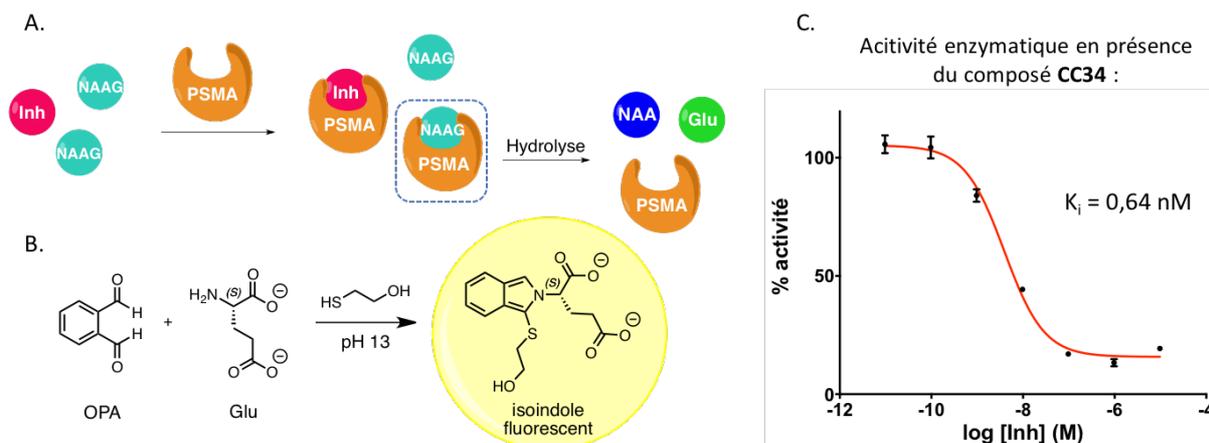


Figure 137. A. Représentation schématique du test compétitif entre un inhibiteur et le substrat NAAG ; B. Réaction fluorogénique entre le glutamate et l'*o*-phthalaldéhyde ; C. Résultats obtenus pour la mesure du pouvoir inhibant du composé **CC34**.

⁹⁵ Benson, S. C.; Lee, L.; Yang, L.; Snyder, J. K. *Tetrahedron*. **2000**, 56, 1165–1180

Radiomarquage

Comme le vecteur est de type pseudo-peptidique, donc beaucoup moins fragile que les protéines, des conditions de radiomarquage assez drastiques (95 °C) ont été utilisées. La radioméallation de **CC34** a été effectuée sans difficulté en 30 min à pH 8,0 pour le ^{64}Cu et l' ^{111}In , et en 10 min à pH 4,0 pour le ^{68}Ga . Pour chacun des radiomarquages, le rendement et la pureté radiochimique sont supérieurs à 98 % et 95 %, respectivement. En parallèle, HBED-CC-PSMA a été radiomarké au ^{68}Ga et PSMA-617 à l' ^{111}In . Les activités spécifiques sont comprises entre 75 et 80 MBq/nmol pour les composés marqués au gallium, aux alentours de 40 MBq/nmol pour le composé marqué au cuivre et aux alentours de 10 MBq/nmol pour les composés marqués à l'indium.

Mesure des logD

La lipophilie des composés radiomarqués a été estimée par mesure des logD octanol/PBS à pH 7,4 via la méthode « *shake-flask* » décrite dans la partie expérimentale. Les radiotraceurs ont tous montré un fort caractère hydrophile avec des logD négatifs. Par comparaison aux traceurs commerciaux [^{68}Ga]-PSMA-11 et ^{111}In -PSMA-617 qui présentent des logD aux alentours de -4,0, les radiotraceurs dérivés de **CC34** sont légèrement moins hydrophiles avec des logD compris entre -3,0 et -3,5.

Évaluation sur cellules LNCaP

L'affinité, la concentration de saturation, ainsi que le taux d'internalisation de chacun des radiotraceurs ont été mesurés sur des cellules d'adénocarcinome prostatique humain exprimant la PSMA, les cellules LNCaP. Pour chaque étude, une expérience contrôle en présence de l'inhibiteur de référence 2-PMPA a été effectuée afin de déterminer la proportion de liaison non spécifique.

L'affinité des radiotraceurs a été mesurée par comptage gamma après incubation des cellules à 4°C pendant 2 h en présence de chaque traceur. Tous les radiotraceurs ont montré une forte affinité avec des valeurs de K_d comprises entre 5,4 et 27,5 nM et les concentrations de composé nécessaires pour saturer les récepteurs (concentration de saturation, B_{max}) sont comparables (**tableau 5**).

Tableau 5. Constantes de dissociation et concentrations de saturation des récepteurs mesurées pour les cinq radiotraceurs après incubation avec les cellules LNCaP.

	^{68}Ga - CC34	^{111}In - CC34	^{64}Cu - CC34	^{68}Ga -HBED-CC-PSMA	^{111}In -PSMA-617
K_d (nM)	19.3 ± 2.5	5.5 ± 0.9	27.5 ± 2.7	2.9 ± 0.6	5.4 ± 0.8
B_{max} (nM)	0.73 ± 0.05	0.42 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.65 ± 0.02

La capacité des différents composés à être internalisés au sein de la cellule a été évaluée par incubation des cellules à 37 °C en présence des différents radiopeptides. L'activité spécifique totale ainsi que la proportion de radioligand internalisé ou simplement lié à la surface de la cellule ont été déterminées après différents temps d'incubation allant jusqu'à 3 h pour les composés marqués au ^{68}Ga et jusqu'à 6 h pour ceux marqués à l' ^{111}In ou au ^{64}Cu . Pour chacun des cinq composés, environ

75 % de l'activité totale associée aux cellules est internalisée après 3 h d'incubation (**figure 138**). Probablement en raison de leur affinité supérieure, les composés [¹¹¹In]-CC34 et [¹¹¹In]-PSMA-617 ont montré une activité totale associée aux cellules supérieure à celle des autres composés.

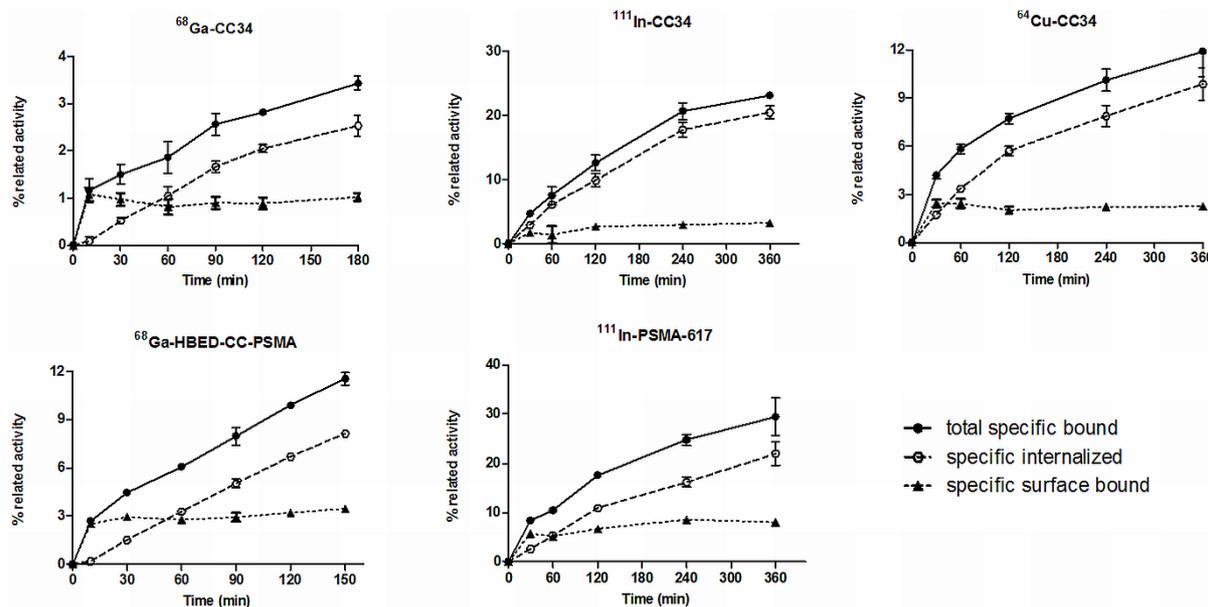


Figure 138. Evaluation de l'internalisation après incubation des cinq radiotraceurs sur le modèle de cellules LNCaP. La liaison spécifique totale est calculée par addition de l'activité spécifique internalisée et de l'activité spécifique membranaire. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la dose de radioactivité introduite.

L'affinité et la capacité d'internalisation sont des paramètres extrêmement importants permettant de déterminer si un composé est un candidat adéquat pour la détection de tumeurs *in vivo*. Cependant, la pharmacocinétique globale d'un composé donné peut être fortement influencée par de nombreux autres paramètres, tels que le caractère hydrophile, le poids moléculaire, la charge et la capacité à se lier aux protéines plasmatiques.

Ces différentes expériences sur cellules montrent que les radiotraceurs obtenus à partir du composé **CC34** possèdent des propriétés *in vitro* intéressantes, similaires à celles des traceurs de référence, ⁶⁸Ga-HBED-CC-PSMA et [¹¹¹In]-PSMA-617, et leur évaluation a donc été poursuivie sur modèle murin.

c. Evaluation *in vivo*

Stabilité métabolique

Afin d'évaluer la stabilité plasmatique de notre composé, une dose de 80 pmol (correspondant à 9 MBq) du radiotracer [⁶⁸Ga]-**CC34** a été administrée à deux souris. Après 15 min, les souris ont été sacrifiées et leur sang a été collecté, centrifugé et filtré pour éliminer les protéines. L'analyse par RP-HPLC de l'échantillon indique que 95 % de l'activité circulante après 15 min correspond au radiotracer intact (**figure 139**).

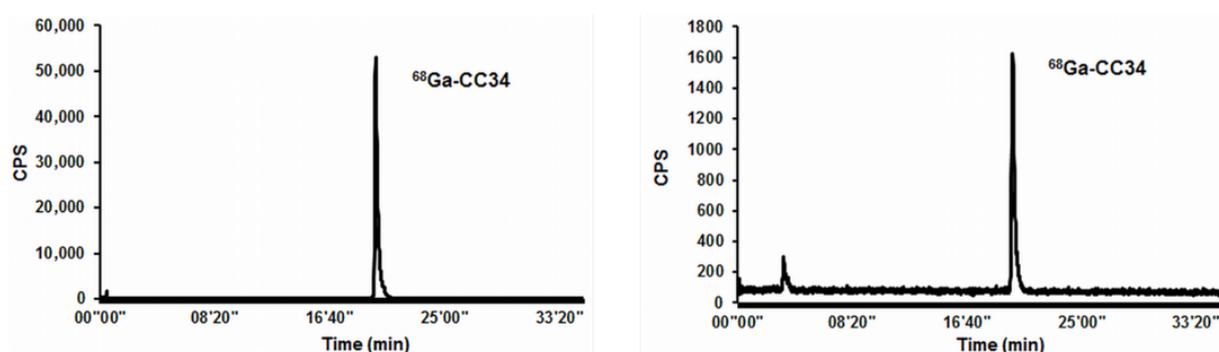


Figure 139. Profils HPLC du radiotracteur [^{68}Ga]-CC34 initial (gauche) et de plasma murin collecté 15 min après l'injection du radiotracteur (droite).

Biodistribution

Le comportement pharmacocinétique des 5 radiotraceurs a été étudié par administration de 10 pmol chez des souris BALB/c nude portant des tumeurs LNCaP implantées au niveau de l'épaule droite. La biodistribution a été mesurée 1 h et 2 h p.i. pour les composés marqués au gallium, et 1 h, 4 h, 24 h et 48 h p.i. pour les composés marqués au cuivre ou à l'indium. Les valeurs de biodistribution sont exprimées en pourcentage de la dose injectée divisé par la masse de l'organe en gramme (%IA/g) et correspondent à la moyenne sur trois à quatre souris (*mean ± SD*). Pour les composés [^{68}Ga]-HBED-CC-PSMA, [^{68}Ga]-CC34 et [^{64}Cu]-CC34, des images TEP *in vivo* ont été réalisées.

Comme les études *in vitro* le laissaient présager, tous les traceurs ont montré une forte accumulation dans les cellules cancéreuses xénogreffées (**tableaux 6, 7, 8 et 9**). Les données collectées 1 h après l'injection ont mis en évidence une forte accumulation dans la tumeur, mais également dans les reins, organes impliqués dans le processus d'élimination de ces radiotraceurs très hydrophiles. La co-injection d'un large excès de 2-PMPA (20 nmol) a généré une importante diminution du signal tumoral (de 75 % à plus de 90 %), ce qui prouve que l'accumulation tumorale est effectivement due à une liaison spécifique à la PSMA. L'expérience de blocage a également montré que l'accumulation observée dans les organes comme les reins, la rate et les poumons, est en grande partie le fait d'un ciblage spécifique due à la présence de PSMA dans ces tissus. De plus, hormis le composé [^{111}In]-CC34, tous les agents testés ont été rapidement éliminés de la circulation sanguine avec une activité circulante d'environ 0,2 % de l'activité injectée par gramme après 2 h.

Tableau 6. Valeurs de biodistribution obtenues 1 h et 2 h après l'injection de 10 pmol des composés [⁶⁸Ga]-HBED-CC-PSMA et [⁶⁸Ga]-CC34 (0.7-0.8 MBq, 100 µL) en intraveineuse dans la queue.

Organ ^a	⁶⁸ Ga-HBED-CC-PSMA			⁶⁸ Ga-CC34		
	1 h	1 h blocked	2 h	1 h	1 h blocked	2 h
Blood	0.2±0.04	0.4±0.04	0.2±0.04	0.5±0.3	0.3±0.4	0.2±0.1
Heart	0.6±0.06	0.2±0.06	0.6±0.02	0.4±0.2	0.1±0.06	0.3±0.03
Liver	0.4±0.01	0.4±0.05	0.4±0.05	0.3±0.1	0.3±0.2	0.2±0.1
Spleen	31±6	2.1±0.06	29±2	15±2	0.4±0.02	9.5±3.4
Lung	3.5±0.2	0.7±0.2	3.2±0.2	1.8±0.6	0.3±0.1	1.3±0.1
Kidney	208±4	11±3	211±29	263±29	6.4±0.2	271±36
Stomach	0.7±0.1	0.3±0.01	1±0.6	0.9±0.2	0.2±0.1	0.8±0.1
Intestine	0.5±0.1	0.3±0.04	0.5±0.2	1.2±0.4	0.2±0.1	0.8±0.3
Adrenal	23±4	1.1±0.5	23±0.8	11.7±1.4	0.2±0.1	12±1.3
Pancreas	1.4±0.3	0.3±0.04	2±0.5	0.9±0.1	0.1±0.02	0.8±0.4
Muscle	0.6±0.06	0.2±0.1	0.6±0.2	0.4±0.08	0.1±0.04	0.2±0.1
Bone	0.5±0.05	0.4±0.2	0.4±0.2	0.7±0.1	0.4±0.3	0.8±0.2
LNCaP-tumor	15.8±1.4	4.1±1.2	14.8±2.2	14.5±2.9	1.2±0.03	11.2±2.3
Tumor/blood	68±4		83±15	31±13		53±10
Tumor/kidney	0.08±0.01		0.07±0.02	0.06±0.01		0.04±0.01
Tumor/muscle	29±6		24±3	36±6		47±14

Tableau 7. Valeurs de biodistribution obtenues 1 h, 2 h, 24 h et 48 h après l'injection de 10 pmol du composé [⁶⁴Cu]-CC34 (0.2-0.3 MBq, 100 µL) en intraveineuse dans la queue.

Organ ^a	1 h	1 h blocked	4 h	24 h	48 h
Blood	0.5±0.08	0.1±0.03	0.2±0.03	0.1±0.02	0.06±0.00
Heart	0.7±0.3	0.2±0.01	0.3±0.02	0.2±0.1	0.2±0.01
Liver	0.7±0.06	0.6±0.01	0.6±0.1	0.5±0.1	0.4±0.01
Spleen	31±2.9	0.7±0.5	6.7±1.2	0.6±0.1	0.2±0.05
Lung	2.3±0.2	0.7±0.2	1.3±0.2	0.3±0.1	0.2±0.04
Kidney	275±26	8±0.8	275±21	22±2	2.0±1.2
Stomach	0.9±0.1	0.4±0.3	0.9±0.1	0.3±0.1	0.2±0.02
Intestine	0.8±0.3	0.3±0.1	0.9±0.4	0.3±0.1	0.2±0.03
Adrenal	11.0±2.2	0.6±0.3	6.2±1.0	1.0±0.4	0.2±0.05
Pancreas	1.4±0.4	0.1±0.002	0.6±0.2	0.1±0.03	0.06±0.00
Muscle	0.4±0.07	0.06±0.02	0.2±0.1	0.07±0.02	0.03±0.01
Bone	0.3±0.08	0.06±0.02	0.3±0.2	0.2±0.1	0.2±0.07
LNCaP-tumor	20.3±1.5	1.8±0.5	19.1±2.1	7.1±1.1	3.2±0.2
Tumor/blood	41±10		114±17	81±6	58±4
Tumor/kidney	0.07±0.002		0.07±0.009	0.3±0.06	2±0.8
Tumor/muscle	61±18		103±21	112±60	118±47

Tableau 8. Valeurs de biodistribution obtenues 1 h, 2 h, 24 h et 48 h après l'injection de 10 pmol du composé [¹¹¹In]-PSMA-617 (0.09-0.1 MBq, 100 µL) en intraveineuse dans la queue.

Organ ^a	1 h	1 h blocked	4 h	24 h	48 h
Blood	0.6±0.2	0.4±0.1	0.1±0.02	0.01±0.0	0.01±0.0
Heart	0.5±0.2	0.2±0.1	0.07±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01
Liver	0.4±0.1	0.3±0.03	0.1±0.01	0.06±0.01	0.04±0.0
Spleen	29±5	0.5±0.1	2.1±0.6	0.1±0.05	0.1±0.01
Lung	2.6±0.7	0.7±0.1	0.5±0.04	0.2±0.1	0.1±0.02
Kidney	290±29	4.1±0.6	126±15	3.0±0.5	1.3± 0.1
Stomach	0.9±0.2	0.2±0.05	0.3±0.1	0.03±0.0	0.03±0.01
Intestine	1.0±0.7	0.3±0.05	0.2±0.1	0.02±0.0	0.02±0.01
Adrenal	8.0 ±0.4	0.3±0.2	2.8±0.6	0.01±0.01	0.1±0.01
Pancreas	1.3±0.1	0.2±0.03	0.3±0.1	0.02± 0.0	0.02±0.01
Muscle	0.4±0.1	0.07±0.02	0.1±0.02	0.01± 0.0	0.01±0.00
Bone	0.8±0.3	0.1±0.06	0.3± 0.1	0.2± 0.04	0.1±0.06
LNCaP-tumor	52.1±6.5	4.8±0.6	51.4±4.5	27.2±1.9	21.2±1.6
Tumor/blood	72±19		772±153	4768±110	5343±1033
Tumor/kidney	0.2±0.01		0.4±0.04	9±2	16±2
Tumor/muscle	148±61		582±24	2819±864	1987±177

Tableau 9. Valeurs de biodistribution obtenues 1 h, 2 h, 24 h et 48 h après l'injection de 10 pmol du composé [¹¹¹In]-CC34 (0.09-0.1 MBq, 100 µL) en intraveineuse dans la queue.

Organ ^a	1 h	1 h blocked	4 h	24 h	48 h
Blood	8.1±0.3	13.8±0.9	2.0±0.8	0.2±0.02	0.1±0.03
Heart	2.8±0.34	3.6±0.3	1.0±0.2	0.1±0.02	0.1±0.01
Liver	3.2±0.5	5.1±0.6	1.1±0.3	0.3±0.02	0.2±0.05
Spleen	38±5	3.7±0.8	34.1±7.4	4.5±0.9	2.5±0.9
Lung	7.6±0.7	8.2±1.3	4.9±1.4	1.2±0.3	0.5±0.03
Kidney	148±14	16.9±1.6	256±29	210±33	128±11
Stomach	1.6±0.1	1.9±0.2	0.9±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1
Intestine	2.1±0.5	3.4±0.5	0.6±0.1	0.1±0.02	0.1±0.01
Adrenal	12.9±2.7	3.4±1.5	15.8±1.0	4.6±0.9	2.8±0.1
Pancreas	2.6±0.3	1.9±0.2	1.5±0.3	0.4±0.1	0.2±0.1
Muscle	1.5±0.1	1.6±0.1	0.6±0.02	0.1±0.03	0.1±0.02
Bone	1.2±0.2	1.3±0.1	0.5±0.2	0.2±0.1	0.3±0.1
LNCaP-tumor	28.5±2.6	5.3±0.8	31.3±5.9	21.4±3.7	16.5±1.9
Tumor/blood	3.4±0.5		16±3	119±31	127±11
Tumor/kidney	0.2±0.02		0.1±0.03	0.1±0.01	0.1±0.01
Tumor/muscle	19±1		52±8	186±35	226±37

Les traceurs [¹¹¹In]-PSMA-617 et [⁶⁴Cu]-CC34 montre un profil pharmacocinétique optimal, avec une forte accumulation dans les tissus tumoraux et une clairance rapide dans le sang, les reins et la rate conduisant à des ratios tumeur/bruit de fond très élevés (**tableaux 8 et 9** et **figure 140. A**). En revanche, le composé [¹¹¹In]-CC34 montre un profil pharmacocinétique assez différent des autres traceurs et malheureusement peu adapté à une utilisation en clinique. En effet, bien que l'accumulation tumorale de ce traceur soit élevée, sa clairance s'est révélée très lente. Le composé est éliminé de la circulation sanguine beaucoup plus lentement que les autres radiotraceurs et environ 24 h sont nécessaires pour atteindre un pourcentage d'activité injectée de 0.2 dans le sang (**tableau 9** et **figure 140. B**). Par ailleurs, l'accumulation rénale du composé [¹¹¹In]-CC34 est encore très importante après 48 h, au contraire de celle des autres radiotraceurs qui diminue fortement après 24 h (**figure 140. C**).

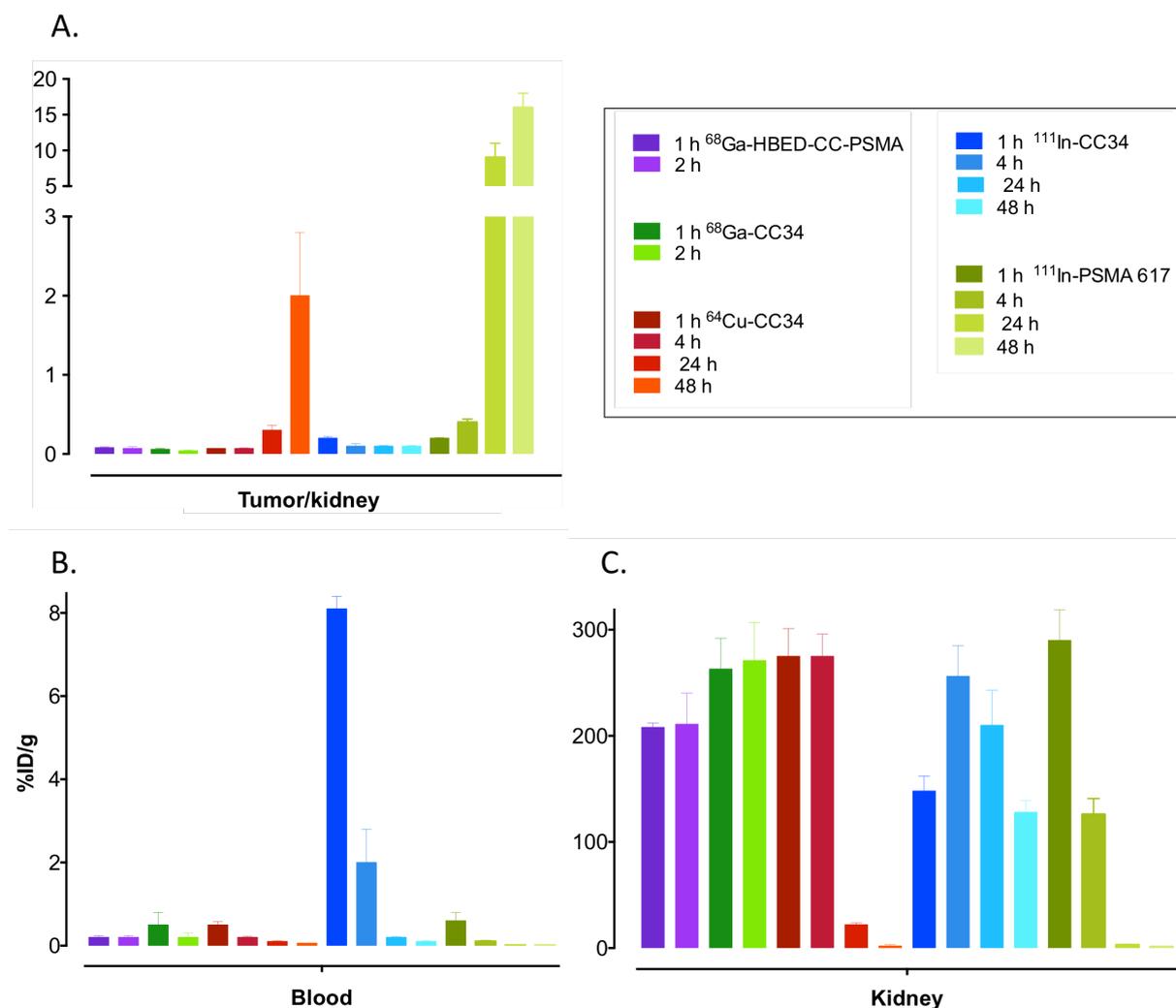


Figure 140. Comparaison des données de biodistribution de chacun des cinq radiotraceurs testés ; **A.** Ratio tumeur/rein ; **B.** Pourcentage de la dose injectée dans le sang ; **C.** Pourcentage de la dose injectée dans les reins.

Les données de biodistribution ainsi que la comparaison des images TEP obtenues pour ^{68}Ga -HBED-CC-PSMA et ^{68}Ga -CC34 montre que ces deux agents possèdent des propriétés de diagnostic plus ou moins similaires (**figure 141. A**). Toutefois, le traceur ^{64}Cu -CC34 apporte un réel bénéfice par rapport aux traceurs à base de gallium-68 (**figure 141. B**). Grâce à la demi-vie supérieure du cuivre-64, il nous a été possible de réaliser des images TEP, un ou deux jours après l'injection, qui ont révélé un comportement pharmacocinétique très intéressant. En effet, nous avons observé l'élimination rapide du composé ^{64}Cu -CC34 hors des reins tandis que l'accumulation tumorale reste relativement élevée. Ce phénomène a ainsi généré une augmentation considérable du ratio tumeur/reins au cours du temps.

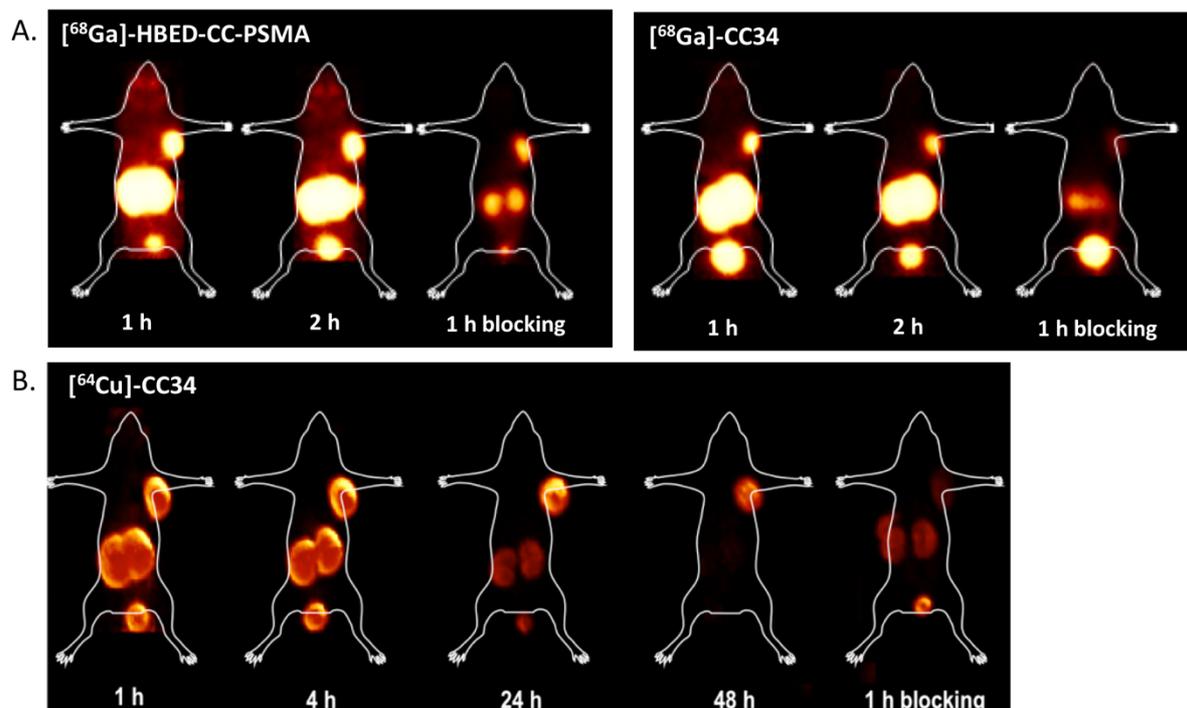


Figure 141. Maximum d'intensité de projections (MIP) obtenues par imagerie TEP après injection de 100 pmol (7-8 MBq, 100 μL) des traceurs radiométallés : **A.** au gallium-68 ($[^{68}\text{Ga}]\text{-HBED-CC-PSMA}$ et $[^{68}\text{Ga}]\text{-CC34}$) ; **B.** au cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{-CC34}$).

Les résultats de cette expérience attestent de l'efficacité du composé **CC34** qui, grâce à son macrocycle (*R*)-NODAGA, est capable de complexer efficacement le ^{64}Cu , permettant ainsi une nette amélioration des capacités de diagnostic par comparaison aux traceurs à base de ^{68}Ga .

Le potentiel du composé **CC34** a été évalué, chez l'homme, au sein du département de médecine nucléaire de l'hôpital de Vienne en Autriche (communication personnelle, 2 octobre 2018). L'étude a été conduite par S. Mirzaei et décrit l'évaluation du traceur **CC34** marqué au cuivre-64 sur une cohorte de 23 patients.⁹⁶ Les auteurs ont observé un taux élevé de détection des tumeurs et une haute stabilité du composé *in vivo*. Comme suggéré par nos résultats précliniques, l'accumulation tumorale du traceur chez les patients a significativement augmenté au cours du temps (entre les temps d'imagerie 30 min et 3 h). L'étude conclue sur le fort potentiel du ligand $[^{64}\text{Cu}]\text{-NODAGA-PSMA}$ pour la détection de la maladie résiduelle chez les patients atteints d'un cancer de la prostate progressif ou récurrent.

⁹⁶ Sevcenco, S.; Klingler, H. C.; Eredics, K.; Friedl, A.; Schneeweiss, J.; Knoll, P.; Kunit, T.; Lusuardi, L.; Mirzaei, S. *Adv. Ther.* **2018**, *35*, 779–784

II.2. Optimisation de l'espaceur

Comme nous l'avons précédemment indiqué, l'espaceur vise à éloigner suffisamment l'agent de ciblage du macrocycle afin que l'affinité pour la PSMA ne soit pas affectée par la présence de ce dernier. Il permet également de moduler la biodistribution du traceur dans l'organisme et peut éventuellement stabiliser l'interaction avec la cible biologique. L'espaceur pseudo-peptidique Phe-Phe-Lys(subéroyle) sur lequel est basé **CC34** permet d'obtenir des composés ayant de bonnes affinités pour la PSMA et une pharmacocinétique satisfaisante. Cependant, sa synthèse est complexe et son rôle dans l'interaction avec la PSMA reste peu connu à ce jour. Nous avons donc cherché à identifier un espaceur plus simple qui apporterait un bon équilibre en termes de facilité de synthèse, d'hydrophilie et d'affinité. Dans ce but, cinq traceurs possédant des bras espaceurs avec des longueurs et des polarités variables ont été synthétisés (**figure 142**).

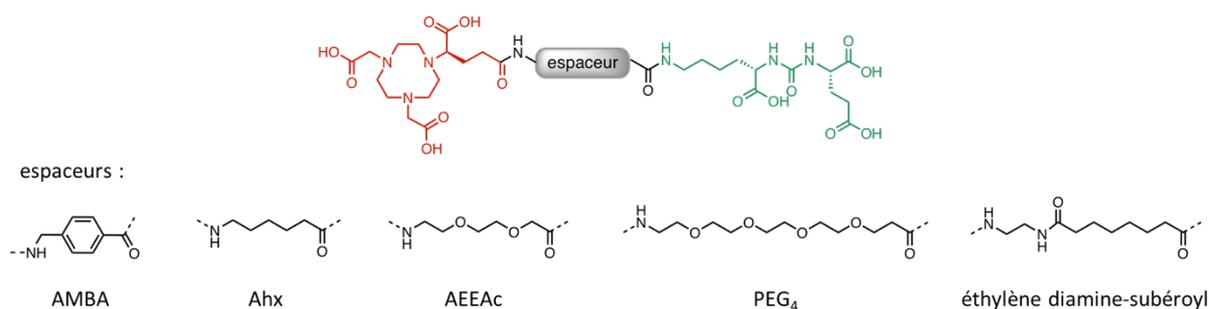


Figure 142. Structure des cinq traceurs obtenus à partir des bras espaceur : acide 4-(aminométhyl)benzoïque (AMBA), acide amino-6-hexanoïque (Ahx), acide 2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)acétyl (AEEAc), PEG₄ et éthylènediamine-subéroyle.

Les quatre premiers traceurs ont été élaborés à partir du précurseur **42** auquel nous avons fixé par couplage peptidique, les espaceurs AMBA, Ahx, AEEAc et PEG₄ protégés par un groupement Fmoc (**schéma 28. A**). La fonction amine a ensuite été libérée par un traitement à la pipéridine à 20 % dans le DMF pour générer les composés **45**, **46**, **47** et **48**. Le macrocycle (*R*)-NODAGA activé sous forme d'ester de NHS a alors été couplé à la molécule par formation d'une deuxième liaison amide. Les quatre traceurs finaux (*R*)-NODAGA-AMBA-Lys-urée-Glu **49**, (*R*)-NODAGA-Ahx-Lys-urée-Glu **50**, (*R*)-NODAGA-AEEAc-Lys-urée-Glu **51** et (*R*)-NODAGA-PEG₄-Lys-urée-Glu **52** ont été obtenus après déprotection des esters *tert*-butyliques en conditions acides.

Le traceur **53**, dont l'espaceur est composé d'un motif éthylènediamine lié à un bras subéroyle, a quant à lui été obtenu à partir de l'intermédiaire **44**. Le macrocycle (*R*)-NODAGA-éthylènediamine, commercialisé par CheMatech, a été couplé à l'intermédiaire **44** par formation d'une liaison amide et les esters *tert*-butyliques ont ensuite été déprotégés par un traitement acide (**schéma 28. B**).

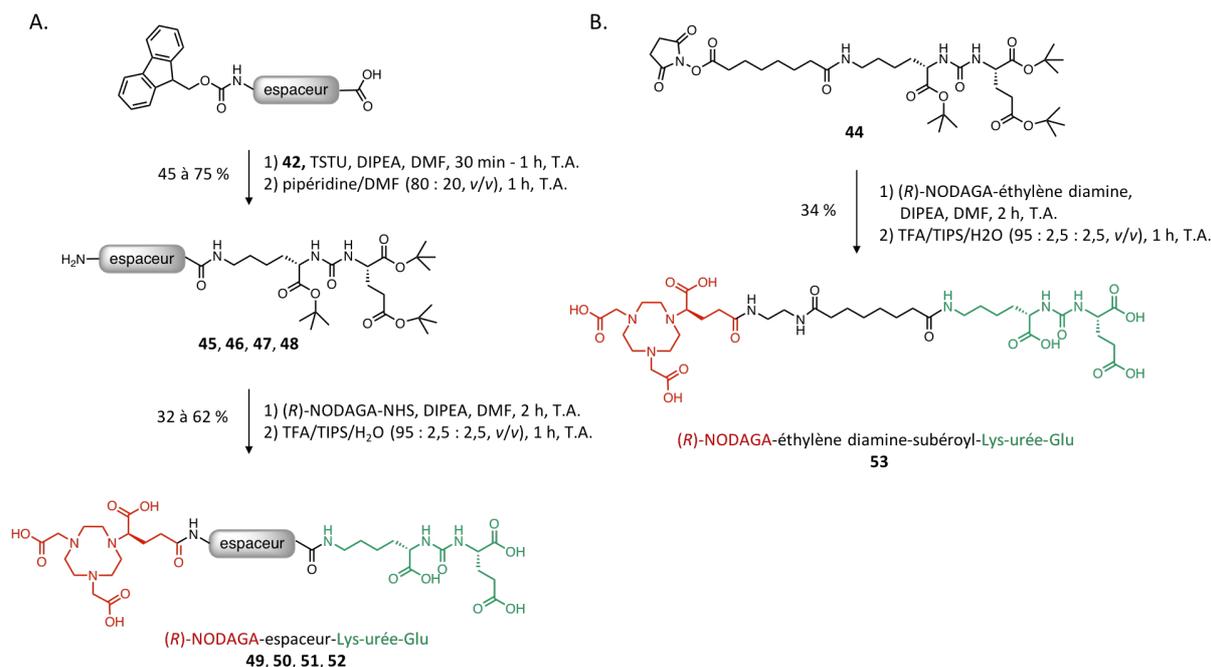
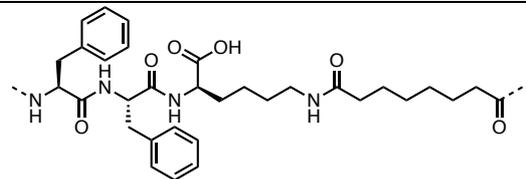
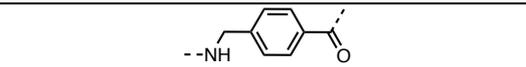
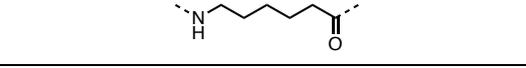
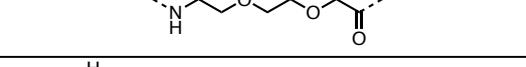
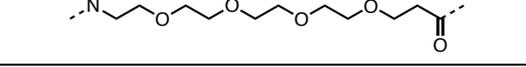
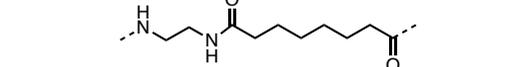


Schéma 28. Voies de synthèse : **A.** des traceurs **49, 50, 51** et **52** à partir du synthon **42** ; **B.** du traceur **53** à partir de l'intermédiaire **44**.

Afin de comparer l'efficacité de la synthèse des nouveaux traceurs **49, 50, 51, 52** et **53** par rapport à celle du traceur initial **CC34**, le rendement global de chacun des traceurs a été calculé en prenant en compte chacune des étapes mises en jeu à partir de l'intermédiaire *t*BuO-Lys-urée-Glu(*Ot*Bu)-*Ot*Bu (**42** ; **tableau 10**). Il est à noter que dans le cas du composé **CC34**, ce rendement inclut la synthèse de l'espacer. Nous avons ainsi constaté que les deux traceurs faisant intervenir le disuccinimidyl subérate (composés **CC34** et **53**) présentent des rendements globaux plus faibles. Afin d'augmenter l'efficacité de la synthèse, il semble donc préférable de choisir un espacer ne nécessitant pas l'introduction d'un bras subéroyle.

Comme pour le traceur **CC34**, nous avons mesuré la constante d'inhibition des différents composés **49, 50, 51, 52** et **53** grâce au test enzymatique dont nous avons précédemment détaillé le protocole. Il est à noter que chaque molécule n'a pu être testée qu'une seule fois en duplicata. Les valeurs des K_i sont donc à considérer avec précaution. Dans le but d'établir une relation entre la nature de l'espacer et l'affinité des composés, nous avons comparé la longueur du bras espacer avec les valeurs des K_i (**tableau 10**).

Tableau 10. Structure et longueur de l'espaceur et K_i ($n = 2$) des traceurs **CC34**, **49**, **50**, **51**, **52** et **53**. Le rendement global indiqué prend en compte chacune des étapes impliquées dans la synthèse des traceurs à partir du précurseur tBuO-Lys-urée-Glu(OtBu)-OtBu (**42**).

Composé	Espaceur	Nombre d'atomes de l'espaceur	K_i (nM)	Rdt global
CC34		20	0,64	7 %
49		6	0,99	18 %
50		6	1,19	28 %
51		8	0,90	44 %
52		15	5,65	22 %
53		11	1,28	12 %

Les quatre nouveaux composés élaborés ont montré des constantes d'inhibition de l'ordre du nanomolaire, globalement similaires à celle obtenue pour le traceur **CC34**. D'après cette étude préliminaire, il semble que pour cette série de traceurs, un bras espaceur de petite taille favorise l'inhibition de la PSMA. Ceci pourrait éventuellement être expliqué par l'implication d'une des fonctions acide carboxylique du macrocycle NODAGA dans la reconnaissance du ligand par la PSMA. Toutefois, la confirmation de cette hypothèse nécessite l'évaluation méthodique d'une plus grande variété de composés.

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour conclure, nous avons mis au point une procédure efficace permettant la synthèse du traceur **CC34** et une quinzaine de mg ont ainsi pu être obtenus. Néanmoins, certaines étapes, telles que l'introduction du bras subéroyle sur le motif Lys-urée-Glu, restent encore à optimiser. La valeur de K_i , calculée à partir du test d'inhibition, montre une affinité pour la PSMA comparable à celle des composés décrits dans la littérature. Le composé a pu être radiométallé par le ^{64}Cu , le ^{68}Ga et l' ^{111}In avec de hauts rendements et puretés radiochimiques. Les études effectuées sur cellules PSMA-positives ont permis de mesurer des affinités de l'ordre du nanomolaire et nous avons constaté une forte internalisation du composé au sein des cellules. La stabilité métabolique du composé a été confirmée par analyse RP-HPLC du plasma de souris après injection du traceur [^{68}Ga]-**CC34**. Enfin, la biodistribution des radiotraceurs a été évaluée chez des souris portant des tumeurs PSMA-positives. Les résultats ont été comparés avec les données obtenues en parallèle pour les composés de référence [^{68}Ga]-HBED-CC-PSMA et [^{111}In]-PSMA-617.

Bien que l'agent imageant [^{111}In]-**CC34** ait montré un comportement peu favorable avec une clairance très lente au niveau du sang et des reins, le traceur [^{64}Cu]-**CC34** s'est révélé extrêmement performant et a permis, grâce à la décroissance lente du cuivre-64, d'atteindre des ratios tumeur/bruit de fond bien meilleurs que dans le cas du composé de référence [^{68}Ga]-HBED-CC-PSMA. Les premiers examens diagnostiques réalisés sur des patients atteints du cancer de la prostate ont confirmé le potentiel du composé **CC34** marqué au cuivre-64 pour la détection des tumeurs primaires aussi bien que les métastases.

Par ailleurs, le composé [^{68}Ga]-**CC34** a montré des propriétés de diagnostic similaires à celles de [^{68}Ga]-HBED-CC-PSMA, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation du composé **CC34**. En effet, grâce à la versatilité du macrocycle NODAGA, **CC34** est capable de complexer efficacement différents radioisotopes, ce qui pourrait faciliter la mise en place des examens diagnostiques dans les hôpitaux ayant accès à un choix peu diversifié de radioisotopes. Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer le potentiel théranostique de ce composé par radiométallation au ^{67}Cu .

Nos travaux sur le rôle de l'espaceur nous ont permis d'identifier plusieurs traceurs constitués de divers espaceurs et possédant une affinité pour la PSMA comparable à celle de **CC34**. Certains de ces traceurs ont l'avantage de faire intervenir une synthèse beaucoup plus simple, ce qui permet d'améliorer considérablement les rendements. Une évaluation plus approfondie, notamment sur cellule ou sur petit animal, est cependant nécessaire pour estimer le potentiel réel de ces composés.

- *CONCLUSION GÉNÉRALE* -

Ces travaux de thèse concentrent plusieurs axes de recherche qui s'articulent autour de l'élaboration d'agents imageants moléculaires et du domaine de la bioconjugaison. Les différents projets développés s'inscrivent dans une dynamique de recherche concrète visant à obtenir des résultats qui peuvent être directement mis à profit pour solutionner des problématiques actuelles. Ainsi, les disciplines abordées se situent à l'interface entre la synthèse organique et la biochimie.

Les travaux effectués ont permis la mise au point de différentes approches ayant pour objectif de faciliter l'élaboration de bioconjugués, par modification chimiosélective de biomolécules vectrices.

Nous avons ainsi développé deux stratégies (présentées dans les chapitres I et II) permettant la double modification régiospécifique de protéines afin d'obtenir des conjugués bifonctionnels vectorisés composés d'une protéine vectrice et de deux groupements d'intérêt. Ainsi, grâce à l'utilisation de l'hétérocycle trifonctionnel 3,6-dichloro-1,2,4,5-tétrazine, il nous a été possible de synthétiser trois agents pharmaceutiques bifonctionnels. Un anticorps bimodal traçable par imagerie TEMP/optique a pu être préparé avec succès grâce à la stratégie 1 et son évaluation *in vivo* a confirmé son efficacité en tant qu'agent diagnostique. La stratégie 2 a, quant à elle, été validée *via* : 1) la double modification d'albumine par un fluorophore et un macrocycle pour la complexation de radiométaux ; 2) la synthèse d'un agent théranostique constitué d'un *nanobody* modifié par, à nouveau, un macrocycle et par un photosensibilisateur.

L'utilisation de la plateforme dichlorotétrazine confère une grande modularité à nos deux technologies. Ceci constitue un avantage important par rapport aux nombreuses techniques actuelles de double modification qui ne font pas intervenir de plateforme et qui sont, par conséquent, beaucoup plus complexes à mettre en œuvre. Ainsi, nous avons pu montrer qu'il était possible de modifier diverses protéines par des groupements d'intérêt variables (imageant ou photosensibilisant). Nous souhaiterions multiplier les exemples d'applications de ces deux stratégies *via* la bioconjugaison d'autres types de molécules, telles que des chaînes polyéthylène glycol ou des tags facilitant la purification. Par ailleurs, ces stratégies permettent aussi l'introduction de deux groupements identiques, ce qui peut se révéler intéressant pour les études mettant en jeu une technique d'imagerie monomodale et pour augmenter le pouvoir imageant ou l'effet cytotoxique d'un agent pharmaceutique.¹

La chimiosélectivité de nos stratégies constitue bien évidemment un avantage considérable. La première stratégie implique l'utilisation de biomolécules présentant une fonction bioorthogonale pour la réaction de IEDDA. Cette fonction peut être introduite *via* l'incorporation d'un acide aminé non naturel à la protéine, ce qui peut se révéler parfois compliqué à mettre en place. Cependant, les laboratoires ne possédant pas les compétences/dispositifs pour obtenir ce type de protéines génétiquement modifiées peuvent également greffer l'ancre bioorthogonale par une technique de bioconjugaison régiospécifique classique. La seconde stratégie est basée sur la modification des cystéines et est donc particulièrement puissante, car l'introduction régiosélective de cystéines est relativement simple.

¹ Joosten, L.; Brom, M.; Peeters, H.; Heskamp, S.; Béhé, M.; Boerman, O.; Gotthardt, M. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 486–494

En parallèle, nous avons pu développer une troisième stratégie de bioconjugaison régiospécifique qui permet l'élaboration d'agents imageants vectorisés fluoresçant dans le proche infrarouge. La technologie met en jeu un fluorophore commercial peu coûteux, stable et possédant des propriétés spectrales très attractives. La bioconjugaison est réalisée en une seule étape, par modification spécifique d'un (ou plusieurs) résidu(s) cystéine(s) disponible(s) sur la protéine vectrice, et peut être effectuée en une heure seulement. Nous avons démontré la faisabilité et l'efficacité de la stratégie *via* le marquage fluorescent de l'albumine suivi de l'évaluation des propriétés pharmacocinétiques de l'agent fluorescent proche infrarouge résultant, après son injection chez un modèle murin.

La grande simplicité de la réaction et la disponibilité immédiate du fluorophore sont des atouts incontestables. En effet, la réaction pourrait éventuellement être transposée à l'échelle industrielle et la stratégie pourrait être utilisée en routine, au sein de laboratoires de biologie, afin d'obtenir simplement des protéines fluorescentes.

Contrairement aux deux premières approches, cette technique de bioconjugaison est moins versatile et ne permet pas l'introduction conjointe de deux groupements distincts. Néanmoins, il est probablement possible de greffer d'autres fluorophores possédant une fonction chloro-cyclohexyle (ou apparentée) selon cette même stratégie. Et, bien qu'une étape de synthèse soit alors nécessaire, notre stratégie pourrait aussi être appliquée à la préparation de conjugués bimodaux *via* l'introduction préalable du second agent imageant sur le fluorophore IR783, par fonctionnalisation d'un des groupements sulfonates, par exemple.^{2,3}

Le dernier chapitre s'inscrit dans la thématique de recherche très compétitive visant à l'identification de radiotraceurs spécifiques de la PSMA permettant le diagnostic efficace du cancer de la prostate. Nous avons pu élaborer un traceur TEP qui se démarque des agents radiopharmaceutiques actuellement testés en clinique. En effet, l'évaluation préclinique du radiopeptide a montré qu'il était possible d'améliorer nettement le contraste entre les tissus tumoraux et sains en enregistrant des images à des temps p.i. d'un à deux jours. Ceci est possible grâce à l'emploi de notre traceur qui est capable de complexer efficacement l'émetteur longue-durée ⁶⁴Cu, au contraire des composés précédemment décrits dans la littérature. Le composé ⁶⁴Cu-CC34 a fait l'objet d'une évaluation préliminaire chez l'homme et donné des résultats particulièrement encourageants.

² Caddick, S.; Wilden, J. D.; Judd, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1024–1025

³ Kreimerman, I.; Porcal, W.; Olivera, S.; Oliver, P.; Savio, E.; Engler, H. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *10*, 212–220

- *PARTIE EXPÉRIMENTALE* -

- PARTIE EXPÉRIMENTALE -	224
MATERIALS AND METHODS	228
CHAPTER I - EXPERIMENTAL PART	231
Synthesis of compounds 1 to 12	231
<i>In vitro</i> stability of the bimodal probe 12 in FBS/RPMI (25 : 75, v/v)	259
Conjugation of the bimodal probe 12 to trastuzumab	260
Characterization of the conjugate 14	261
Radiolabeling of the conjugate 14 with ¹¹¹ In	263
<i>In vivo</i> evaluation of the radiolabeled conjugate 15 by SPECT-CT/fluorescence imaging	265
CHAPTER II - EXPERIMENTAL PART	270
Synthesis of (<i>R</i>)-NODAGA-S-Tz-Cl 17	270
Evaluation of the bioconjugation on model peptides	274
Synthesis of the compounds 22 to 29	278
Sequential dual labeling of bovine serum albumin	297
Characterization of the bioconjugate 30	300
<i>In vivo</i> evaluation of the bioconjugate 30 by fluorescence imaging	301
Application of the strategy to the preparation of a theranostic agent	302
CHAPTER III – EXPERIMENTAL PART	309
Validation of the labeling strategy on a model peptide	309
Labeling of a Fab' fragment of pertuzumab	314
Labeling of bovine serum albumin	322
Characterization of the bioconjugate 39	324
<i>In vivo</i> evaluation of the fluorescent BSA conjugate 39	325
CHAPTER IV – EXPERIMENTAL PART	328
Synthesis of the precursors 40 to 44 and of the final compound CC34	328
Further characterization of CC34	338
Determination of inhibitory potency on a fluorescent assay with hsPSMA	340
Radiolabeling	341
Lipophilicity studies	342
Evaluation of ⁶⁸ Ga-, ⁶⁴ Cu- and ¹¹¹ In-labeled CC34 on LNCaP cells	342
<i>In vivo</i> evaluation of radiolabeled CC34	344
Spacer optimization	345
Inhibition of PSMA enzymatic activity by compounds 49 to 53	359

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics and Alfa Aesar and used without further purification. The Fmoc-protected amino acids and coupling reagents for peptide synthesis were from Iris Biotech. (*R*)-NODAGA-NH₂, (*R*)-NODAGA(*t*Bu)₃, (*R*)-NODAGA-BCN, DOTAGA-NH₂ and DOTAGA(*t*Bu)₄ were provided by CheMatech. The non-sulfonated and sulfonated Cyanine 5.0-COOH dyes and the BODIPY-COOH dye were kindly given by Pr. A. Romieu and Dr. C. Goze (ICMUB, Dijon, France). IRDye700DX were obtained from LICOR (IRDye® 700DX). The cyanine-based fluorophores IR783 (inner salt, sodium salt, dye content 90%) and DiSulfo-CY_{anine}7 - Maleimide (K salt, FluoProbe®) were obtained from Sigma-Aldrich and Interchim respectively. Trastuzumab and pertuzumab antibodies (Herceptin®; Roche, Welwyn Garden City, U.K.), and human serum (healthy male) were obtained through the Georges-Francois LECLERC Cancer Center - UNICANCER (Dijon, France). The 7D12 VHH was given by Dr. S. Heskamp. Fmoc-*D*-Lys(Boc)-Wang resin was given by Dr. V. Goncalves.

HPLC-gradient grade MeCN was obtained from Biosolve or Carlo Erba. LC-HRMS grade MeCN was obtained from Fisher Scientific. All aq. buffers used in this work and aq. mobile-phases for HPLC and ionic chromatography were prepared using water purified with a PURELAB Ultra system from ELGA (purified to 18.2 MΩ cm). Peptide synthesis grade DMF used for SPPS was obtained from Iris Biotech or Carlo Erba.

Moisture sensitive reactions were performed under nitrogen or argon atmosphere.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on NMR 300 MHz Bruker Avance III NanoBay or NMR 500 MHz Bruker Avance III spectrometers under routine conditions at 298 K and were referenced to TMS or residual solvent signals. The following abbreviations and their combinations are used: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet; bs, broad singlet; bt, broad triplet; bq, broad quadruplet. Diastereotopic protons signals from a CH₂ group were indicated by the notation "CH (CH₂ diast.)". The ¹H and ¹³C resonance signals were attributed by means of 2D COSY and HMQC experiments.

When possible, the number of TFA counterions was quantified by ionic chromatography. Otherwise, the number of TFA counterions was estimated, by assuming that all basic functions on the molecules formed TFA salts.

Ionic chromatography analyses were performed by Dr. Myriam Laly (PACSMUB, Dijon) on a Dionex ICS-5000 DC system equipped with Dionex AS11-HC column and conductivity detector (Thermo Scientific). The separation was achieved with the following eluents: A: NaOH, 30 mM and B: H₂O by isocratic mode A/B (90 : 10, v/v). Analysis were performed in duplicates.

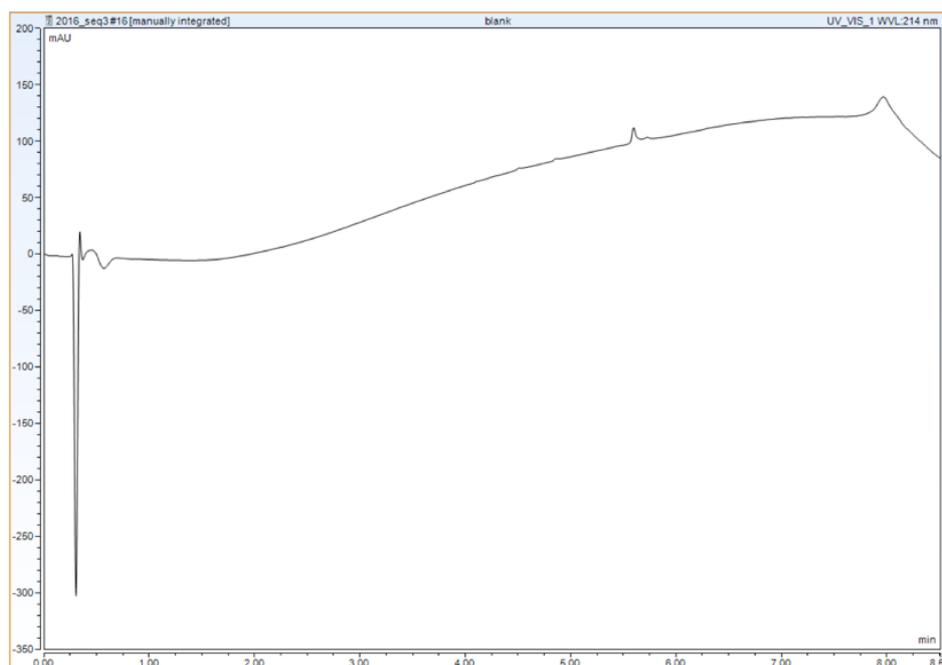
HRMS spectra of organic compounds and peptide-related conjugates were recorded on a mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) using an ESI source. If not specified, the spectrum was recorded in positive mode.

UV-Vis absorbance/fluorescence spectra were recorded on a CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH) with an Lvis plate for absorbance spectra measurements and black 96-wells microplates for excitation and emission spectra measurements.

Organic compounds, peptides and peptide-related conjugates were characterized by RP-HPLC-LRMS analyses performed on an UltiMate 3000 system Dionex (Thermo Scientific) equipped with a DAD detector and coupled to a low-resolution mass spectrometry detector MSQ Plus (Thermo Scientific) equipped with an ESI source. Separation was achieved using an RP Kinetex™ column (Phenomenex) (2.6 μm , 100 \AA , 50 \times 2.1 mm) with ultrapure water and HPLC-grade MeCN: A: H₂O 0.1% FA and B: MeCN 0.1% FA. Analyses were performed with the following gradient program: 5% to 100% of B in 5 min, 100% B for 1.5 min, 100% to 5% B in 0.1 min and 5% B for 1.9 min, at a flow rate of 0.5 mL/min.

The purity of title compounds was determined from the integration of HPLC-LRMS chromatograms at 214 nm. An example of blank chromatogram is shown below. Yields were calculated taking into account the purity determined from RP-HPLC-LRMS (yield = experimental mass \times HPLC purity_{214 nm} / theoretical mass).

Illustrative RP-HPLC-LRMS chromatogram of a H₂O injection (blank):



Proteins and related conjugates were characterized by RP-HPLC-HRMS analyses performed on a HPLC UltiMate 3000 system (Thermo Scientific) equipped with a UV-visible detector and coupled to a high-resolution mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) equipped with an ESI source. The separation was achieved on a Thermo Scientific™ MAbPac™ column (4 μm , 50 \times 2.1 mm) with the following eluents: A: H₂O, 0.1% FA + 0.02% TFA and B: MeCN/H₂O (90 : 10, v/v), 0.1% FA + 0.02% TFA, and a linear gradient program: 5% to 100% of B in 15 min, 100% B for 3 min, 100% to 5% B in 0.1 min and 5% B for 6 min, at a flow rate of 0.3 mL/min, at 80 °C. Multicharged mass spectra were deconvoluted with the Protein Deconvolution 2.0 software (Thermo Scientific).

Purifications by semi-preparative RP-HPLC were performed on an UltiMate 3000 system Dionex (Thermo Scientific) equipped with an UV-visible detector, on the following columns: BetaBasic-18 column (Thermo Scientific) (5 μm , 150 \AA , 150 \times 30 mm) at 15 mL/min or SiliaChrom[®] dt C18 column (Silicycle) (10 μm , 100 \AA , 250 \times 20 mm) at 20 mL/min, with HPLC grade eluents. The fractions of interest were analyzed by RP-HPLC-LRMS, pooled, concentrated under reduced pressure to remove organic solvents and freeze-dried.

Thin layer chromatographies (TLC) were performed on silica plates 60F₂₅₄ and revealed under UV light (254/365 nm).

Purifications by flash chromatography were performed on a Puriflash 430 system (Interchim) with prepacked silica columns (25 μm size particles; Interchim) or on a Reveleris[®] X1 IES system (Grace) with prepacked GraceResolv Silica columns (20 μm size particles; Grace). The fractions of interest were analyzed by RP-HPLC-LRMS or TLC, pooled and concentrated under reduced pressure to remove solvents.

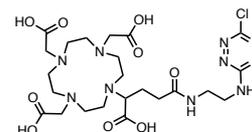
SDS-PAGE analyses were performed on Mini-PROTEAN[®] TGX[™] 4 to 20 % Precast gel (BioRad) in non-reductive conditions. 5 μL of sample solution at a concentration of about 1 mg/mL was mixed with 5 μL of loading buffer and denatured at 90 °C during 5 min. The loading buffer was constituted of 0.125 M Tris HCl, 20% glycerol, 4% SDS and 0.004% bromophenol blue. After loading, the electrophoresis was started (160 V, 45 min) in a running buffer constituted of 0.3% Tris HCl, 1.92 M glycine, 0.1% SDS and 0.05% sodium azide. The protein ladder used as reference was a PageRuler[™] Plus Prestained (Thermo Scientific). For visualization of fluorescent sulfonated Cyanine 5.0-, IRDye700DX- or IR783-conjugates, a fluorescence image of the gel was recorded on an IVIS Lumina III In Vivo Imaging System (Perkin Elmer) in pair filter mode 620/670 nm, 660/710 nm or 740/790 nm, respectively. Bandwidth was of 20 nm for excitation and 40 nm for emission. Then, the gel was stained with Coomassie brilliant blue during 1 h.

CHAPTER I - EXPERIMENTAL PART

Synthesis of compounds 1 to 12

2,2',2''-(10-(1-carboxy-4-((2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid, DOTAGA-NH-Tz-Cl **1**.

2,2',2''-(10-(4-((2-aminoethyl)amino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (DOTAGA-NH₂·1.7H₂O) (243 mg, 443 μmol) was dissolved in borate buffer (0.5 M, pH 8) (7 mL) and the pH was adjusted to pH 8 with NaOH 2.5 M. Then *s*-dichlorotetrazine



(68 mg, 443 μmol, 1.0 eq) in MeCN (2 mL) was added. The reaction was stopped after 2 h at room temperature and solvents were eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) afforded DOTAGA-NH-Tz-Cl·1.5TFA as an orange powder (154 mg, 17%, purity: >99%).

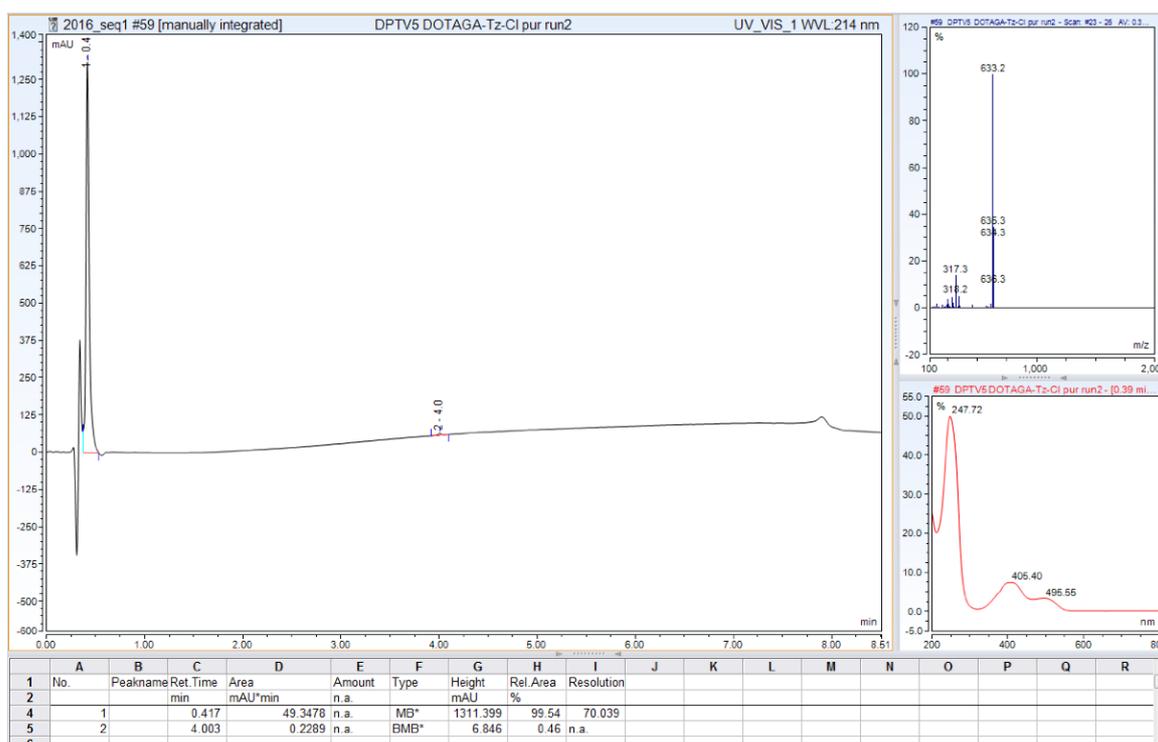
Ionic chromatography analysis indicates an amount of 1.5 TFA per molecule;

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 2.01 (m, 2H; CH₂), 2.55 (m, 2H; CH₂), 2.96 to 3.50 (m, 12H; CH₂), 3.51 (m, 2H; CH₂), 3.53 to 3.68 (m, 4H; CH₂), 3.71 (m, 2H; CH₂), 3.73 to 4.29 (m, 7H; CH, CH₂);

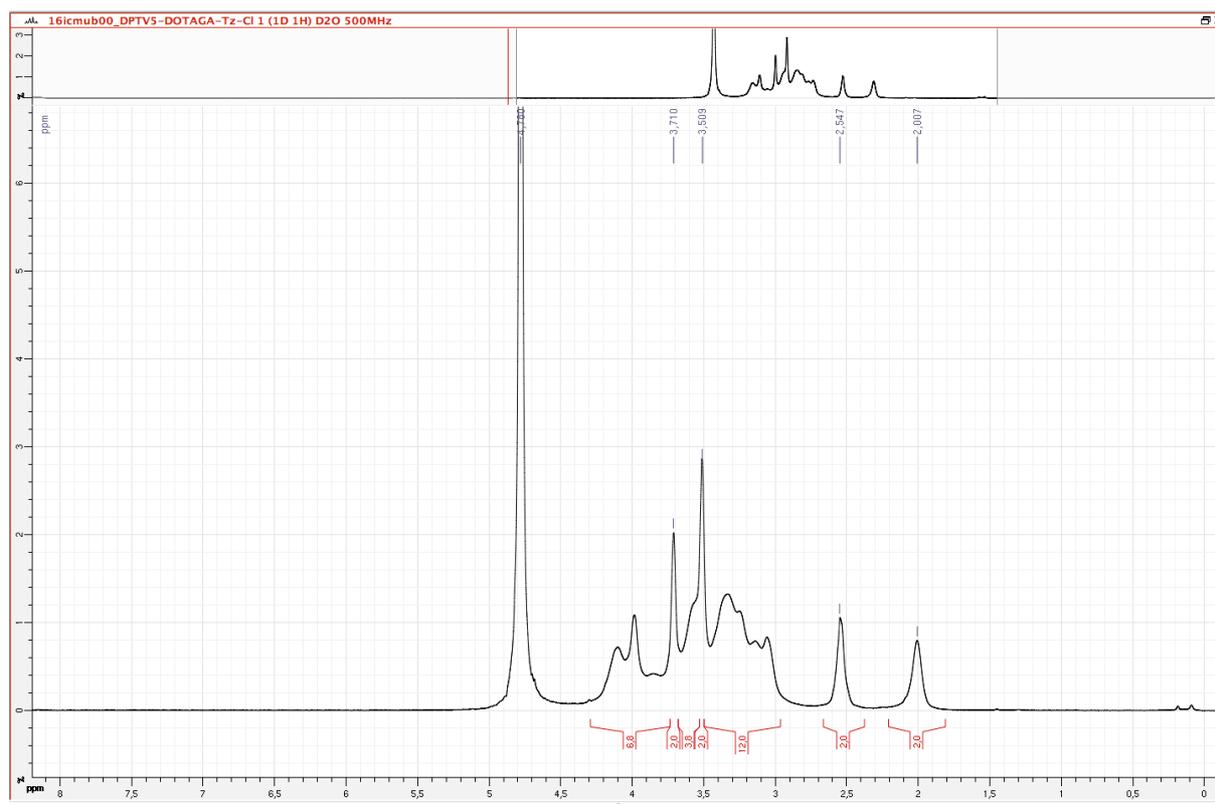
¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 32.9, 38.3, 40.2, 42.2, 44.0 to 64.0, 116.3 (q, ¹J = 290.0 Hz, TFA), 162.8 (poorly resolved, TFA) 158.5, 161.6, 166.0 to 176.0;

LRMS: C₁₉H₃₁ClN₉O₇⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 633.3, found: 633.2.

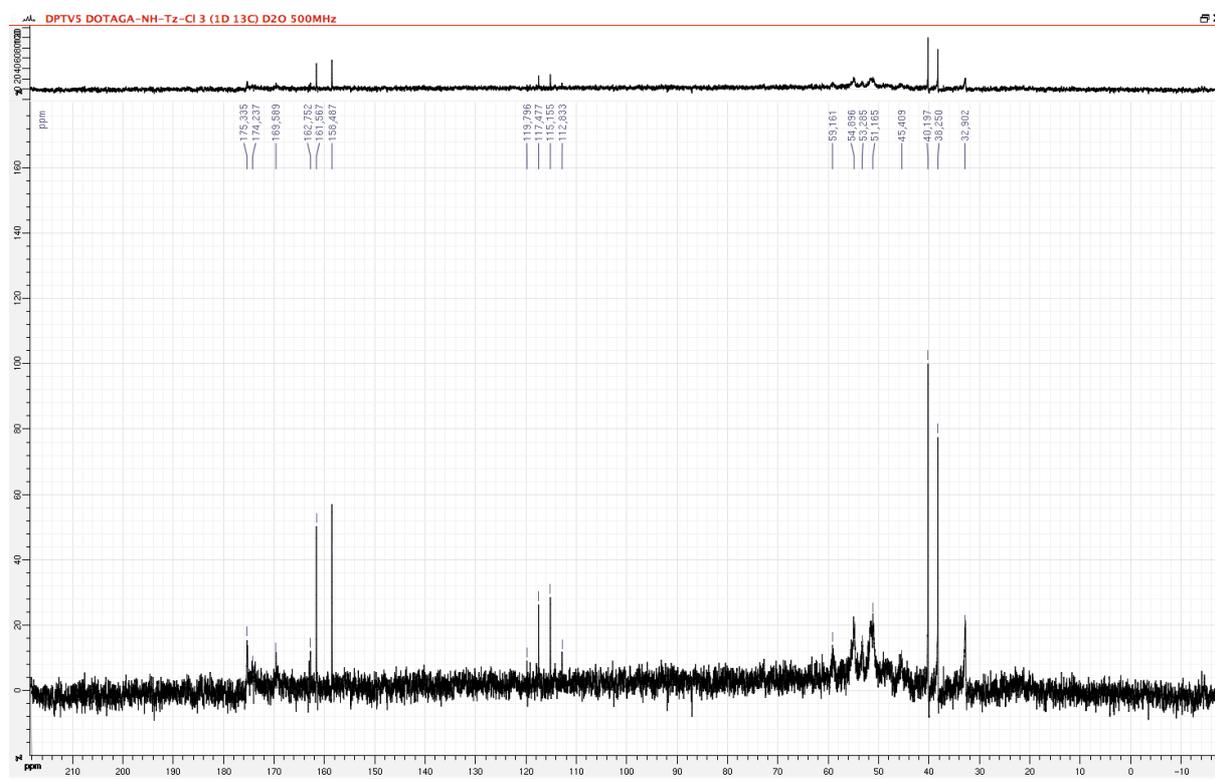
RP-HPLC-LRMS analysis of DOTAGA-NH-Tz-Cl **1**:



¹H NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-Cl 1:

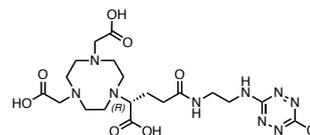


¹³C NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-Cl 1:



(R)-2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid, (R)-NODAGA-NH-Tz-Cl 2.

(R)-2,2'-(7-(4-((2-aminoethyl)amino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid ((R)-NODAGA-NH₂) (95.3 mg, 228 μmol) was dissolved in borate buffer (0.5 M, pH 8) (1 mL) and the pH was adjusted to pH 8 with NaOH 2.5 M. Then s-dichlorotetrazine (34.5 mg, 228 μmol, 1.0 eq) in MeCN (300 μL) was added. The reaction was stopped after 2 h at room temperature and solvents were eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) afforded (R)-NODAGA-NH-Tz-Cl-0.4TFA **2** as an orange powder (43.8 mg, 28%, purity: 85%).

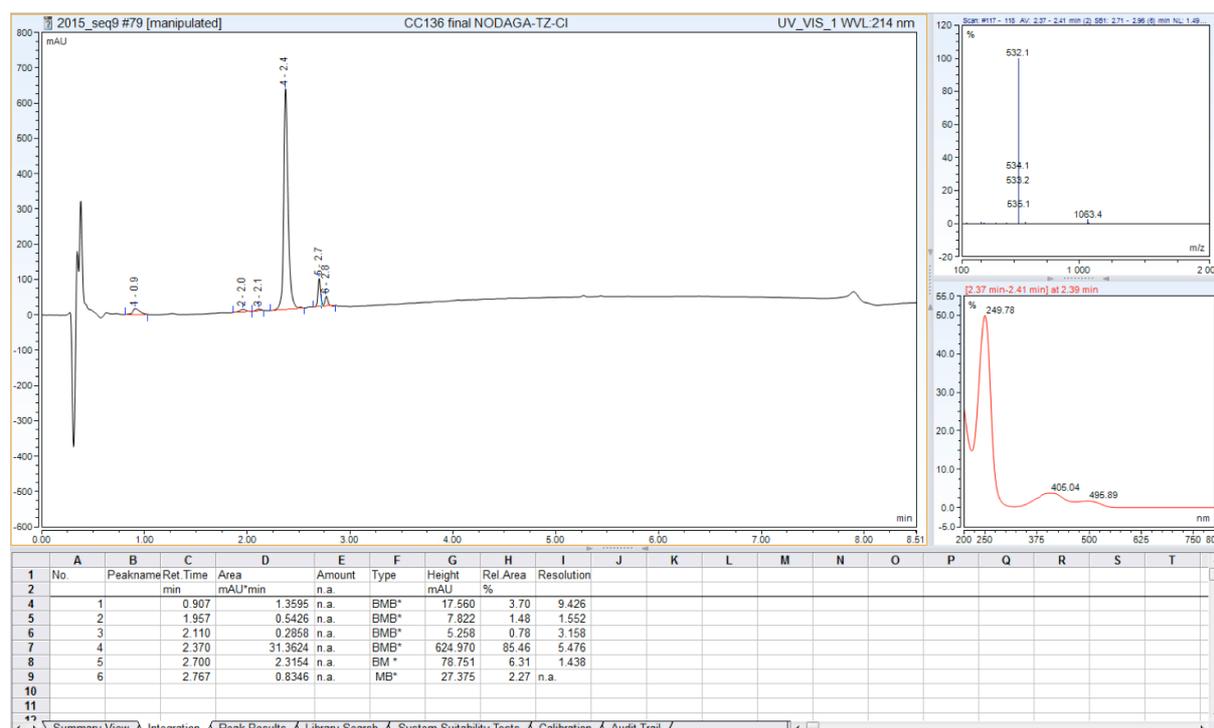


Ionic chromatography analysis indicates an amount of 0.4 TFA per molecule;

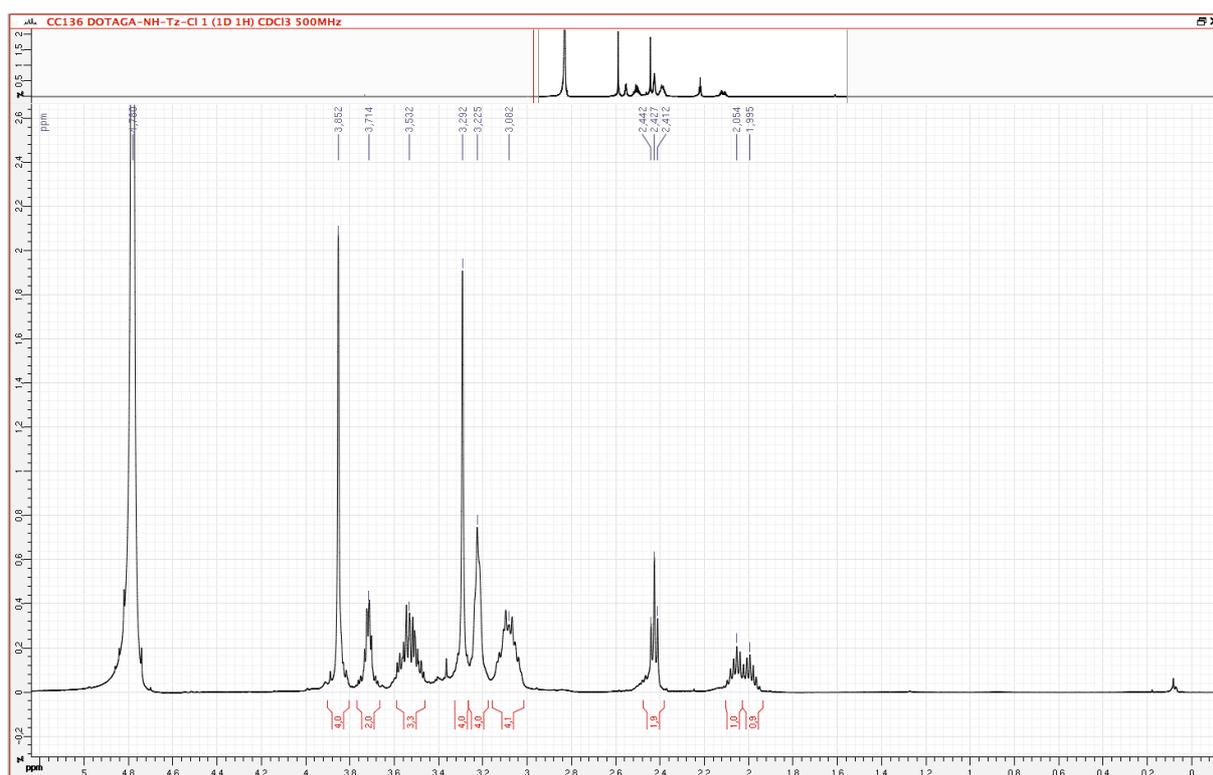
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.02 (m, 2H; CH₂), 2.43 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H; CH₂), 3.01 to 3.15 (m, 4H; CH₂), 3.22 (m, 4H; CH₂), 3.29 (s, 4H; CH₂), 3.46 to 3.59 (m, 3H; CH, CH₂), 3.71 (m, 2H; CH₂), 3.85 (s, 4H; CH₂); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 26.8, 35.1, 40.7, 42.8, 48.5, 51.8, 53.4, 58.8, 66.9, 161.1, 164.2, 175.2, 177.8, 178.2;

HRMS: C₁₉H₃₁ClN₉O₇⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 532.20295, found 532.20241.

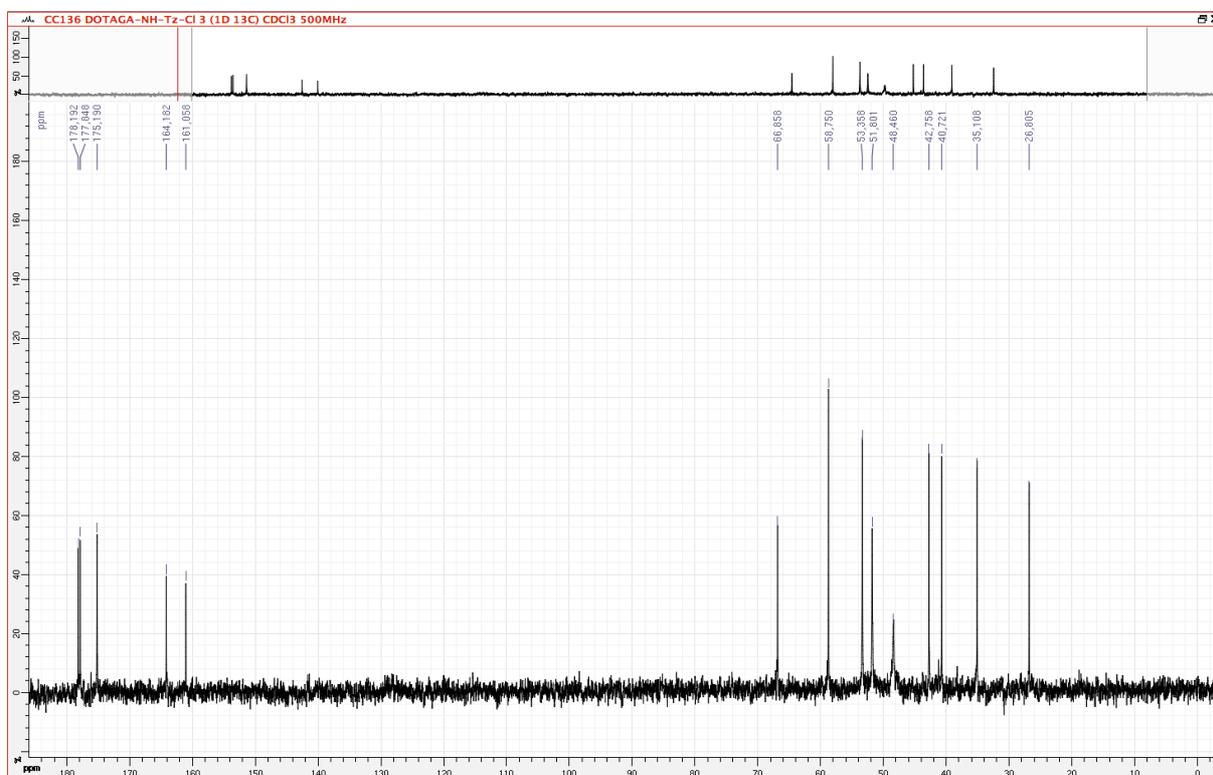
RP-HPLC-LRMS analysis of (R)-NODAGA-NH-Tz-Cl **2**:



¹H NMR spectrum of (R)-NODAGA-NH-Tz-Cl 2:

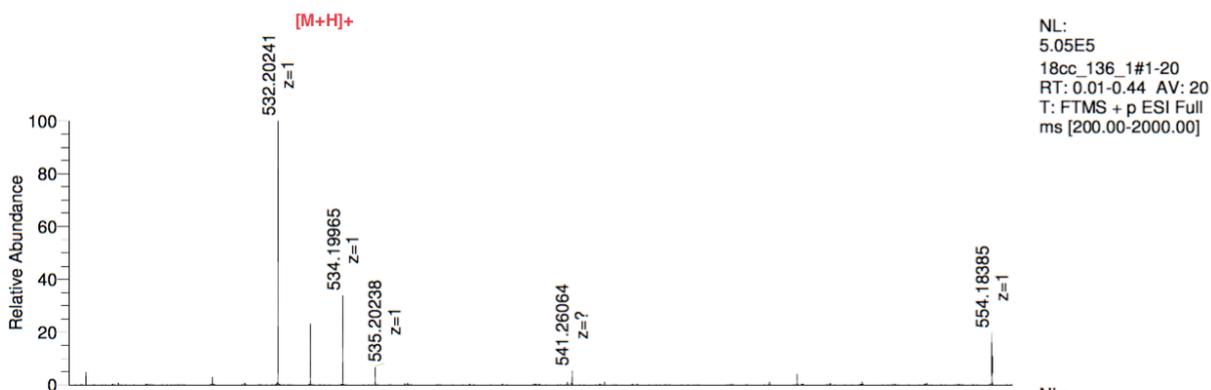
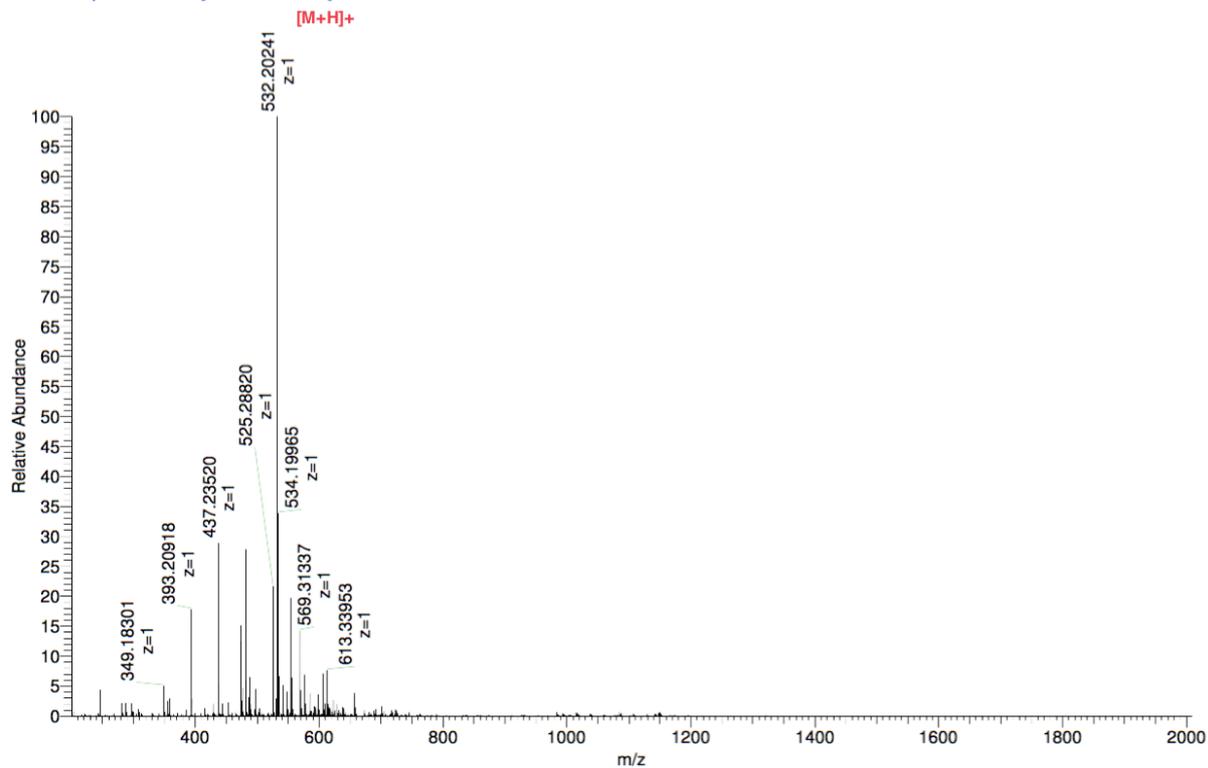


¹³C NMR spectrum of (R)-NODAGA-NH-Tz-Cl 2:

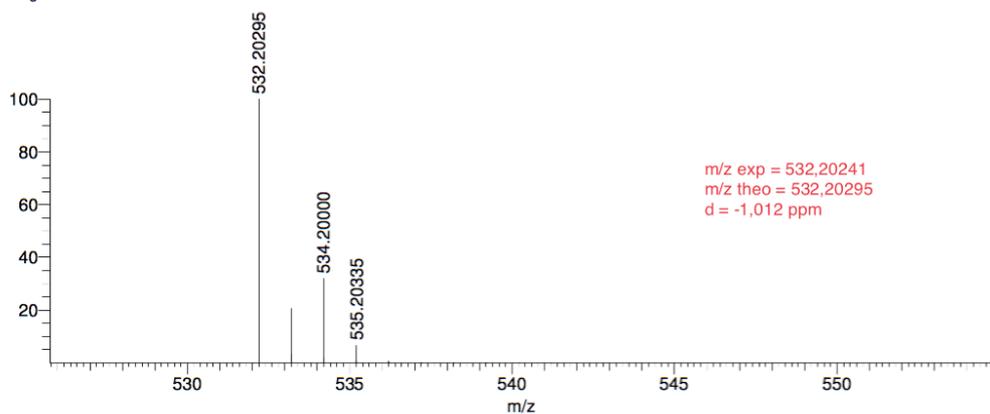


HRMS spectrum of (*R*)-NODAGA-NH-Tz-Cl **2** and comparison with simulated spectrum:

18cc_136_1 #1-20 RT: 0.01-0.44 AV: 20 NL: 5.05E5
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]



NL:
5.05E5
18cc_136_1#1-20
RT: 0.01-0.44 AV: 20
T: FTMS + p ESI Full
ms [200.00-2000.00]

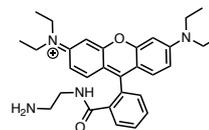


NL:
5.85E5
C₁₉H₃₀ClN₉O₇+H:
C₁₉H₃₁Cl₁N₉O₇
pa Chrg 1

m/z exp = 532.20241
m/z theo = 532.20295
d = -1,012 ppm

***N*-(9-(2-((2-aminoethyl)carbamoyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-ylidene)-*N*-ethylethanaminium, Rhodamine B-NH₂ 3.**

The chloride salt of *N*-(9-(2-carboxyphenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-ylidene)-*N*-ethylethanaminium (Rhodamine B·1Cl) (300 mg, 626 μmol), TSTU (225 mg, 748 μmol, 1.2 eq) and DIPEA (130 μL, 748 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). The solution was stirred 20 min at room temperature and ethylene diamine (416 μL, 6.24 mmol, 10 eq) and DIPEA (702 μL, 4.05 mmol, 6.5 eq) were added. After 1 h at room temperature, the reaction was placed at 4 °C. After 12h, the reaction was completed and solvents were eliminated under reduced pressure. The purification of the crude product by flash chromatography (eluent: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) yielded Rhodamine B-NH₂·1.9TFA as a purple powder (314 mg, 67%, purity: 94%).



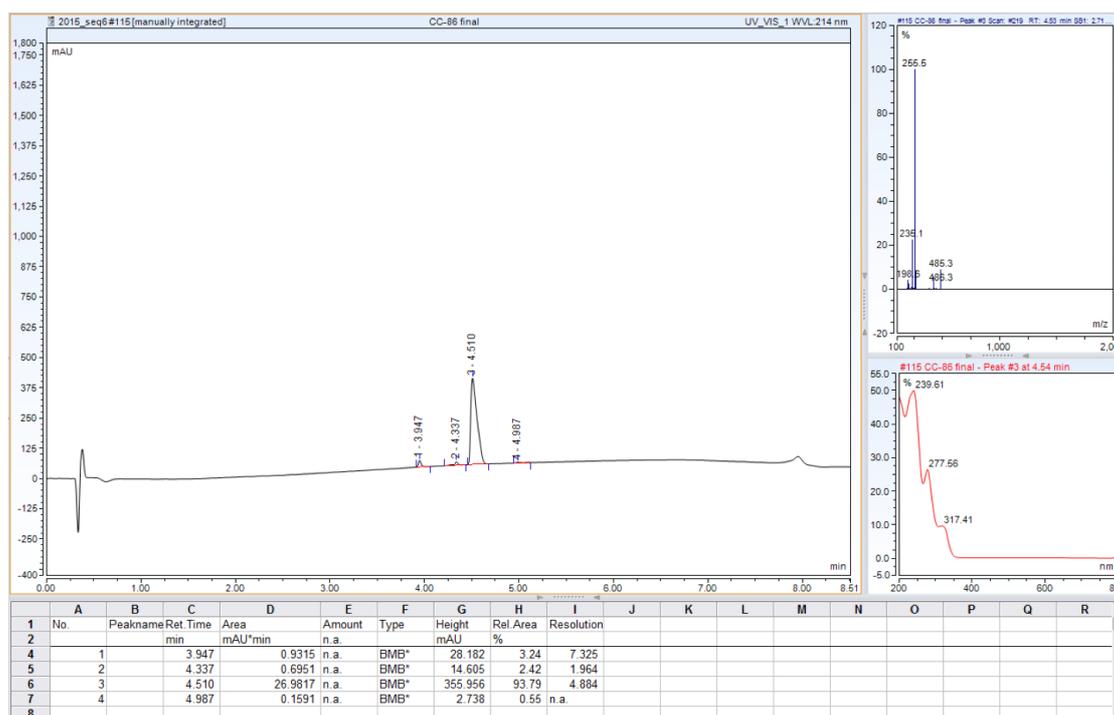
Ionic chromatography analysis indicates an amount of 1.9 TFA per molecule;

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) equilibrium between two forms, non-cyclic amide:lactam (1:0.1), non-cyclic amide form: δ 1.17 (t, ³J = 7.1 Hz, 12H; CH₃), 2.65 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H; CH₂), 3.42 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H; CH₂), 3.47 (q, ³J = 7.1 Hz, 8H; CH₂), 6.62 (m, 4H; CH), 6.76 (m, 2H; CH), 7.11 (m, 1H; CH), 7.60 (m, 2H; CH), 7.94 (m, 1H; CH), lactam form: δ 1.31 (t, ³J = 7.1 Hz, 12H; CH₃), 2.94 (m, 2H; CH₂), 3.36 (m, 2H; CH₂), 3.68 (q, ³J = 7.1 Hz, 8H; CH₂), 6.94 to 7.06 (m, 4H; CH), 7.21 (m, 2H; CH), 7.44 (m, 1H; CH), 7.79 (m, 2H; CH), 8.03 (m, 1H; CH);

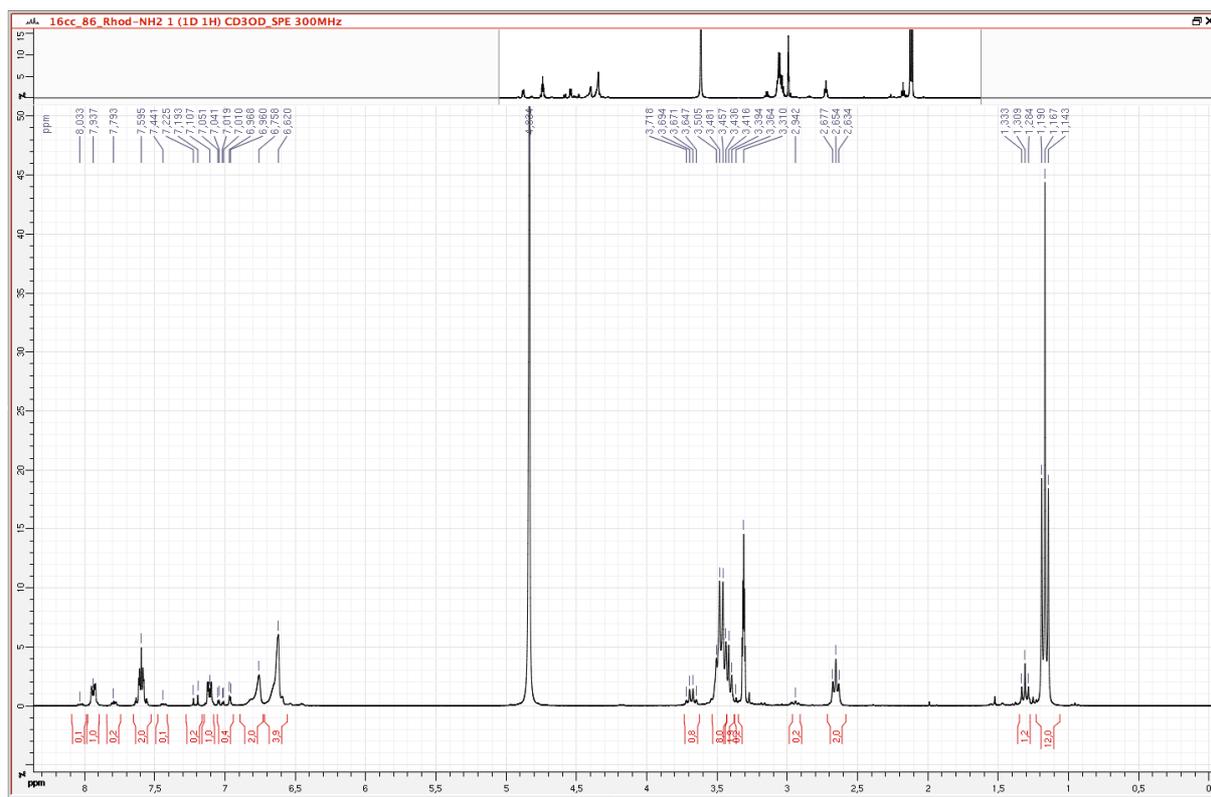
¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) equilibrium between two forms non-cyclic amide:lactam (1:0.1), non-cyclic amide form: δ 12.5, 39.2, 40.3, 47.6, 102.2, 112.0, 115.4, 124.2, 125.3, 129.4, 130.1, 130.2, 131.3, 148.6, 151.1, 154.7, 154.9, 171.3, lactam form signals were poorly resolved and were not attributed;

LRMS: C₃₀H₃₈N₄O₂⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 486.3, found: 486.3.

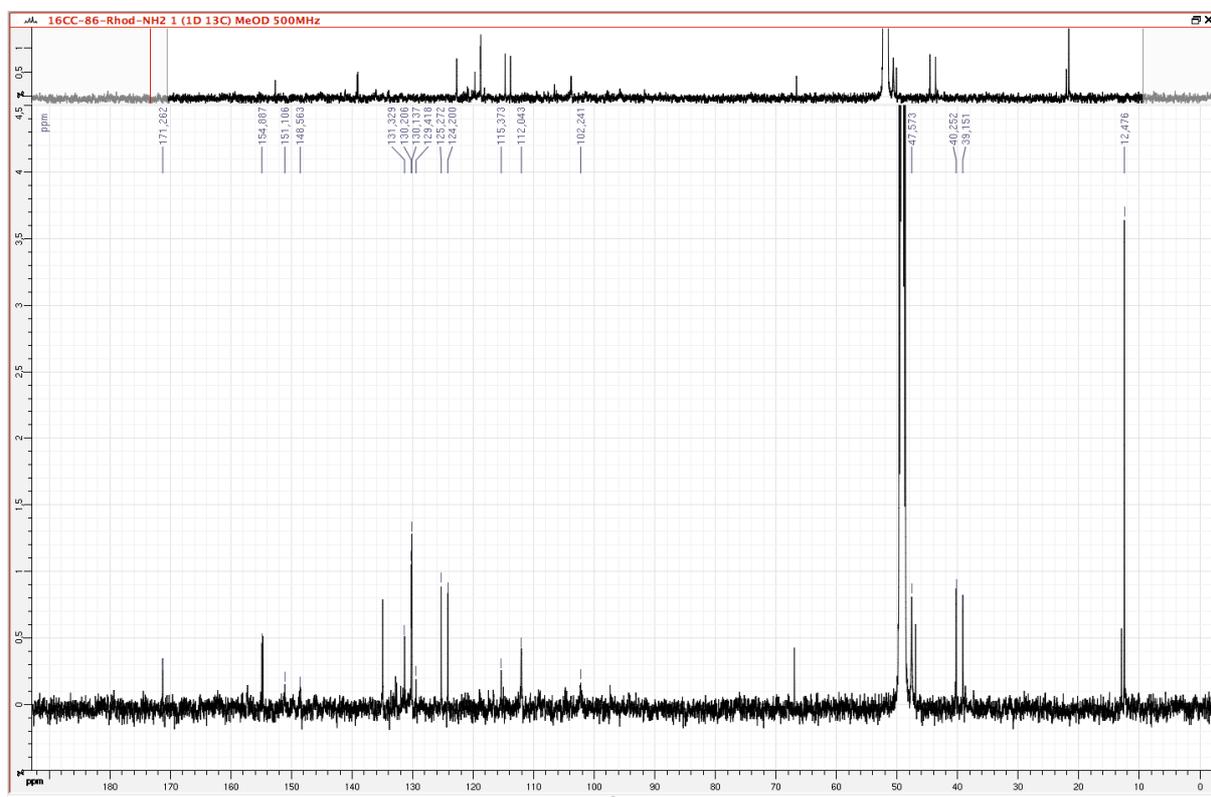
RP-HPLC-LRMS analysis of Rhodamine B-NH₂ 3:



^1H NMR spectrum of Rhodamine B-NH₂ 3:

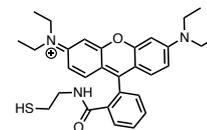


^{13}C NMR spectrum of Rhodamine B-NH₂ 3:



***N*-(6-(diethylamino)-9-(2-((2-mercaptoethyl)carbamoyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-ylidene)-*N*-ethylethanaminium, Rhodamine B-SH 4.**

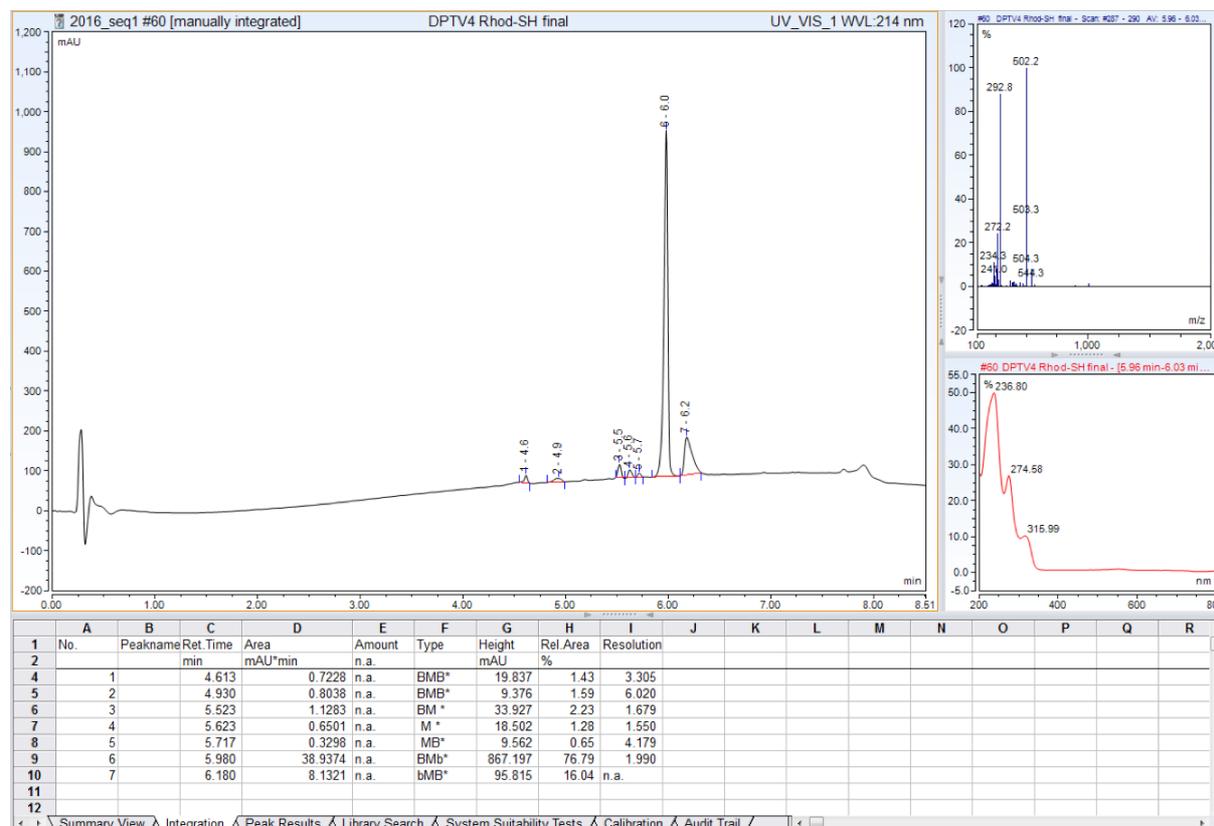
Rhodamine B·1Cl (200 mg, 418 μmol), HATU (191 mg, 502 μmol, 1.2 eq) and DIPEA (87 μL, 502 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). The solution was stirred 2 h at room temperature and cysteamine hydrochloride (95 mg, 836 μmol, 2.0 eq) and DIPEA (139 μL, 836 μmol, 2.0 eq) were added.



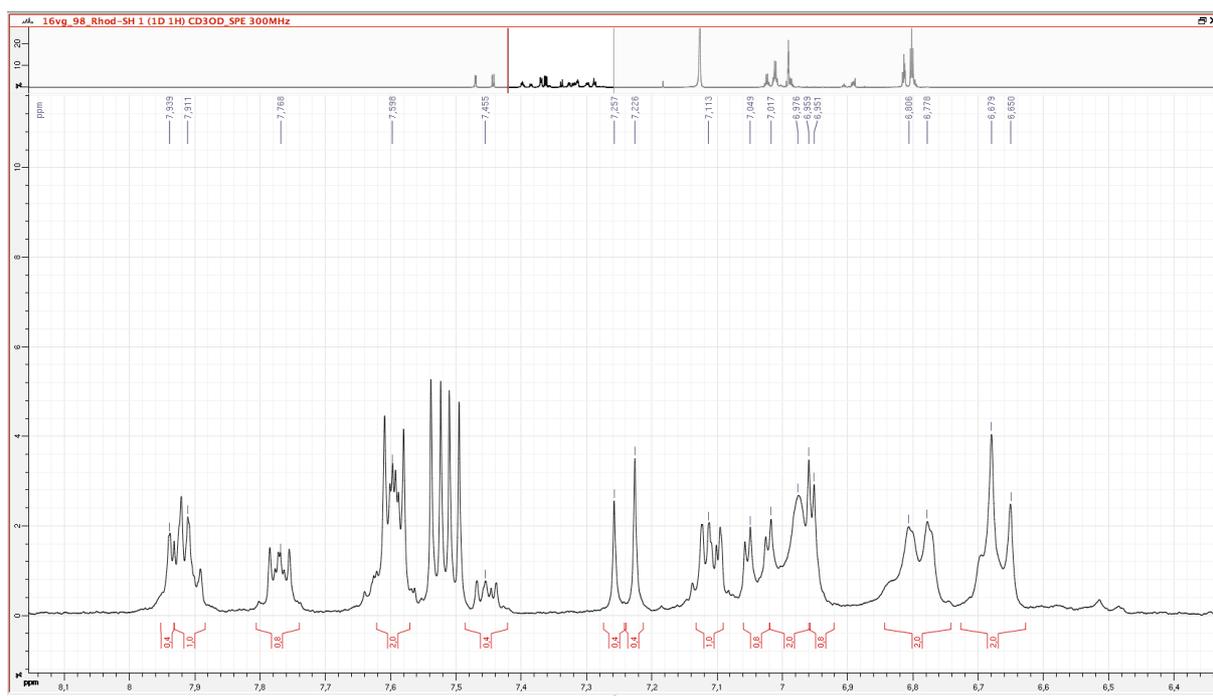
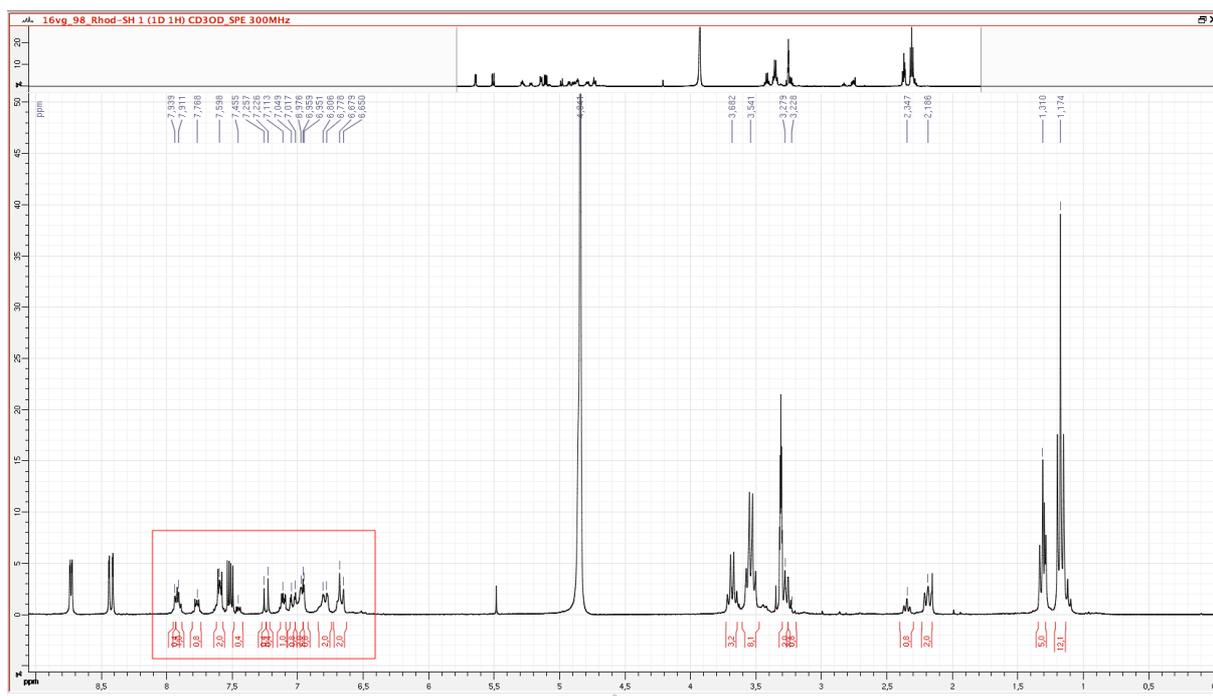
After 2 h at room temperature, the DMF was eliminated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica (eluents: DCM/MeOH) afforded Rhodamine B-SH·1Cl as a purple powder (179.3 mg, 61%, purity: 77%).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) equilibrium between two forms, lactam/non-cyclic amide (1:0.4), non-cyclic amide form: δ 1.17 (t, ³J = 7.1 Hz, 12H; CH₃), 2.19 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H; CH₂), 3.28 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H; CH₂), 3.54 (q, ³J = 7.1 Hz, 8H; CH₂), 6.63 to 6.73 (m, 2H; CH), 6.74 to 6.84 (m, 2H; CH), 6.98 (m, 2H; CH), 7.11 (m, 1H; CH), 7.60 (m, 2H; CH), 7.91 (m, 1H; CH), lactam form: δ 1.31 (t, ³J = 7.1 Hz, 12H; CH₃), 2.35 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H; CH₂), 3.23 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H; CH₂), 3.68 (q, ³J = 7.1 Hz, 8H; CH₂), 6.92 to 6.96 (m, 2H; CH), 7.02 to 7.06 (m, 2H; CH), 7.23 (s, 1H; CH), 7.26 (s, 1H; CH), 7.46 (m, 1H; CH), 7.77 (m, 2H; CH), 7.94 (m, 1H; CH); some non-attributed impurities were detected at 7.52, 8.43 and 8.73; LRMS: C₃₀H₃₆N₃O₂S⁺ ([M]⁺) m/z calculated: 502.3, found: 502.2.

RP-HPLC-LRMS analysis of Rhodamine B-SH 4:

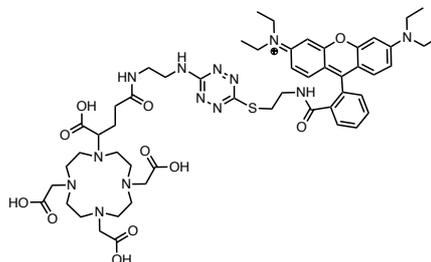


^1H NMR spectrum of Rhodamine B-SH **4** and magnification of the region between 6.3 and 8.1 ppm:



***N*-(9-(2-(((6-((2-(4-carboxy-4-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)ethyl)amino)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)thio)ethyl)carbamoyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-ylidene)-*N*-ethylethanaminium, DOTAGA-NH-Tz-S-Rhodamine B 5.**

DOTAGA-NH-Tz-Cl·1.5TFA **1** (50.0 mg, 45.9 μmol) and rhodamine B-SH-Cl **4** (39.7 mg, 73.9 μmol, 1.6 eq) were dissolved in anhydrous DMF and DIPEA (65.7 μL, 395 μmol, 8.5 eq) was added. After 3 h at 75 °C, the solvent was removed under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) afforded DOTAGA-NH-Tz-S-Rhodamine B·2.9TFA as a red oil (37.0 mg, 51%, purity: 91%).



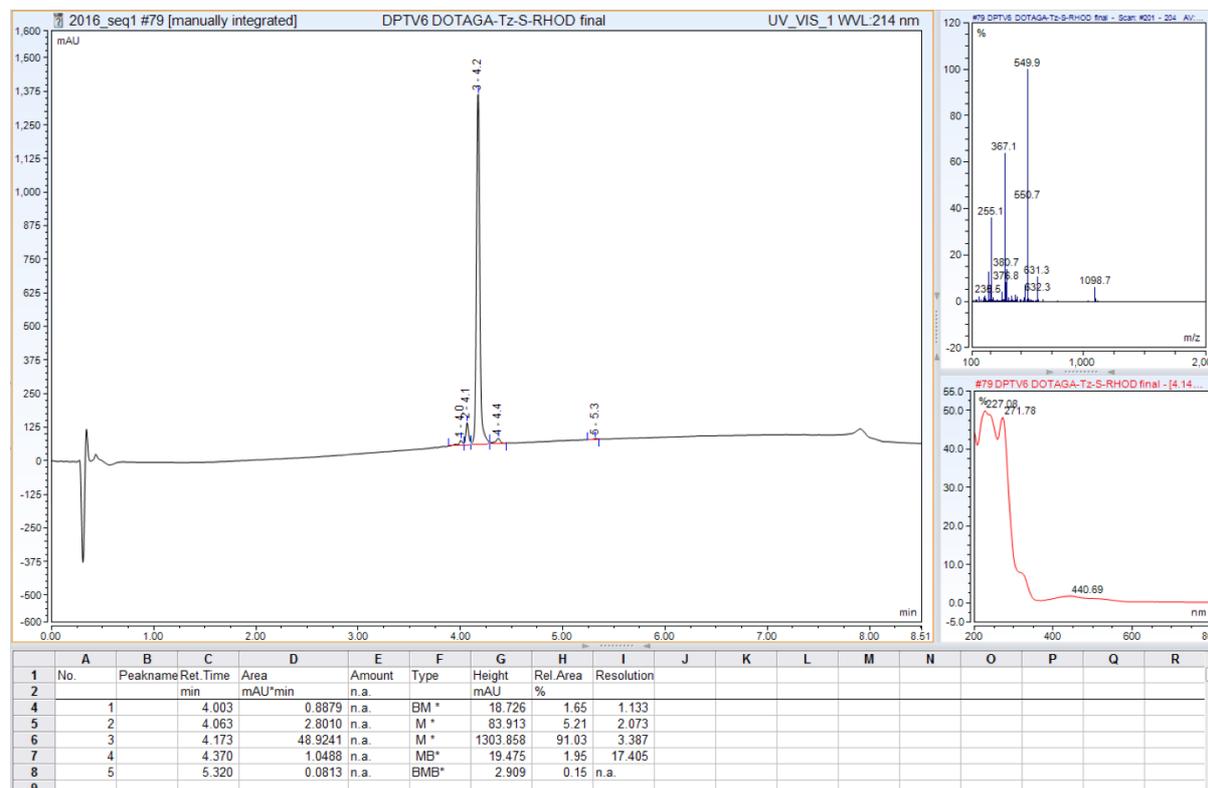
Ionic chromatography analysis indicates an amount of 2.9 TFA per molecule;

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.13 (m, 12H; CH₃), 2.01 (m, 2H; CH₂), 2.56 (m, 2H; CH₂), 2.96 (m, 2H; CH₂), 3.00 to 3.48 (m, 12H; CH₂), 3.48 to 3.63 (m, 8H; CH₂), 3.69 (m, 10H; CH₂), 3.74 to 4.37 (m, 6H; CH₂), 3.99 (m, 1H; CH), 7.11 (m, 2H; CH), 7.24 (m, 3H; CH), 7.63 (m, 2H; CH), 7.72 (m, 2H; CH), 8.02 (m, 1H; CH);

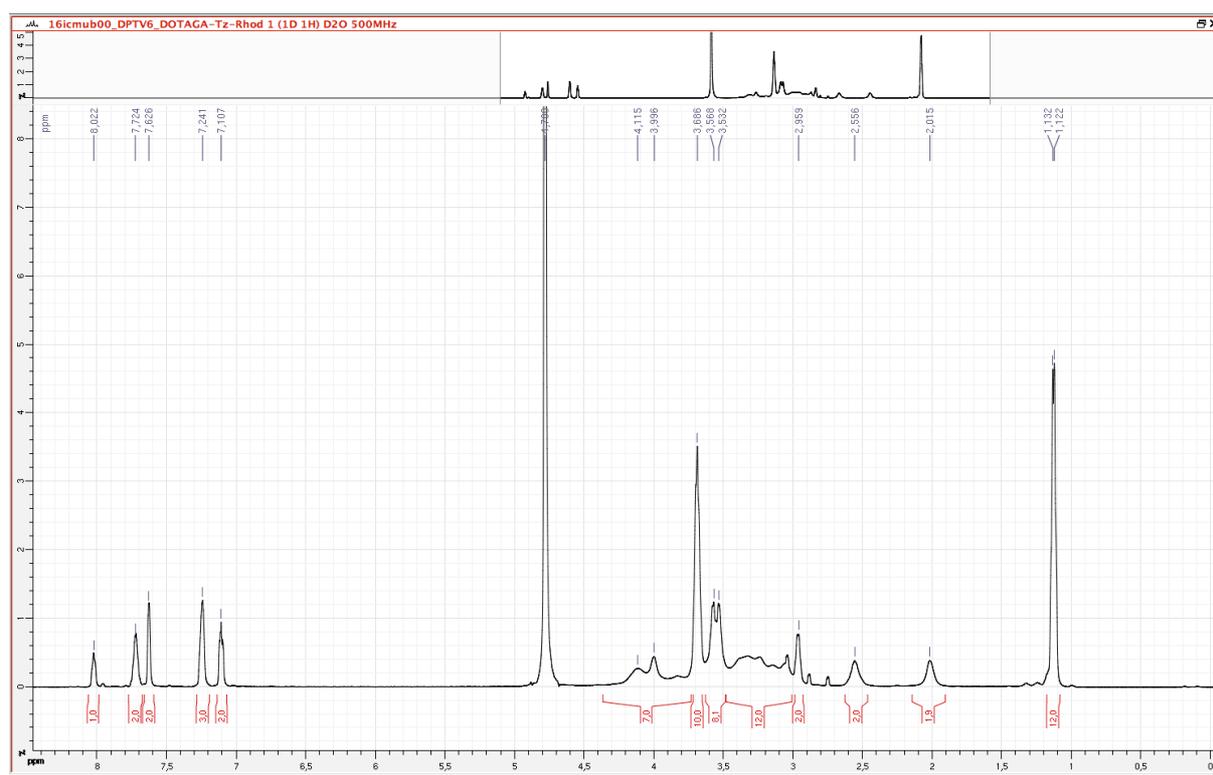
¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 9.7, 28.3, 39.7, 40.1, 53.8, 64.4, 112.1, 116.4 (q, ¹J = 290.1 Hz, TFA), 118.2, 120.3, 123.4, 124.0, 129.2, 130.1, 131.2, 134.6, 138.5, 151.9, 152.1, 160.9, 162.9 (q, ²J = 35.2 Hz, TFA), 164.4, 170.7, macrocycle CH₂ signals were not distinguishable;

HRMS: C₅₃H₇₂N₁₃O₁₁S⁺ ([M]⁺) m/z calculated: 1098.51895, found: 1098.52126; C₅₃H₇₁N₁₃NaO₁₁S⁺ ([M+Na]⁺) m/z calculated: 1120.50089, found: 1120.50291; C₅₃H₇₀KN₁₃NaO₁₁S⁺ ([M-H+Na+K]⁺) m/z calculated: 1158.45677, found: 1158.45431.

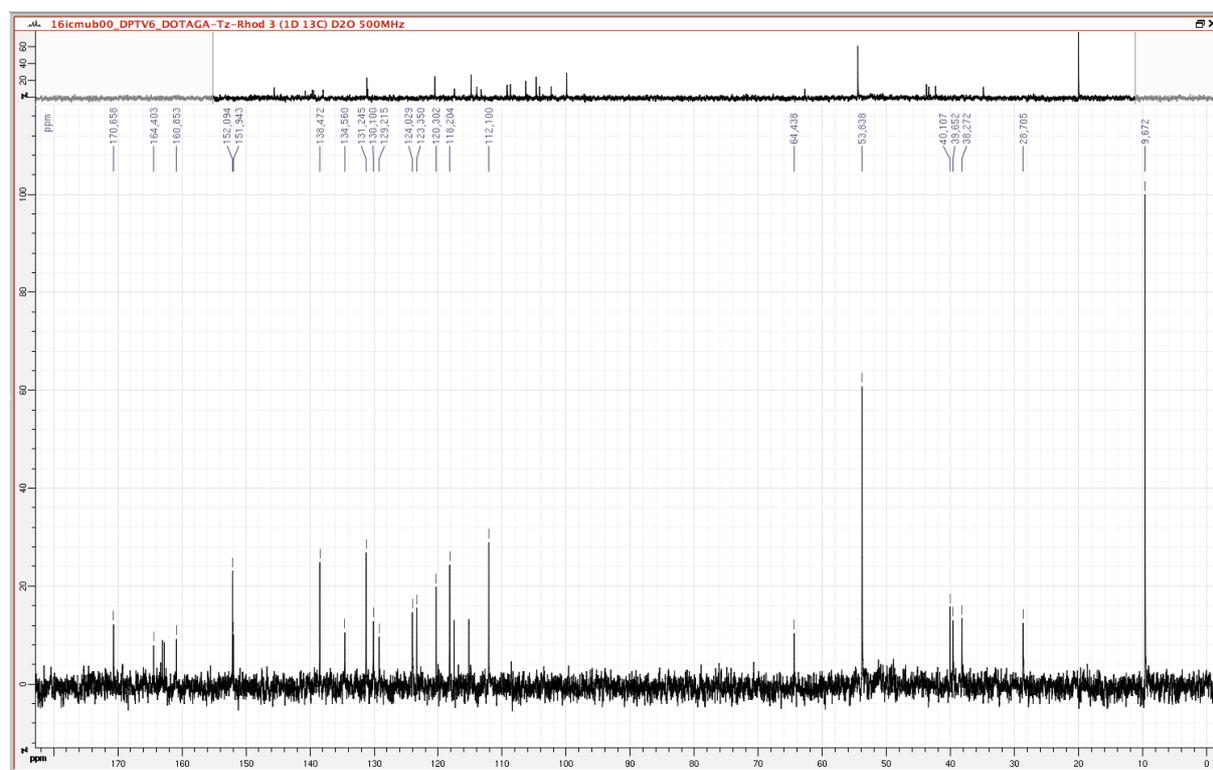
RP-HPLC-LRMS analysis of DOTAGA-NH-Tz-S-Rhodamine B 5:



^1H NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-Rhodamine B 5:

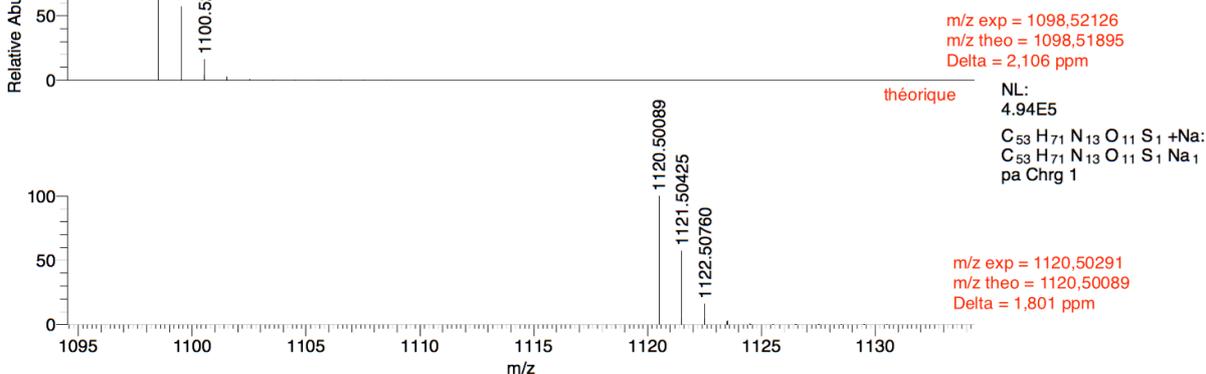
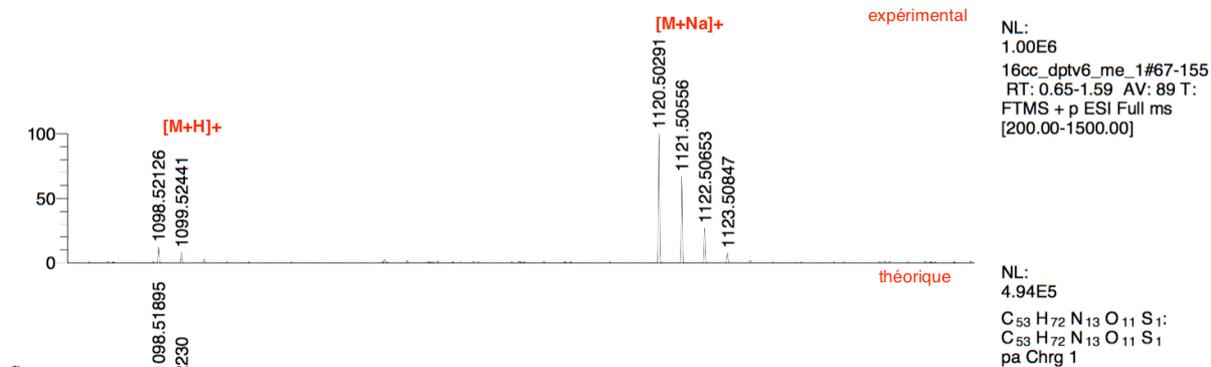
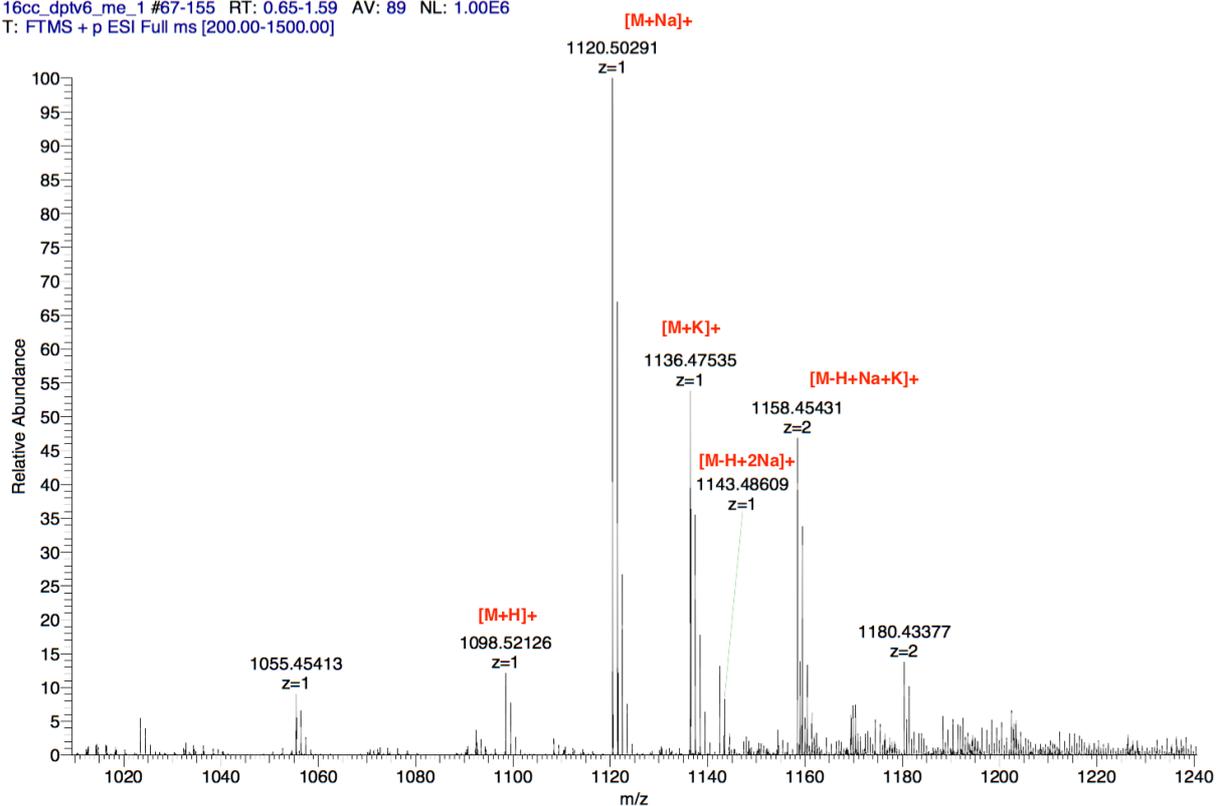


^{13}C NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-Rhodamine B 5:



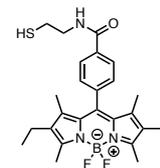
HRMS spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-Rhodamine B 5 and comparison with simulated spectrum:

16cc_dptv6_me_1 #67-155 RT: 0.65-1.59 AV: 89 NL: 1.00E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-1500.00]



4-(2,8-diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-N-(2-mercaptoethyl)benzamide, BODIPY-SH 6.

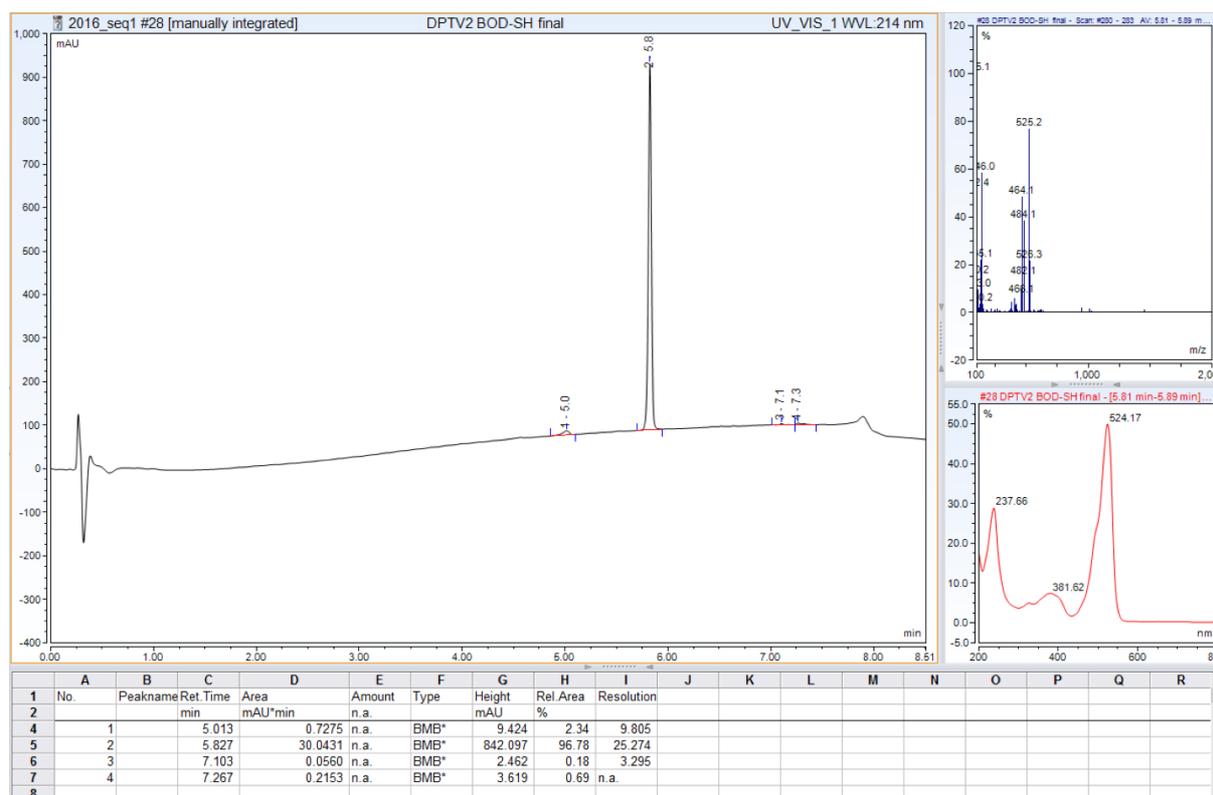
4-(2,8-diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-N-(2-mercaptoethyl)benzoic acid (BODIPY-COOH) (100 mg, 235 μmol) and carbonyldiimidazole (46 mg, 282 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF. The solution was stirred 1 h at room temperature and cysteamine hydrochloride (54 mg, 470 μmol, 2.0 eq) was added. After 20 min at room temperature, the solvent was eliminated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica (eluents: DCM, MeOH) yielded BODIPY-SH as a red powder (65.0 mg, 55%, purity: 97%).



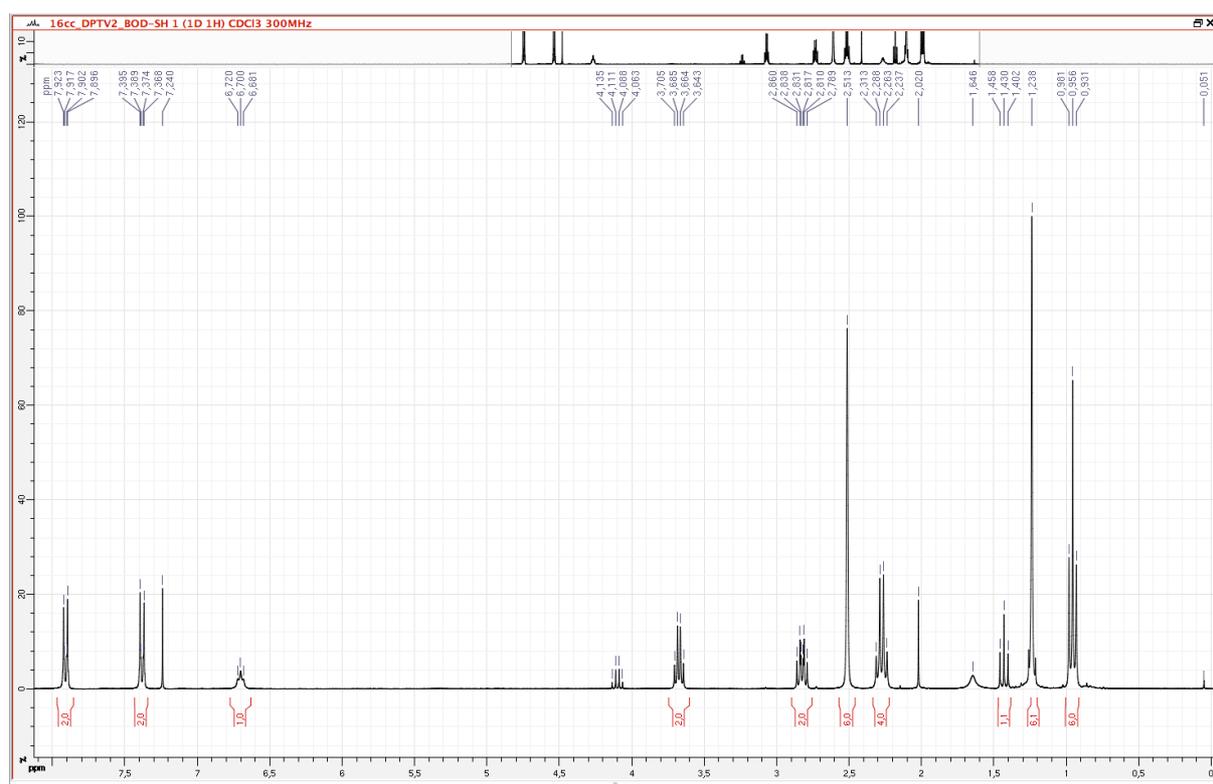
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.95 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H; CH₃), 1.23 (s, 6H; CH₃), 1.43 (t, ³J = 8.4 Hz, 1H; SH), 2.27 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H; CH₂), 2.51 (s, 6H; CH₃), 2.81 (dt, ³J = 8.4, 6.3 Hz, 2H; CH₂), 3.66 (dt, ³J = 5.7, 6.3 Hz, 2H; CH₂), 6.70 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H; NH), 7.37 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H; CH), 8.18 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H; CH); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 12.1, 12.8, 14.8, 17.3, 24.9, 43.1, 127.9, 129.1, 130.6, 133.3, 134.8, 138.3, 138.9, 139.7, 154.5, 166.9;

LRMS: m/z calculated for C₂₆H₃₂BFN₃OS⁺ [M-F]⁺ 464.2, found 464.1.

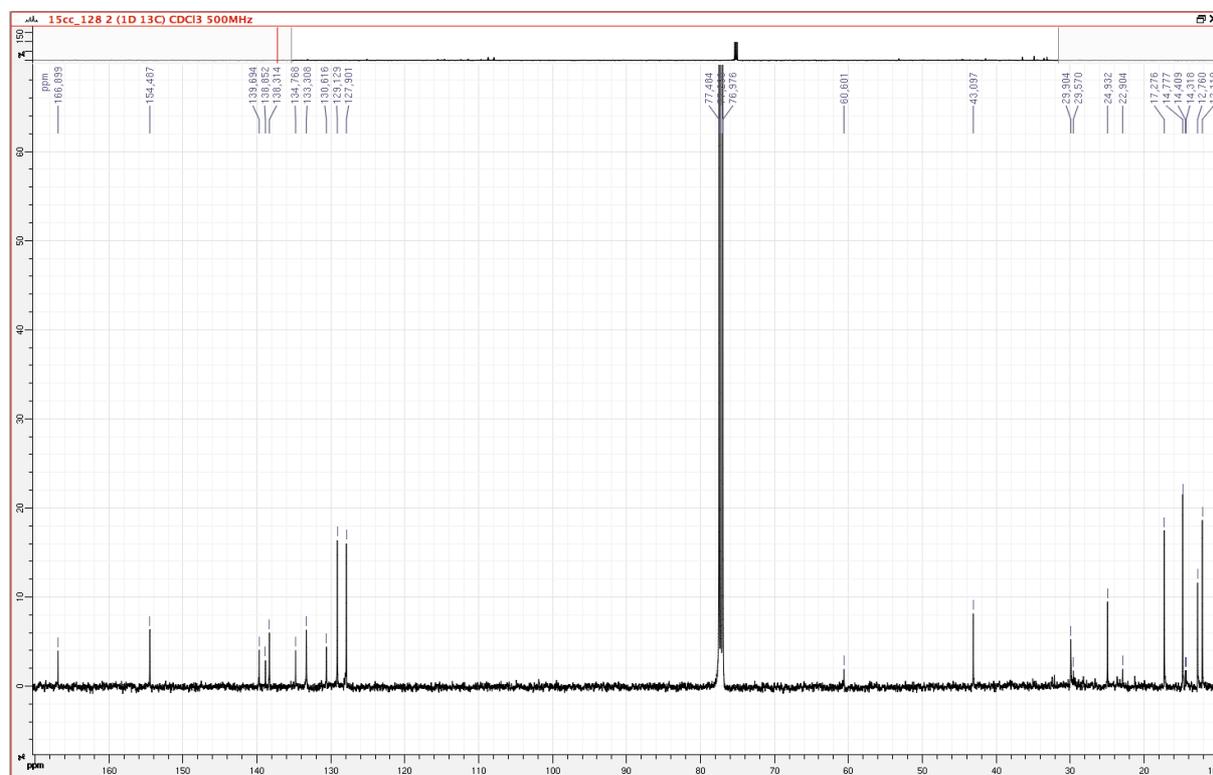
RP-HPLC-LRMS analysis of BODIPY-SH 6:



¹H NMR spectrum of BODIPY-SH 6:

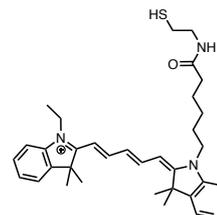


¹³C NMR spectrum of BODIPY-SH 6:



1-ethyl-2-((1*E*,3*E*)-5-((*E*)-1-(6-((2-mercaptoethyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3*H*-indol-1-ium, Cyanine 5.0-SH 7.

The TFA salt of 2-((1*E*,3*E*)-5-((*E*)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3*H*-indol-1-ium (Cyanine 5.0-COOH·1TFA) (20.0 mg, 32.7 μmol), TSTU (11.8 mg, 39.3 μmol, 1.2 eq) and DIPEA (6.9 μL, 39.3 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (800 μL). The solution was stirred 10 min at room temperature and cysteamine hydrochloride (7.4 mg, 65.4 μmol, 2.0 eq) and DIPEA (11.4 μL, 65.4 μmol, 2.0 eq) were added. After 1 h at room temperature, DTT (13.1 mg, 85.0 μmol, 2.6 eq) and water (400 μL) were added and the solution was stirred 7 h at room temperature. The DMF was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluent: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) gave Cyanine 5.0-SH·1TFA **7** as a blue powder (22.2 mg, 89%, purity: 88%).

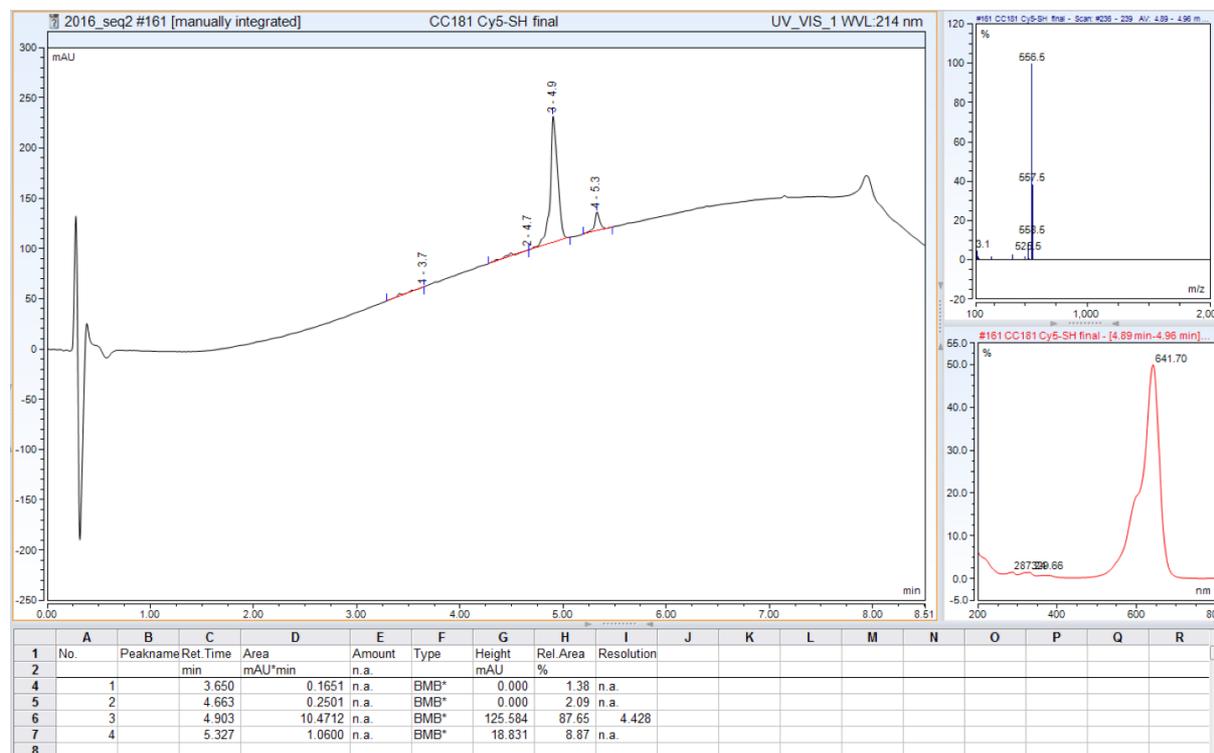


¹H NMR (500 MHz, CD₃CN+D₂O) δ 1.34 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H; CH₃), 1.42 (m, 2H; CH₂), 1.60 (m, 1H; SH), 1.63 (m, 2H; CH₂), 1.66 (s, 12H; CH₃), 1.78 (m, 2H; CH₂), 2.13 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H; CH₂), 2.54 (m, 2H, CH₂), 2.72 to 3.22 (non-identified impurity) 3.27 (m, 2H, CH₂), 4.00 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H; CH₂), 4.06 (q, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 6.22 (d, ³J = 13.7 Hz, 2H; CH), 6.55 (t, ³J = 12.5 Hz, 1H; CH), 6.74 (bs, 1H, NH), 7.25 (m, 4H, CH), 7.40 (m, 2H, CH), 7.48 (m, 2H, CH), 8.08 (dd, ³J = 13.7, 12.5 Hz, 2H, CH);

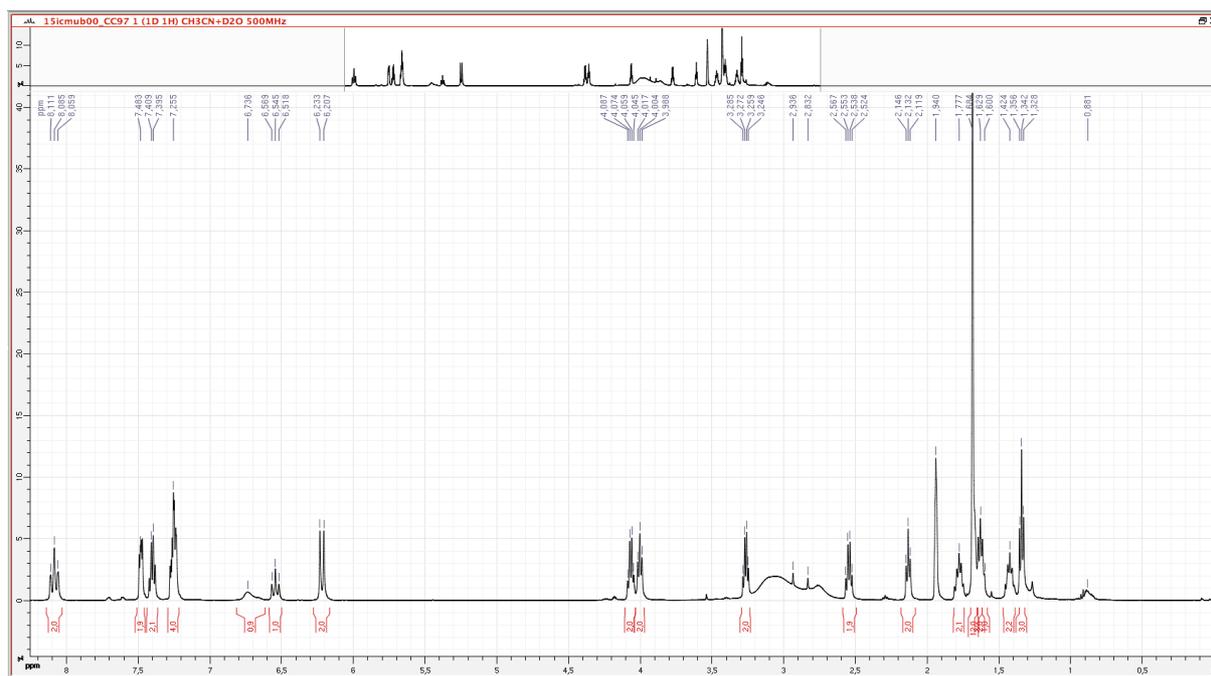
¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN+D₂O) δ 13.0, 25.2 (2C), 26.4, 27.4, 28.1, 28.2, 36.8, 40.5, 43.6, 45.3, 50.6, 50.7, 104.1, 104.4, 112.2, 112.4, 123.6, 123.7, 125.9, 126.4 (2C), 129.9, 130.0, 142.8, 143.0, 143.3, 143.7, 155.2, 155.3, 174.1, 174.4, 174.8;

LRMS: C₃₅H₄₆N₃O⁺ ([M]⁺) m/z calculated: 556.3, found: 556.5.

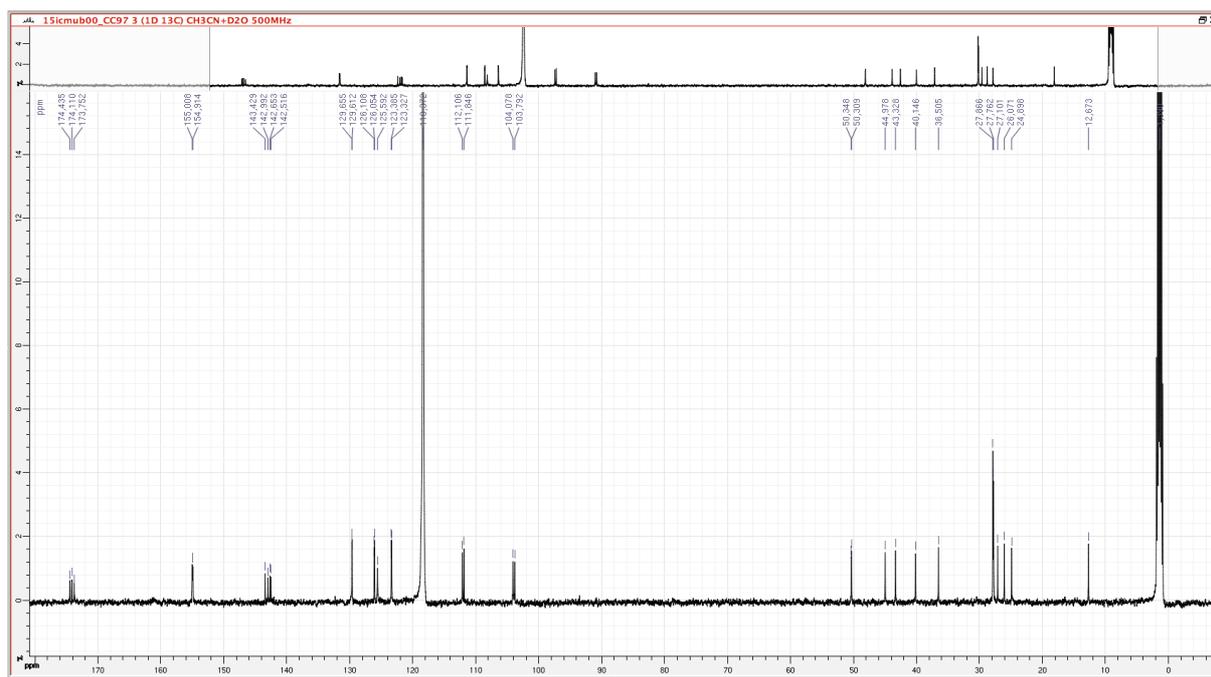
RP-HPLC-LRMS analysis of Cyanine 5.0-SH **7**:



^1H NMR spectrum of Cyanine 5.0-SH 7:

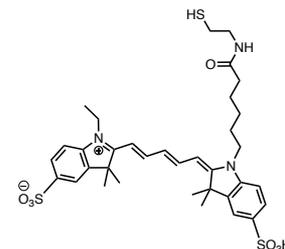


^{13}C NMR spectrum of Cyanine 5.0-SH 7:



1-ethyl-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2-mercaptoethyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate, sulfonated Cyanine 5.0-SH **8.**

2-((1E,3E)-5-((E)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate (sulfonated Cyanine 5.0-COOH) (16.0 mg, 24.4 μmol), TSTU (8.8 mg, 29.2 μmol , 1.2 eq) and DIPEA (15.3 μL , 87.6 μmol , 3.6 eq) were dissolved in anhydrous DMF (500 μL). The solution was stirred 5 min at room temperature and cystamine dihydrochloride (8.2 mg, 36.5 μmol , 1.5 eq), dissolved in 500 μL of borate buffer (0.5 M, pH 8) and DIPEA (3.2 μL , 18.4 μmol) was added. After 1 h at room temperature, DTT (6.8 mg, 43.8 μmol , 1.8 eq) was added and the solution was stirred overnight at room temperature. Solvents were eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) yielded sulfonated Cyanine 5.0-SH as a blue powder (7.3 mg, 34%, purity: 82%).

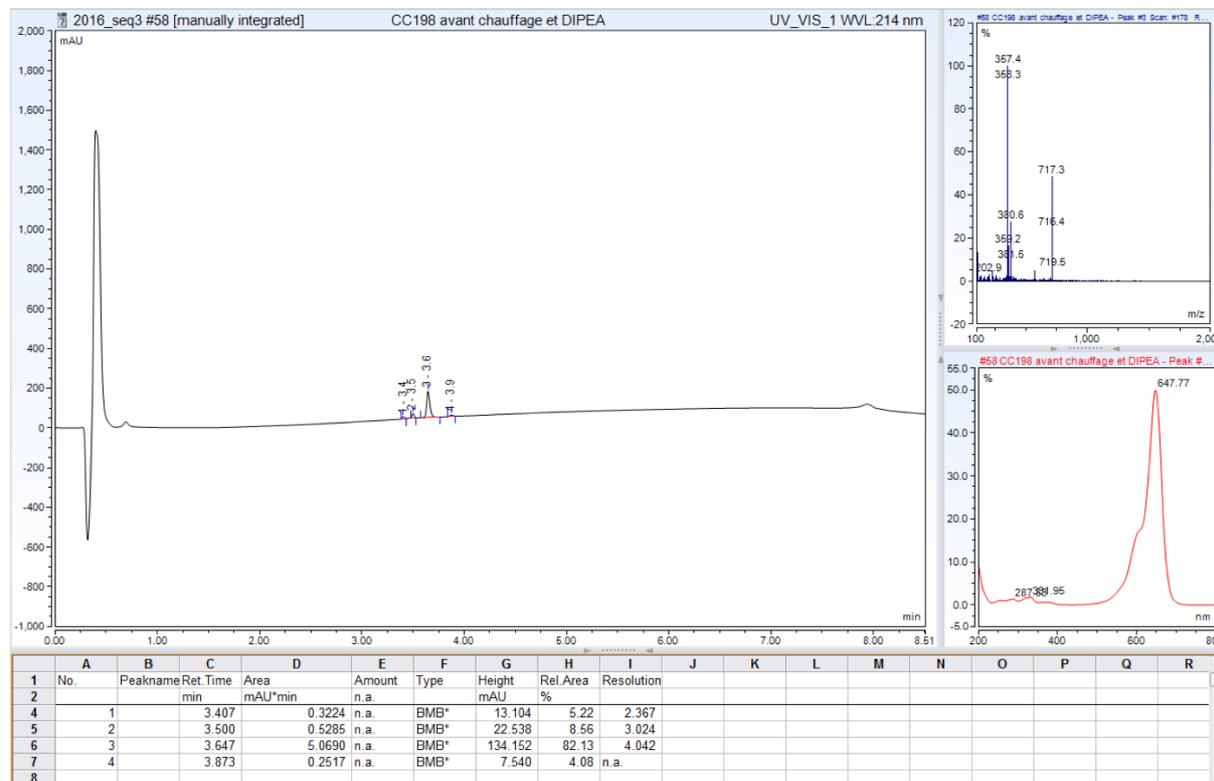


¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.51 (m, 5H; CH₂, CH₃), 1.70 (m, 2H; CH₂), 1.78 (bs, 6H; CH₃), 1.83 (s, 6H; CH₃), 1.96 (m, 2H; CH₂), 2.40 (m, 2H; CH₂), 2.71 (m, 2H; CH₂), 3.44 (m, 2H; CH₂), 4.21 (m, 4H; CH₂), two ethylenic protons are missing, 6.71 (m, 1H; CH), 7.48 (m, 2H, CH), 8.02 (m, 4H, CH), 8.18 (m, 2H, CH);

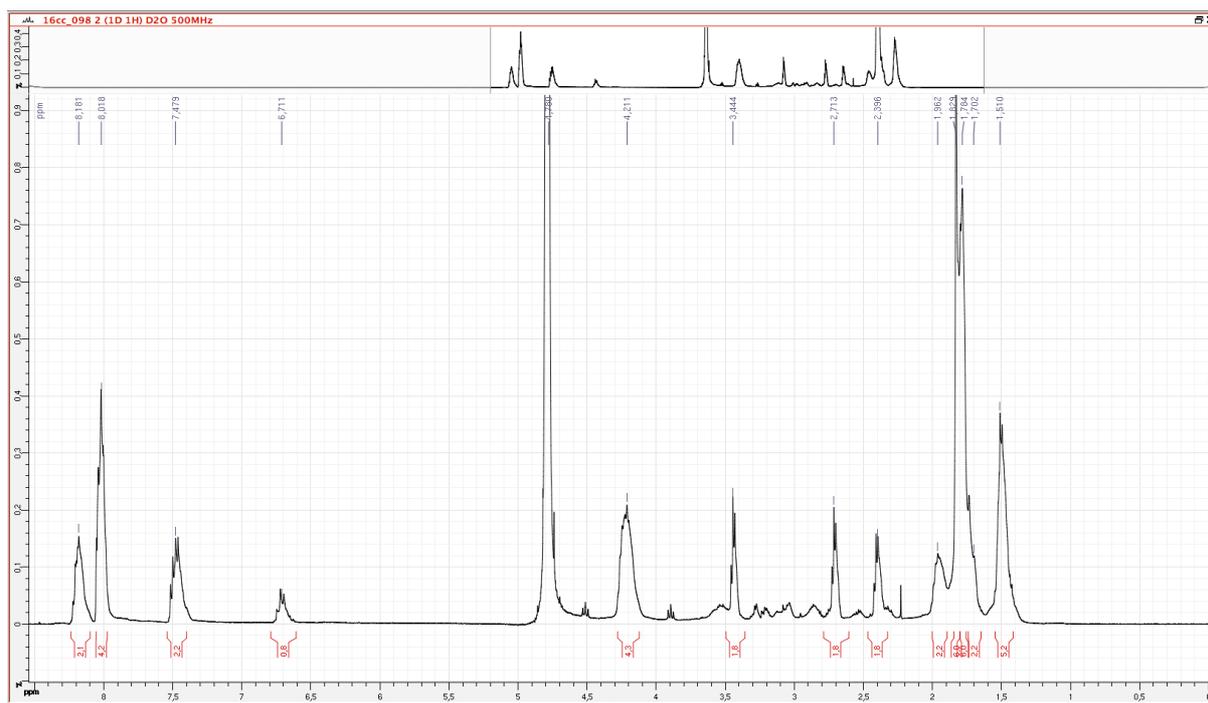
The low amount of product available did not allow us to perform proper ¹³C NMR;

LRMS: C₃₅H₄₆N₃O₇S₃⁺ ([M]⁺) m/z calculated: 716.2, found: 716.3.

RP-HPLC-LRMS analysis of sulfonated Cyanine 5.0-SH **8**:

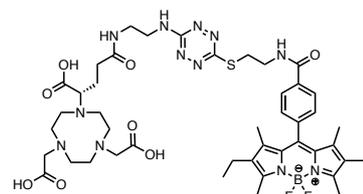


¹H NMR spectrum of sulfonated Cyanine 5.0-SH **8**:



(R)-2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2-((6-((2-(4-(2,8-diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzamido)ethyl)thio)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid, (R)-NODAGA-NH-Tz-S-BODIPY **9.**

BODIPY-SH (17.0 mg, 40.1 μmol) and (R)-NODAGA-NH-Tz-Cl·0.4TFA **2** (27.4 mg, 47.4 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (48.3 μL, 275.5 μmol, 5.0 eq) was added. The reaction was completed in 1 h at 75 °C. The solvent was removed under reduced pressure. Purification by semi-preparative reverse-phase RP-HPLC (eluent: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) gave (R)-NODAGA-NH-Tz-S-BODIPY·0.5TFA as a pink powder (8.1 mg, 12%, purity: 60%).

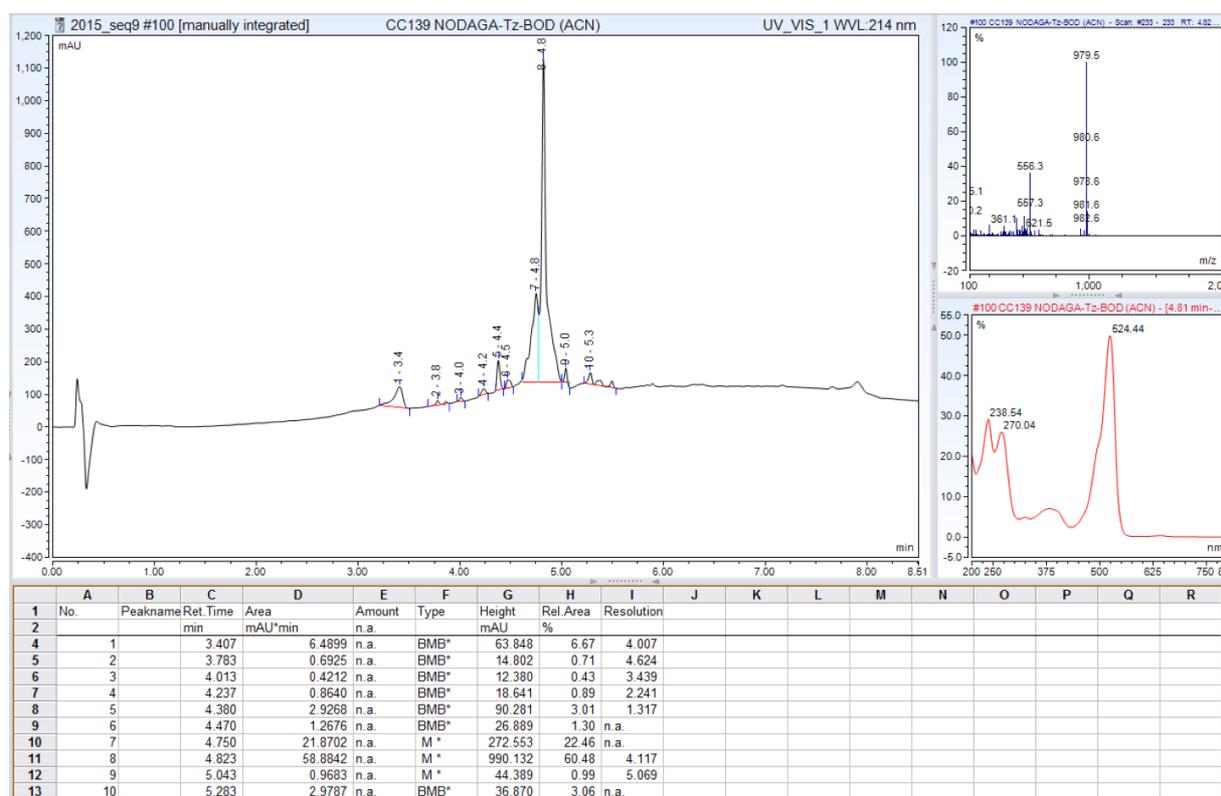


Ionic chromatography analysis indicates an amount of 0.5 TFA per molecule;

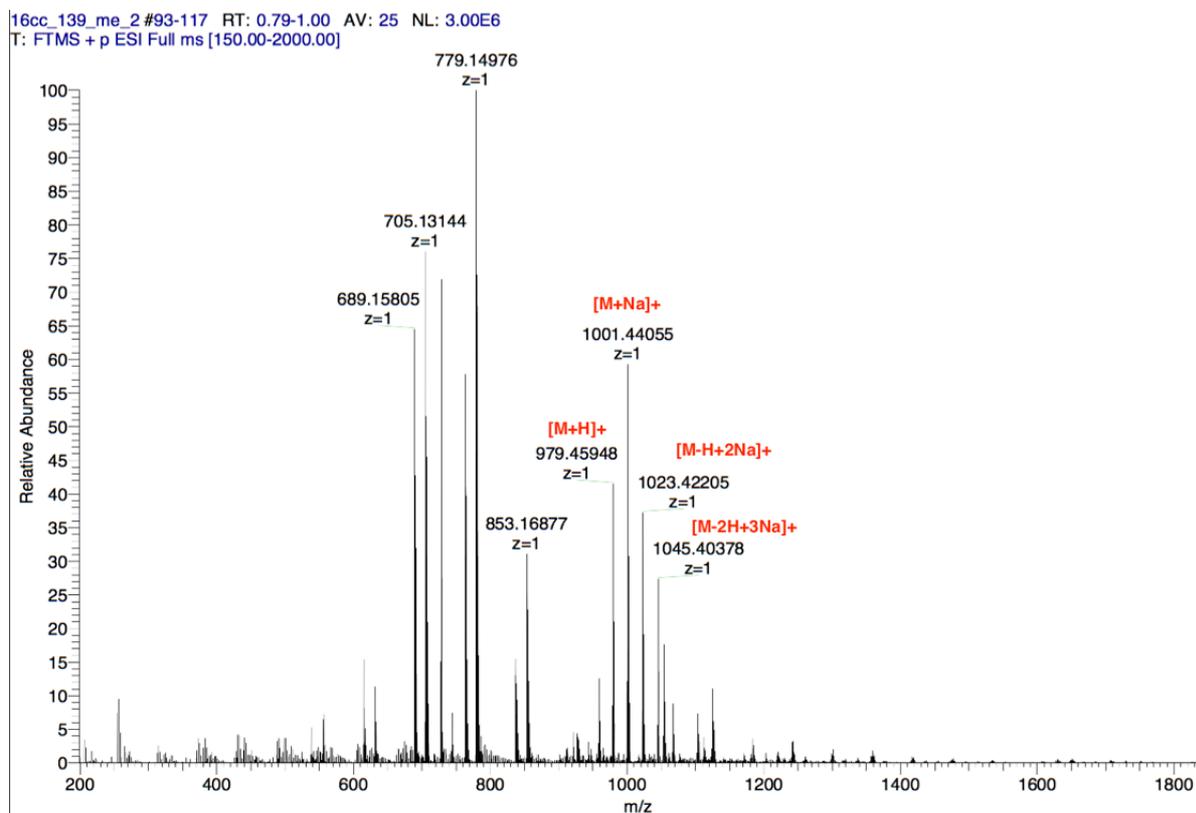
The low purity did not allow us to perform proper NMR spectra;

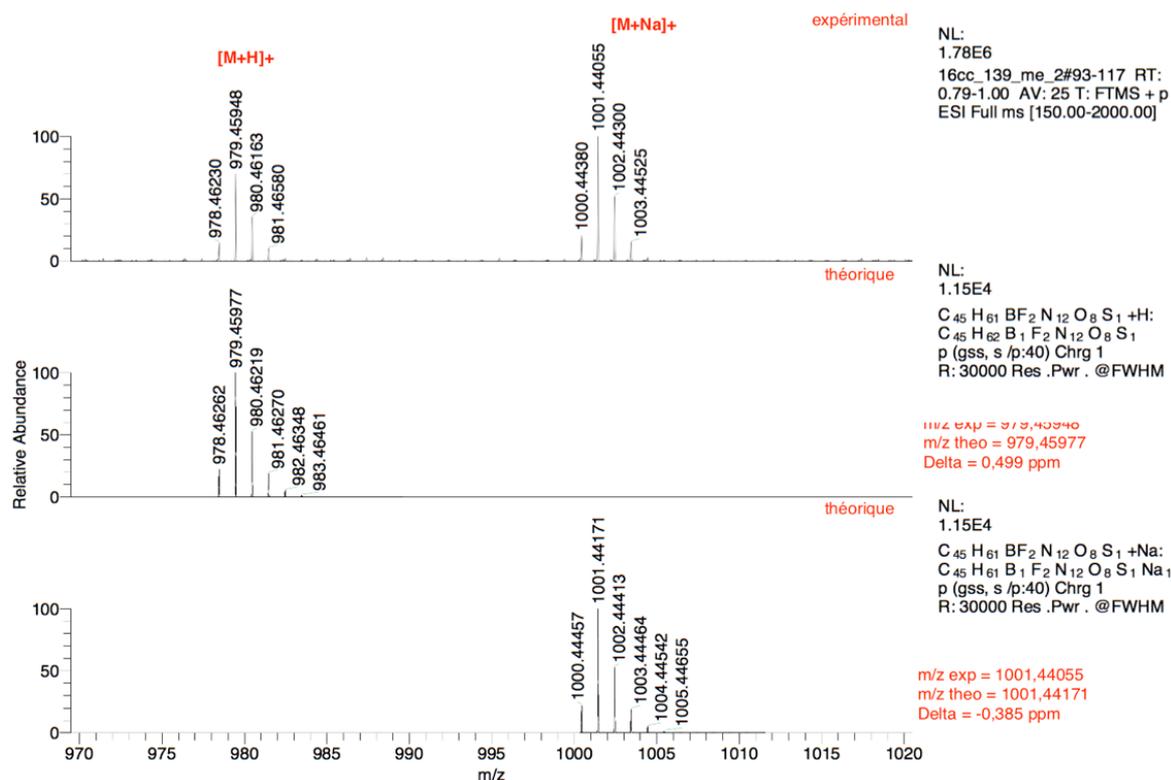
HRMS: C₄₅H₆₂BF₂N₁₂O₈S⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 979.45899, found: 979.45948; C₄₅H₆₁BF₂N₁₂NaO₈S⁺ ([M+Na]⁺) m/z calculated: 1001.44094, found: 1001.44055; C₄₅H₆₀BF₂N₁₂Na₂O₈S⁺ ([M-H+2Na]⁺) m/z calculated: 1023.42288, found: 1023.42205; C₄₅H₅₉BF₂N₁₂Na₃O₈S⁺ ([M-2H+3Na]⁺) m/z calculated: 1045.40482, found: 1045.40378; some impurities were detected at 689.15805, 705.13144 and 779.14976 m/z with z = 1.

RP-HPLC-LRMS analysis of (R)-NODAGA-NH-Tz-S-BODIPY 9:



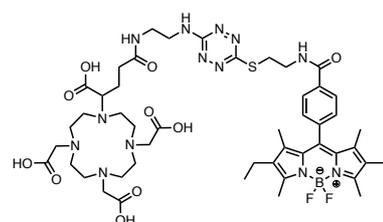
HRMS spectrum of (R)-NODAGA-NH-Tz-S-BODIPY 9 and comparison with simulated spectrum:





2,2',2''-(10-(1-carboxy-4-((2-((6-((2-(4-(2,8-diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzamido)ethyl)thio)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid, DOTAGA-NH-Tz-S-BODIPY 10.

BODIPY-SH (11.7 mg, 24.2 μmol, 1.7 eq) and DOTAGA-NH-Tz-Cl·1.5TFA **1** (15.3 mg, 14.0 μmol, 1.0 eq) were dissolved in anhydrous DMF (1 mL), and DIPEA (22.8 μL, 121.0 μmol, 8.6 eq) was added. The reaction was completed in 1.5 h at 75 °C and the solvent was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on reverse-phase (eluents: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) yielded DOTAGA-NH-Tz-S-BODIPY·0.1TFA as a pink powder (18.0 mg, 68%, purity: 78%).

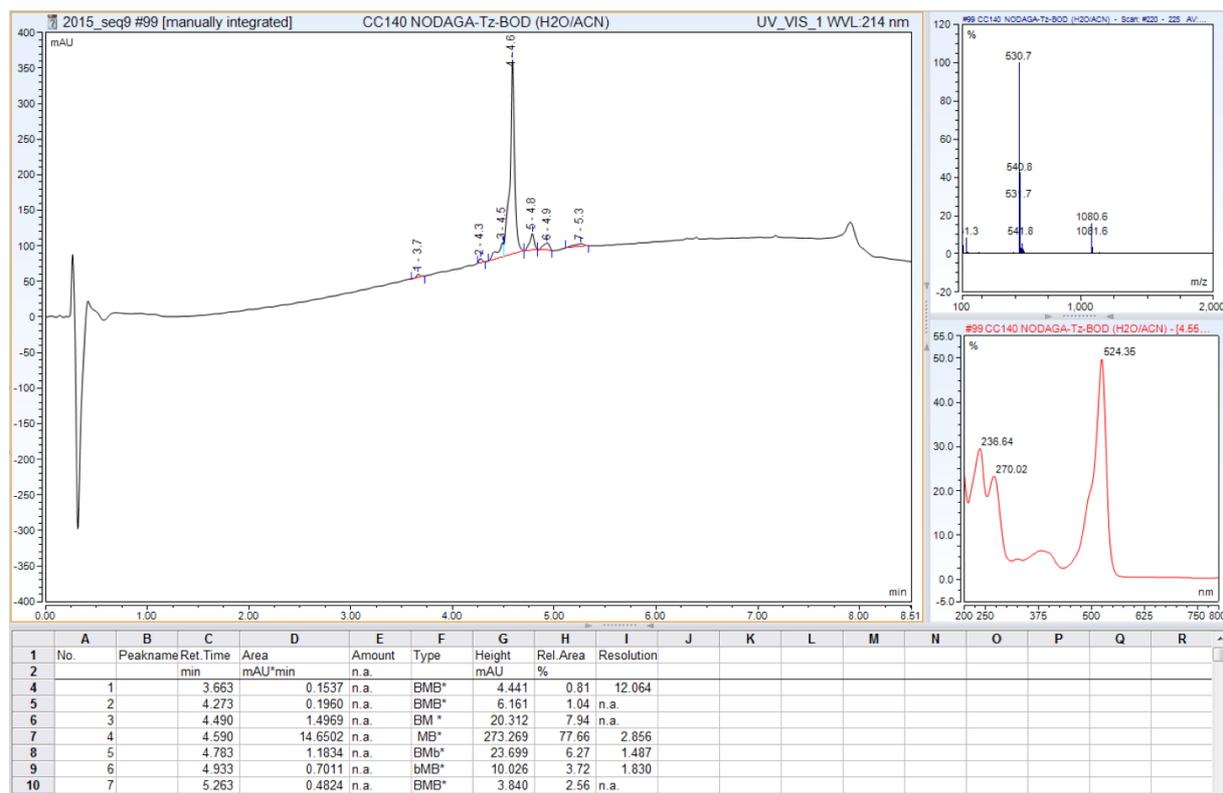


Ionic chromatography analysis indicates an amount of 0.1 TFA per molecule;

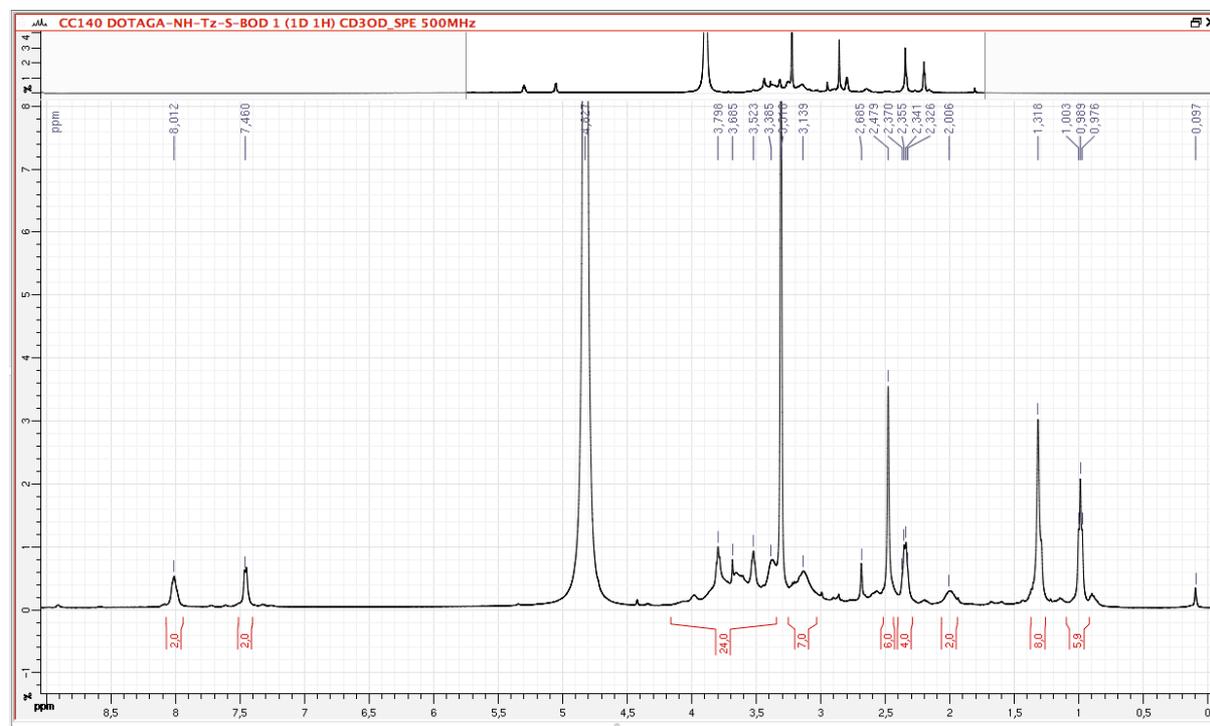
¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 0.99 (bt, 6H; CH₃), 1.32 (s, 8H; CH₂, CH₃), 2.01 (m, 2H; CH₂), 2.35 (bq, 4H; CH₂), 2.48 (s, 6H; CH₃), 3.03 to 3.25 (m, 7H; CH, CH₂), 3.34 to 4.16 (m, 24H; CH₂), 7.46 (m, 2H; CH), 8.01 (m, 2H; CH);

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ 11.5, 12.3, 14.5, 16.4, 29.7, 32.4, 37.6, 49.8, 50.7, 52.8, 54.3, 55.2, 61.9, 128.1, 128.3, 129.7, 132.8, 134.6, 137.6, 138.0, 139.6, 153.5, 160.9, 164.1, 165.7, 170.4, 172.3, 172.8; HRMS: C₄₉H₆₉BF₂N₁₃O₁₀S⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 1080.50667, found: 1080.50639; C₄₉H₆₈BF₂N₁₃NaO₁₀S⁺ ([M+Na]⁺) m/z calculated: 1102.48861, found: 1102.48834; C₄₉H₆₇BF₂N₁₃Na₂O₁₀S⁺ ([M+2Na]⁺) m/z calculated: 1124.47056, found: 1124.46975.

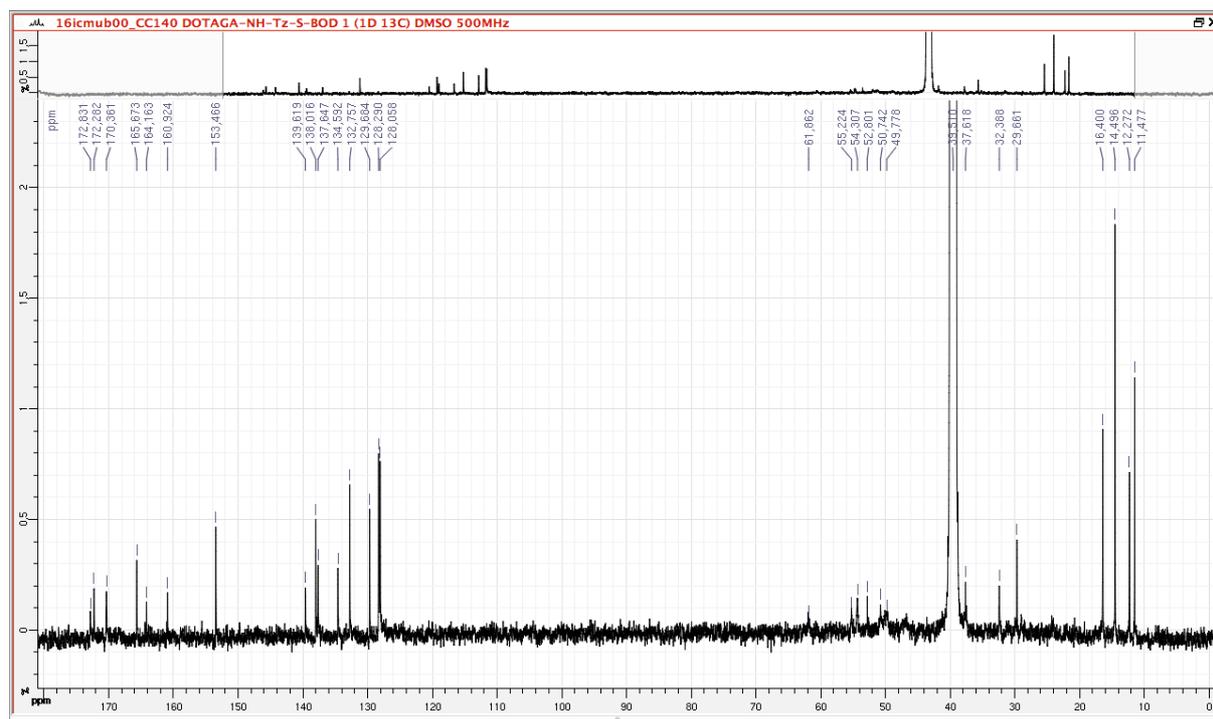
RP-HPLC-LRMS analysis of DOTAGA-NH-Tz-S-BODIPY 10:



¹H NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-BODIPY 10:

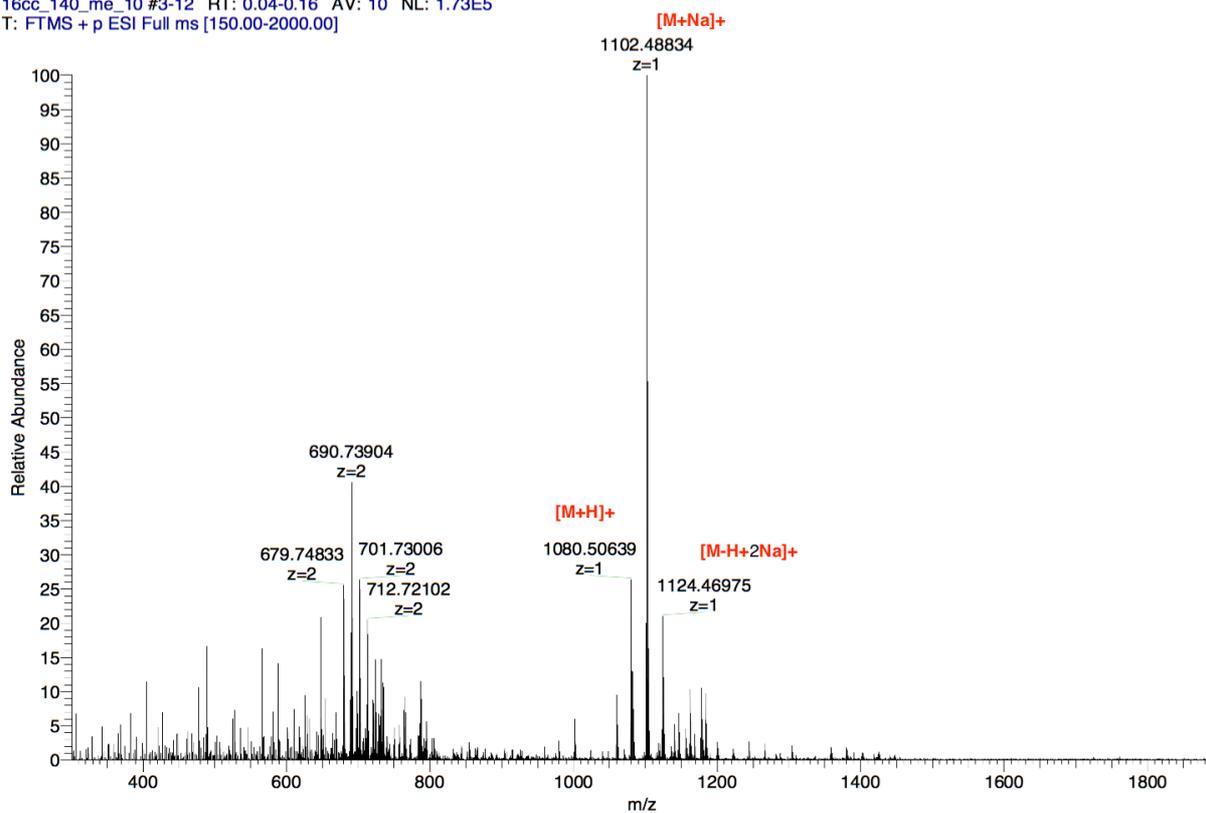


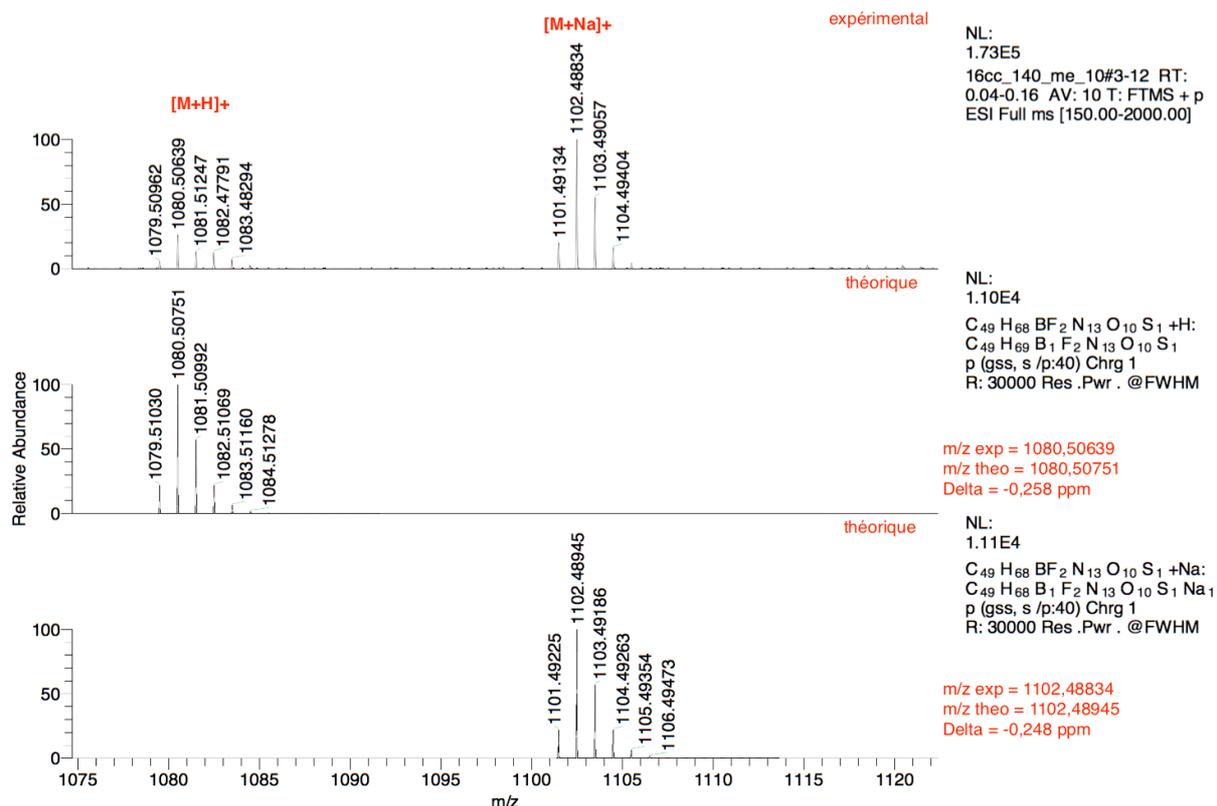
^{13}C NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-BODIPY **10**:



HRMS spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-BODIPY **10** and comparison with simulated spectrum:

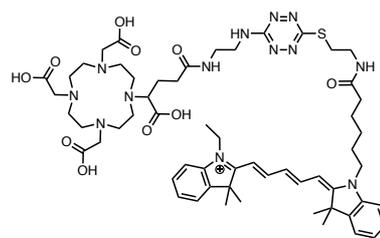
16cc_140_me_10 #3-12 RT: 0.04-0.16 AV: 10 NL: 1.73E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]





2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2-((6-((2-(4-carboxy-4-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)ethyl)amino)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)thio)ethyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium, DOTAGA-NH-Tz-S-Cyanine 5.0 **11.**

DOTAGA-NH-Tz-Cl·1.5TFA **1** (19.5 mg, 24.3 μmol, 1.1 eq) and Cyanine 5.0-SH·1TFA **7** (14.9 mg, 22.2 μmol, 1.0 eq) were dissolved in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (28.0 μL, 149.5 μmol, 6.7 eq) was added. After 1 h at 75 °C, the solvent was removed under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluent: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) gave DOTAGA-NH-Tz-S-Cyanine 5.0·2.2TFA **11** as a blue powder (6.3 mg, 18%, purity: 90%).



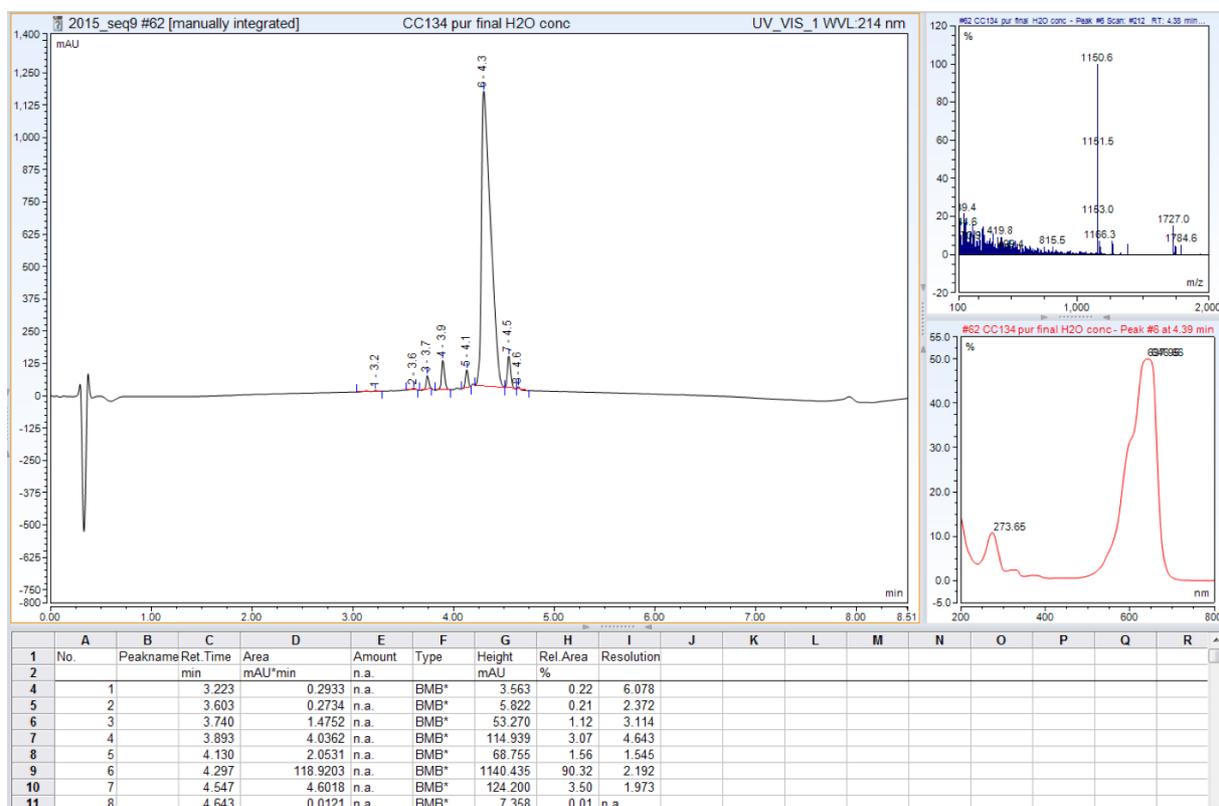
Ionic chromatography analysis indicates an amount of 2.2 TFA per molecule;

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 1.33 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H; CH₃), 1.42 (m, 2H; CH₂), 1.61 (m, 2H; CH₂), 1.67 (s, 12H; CH₃), 1.76 (m, 2H; CH₂), 2.12 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H; CH₂), 2.17 to 2.75 (non-identified impurity), 2.76 to 3.97 (m, 35H; macrocycle + CH₂), 4.00 (bt, 2H; CH₂), 4.06 (q, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 6.21 (d, ³J = 13.0 Hz, 2H; CH), 6.53 (t, ³J = 13.0 Hz, 1H; CH), 7.25 (m, 4H, CH), 7.40 (m, 2H, CH), 7.47 (m, 2H, CH), 8.07 (dd, ³J = 13.0, 13.0 Hz, 2H, CH);

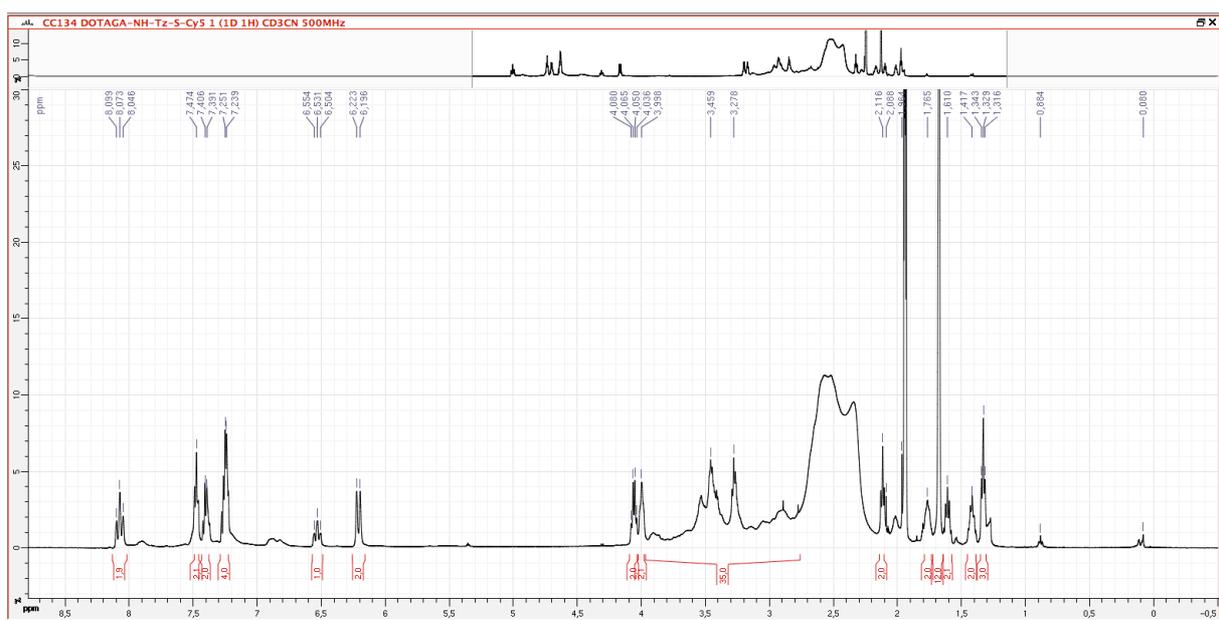
¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN) δ 13.0, 26.4, 27.4, 28.1, 28.2, 31.5, 36.8, 39.5, 39.7, 40.5, 42.4, 45.3, 50.6, 50.7, 104.1, 104.3, 112.2, 112.4, 123.6, 123.7, 125.9, 126.4, 126.5, 129.9, 130.0, 142.8, 143.0, 143.3, 143.7, 155.2, 155.3, 160.8, 161.1, 162.5, 162.8, 166.7, 174.2, 174.5, 174.7, macrocyclic signals in the range of 20.0 to 60.0 were not clearly distinguishable;

HRMS: $C_{58}H_{82}N_{13}O_{10}S^+$ ($[M]^+$) m/z calculated: 1152.60228, found: 1152.60445; $C_{58}H_{82}N_{13}NaO_{10}S^{2+}$ ($[M+Na]^{2+}$) m/z calculated: 587.79575, found: 587.79558.

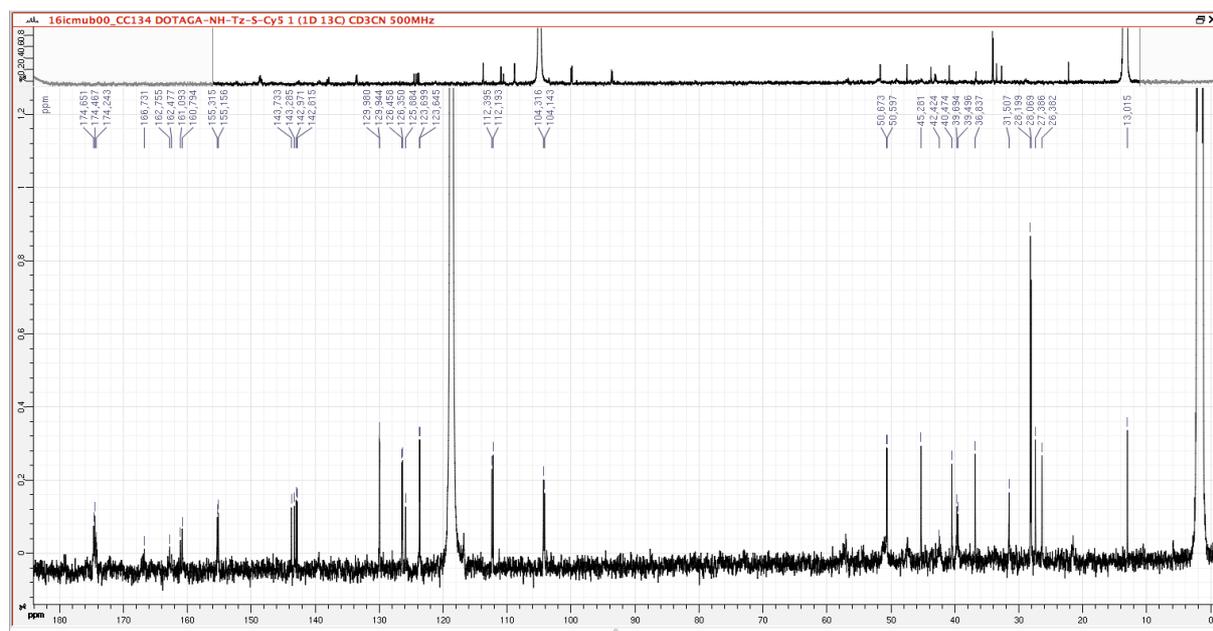
RP-HPLC-LRMS analysis of DOTAGA-NH-Tz-S-Cyanine 5.0 11:



1H NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-Cyanine 5.0 11:

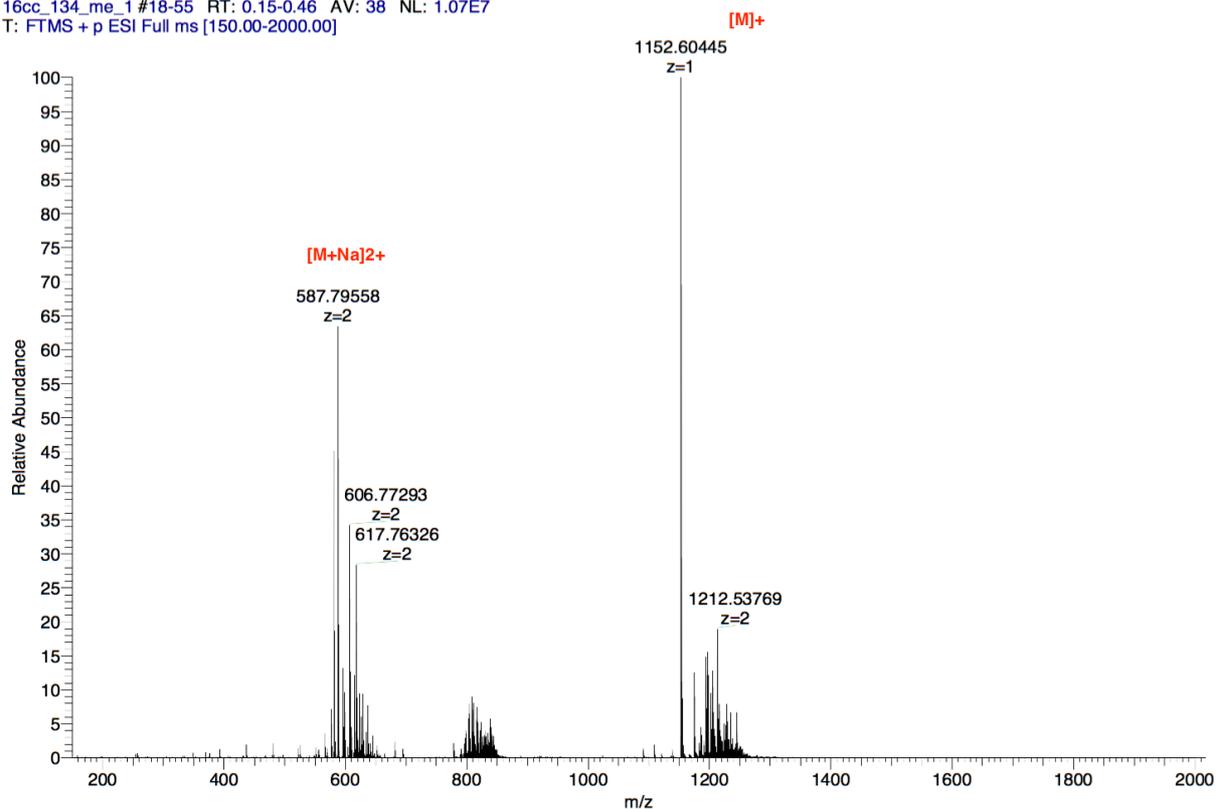


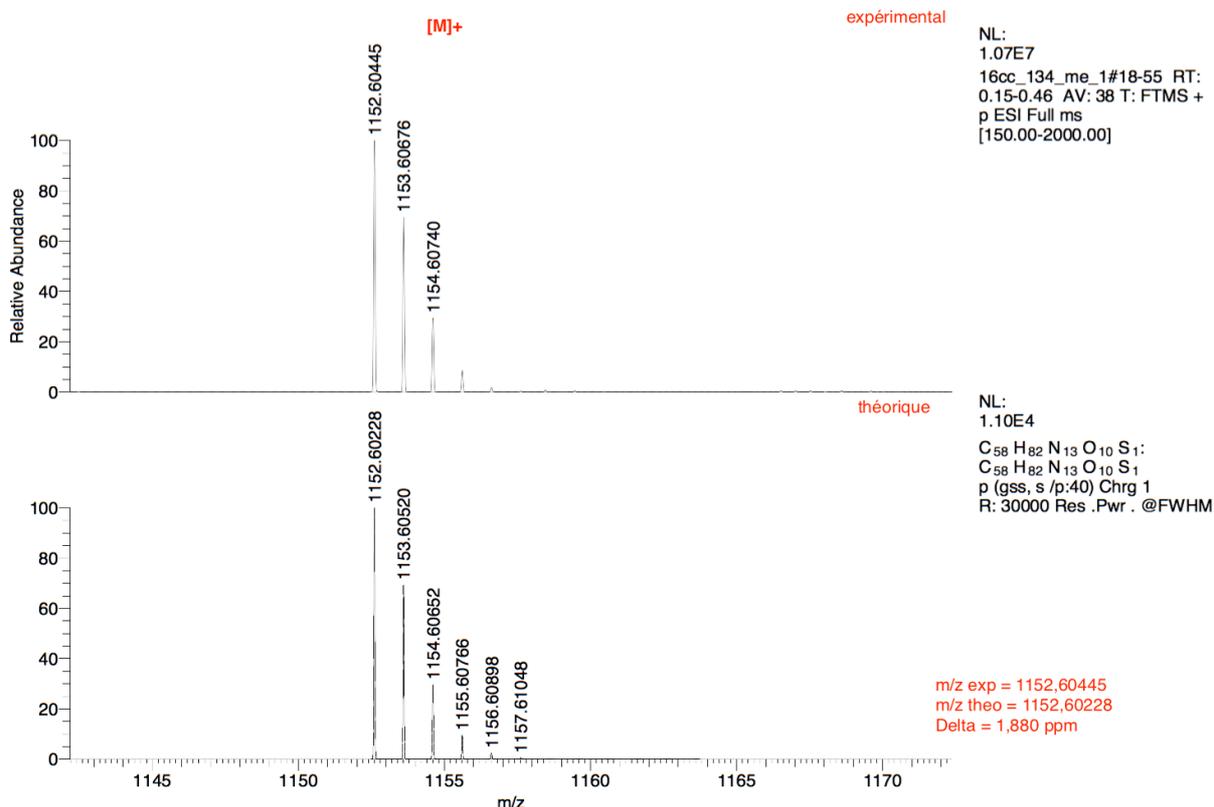
^{13}C NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-Cyanine 5.0 **11**:



HRMS spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-Cyanine 5.0 **11** and comparison with simulated spectrum:

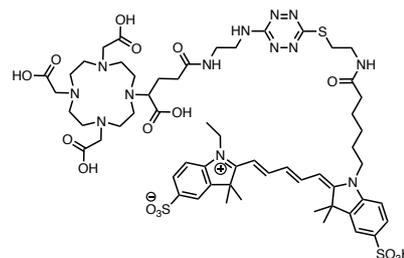
16cc_134_me_1 #18-55 RT: 0.15-0.46 AV: 38 NL: 1.07E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]





2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2-((6-((2-(4-carboxy-4-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)ethyl)amino)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)thio)ethyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate, DOTAGA-NH-Tz-S-sulfonated Cyanine 5.0 **12.**

DOTAGA-NH-Tz-Cl·1.5TFA **1** (5.7 mg, 7.1 μmol) and sulfonated Cyanine 5.0-SH **8** (5.4 mg, 7.54 μmol , 1.1 eq) were dissolved in anhydrous DMF (800 μL) and DIPEA (8.47 μL , 45.3 μmol , 6.4 eq) was added. After 5 h at 75 $^{\circ}\text{C}$, the solvent was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluent: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) gave DOTAGA-NH-Tz-S-sulfonated Cyanine 5.0 **12** as a blue powder (3.8 mg, 34%, purity: 82%).



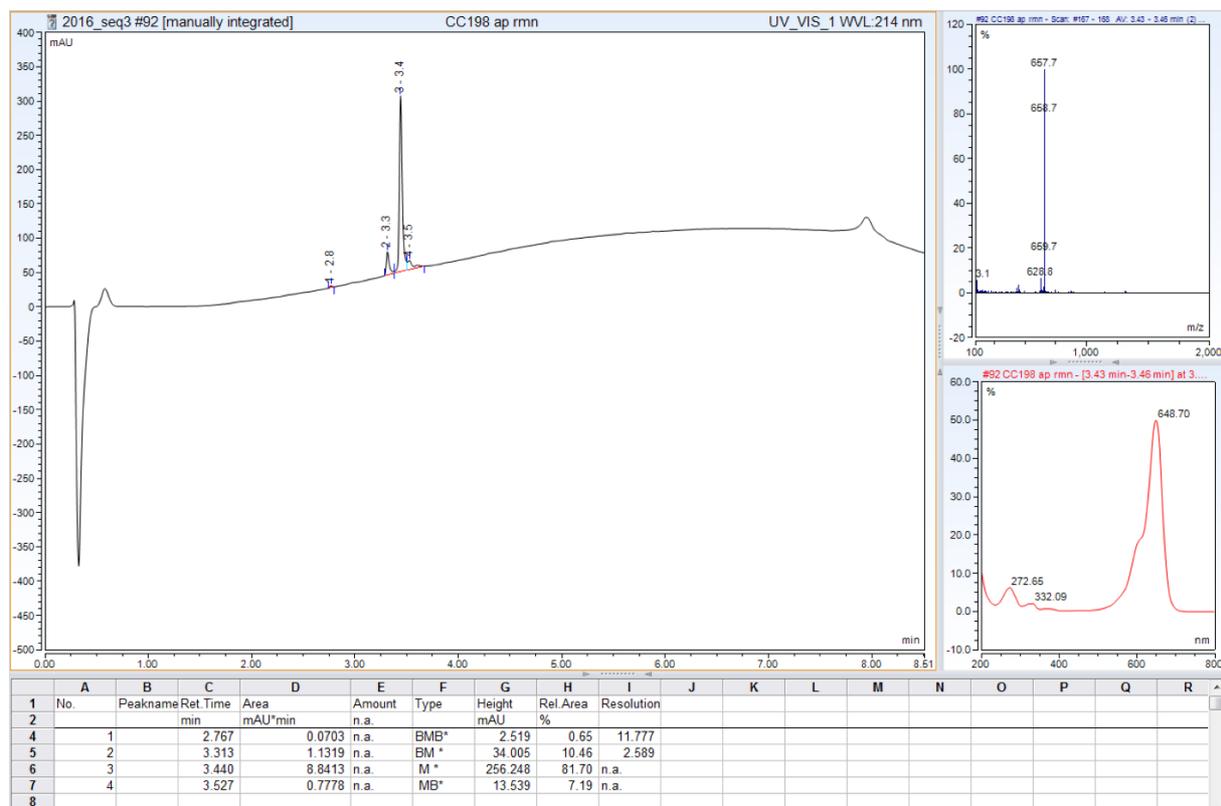
Number of TFA determined as 0 by ionic chromatography;

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.31 (m, 5H; CH₂, CH₃), 1.58 (m, 2H; CH₂), 1.61 (s, 6H; CH₃), 1.67 (s, 6H; CH₃), 1.81 (m, 2H; CH₂), 1.88 (m, 2H; CH₂), 2.20 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H; CH₂), 2.44 (m, 2H; CH₂), 2.97 to 3.63 (m, 26H; CH₂), 3.82 (m, 5H; CH₂, CH), 4.07 (m, 4H; CH₂), 6.15 (d, ³J = 13.6 Hz, 1H; CH), 6.23 (d, ³J = 13.6 Hz, 1H; CH), 6.48 (t, ³J = 12.3 Hz, 1H; CH), 7.33 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H; CH), 7.79 to 7.88 (m, 4H; CH), 7.96 (m, 1H; CH), 8.01 (m, 1H; CH);

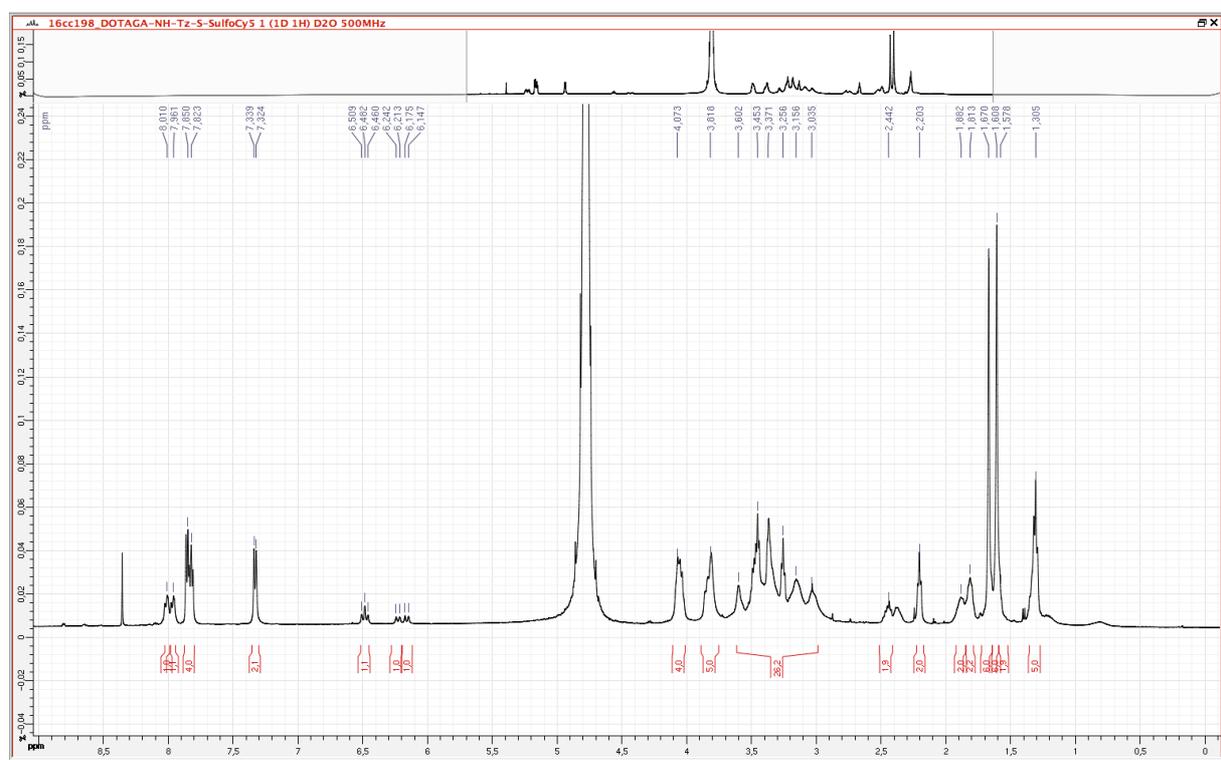
The low amount of product available did not allow us to perform proper ¹³C NMR;

HRMS: C₅₈H₈₂N₁₃O₁₆S₃⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 1312.51591, found 1312.51945.

RP-HPLC-LRMS analysis of DOTAGA-NH-Tz-S-sulfonated Cyanine 5.0 12:



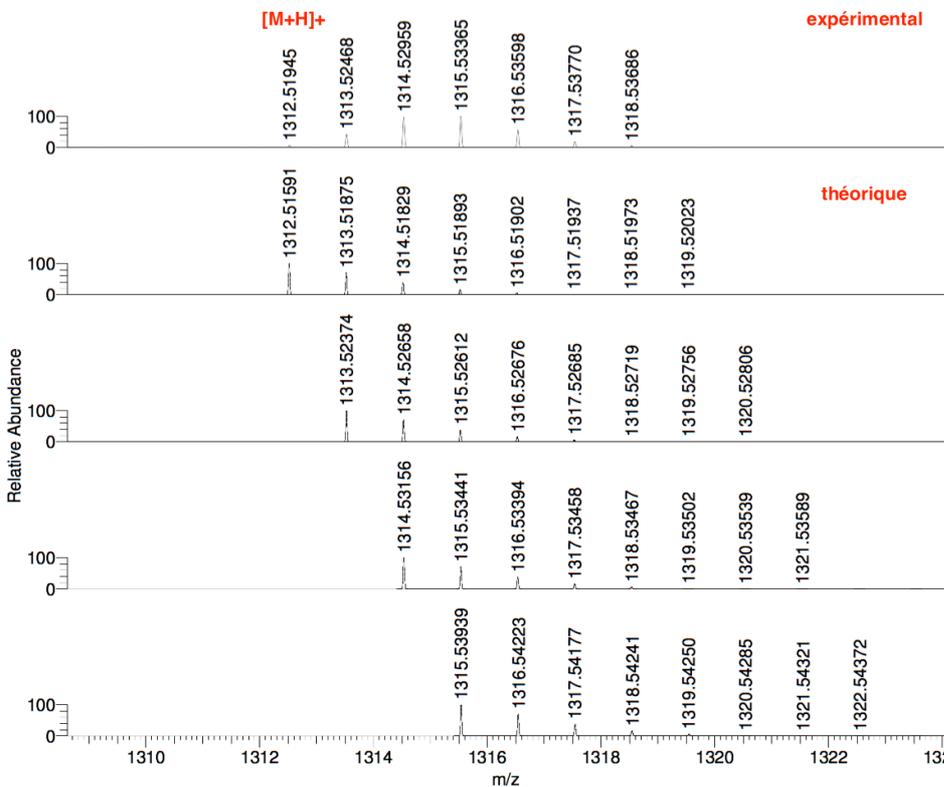
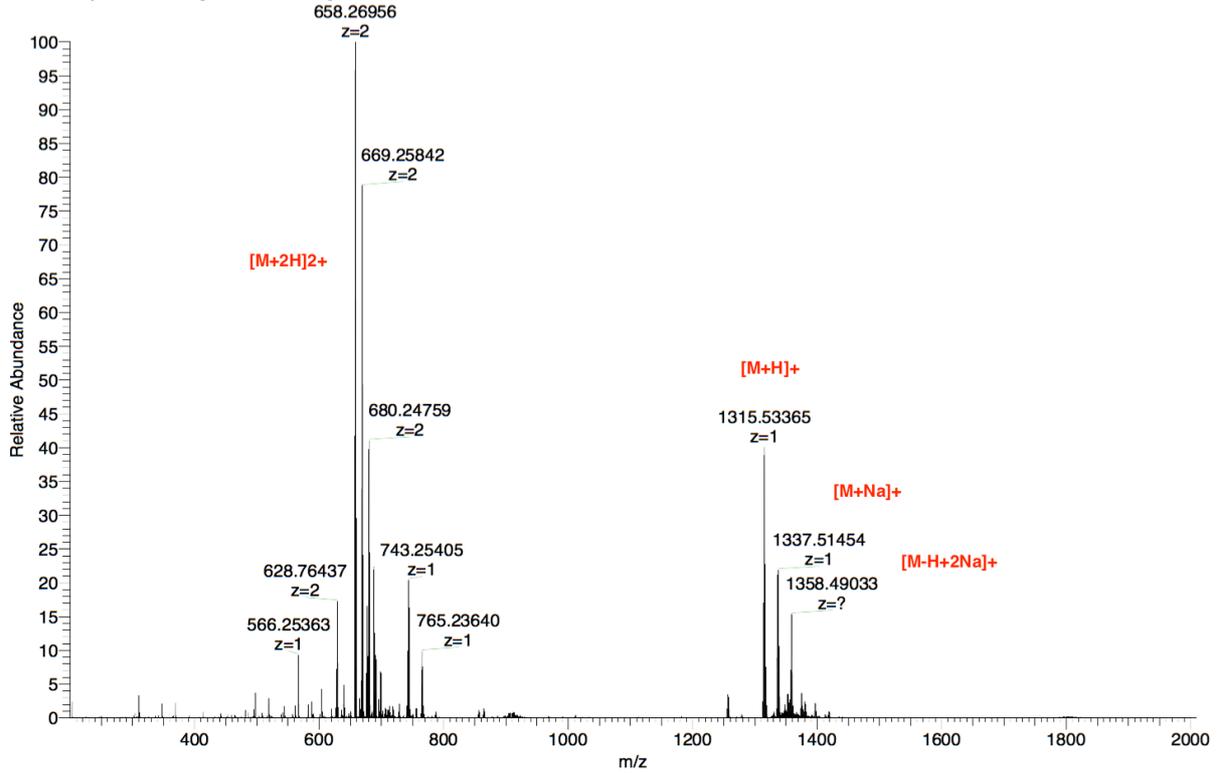
¹H NMR spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-sulfonated Cyanine 5.0 12:



HRMS spectrum of DOTAGA-NH-Tz-S-sulfonated Cyanine 5.0 **12** and comparison with simulated spectrum:

16cc_198_me_160705173907 #25-59 RT: 0.55-1.21 AV: 35 NL: 1.43E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

mode positif



NL:
5.72E5
16cc_198_me_160705173907#
25-59 RT: 0.55-1.21 AV: 35
T: FTMS + p ESI Full ms
[200.00-2000.00]

NL:
9.77E3
C₅₈H₈₁N₁₃O₁₆S₃+H:
C₅₈H₈₂N₁₃O₁₆S₃
p (gss, s/p:40) Chrg 1
R: 50000 Res .Pwr .@FWHM

NL:
9.77E3
C₅₈H₈₂N₁₃O₁₆S₃+H:
C₅₈H₈₃N₁₃O₁₆S₃
p (gss, s/p:40) Chrg 1
R: 50000 Res .Pwr .@FWHM

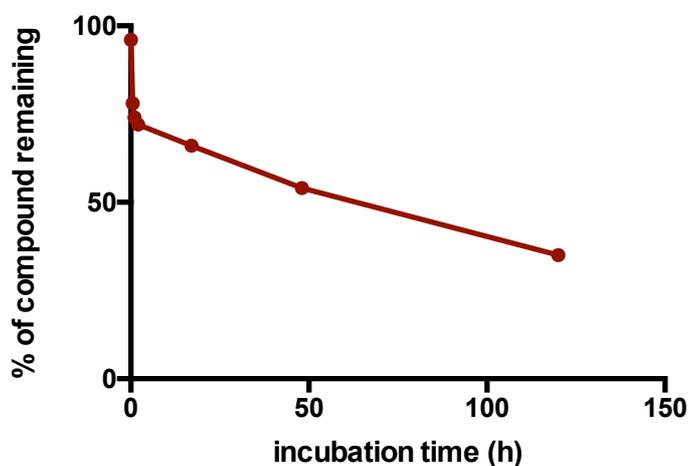
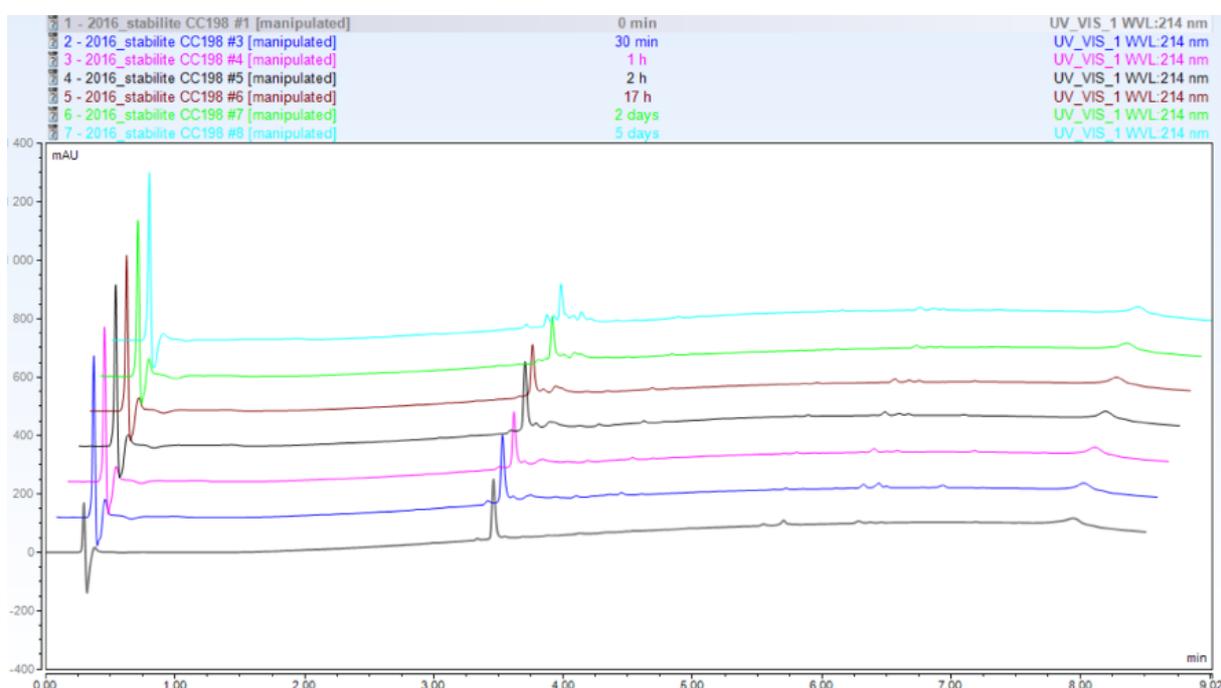
NL:
9.77E3
C₅₈H₈₃N₁₃O₁₆S₃+H:
C₅₈H₈₄N₁₃O₁₆S₃
p (gss, s/p:40) Chrg 1
R: 50000 Res .Pwr .@FWHM

NL:
9.77E3
C₅₈H₈₄N₁₃O₁₆S₃+H:
C₅₈H₈₅N₁₃O₁₆S₃
p (gss, s/p:40) Chrg 1
R: 50000 Res .Pwr .@FWHM

***In vitro* stability of the bimodal probe **12** in FBS/RPMI (25 : 75, v/v)**

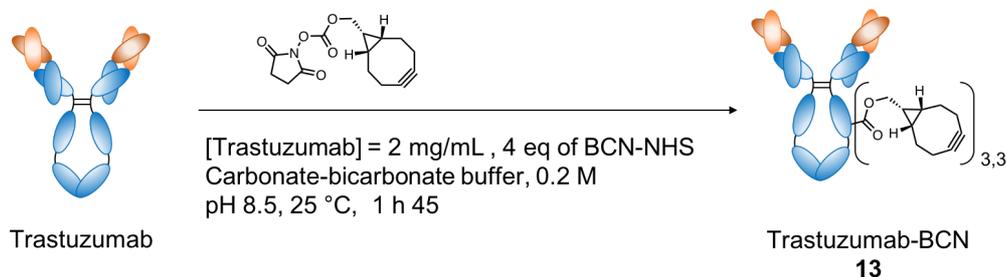
25 μ L of a stock solution of DOTAGA-NH-Tz-S-sulfonated Cyanine 5.0 **12** at 5 mM in H₂O (125 nmol) were stirred in a thermomixer (400 rpm, 37 °C, dark) with 100 μ L of FBS/RPMI (25 : 75, v/v). Final concentration in **12** was 1 mM. After 30 min, 1 h, 2 h, 17 h, 2 days and 5 days, a sample of 10 μ L of solution was collected and diluted with 40 μ L of absolute EtOH. Samples were vortexed and centrifuged (11700 rpm, 30 min) to remove precipitated proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-LRMS (UV detection at 214 nm).

Top: RP-HPLC-LRMS analysis of the initial compound **12** of the samples collected after incubation in FBS/RPMI (25 : 75, v/v) during 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 17 h, 2 d, 5 d; Bottom: percentage of intact probe **12** remaining after incubation in FBS/RPMI (25 : 75, v/v) at the previously indicated time points:



Conjugation of the bimodal probe **12** to trastuzumab

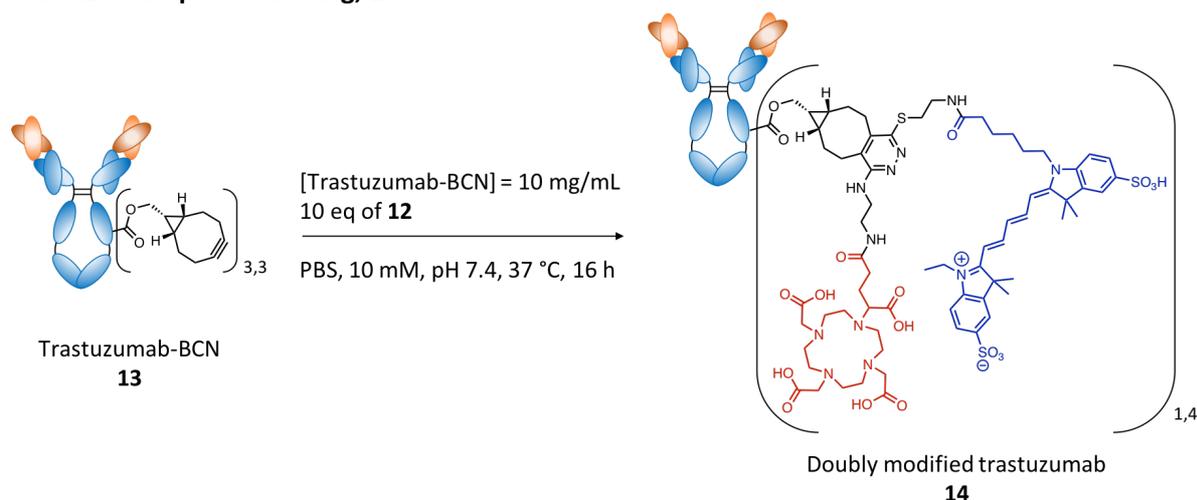
Modification of trastuzumab with bicyclononyne, **13**:



26.7 μL of a stock solution of ((1*R*,8*S*,9*S*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl 2,5-dioxopyrrolidine-1-carboxylate (BCN-NHS) at 2 mM in DMSO (53.3 nmol, 4.0 eq) was added to a 2 mg/mL solution of trastuzumab (2 mg, 13.3 nmol) in carbonate-bicarbonate buffer (0.2 M, pH 8.5) with 10% DMSO. The solution was stirred in a thermomixer (800 rpm, 25 °C) during 1 h 45. Excess of BCN was removed by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel-30 kDa (Merck Millipore). This ultrafiltration step allowed us to concentrate the product and exchange the buffer from carbonate-bicarbonate buffer to PBS (1 M, pH 7.4). The pure BCN-modified trastuzumab **13** was obtained as a 35.5 mg/mL* solution in PBS (protein recovery = 91%). Based on MALDI-TOF analysis, the degree of labeling (amount of BCN per BSA) was determined to be 3.3.

* *note*: the concentration of the trastuzumab in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of the trastuzumab at 280 nm ($1.48 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, value from ExpASy).

Trastuzumab-probe labeling, **14**:



75.3 μL of a 5 mM stock solution of bimodal probe **12** in H_2O (376.6 nmol, 33.0 eq) was added to a 10 mg/mL solution of trastuzumab-BCN (1.71 mg, 11.4 nmol) in PBS (1 M, pH 7.4) with 10% of DMSO. The solution was stirred in a thermomixer (800 rpm, 37 °C) during 16 h. Then, excess of **12** was

removed by FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) on a Hitrap desalting column (Sephadex G-25 Superfine resin, cross-linked dextran, bead size 15-70 μm , 16 \times 25 mm, 5 mL) with AcONH_4 (0.1 M, pH 5.8) as eluent. The pure, dually labeled, trastuzumab was obtained as a 2.0 mg/mL solution in AcONH_4 (protein recovery = 49%). Based on the spectroscopy measurements, the degree of labeling (amount of bimodal probe per antibody) was determined to be 1.4.*

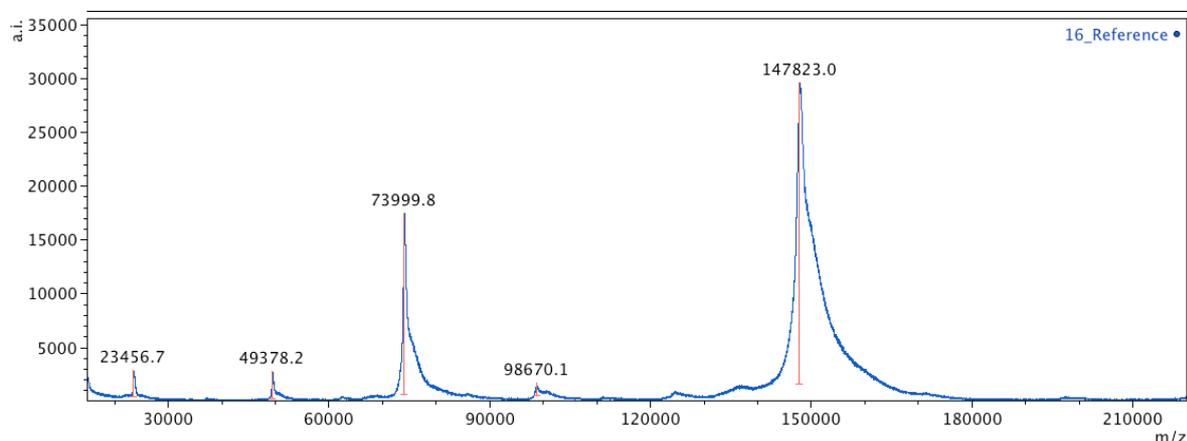
* *note:* A correction factor (0.05)¹ was introduced to account for the contribution of the fluorophore absorbance at 280 nm. The molar concentration of the fluorophore was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of the sulfonated Cyanine 5.0 in PBS (250000 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).¹

Characterization of the conjugate 14

MALDI-TOF analyses of the dual-labeling of the trastuzumab:

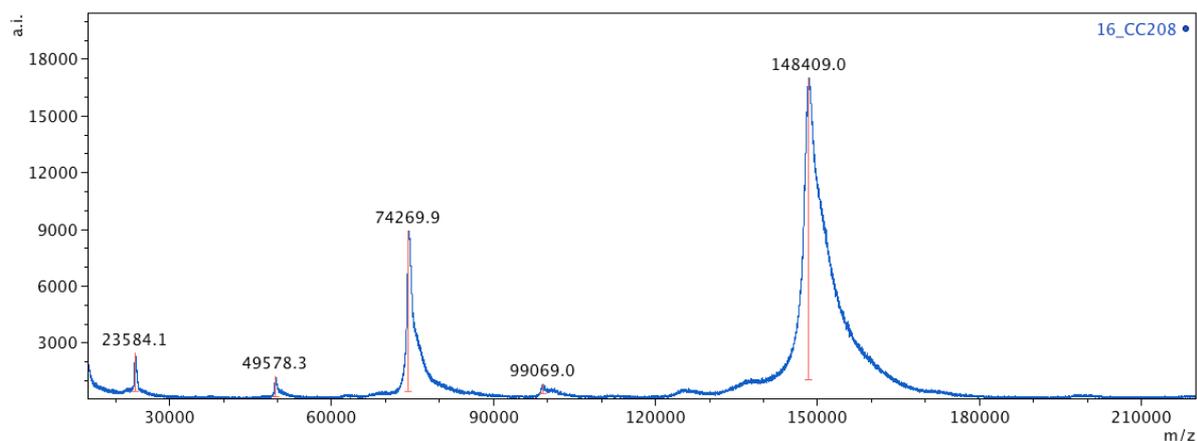
Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI/TOF) mass spectra were carried out on a Bruker Daltonics Ultraflex II LRF 2000 mass spectrometer using a matrix made of saturated solution of sinapinic acid (Sigma-Aldrich) in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (60 : 40, v/v) with TFA 0.1%. The target used is an MTP AnchorChip™ 384 (Bruker).

MALDI-TOF mass spectrum of native trastuzumab:

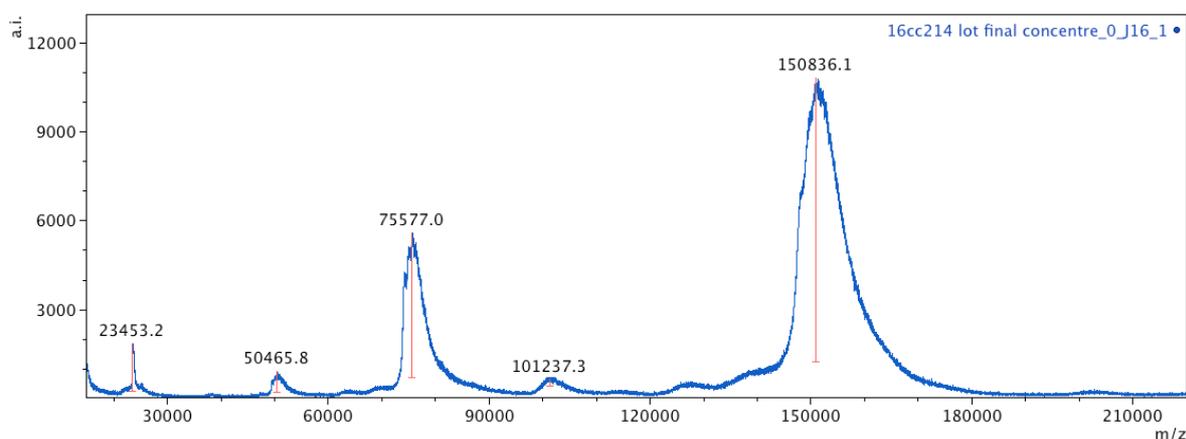


¹ Ballou, B.; Fisher, G. W.; Hakala, T. R.; Farkas, D. L. *Biotechnol. Prog.* **1997**, 13, 649–658

MALDI-TOF mass spectrum of trastuzumab-BCN, **13**:



MALDI-TOF mass spectrum of the dually-modified trastuzumab **14**:



Evaluation of the spectral properties of the conjugate **14**:

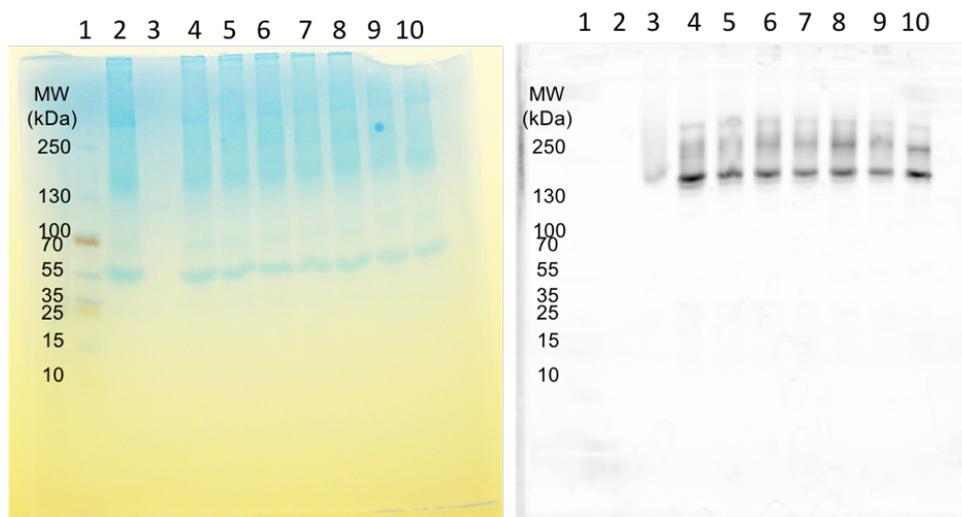
UV-Vis absorbance and fluorescence spectra of **14** in AcONH₄ buffer (0.1 M, pH 5.8) were recorded on a CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH). The excitation spectrum was measured from 320 nm to 670 nm with a fixed emission wavelength at 700 nm. The emission spectrum was measured from 630 nm to 740 nm with a fixed excitation wavelength at 600 nm. Values for $\lambda_{Abs, max}$, $\lambda_{Ex, max}$ and $\lambda_{Em, max}$ were respectively 651 nm, 655 nm and 673 nm.

In vitro stability of the conjugate **14**:

10.53 μ L of a stock solution of **14** at 1.9 mg/mL (20 μ g) in AcONH₄ buffer (0.1 M, pH 5.8) were stirred in a thermomixer (800 rpm, 37 °C, dark) with 20 μ L of human plasma and 9.47 μ L of water. The final concentration in **14** was 0.5 mg/mL. After 1, 2, 4, 8, 24 or 48 h, the reactions were stopped and 5 μ L samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (Mini-PROTEAN® TGX™ 4 to 20 % Precast gel, Biorad), in non-reductive conditions.

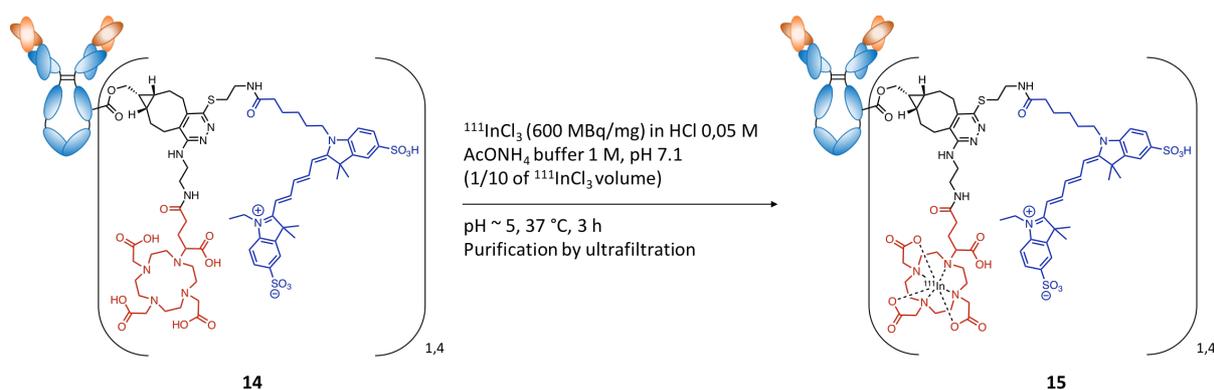
The samples were not denaturated at 90 °C prior to the electrophoresis to avoid unsuitable degradation.

SDS-PAGE analysis of **14**, line 1: Protein ladder, line 2: human plasma, line 3: bioconjugate **14** without incubation in human plasma, lines 4 to 10: bioconjugate **14** with incubation in human plasma during respectively 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h and 48 h, (left) Coomassie staining; (right) Fluorescence analysis, pair filter mode (620/670 nm):



Radiolabeling of the conjugate **14** with ^{111}In

Optimisation of the radiolabeling conditions:



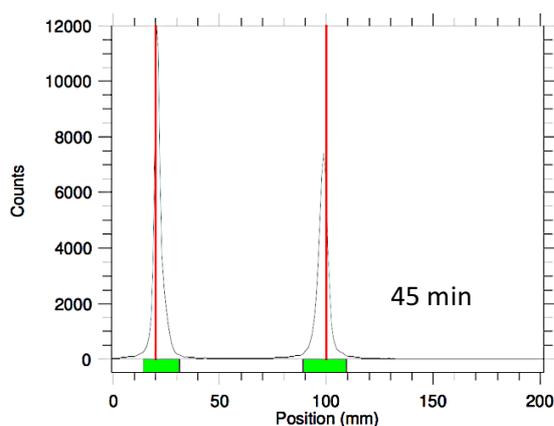
19.5 μL of a $^{111}\text{InCl}_3$ solution at 513 MBq/mL (10 MBq) in HCl was added to 16.7 μg of the bioconjugate **14**. To compensate for the acidity originating from the $^{111}\text{InCl}_3$ solution, 1.95 μL of ammonium acetate buffer (1 M, pH 5.7) were added to reach a final pH around 5. The solution was stirred in a thermomixer at 37 °C. Instant thin layer chromatographies (ITLCs) were performed at 45 min, 1 h 30 and 3 h time points to determine the ratio of ^{111}In complexed. To 1 μL samples of solution, 1 μL of 50 mM EDTA in 0.1 M ammonium acetate was added in order to chelate free indium-111. The 2 μL mixtures were deposited on ITLC-SG strips at 2 cm of the bottom. The eluent

(sodium citrate 0.1 M, pH 5) was allowed to rise to 10 cm from the bottom of the strips. Radiolabeled antibody remained at the application point while free indium-111 or ^{111}In -chelates migrated with solvent front. The strips were then analyzed using a γ -radiochromatograph.

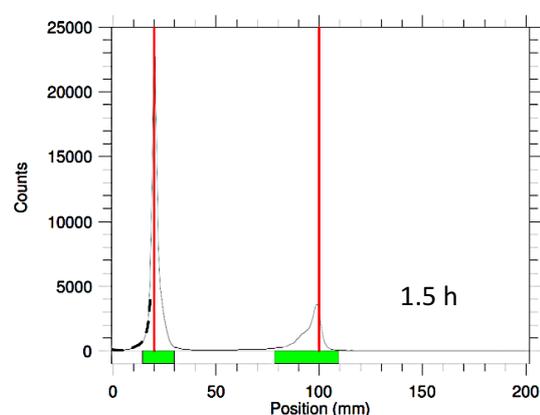
After 3 h of incubation, 3.0 μL of 50 mM EDTA in 0.1 M ammonium acetate was added to the reaction mixture. The resulting ^{111}In -EDTA was then removed by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel-30 kDa (Merck Millipore) and ITLC was performed, that showed a radiochemical purity >99%. Measure of radioactivity introduced in the Amicon Ultra Ultracel-30 kDa and obtained after the ultrafiltration allowed us to calculate a purification yield of 76%, a global ratio of recovered protein of 70% and a radiochemical purity of 496 MBq/mg.

ITLC profiles of the crude reaction mixture at 45 min, 1.5 h, 3 h and of the pure radiolabeled conjugate **15**:

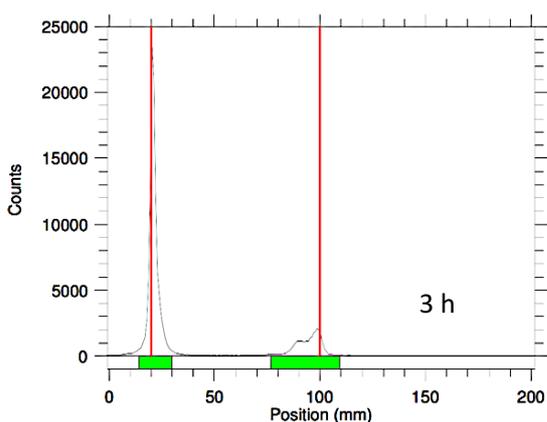
Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	14.3	31.0	21.3	0.016	55882.0	55882.0	51.32	54.43
Rgn 2	89.1	109.3	98.4	0.980	46795.0	46795.0	42.98	45.57
2 Peaks					102677.0	102677.0	94.30	100.00



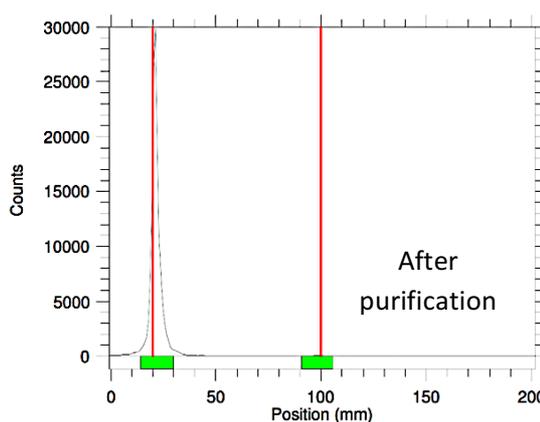
Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	14.3	30.1	20.6	0.008	103602.0	103602.0	69.18	73.94
Rgn 2	78.5	109.3	95.4	0.942	36520.0	36520.0	24.39	26.06
2 Peaks					140122.0	140122.0	93.57	100.00



Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	14.3	30.1	21.2	0.015	101253.0	101253.0	75.40	79.42
Rgn 2	76.8	109.3	94.4	0.931	26240.0	26240.0	19.54	20.58
2 Peaks					127493.0	127493.0	94.94	100.00



Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	14.3	30.1	21.4	0.018	134681.0	134681.0	95.10	99.64
Rgn 2	90.8	105.8	97.8	0.972	489.0	489.0	0.35	0.36
2 Peaks					135170.0	135170.0	95.45	100.00



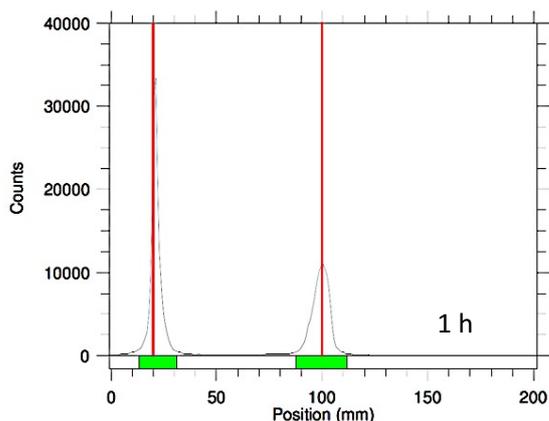
Radiolabeling reaction for *in vivo* studies:

The radiolabeling was performed as described in the optimization study, by using 225 MBq of $^{111}\text{InCl}_3$ and 375.0 μg of **14**. The solution was stirred for 1 h at 37 °C, then the product was purified as previously described. ITLCs performed before and after ultrafiltration gave a ratio of ^{111}In complexed

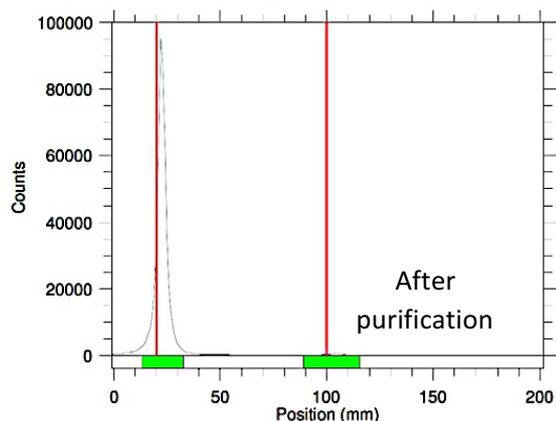
of 58% and a radiochemical purity of 99%, respectively. The measure of radioactivity introduced in the Amicon Ultra Ultracel-30 kDa and obtained after the ultrafiltration allowed us to calculate a purification yield of 85%, a global ratio of recovered protein of 82% and a radiochemical purity of 366 MBq/mg. After purification, the radiolabeled antibody **15** was diluted in PBS 0.1 M, pH 7.4, for injection.

ITLC profiles of the crude reaction mixture at 1 h and of the pure radiolabeled conjugate **15**:

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	13.4	31.0	21.3	0.016	163085.0	163085.0	54.37	57.67
Rgn 2	87.3	111.9	99.3	0.991	119729.0	119729.0	39.92	42.33
2 Peaks					282814.0	282814.0	94.28	100.00



Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	13.4	32.8	22.4	0.030	540218.0	540218.0	93.84	98.82
Rgn 2	89.1	115.5	103.1	1.039	6439.0	6439.0	1.12	1.18
2 Peaks					546657.0	546657.0	94.96	100.00



***In vivo* evaluation of the radiolabeled conjugate **15** by SPECT-CT/fluorescence imaging**

Note: the cell culture, preparation of animal models and animal handling, and *in vivo* imaging experiments by SPECT-CT were performed by our collaborators at Georges-Francois LECLERC Cancer Center – UNICANCER (Dr. A. Oudot and Dr. B. Collin).

BT-474 cells (ATCC, Rockville, MD) are human breast adenocarcinoma cells that express the HER2/*neu* antigen at their surface. These cells were grown as adherent monolayer in RPMI-1640 medium (Lonza, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (Lonza). Cancer cells were harvested just prior to experiments and were washed twice with RPMI1640 medium and resuspended in a mixture of RPMI1640 and matrigel (BD Biosciences) (1/1, v/v). The viability of the cells was assessed by trypan blue exclusion assay. In all cases, viability was greater than 90%.

All animal studies were conducted in accordance with the legislation on the use of laboratory animals (directive 2010/63/EU) and were approved by accredited Ethical committee (C2ea Grand Campus n°105) and the French Ministries of Research (project #7830) and Agriculture (A 21 231 016 EA).

BALB/c nude mice (n = 8; 6–8 weeks old, purchased from Charles River, France) were subcutaneously injected in the flank with 2×10^7 BT-474 human breast carcinoma cells. After tumor growth, mice were randomized into 2 groups. The first group (n = 4) was injected with the ^{111}In radiolabeled bioconjugate intravenously in the lateral tail vein. The injected doses per mice were 22.4–24.7 μg

(8.2-9.0 MBq) in solution in PBS (100 μ L). The second group (n = 3) was co-injected with 16.1-20.9 μ g (5.9-7.6 MBq) of ^{111}In radiolabeled bioconjugate and an excess of trastuzumab (100 equivalents) per mice.

For all imaging procedures, mice were anesthetized under isoflurane (1.5–2.5% in oxygen). Whole body imaging was acquired at 24 h post-injection in both modalities, fluorescence and SPECT-CT.

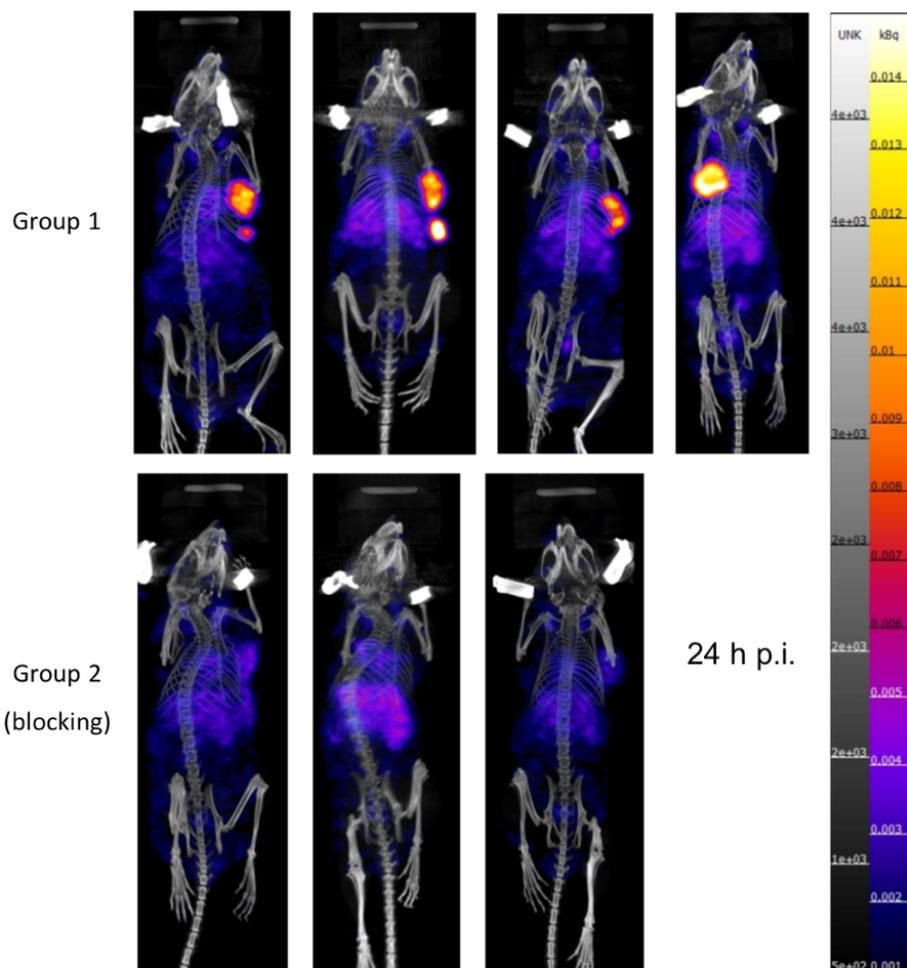
SPECT-CT imaging was performed 24 h after the injection of the radiolabeled conjugate using a NanoSPECT-CT small animal imaging tomographic γ -camera (Bioscan Inc., Washington, DC). CT acquisitions (45 kV, 500 ms) were first acquired during 4–6 min, followed by helical SPECT acquisitions with 30-40 s per projection frame resulting in acquisition times of 15-25 min. Both indium-111 photopeaks (171 and 245 keV) were used with 10% wide energy windows. The CT and SPECT reconstructions were performed using image processing softwares provided by Bioscan Inc. The SPECT-CT fusion image was obtained using the InVivoScope software (Bioscan Inc.).

Immediately after the end of SPECT-CT imaging, the animals were transferred to optical imager. The fluorescence signal was monitored using the Perkin Elmer Ivis Lumina III system with the following excitation/emission settings: 620 nm/670 nm. Data were analyzed with the Living Image[®] software. Values are reported as radiant efficiencies, allowing direct comparison of images from each experiment.

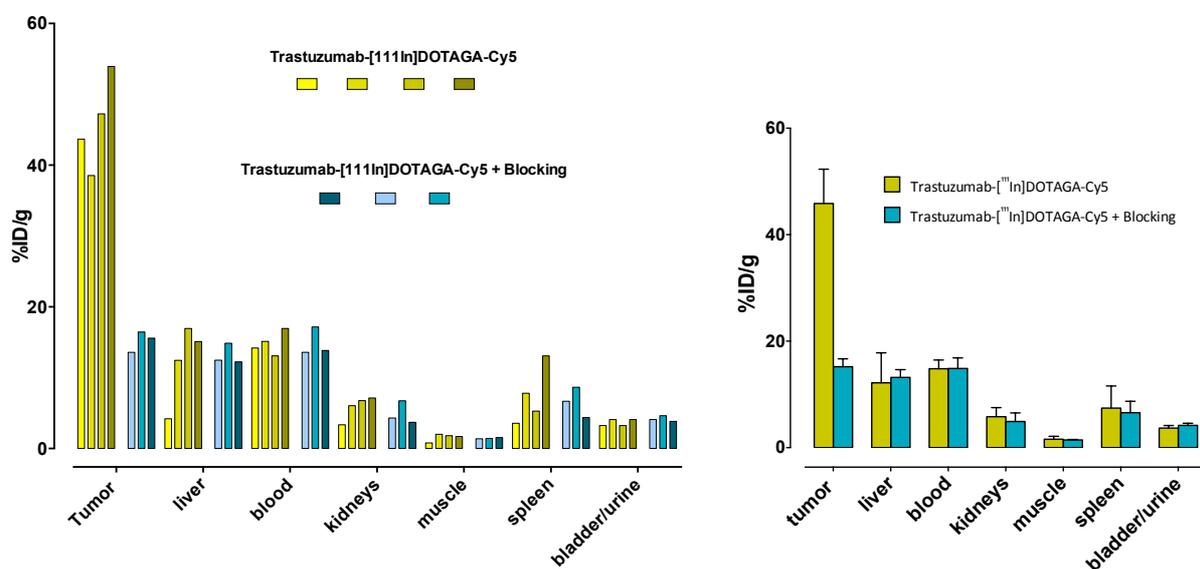
After optical imaging, mice were euthanized and organs collected for *ex vivo* optical imaging at 24 h post-injection. Fluorescence intensities were measured and normalized to photon per second per cm^2 using the region of interest (ROI) function of the Living Image[®] software. The ROI covers the entire tissue.

Then, the radioactivity of each organ was measured with a scintillation γ -counter (Cobra 4180, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Data were then converted to percentage of injected dose and to percentage of injected dose per gram of tissue (the injected doses being corrected for subcutaneously injected material remaining in the animal tail and for radioactive decay).

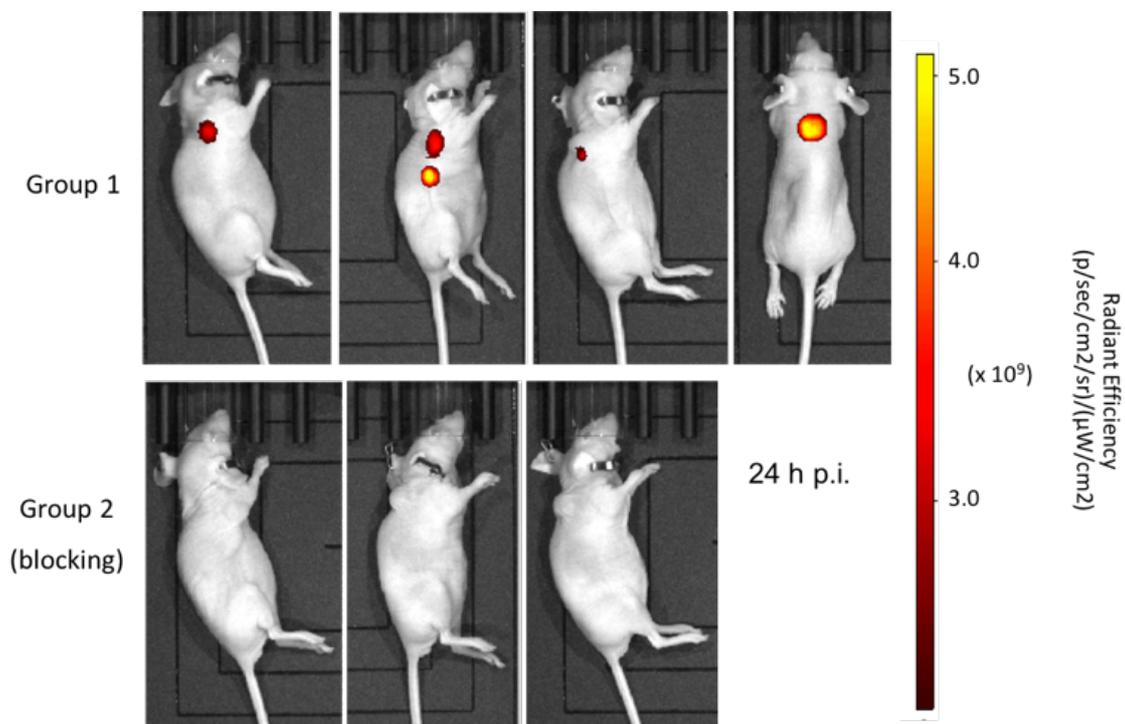
SPECT-CT imaging of the biodistribution of radiolabeled conjugate **15** in living mice at 24 h p.i.; SPECT mean intensity projections were fused to CT images:



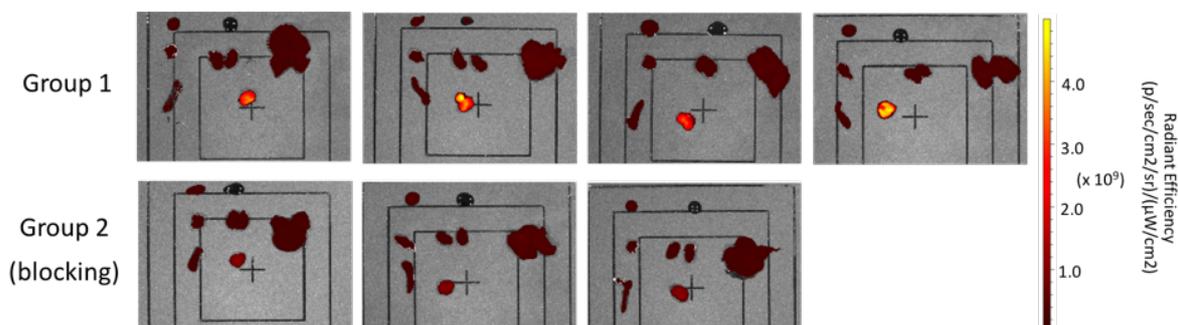
Biodistribution data; values are expressed in percentage of injected dose per gram (%ID/g) for each collected organ (tumor, liver, kidneys, blood, muscle, urine, spleen); graphs were obtained with Prism 7 software (GraphPad); Left: values for each mouse; Right: means and SD for the two groups with n = 4 for group 1 and n = 3 for group 2:



Images of the biodistribution of the radiolabeled conjugate **15** by the measurement of fluorescence (filter mode Ex./Em. 620/670 nm) in living mice at 24 h p.i.; the fluorescence signal, displayed as radiant efficiency ($[p/s/cm^2/sr]/[\mu W/cm^2]$), is superimposed to white light images; the positions were chosen for the best visibility of the tumor:



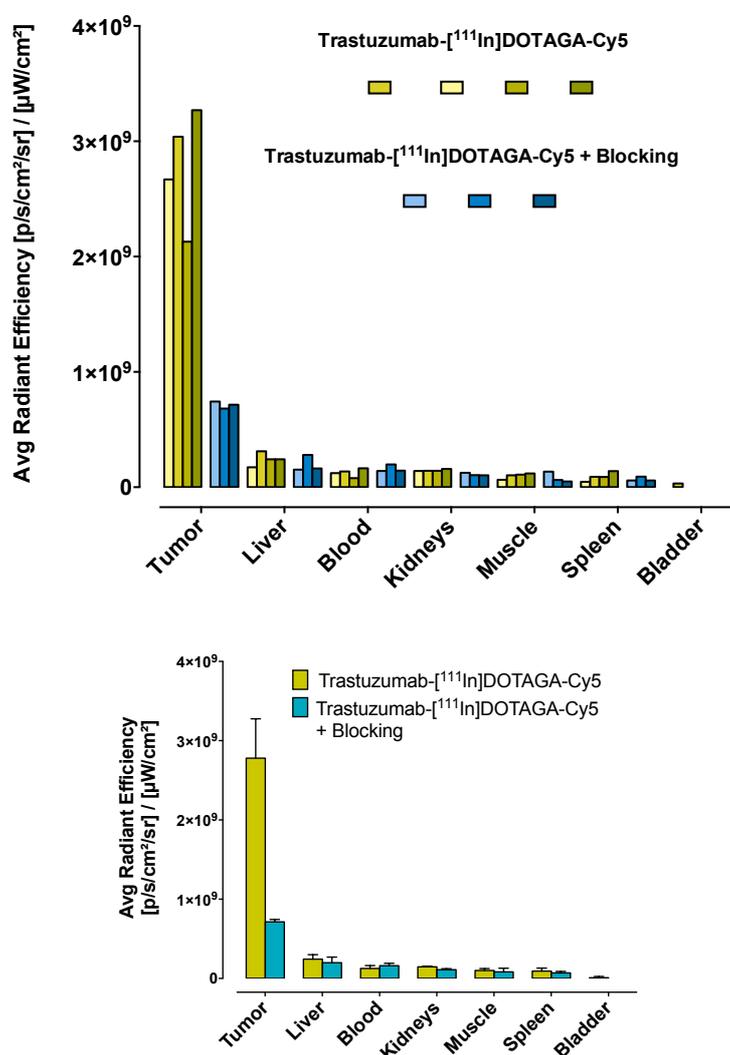
Fluorescence imaging of organs (tumor, liver, kidneys, blood, muscle, urine, spleen) after euthanasia of the mice at 24 h p.i. (filter mode Ex./Em. 620/670 nm):



Organs position:

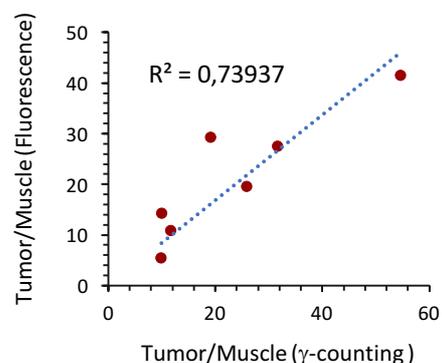
blood/plasma	urine	
muscle	kidneys	liver
spleen	tumor	

Biodistribution data; values are expressed in percentage related to the sum of average radiant efficiency ($[p/s/cm^2/sr] / [\mu W/cm^2]$) for each collected organ; graphs were obtained with Prism 6 or 7 software (GraphPad); Left: values for each mouse; Right: means and SD for the two groups with $n = 4$ for group 1 and $n = 3$ for group 2:



Correlation between gamma-counting and fluorescence data; Left: values of the tumor/muscle ratio for each mouse obtained from gamma-counting and fluorescence biodistribution studies; Right: graph of tumor/muscle ratio obtained by gamma-counting in function of that obtained by fluorescence imaging; the linear regression analysis is displayed:

	Tumor/muscle (Gamma counting)	Tumor/muscle (Fluorescence)
Group 1	54,66	41,5
	19,17	29,2
	25,93	19,5
	31,67	27,5
Group 2	9,88	5,5
	11,62	10,8
	10,02	14,2

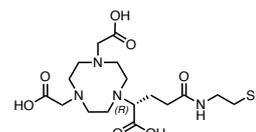


CHAPTER II - EXPERIMENTAL PART

Synthesis of (R)-NODAGA-S-Tz-Cl 17

(R)-2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2-mercaptoethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid, (R)-NODAGA-SH 16.

(R)-4-(4,7-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid ((R)-NODAGA(*t*Bu)₃) (159 mg, 292 μmol), TSTU (97.0 mg, 321 μmol, 1.1 eq) and DIPEA (61.0 μL, 350 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). The solution was stirred 40 min at room temperature and 2-(tritylsulfanyl)ethanamine (102 mg, 321 μmol, 1.1 eq), previously synthesized as described in literature,¹ was added. After 5 h, the solvent was eliminated under reduced pressure and a deprotection solution of TFA/DODT/TIPS (90 : 5 : 5, v/v) (10 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 3 h. The white solid formed was removed by filtration and TFA was evaporated from the filtrate under a stream of gaseous nitrogen. The product was precipitated in Et₂O (10 mL) at 4 °C and isolated by centrifugation (4000 rpm, 4 °C). Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluent: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) gave (R)-NODAGA-SH·1.2TFA **16** as a white hygroscopic powder (89.5 mg, 51%, purity: 95%).



Ionic chromatography analysis indicates an amount of 1.2 TFA per molecule;

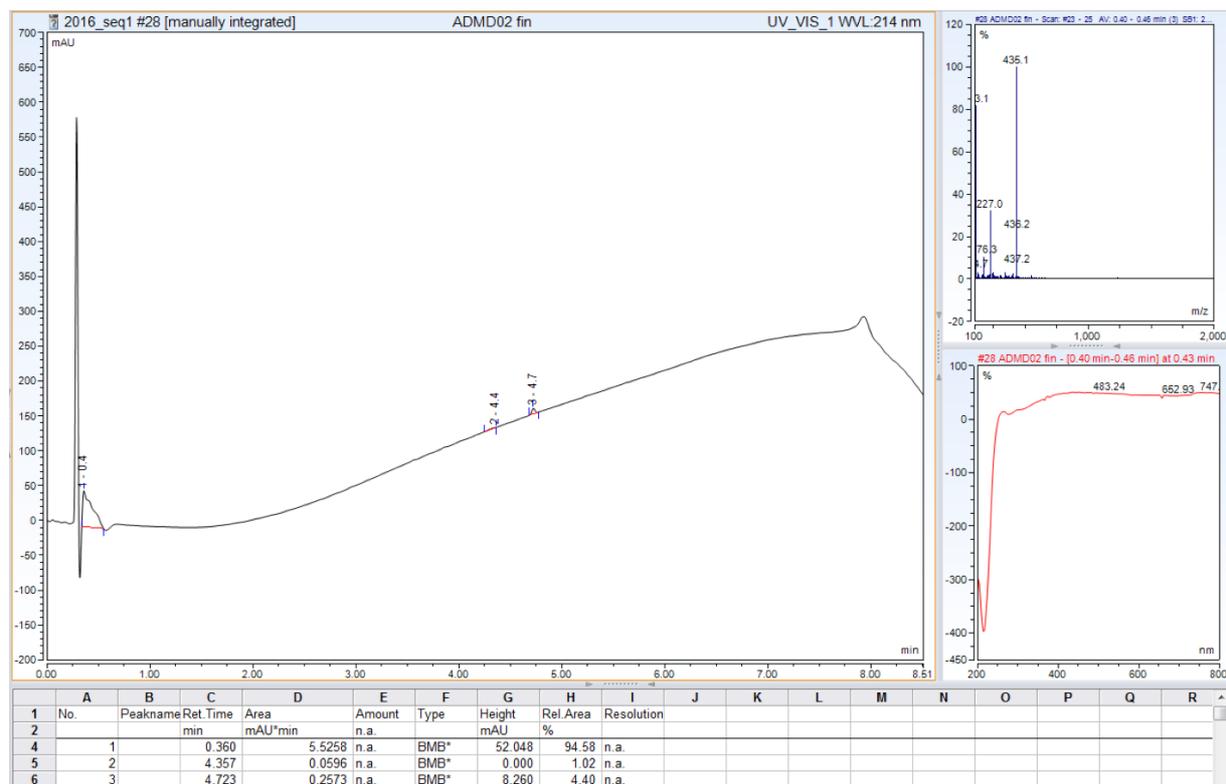
¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 2.02 to 2.27 (m, 2H; CH₂), 2.51 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H; CH₂), 2.68 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H; CH₂), 3.11 to 3.22 (m, 4H; CH₂), 3.22 to 3.31 (m, 4H; CH₂), 3.34 (s, 4H; CH₂), 3.40 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H; CH₂), 3.70 (dd, ³J = 6.0 and 7.8 Hz, 1H; CH), 3.98 (s, 4H; CH₂);

¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 23.2, 24.4, 32.6, 42.1, 45.9, 49.5, 50.9, 55.5, 63.8, 171.9, 172.2, 175.4, some impurities were detected at 112.9, 113.5, 115.1, 117.4, 126.9 and 130.3;

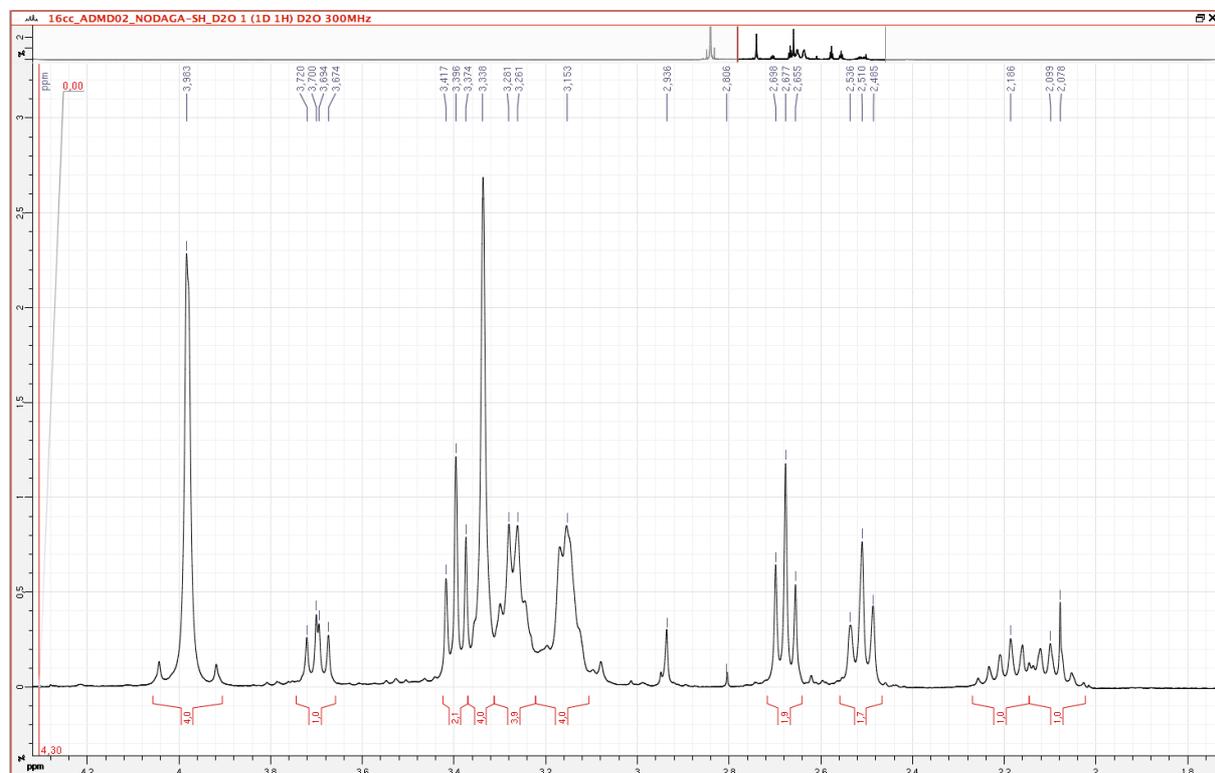
LRMS: m/z calculated for C₁₇H₃₁N₄O₇S⁺ [M+H]⁺ 435.2, found 435.1.

¹ Halkes, K. M.; Souza, A. C. de; Maljaars, C. E. P.; Gerwig, G. J.; Kamerling, J. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005, 3650–3659

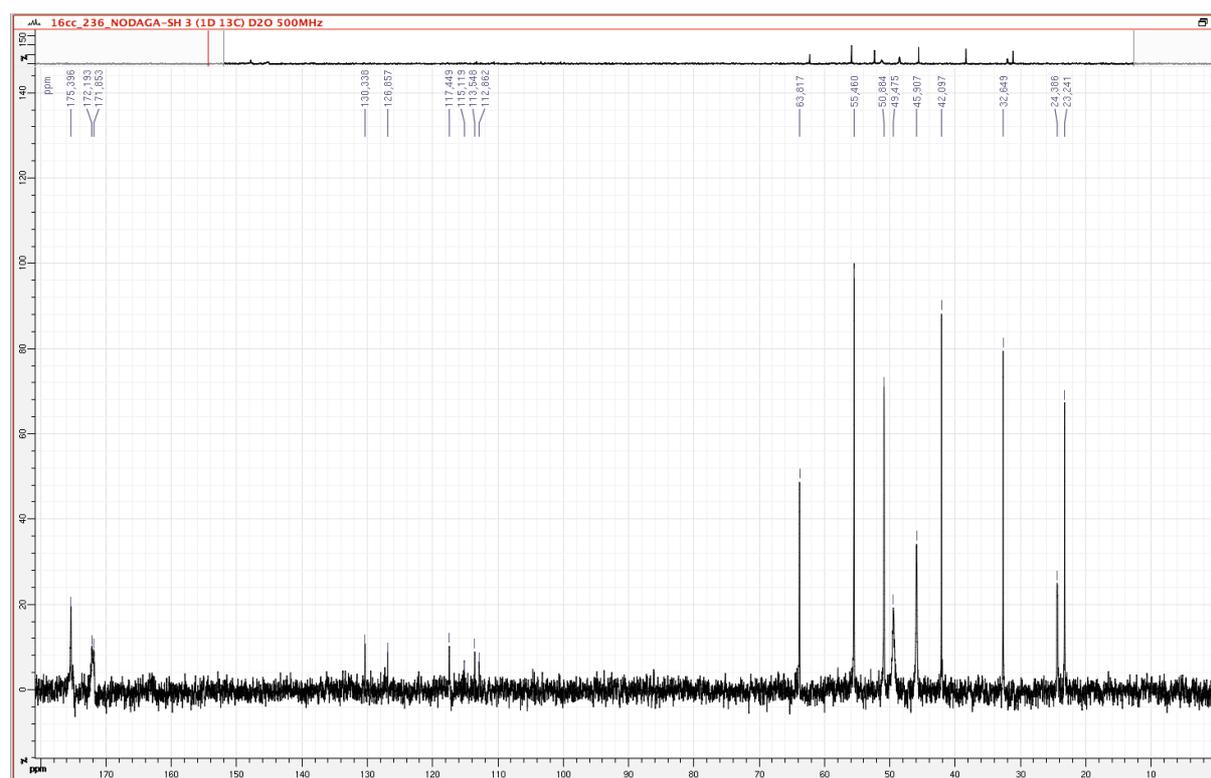
RP-HPLC-LRMS analysis of (R)-NODAGA-SH 16:



¹H NMR spectrum of (R)-NODAGA-SH 16:

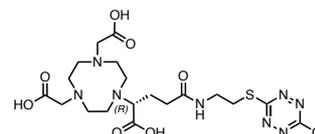


^{13}C NMR spectrum of (*R*)-NODAGA-SH **16**:



(*R*)-2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)thio)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid, (*R*)-NODAGA-S-Tz-Cl **17.**

The intermediate (*R*)-NODAGA-SH·1.2TFA **16** (40.0 mg, 69.9 μmol) and *s*-dichlorotetrazine (41.7 mg, 275 μmol , 3.9 eq) were dissolved in dry DMF (3 mL). After 30 min at room temperature, DMF was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluent: H_2O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) gave (*R*)-NODAGA-S-Tz-Cl·1.2TFA **17** as an orange powder (46 mg, 91%, purity: 95%).



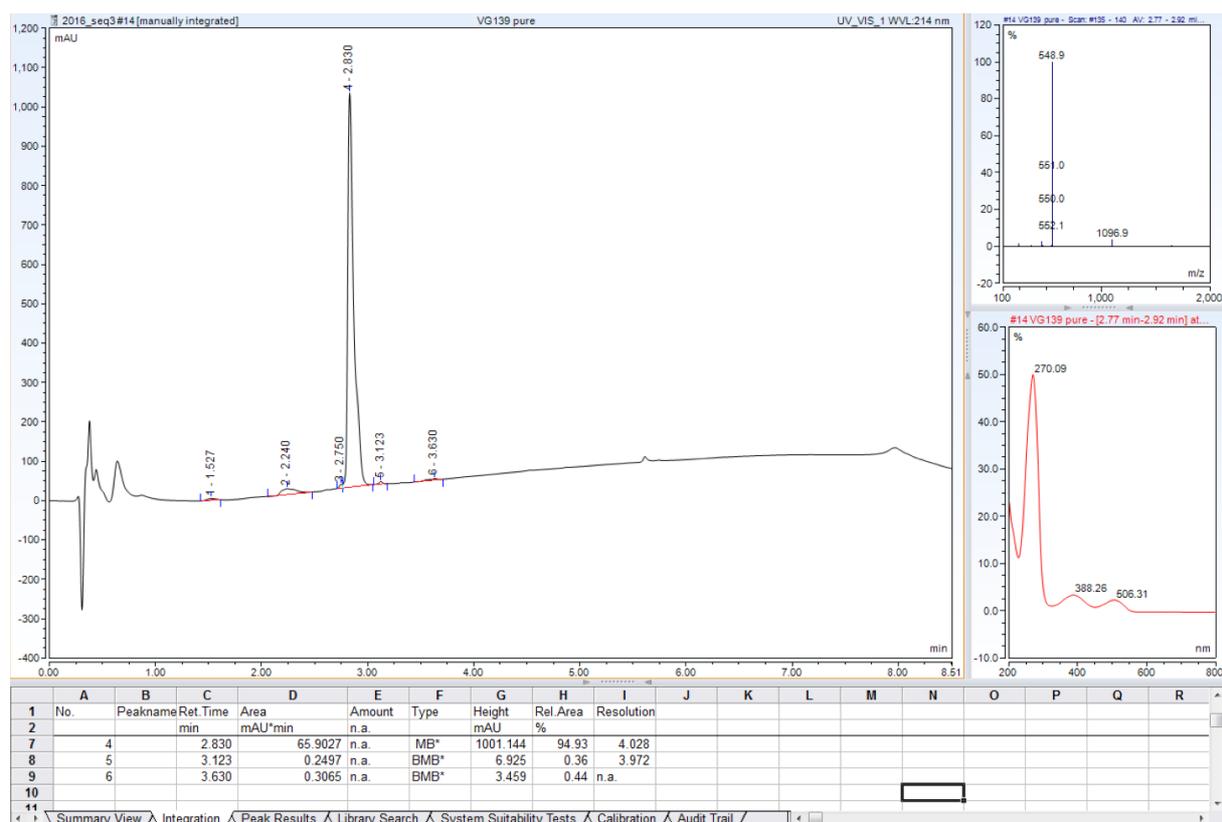
Ionic chromatography analysis indicates an amount of 1.2 TFA per molecule;

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 1.98 to 2.16 (m, 2H; CH_2), 2.46 (m, 2H; CH_2), 3.08 to 3.11 (m, 4H; CH_2), 3.23 (m, 4H; CH_2), 3.29 (s, 4H; CH_2), 3.55 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 1H; CH), 3.58 (m, 2H; CH_2), 3.67 (m, 2H; CH_2), 3.82 (s, 2H; CH_2), 3.83 (s, 2H; CH_2);

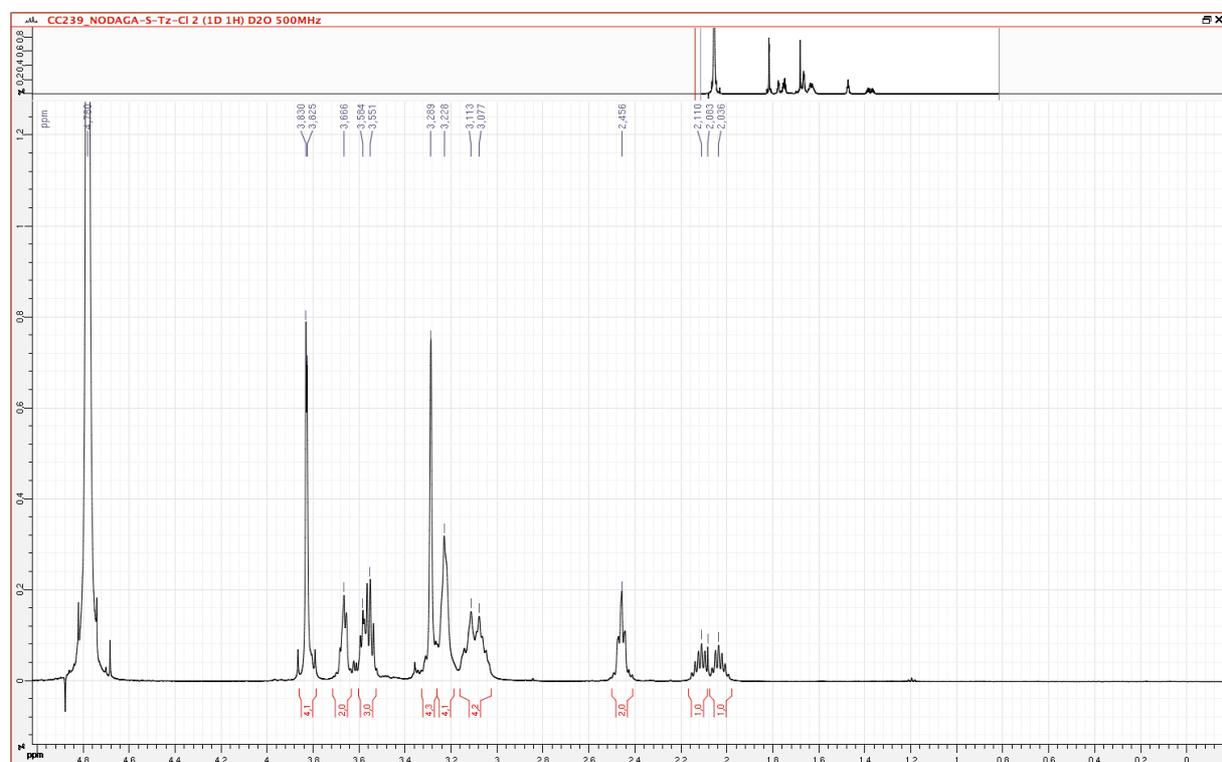
^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ 24.2, 30.2, 32.5, 37.5, 45.9, 49.2, 50.8, 56.3, 64.4, 164.9, 172.7, 175.3, 175.4, 175.6;

LRMS: m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{ClN}_8\text{O}_7\text{S}^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 549.2, found 548.9.

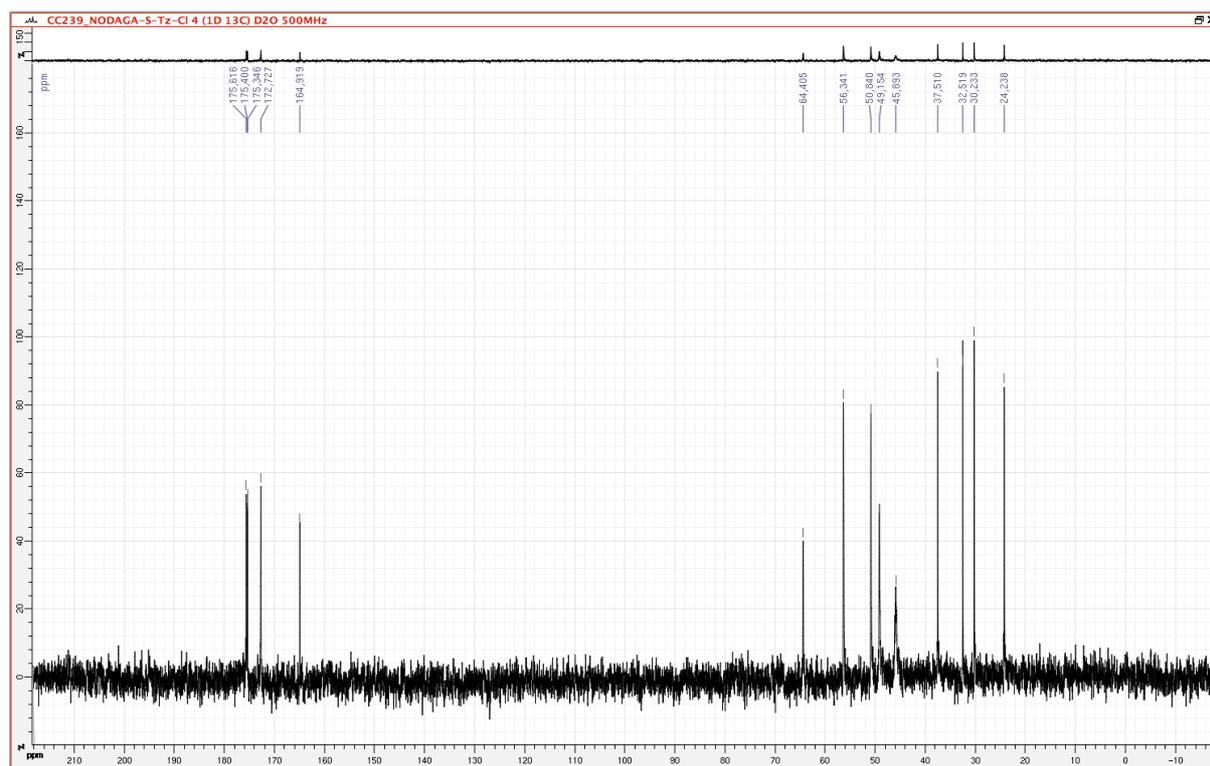
RP-HPLC-LRMS analysis of (R)-NODAGA-S-Tz-Cl 17:



¹H NMR spectrum of (R)-NODAGA-S-Tz-Cl 17:

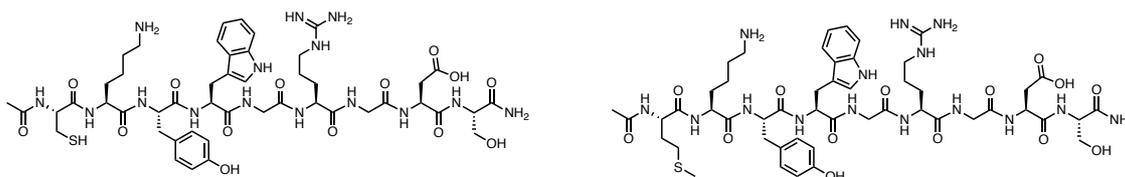


¹³C NMR spectrum of (R)-NODAGA-S-Tz-Cl 17:



Evaluation of the bioconjugation on model peptides

Synthesis of model peptides 18 and 19



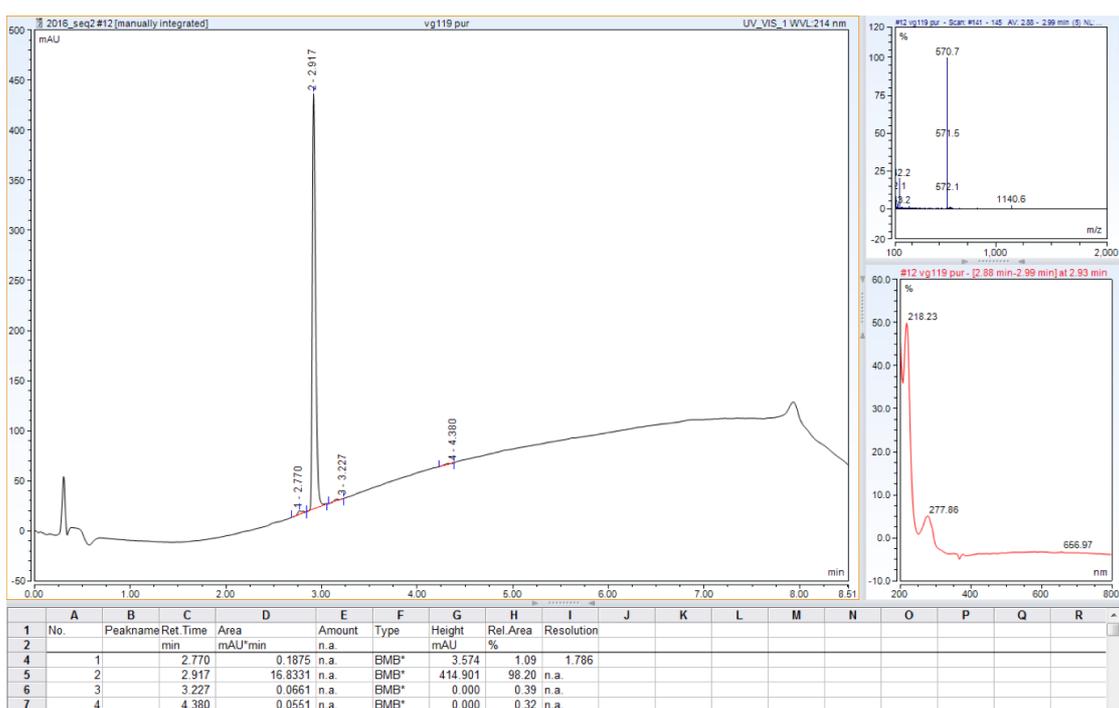
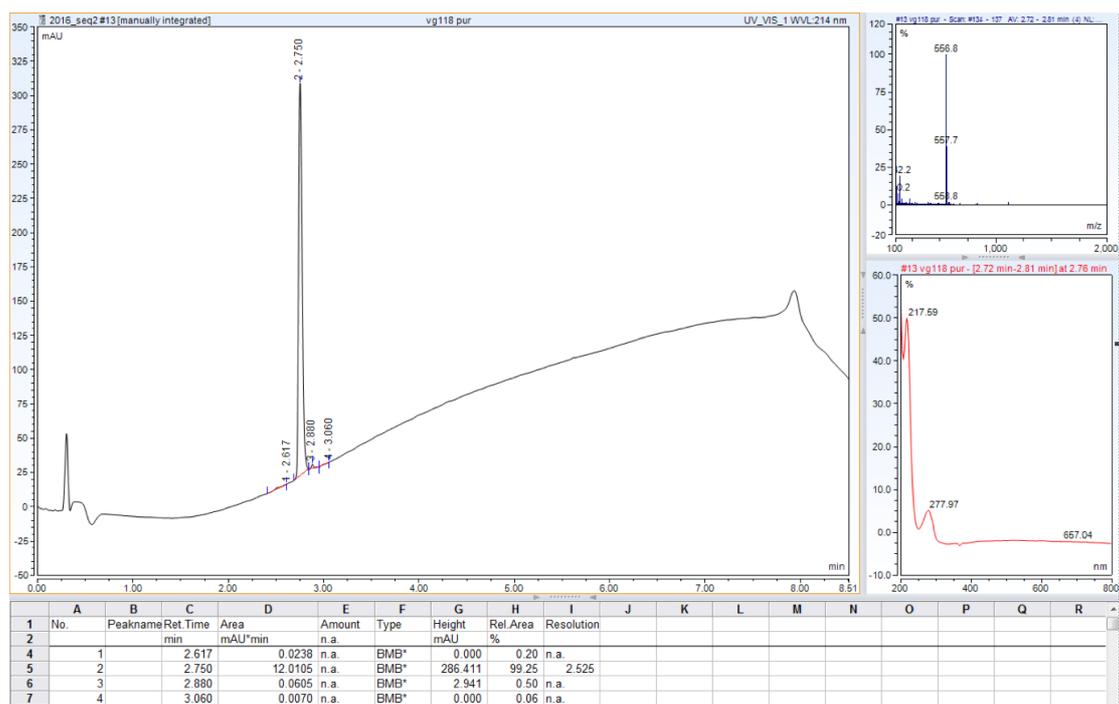
The peptides were synthesized *via* solid phase peptide synthesis on a Liberty Blue™ Automated Microwave Peptide Synthesizer (CEM, USA). Peptide couplings were performed by using predefined Fmoc chemistry protocols on 208 mg (0.1 mmol) of Fmoc-Rink Amide aminomethyl-polystyrene resin (Iris Biotech - loading 0.48 mmol/g). DIC/HOBt in DMF were used as the activating reagents and a solution of piperidine 20% in DMF was used for Fmoc deprotections. The capping of the N-terminal amino acid was performed by reaction at room temperature, during 30 min, with acetic anhydride (472 μ L, 5 mmol, 50 eq) and DIPEA (850 μ L, 5 mmol, 50 eq) in DMF (5 mL). Peptidyl-resins were treated with a cleavage solution formed of TFA/TIPS/DODT/H₂O (92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5, v/v) (5 mL) for 2.5 h. The resin was removed by filtration and the filtrate was concentrated under a flow of nitrogen. The peptides were precipitated in diethyl ether and recovered by centrifugation at 4000 rpm for 10 min. The crude peptides were purified by a semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column

(eluent: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) using a linear gradient solvent (10-50% MeCN in H₂O in 40 min) and the appropriate fractions were lyophilized to afford target peptides.

Peptide **18** (Ac-CKYWGRGDS-NH₂·2TFA): 55.6 mg, 42%, purity 99%. LRMS: m/z calculated for C₄₈H₇₀N₁₅O₁₄S⁺ [M+H]⁺ 1112.5, found 1112.6; m/z calculated for [M+2H]²⁺ 556.8, found 556.8.

Peptide **19** (Ac-MKYWGRGDS-NH₂·2TFA): 38.8 mg, 28%, purity 98%. LRMS: m/z calculated for C₅₀H₇₄N₁₅O₁₄S⁺ [M+H]⁺ 1140.5, found 1140.6; m/z calculated for [M+2H]²⁺ 570.8, found 570.7.

RP-HPLC-LRMS analysis of peptide **18** (top) and **19** (bottom):

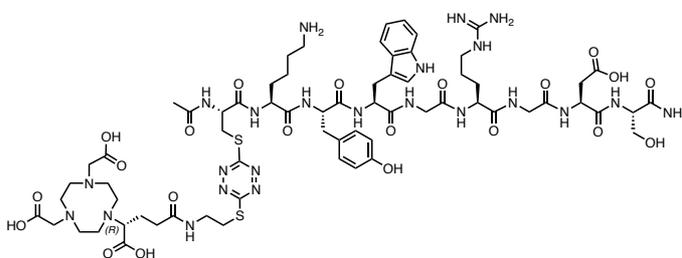


Kinetic evaluation of the labeling of model peptides with the monosubstituted chlorotetrazine **17**:

3 μL of a 2 mM stock solution of the peptide **18** (Ac-CKYWGRGDS-NH₂) or **19** (Ac-MKYWGRGDS-NH₂) in water, and 3 μL or 30 μL of a 5 mM stock solution of (*R*)-NODAGA-S-Tz-Cl **17** in PBS were diluted in aqueous buffers at various pH. The final volume was 300 μL and the final concentration in peptide was 0.02 mM. The reaction was monitored at room temperature, in a range of pH from 3.4 to 7.1 (ammonium acetate buffer 110 mM for pH 3.4 to 5.2, PB 66 mM for pH 6.3 to 7.1). Reactions were quenched, at the desired time, by addition of 100 μL of a 1 M HCl solution. Percentages of conversion were calculated from the absorbance chromatogram at 214 nm obtained by RP-HPLC-LRMS analysis. Experiments were performed in duplicate. Data was fitted in Prism 6 software (GraphPad) in one phase decay fit.

Preparation of the modified peptide Ac-C(Tz-S-(*R*)-NODAGA)KYWGRGDS-NH₂ **20**:

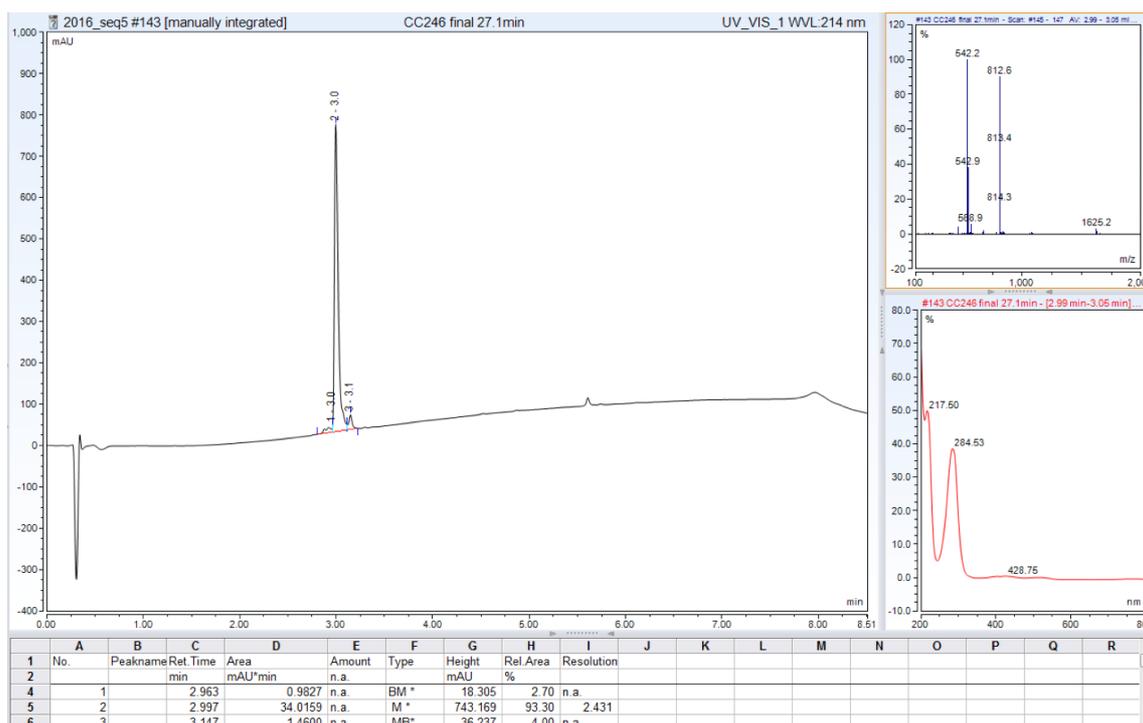
(*R*)-NODAGA-S-Tz-Cl·1.2TFA **17** (8.5 mg, 12.4 μmol) and the peptide **18** (25 mg, 18.7 μmol , 1.5 eq) were dissolved in distilled water (600 μL). The solution was stirred at room temperature, in the dark, for 30 min. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18



column (eluent: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) gave the conjugate Ac-C(Tz-S-(*R*)-NODAGA)KYWGRGDS-NH₂ **20** as an orange powder (5.8 mg, 27%, purity: 93%);

LRMS: C₆₇H₉₈N₂₃O₂₁S₂⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 1624.7, found 1625.2.

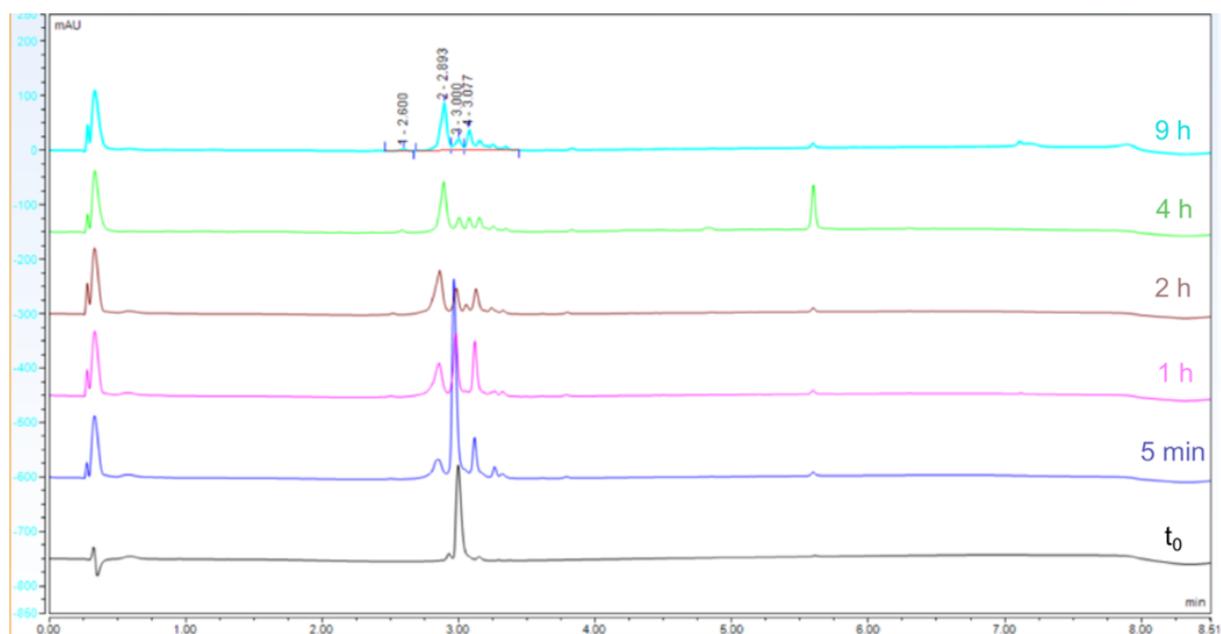
RP-HPLC-LRMS analysis of the conjugate **20**:



***In vitro* stability evaluation of the labeled peptide Ac-C(Tz-S-(R)-NODAGA)KYWGRGDS-NH₂ 20:**

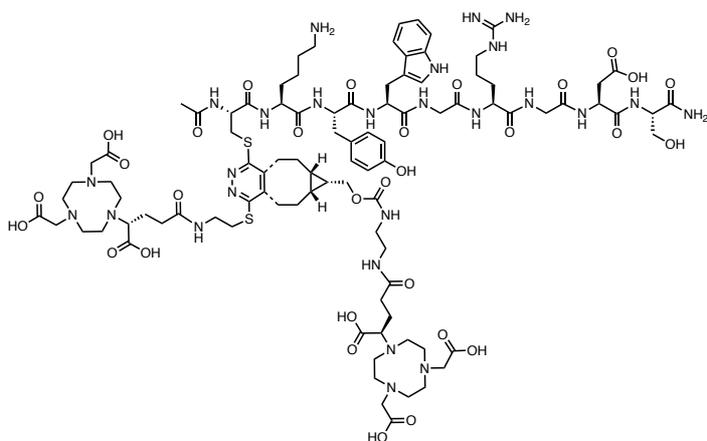
5 μ L of a 30 mM stock solution of conjugate **20** in DMSO (150 nmol) were stirred in a thermomixer (400 rpm, 37 °C, dark) with 145 μ L of FBS/RPMI (25 : 75, v/v). Final concentration in compound **20** was 1 mM. After 5 min, 1 h, 2 h, 4 h and 9 h, a 15 μ L sample of solution was collected and diluted with 60 μ L of absolute EtOH. Samples were vortexed and centrifuged (11700 rpm, 15 min) to remove the precipitated proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-LRMS (UV detection at 280 nm).

RP-HPLC-LRMS analysis of the initial compound **20** and of the samples collected after incubation in FBS/RPMI (25 : 75, v/v) during 5 min, 1 h, 2 h, 4 h and 9 h:



Kinetic evaluation of the second modification of the peptide by IEDDA:

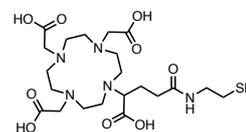
2 μ L of a 30 mM stock solution of conjugate **20** in DMSO (60 nmol) and 12 μ L of a 50 mM stock solution of the 2,2'-(7-((R)-4-((2-((((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)amino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid (NODAGA-BCN) in PBS (600 mmol, 10 eq) were mixed in PBS pH 7.4 at room temperature. The final concentration in compound **20** was 2 mM. Monitoring of the IEDDA reaction was performed on a Cary 50 spectrometer (Varian) equipped with a ultra-micro cell (TrayCell, Hellma analytics, 105.810 type; 3 μ L samples; dilution factor = 10).



Synthesis of the compounds 22 to 29

2,2',2''-(10-(1-carboxy-4-((2-mercaptoethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid, DOTAGA-SH 22.

5-(*tert*-butoxy)-5-oxo-4-(4,7,10-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)pentanoic acid (DOTAGA(*t*Bu)₄) (250 mg, 328 μmol), TSTU (108.7 mg, 361 μmol, 1.1 eq) and DIPEA (69.0 μL, 394 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (6 mL). The solution was stirred 45 min at room temperature and 2-(tritylsulfanyl)ethanamine (115 mg, 361 μmol, 1.1 eq) was added. After stirring 30 min at room temperature, the solvent was eliminated under reduced pressure and a deprotection solution of TFA/DODT/TIPS (90 : 5 : 5, v/v) (10 mL) was added. The reaction mixture was stirred at 45 °C during 1.5 h. The white solid formed was removed by filtration and TFA was evaporated from the filtrate under a stream of gaseous nitrogen. The product was precipitated in Et₂O (10 mL) at 4 °C and isolated by centrifugation (4000 rpm, 4 °C). Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) afforded DOTAGA-SH·4TFA 22 as a white hygroscopic powder (83.0 mg, 26%, purity: > 99%).

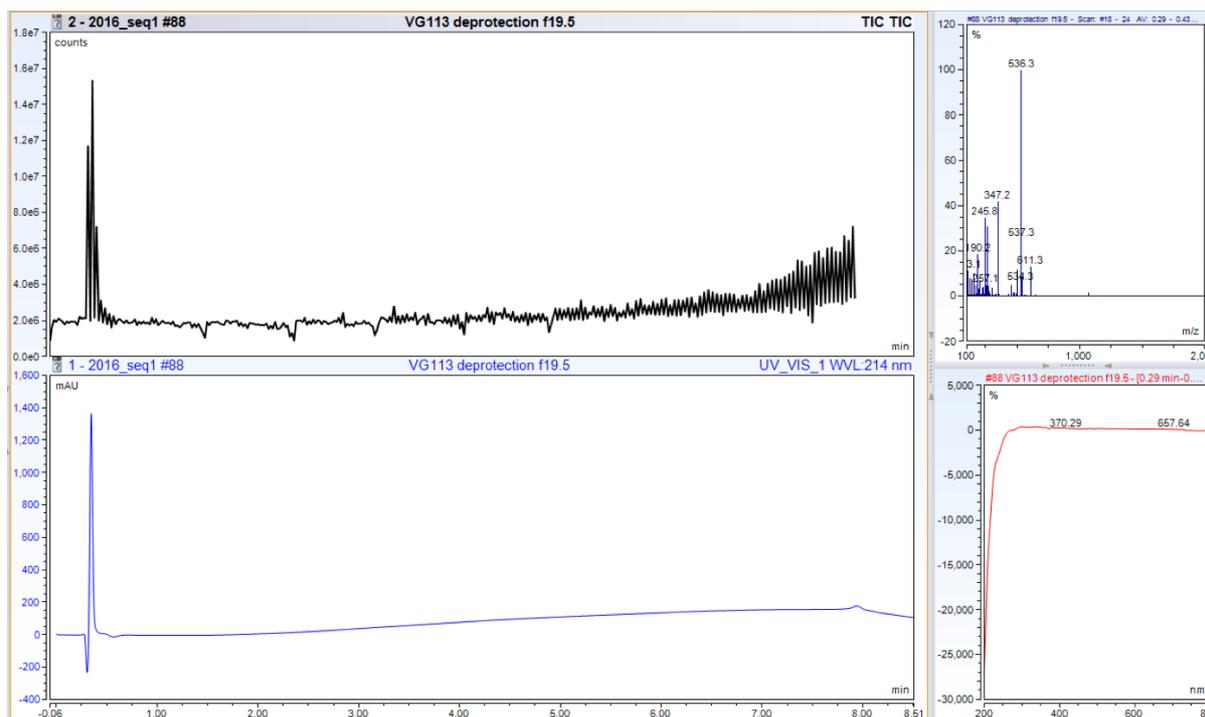


¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 2.08 (m, 2H; CH₂), 2.62 (m, 2H; CH₂), 2.69 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H; CH₂), 3.00 to 3.20 (m, 4H; CH₂), 3.22 to 3.66 (m, 12H; CH₂), 3.40 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H; CH₂), 3.78 to 4.20 (m, 6H; CH₂), 3.98 (t, ³J = 6.4 Hz, 1H; CH);

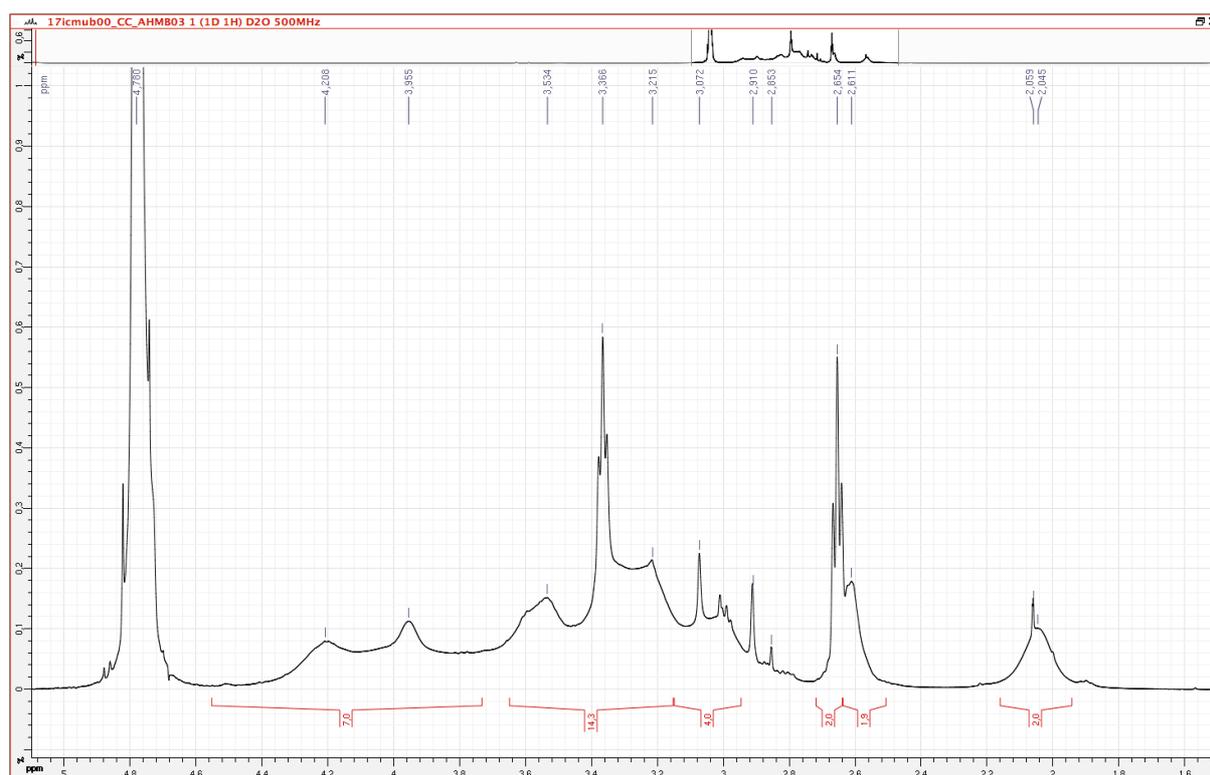
¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 20.9, 23.2, 32.8, 42.2, 46.8 to 60.0, 116.3 (q, ¹J = 290.0 Hz, TFA), 162.8 (q, ²J = 35.5 Hz, TFA), 166.0 to 176.0;

LRMS: C₂₁H₃₈N₅O₉S⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 536.2, found 536.3.

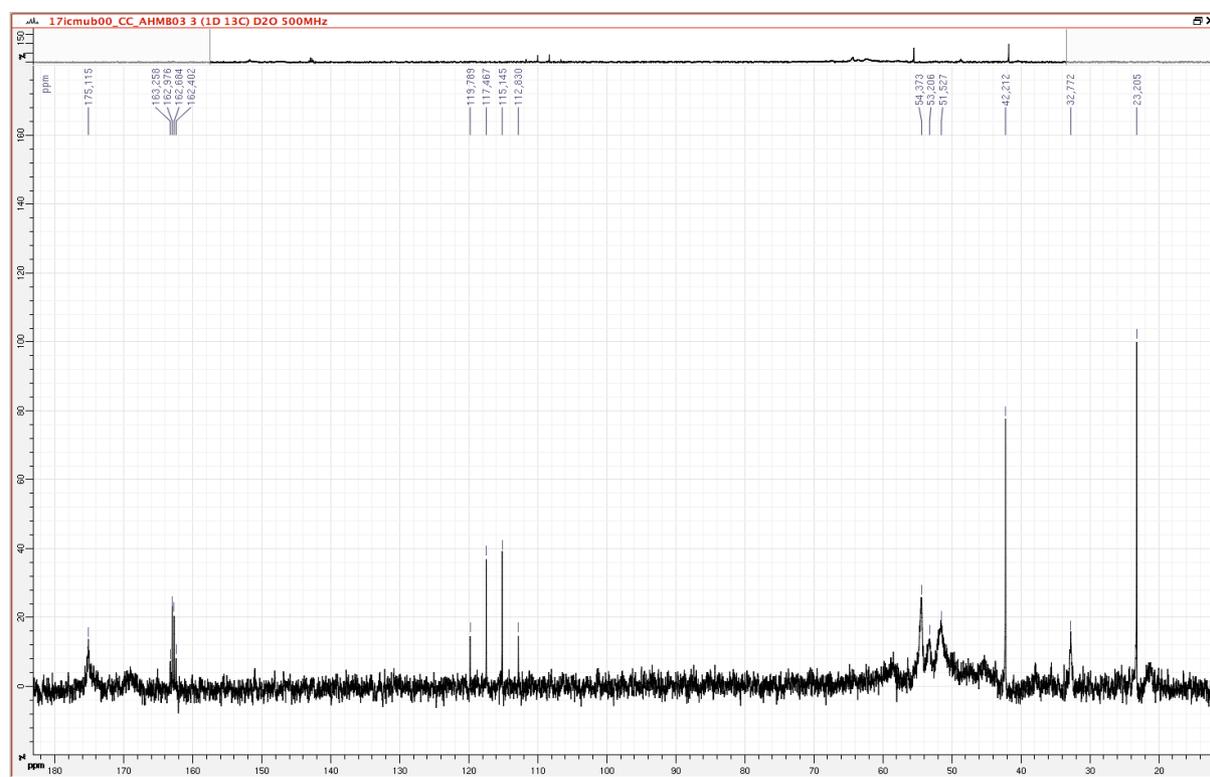
RP-HPLC-LRMS analysis of DOTAGA-SH 22 (total ion chromatogram and UV detection at 214 nm):



¹H NMR spectrum of DOTAGA-SH 22:

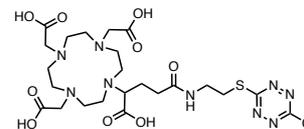


¹³C NMR spectrum of DOTAGA-SH 22:



2,2',2''-(10-(1-carboxy-4-((2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)thio)ethyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid, DOTAGA-S-Tz-Cl **23.**

The intermediate DOTAGA-SH-4TFA (30.0 mg, 30.3 μ mol) and *s*-dichlorotetrazine (25.0 mg, 165.6 μ mol, 5.5 eq) were dissolved in dry DMF (3 mL). After 30 min at room temperature, DMF was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluents: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) gave (*R*)-DOTAGA-S-Tz-Cl-0.5TFA **23** as an orange powder (20.3 mg, 86%, purity: 91%).



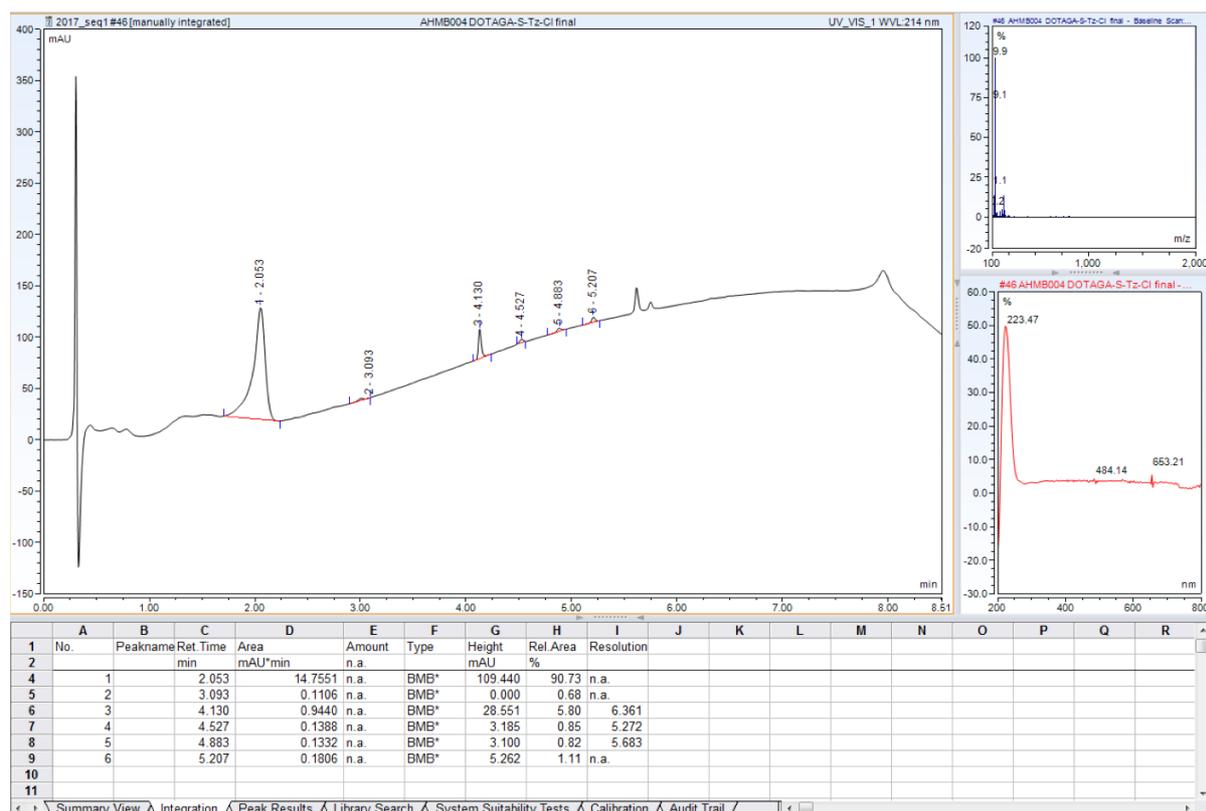
Ionic chromatography analysis indicates an amount of 0.5 TFA per molecule;

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 2.01 (m, 2H; CH₂), 2.57 (m, 2H; CH₂), 2.88 to 3.67 (m, 20H; CH₂), 3.67 to 4.33 (m, 7H; CH₂, CH);

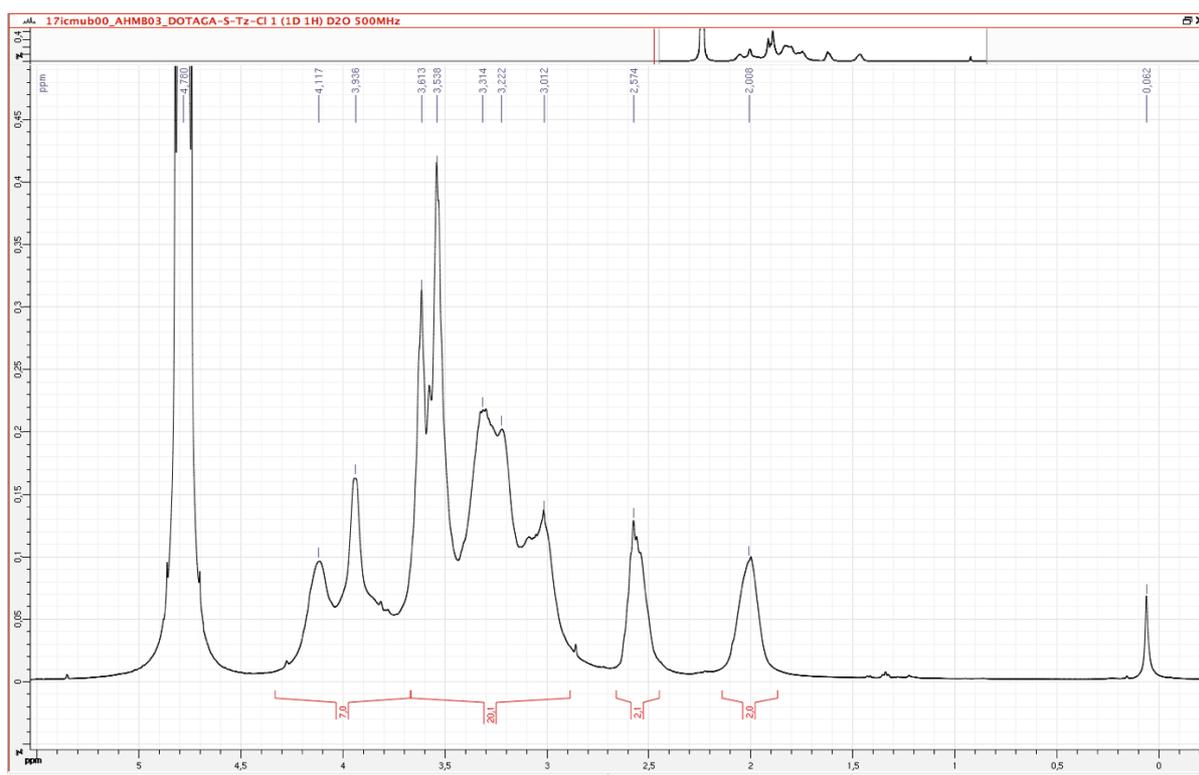
¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 21.3, 30.1, 32.7, 45.5, 51.4, 53.4, 54.7, 58.9, 116.3 (q, ¹J = 290.0 Hz, TFA), 162.9 (q, ²J = 35.5 Hz, TFA), 164.9, 169.0, 175.2, 175.4;

LRMS: C₂₃H₃₇ClN₉O₉S⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 650.2, found 650.4.

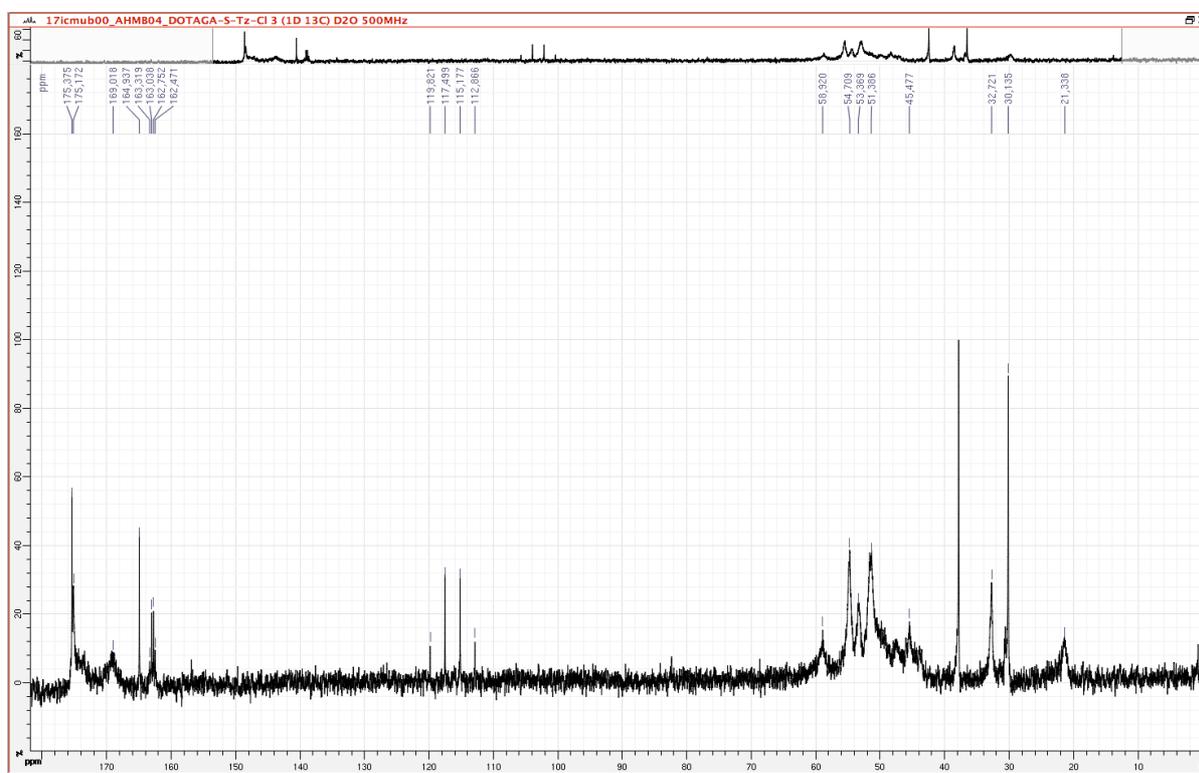
RP-HPLC-LRMS analysis of DOTAGA-S-Tz-Cl **23**:



¹H NMR spectrum of DOTAGA-S-Tz-Cl **23**:

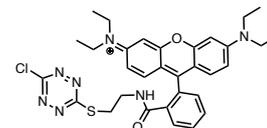


¹³C NMR spectrum of DOTAGA-S-Tz-Cl **23**:



***N*-(9-(2-((2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)thio)ethyl)carbamoyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-ylidene)-*N*-ethylethanaminium, Rhodamine B-S-Tz-Cl **24**.**

The intermediate Rhodamine B-SH-1Cl **4** (84.9 mg, 158.0 μmol) and *s*-dichlorotetrazine (25.6 mg, 169.5 μmol , 1.1 eq) were dissolved in CH_2Cl_2 (2 mL) and DIPEA (29.6 μL , 169.5 μmol , 1.1 eq) was added. After 5 h at room temperature, the solvent was eliminated under reduced pressure.



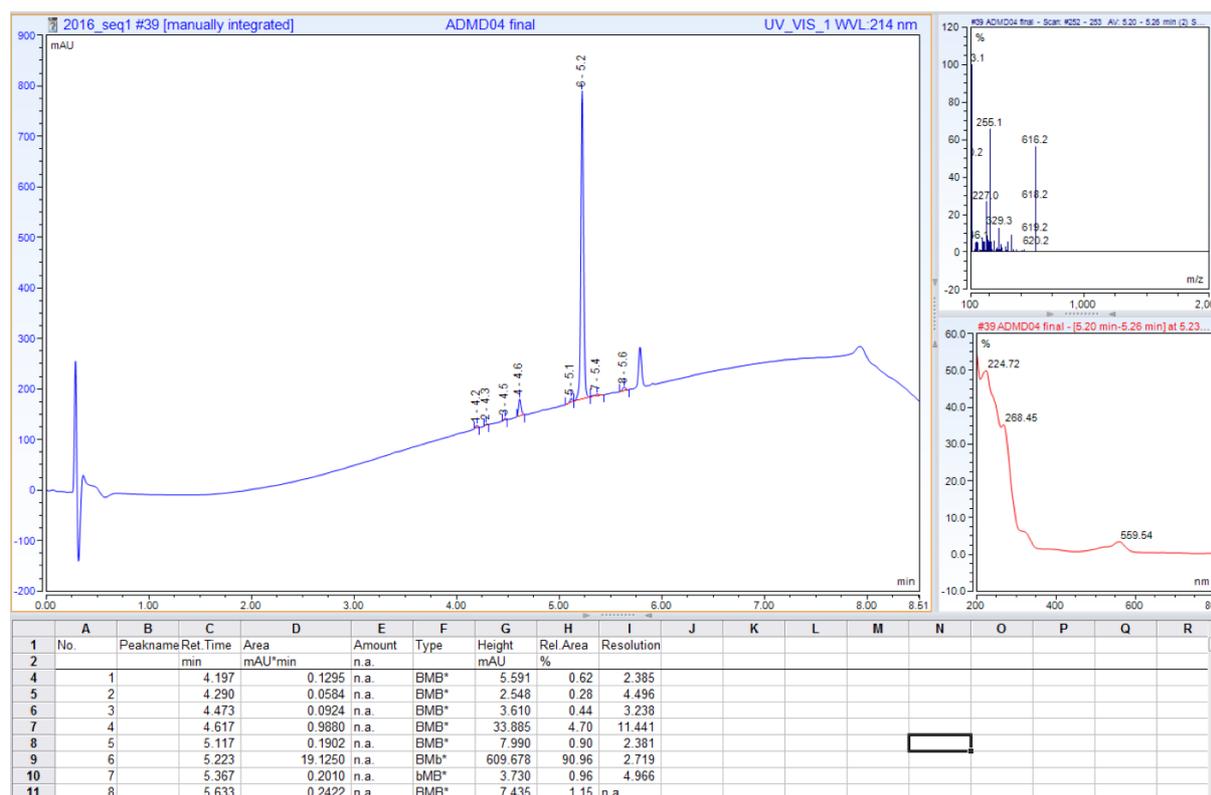
Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluents: H_2O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) gave Rhodamine B-S-Tz-Cl-0.6TFA **24** as a pink powder (11.3 mg, 9%, purity: 91%).

Ionic chromatography analysis indicates an amount of 0.6 TFA per molecule;

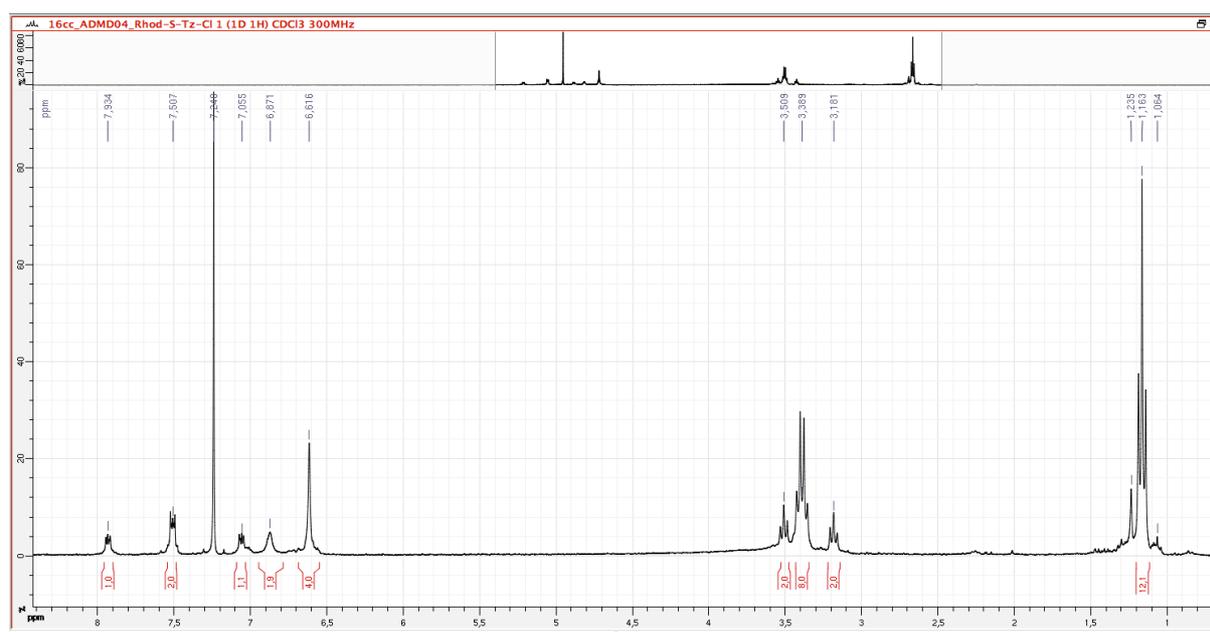
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), only the non-cyclic amide form was detected, δ 1.63 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 12H; CH_3), 3.18 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H; CH_2), 3.39 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 8H; CH_2), 3.51 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H; CH_2), 6.62 (s, 4H; CH), 6.87 (s, 2H; CH), 7.06 (m, 1H; CH), 7.51 (m, 2H; CH), 7.93 (m, 1H; CH);

HRMS: $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{ClN}_7\text{O}_2\text{S}^+$ ($[\text{M}]^+$) m/z calculated: 616.22560, found: 616.22622; $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{ClN}_7\text{NaO}_2\text{S}^+$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/z calculated: 638.20754, found: 638.20749; some non-identified impurities were detected at 926.46789, 1023.46421 and 1639.68710 m/z with $z = 1$.

RP-HPLC-LRMS analysis of Rhodamine B-S-Tz-Cl **24**:

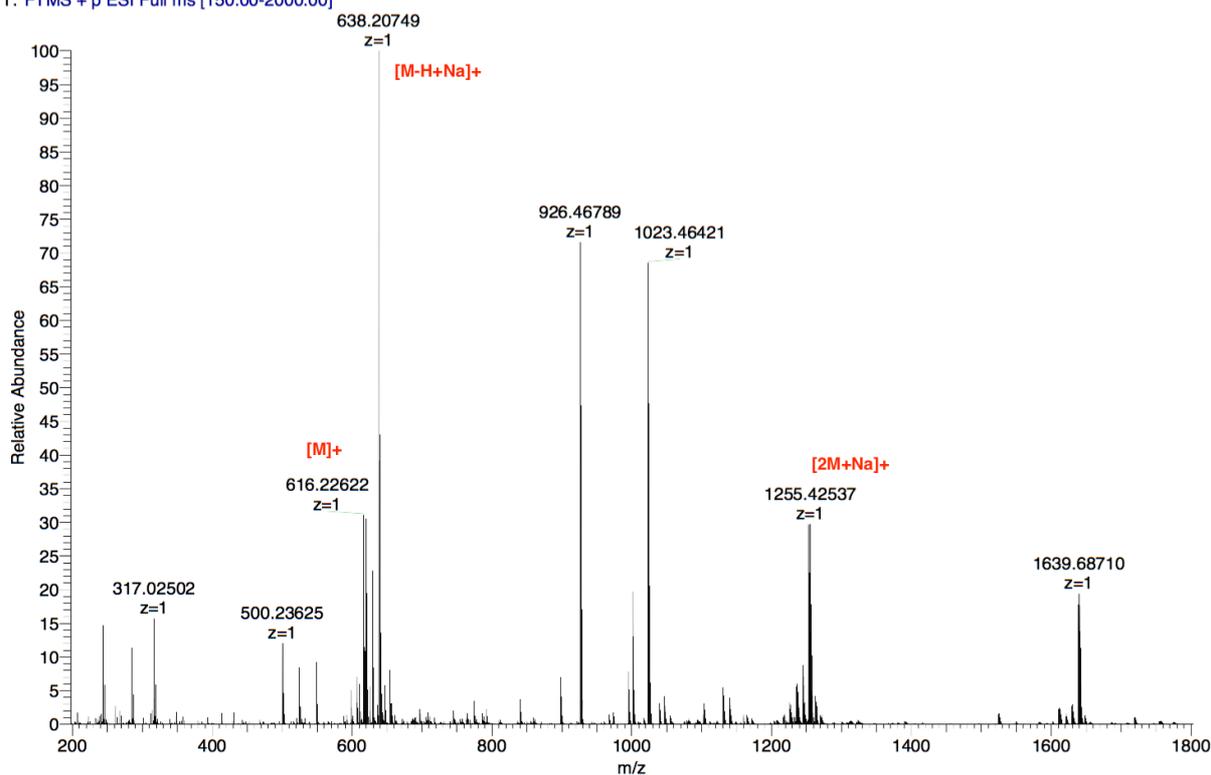


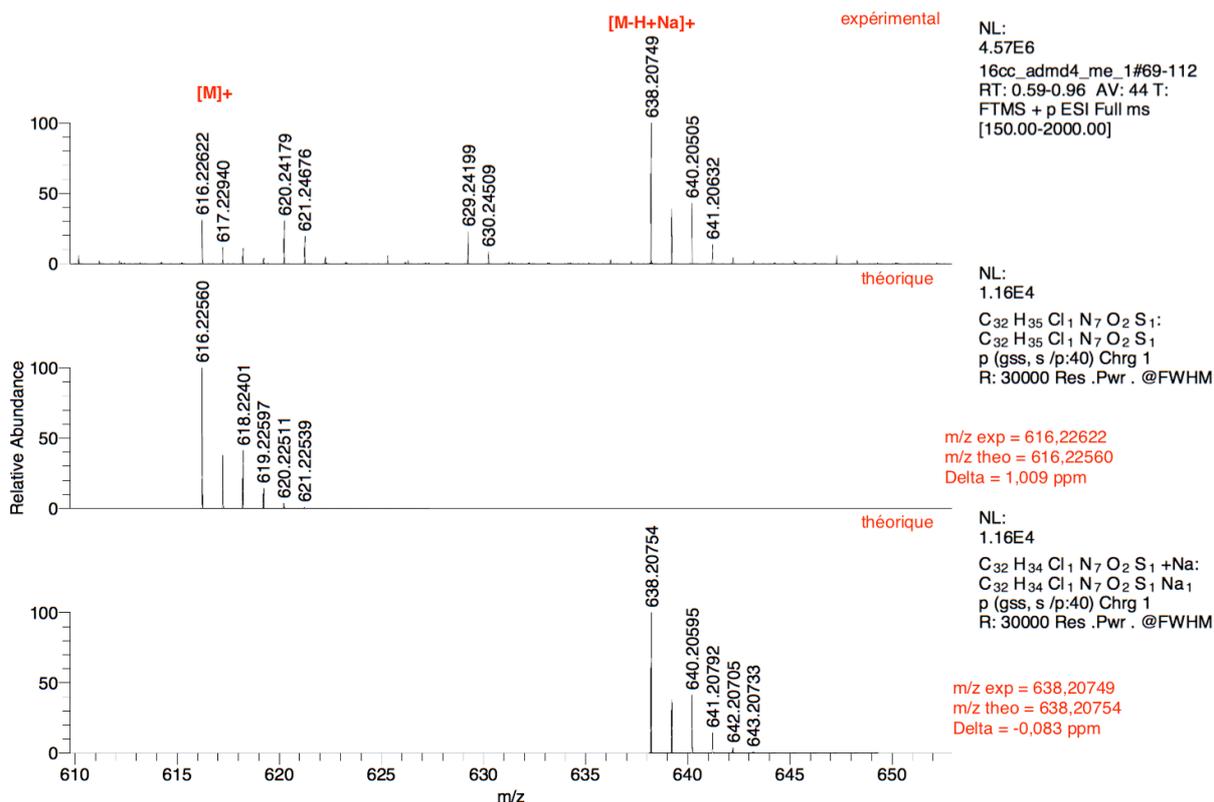
^1H NMR spectrum of Rhodamine B-S-Tz-Cl **24**:



HRMS spectrum of Rhodamine B-S-Tz-Cl **24** and comparison with simulated spectrum:

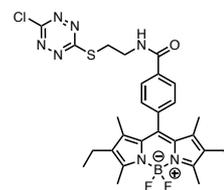
16cc_admd4_me_1 #69-112 RT: 0.59-0.96 AV: 44 NL: 4.57E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]





***N*-(2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)thio)ethyl)-4-(2,8-diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ4,5λ4-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzamide, BODIPY-S-Tz-Cl **25**.**

The intermediate BODIPY-SH (29.1 mg, 60.2 μmol) and *s*-dichlorotetrazine (10.6 mg, 70.2 μmol, 1.2 eq) were dissolved in DMF/MeCN (60 : 40, v/v) (1.5 mL) and DIPEA (12.5 μL, 72.2 μmol, 1.2 eq) was added. After 1 h at room temperature, solvents were eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a SiliaChrom® dt C18 column (eluent: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) gave BODIPY-S-Tz-Cl **25** as a red powder (24.1 mg, 58%, purity: 87%).

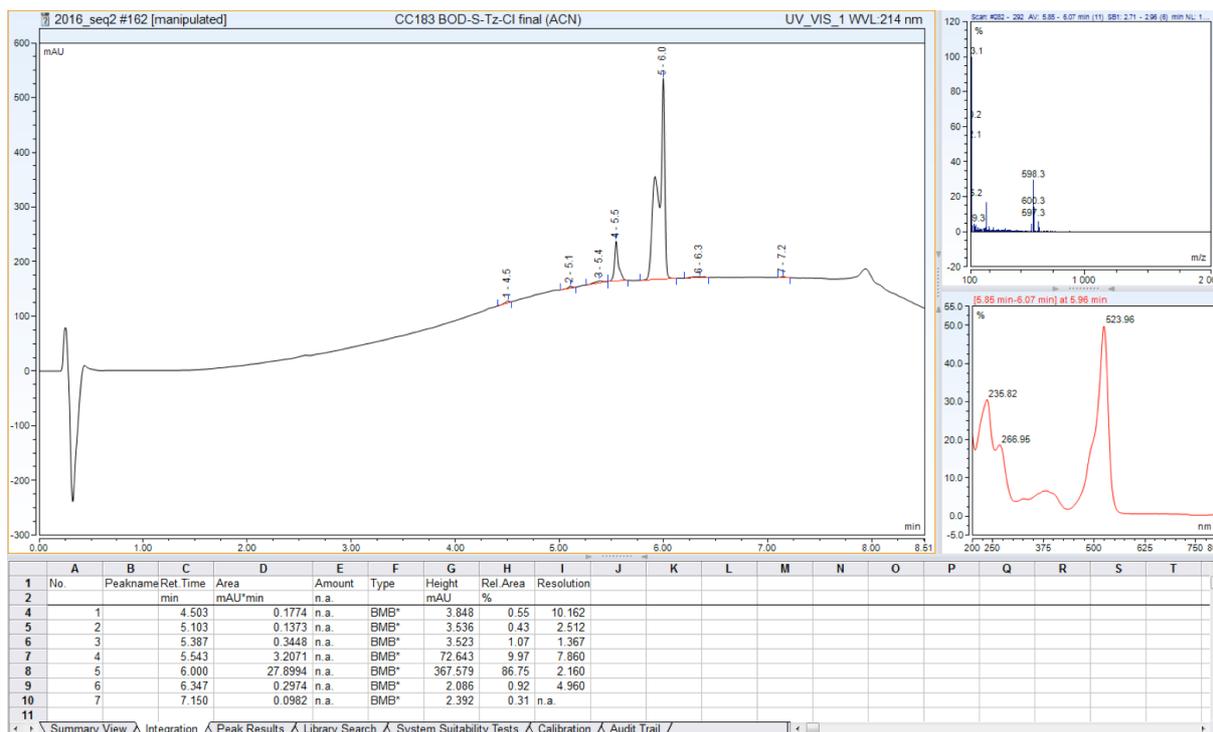


¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.96 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H; CH₃), 1.23 (s, 6H; CH₃), 2.28 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H; CH₂), 2.51 (s, 6H; CH₃), 3.65 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H; CH₂), 3.92 (dt, ³J = 5.7 and 6.3 Hz, 2H; CH₂), 6.71 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H; NH), 7.39 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H; CH), 8.18 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H; CH);

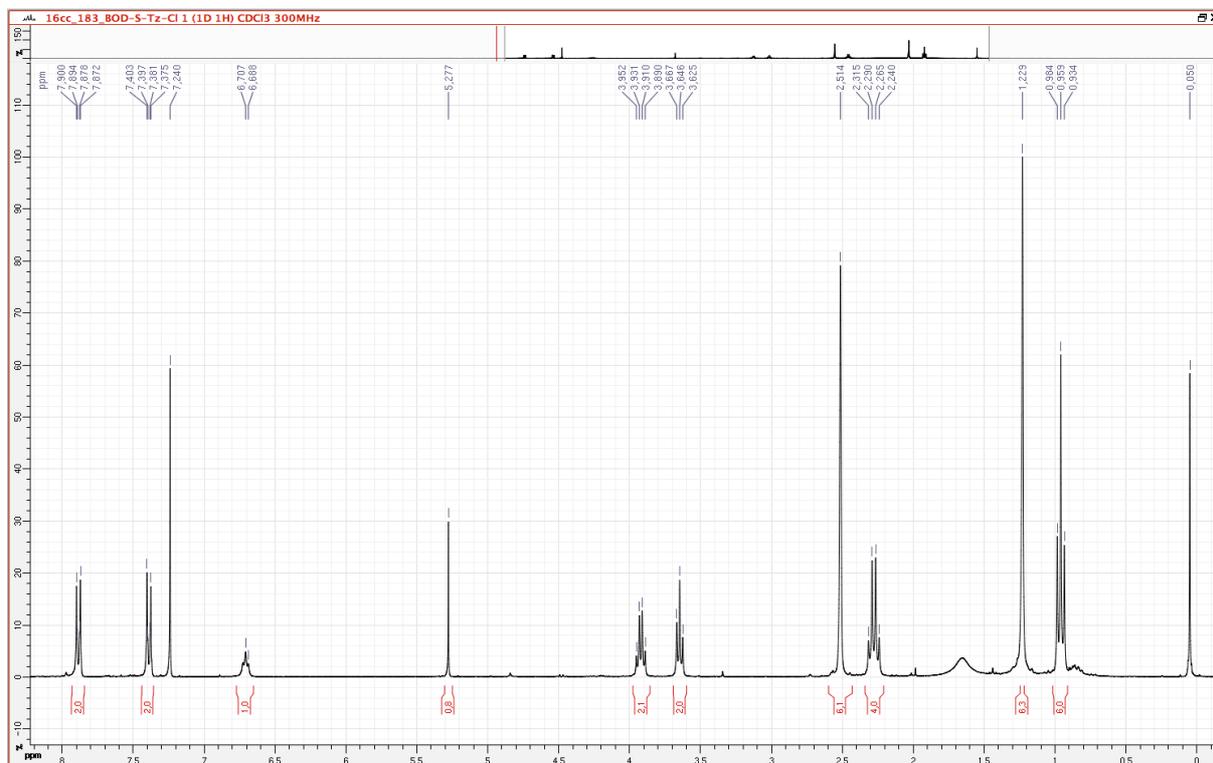
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 12.1, 12.8, 14.8, 17.3, 30.9, 39.2, 127.9, 129.2, 130.6, 133.3, 134.4, 138.3, 138.7, 139.9, 154.5, 166.3, 167.2, 175.7;

HRMS: C₂₈H₃₁BClFN₇O₂S⁺ ([M-F]⁺) m/z calculated: 578.20709, found 578.20828.

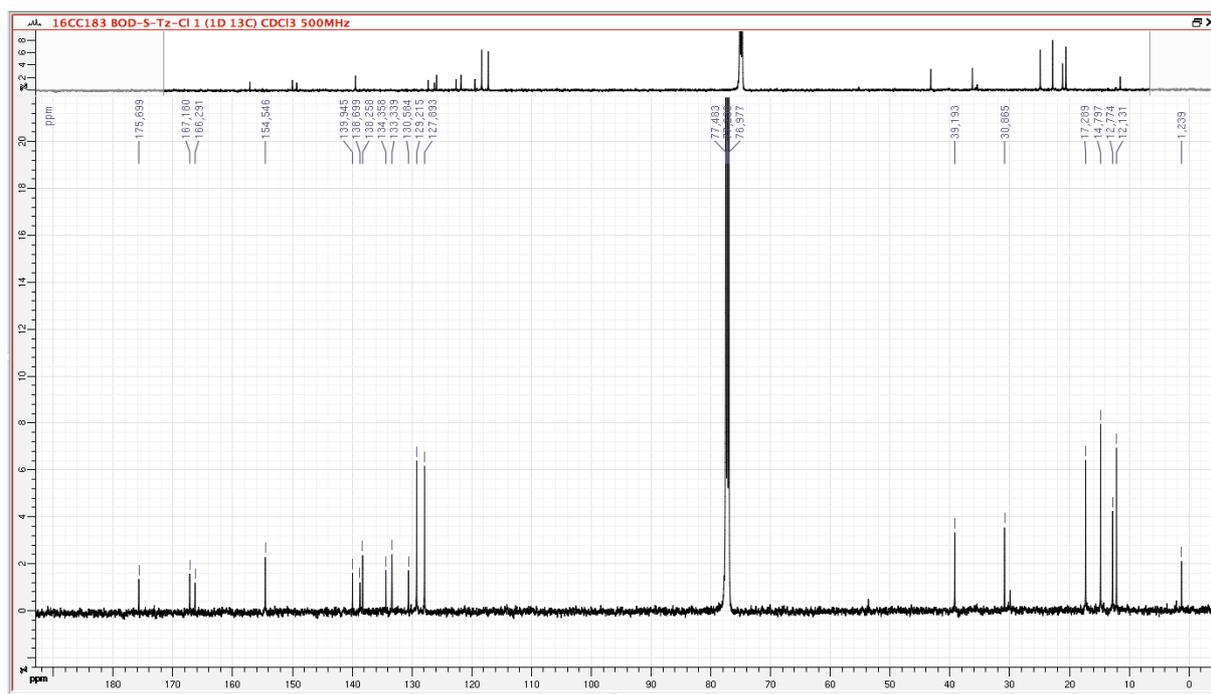
RP-HPLC-LRMS analysis of BODIPY-S-Tz-CI 25:



¹H NMR spectrum of BODIPY-S-Tz-CI 25:

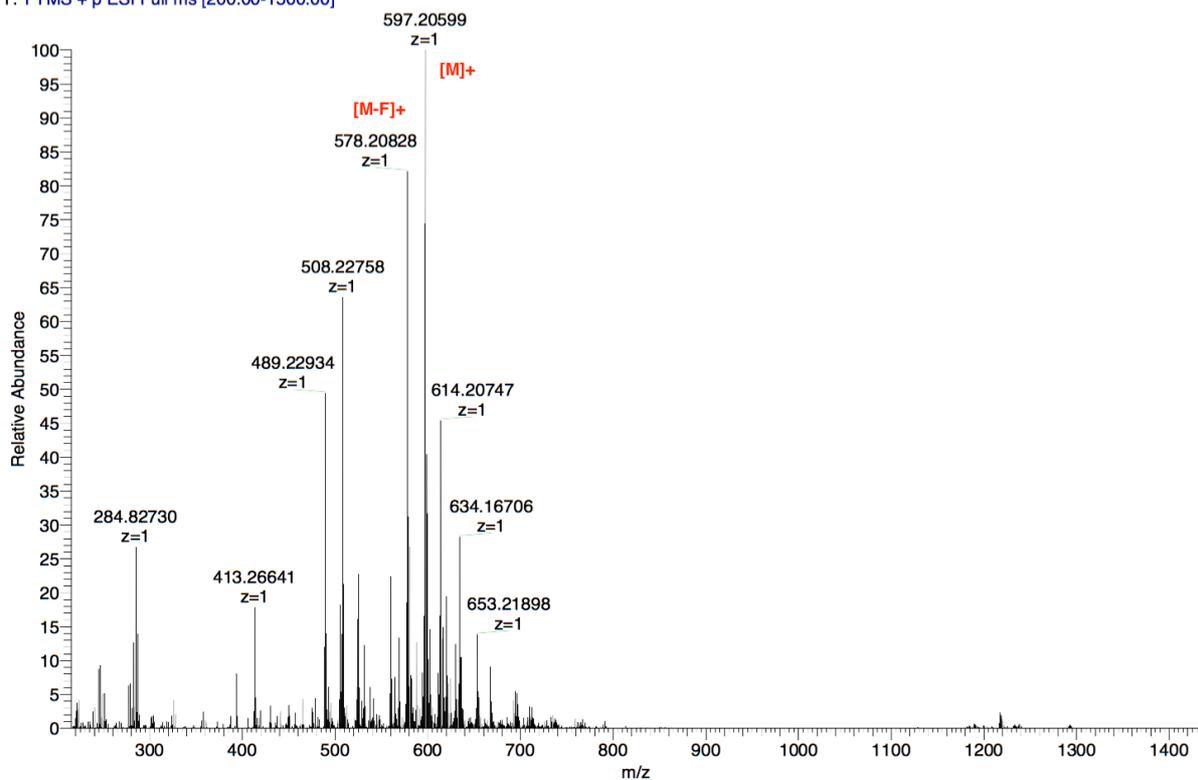


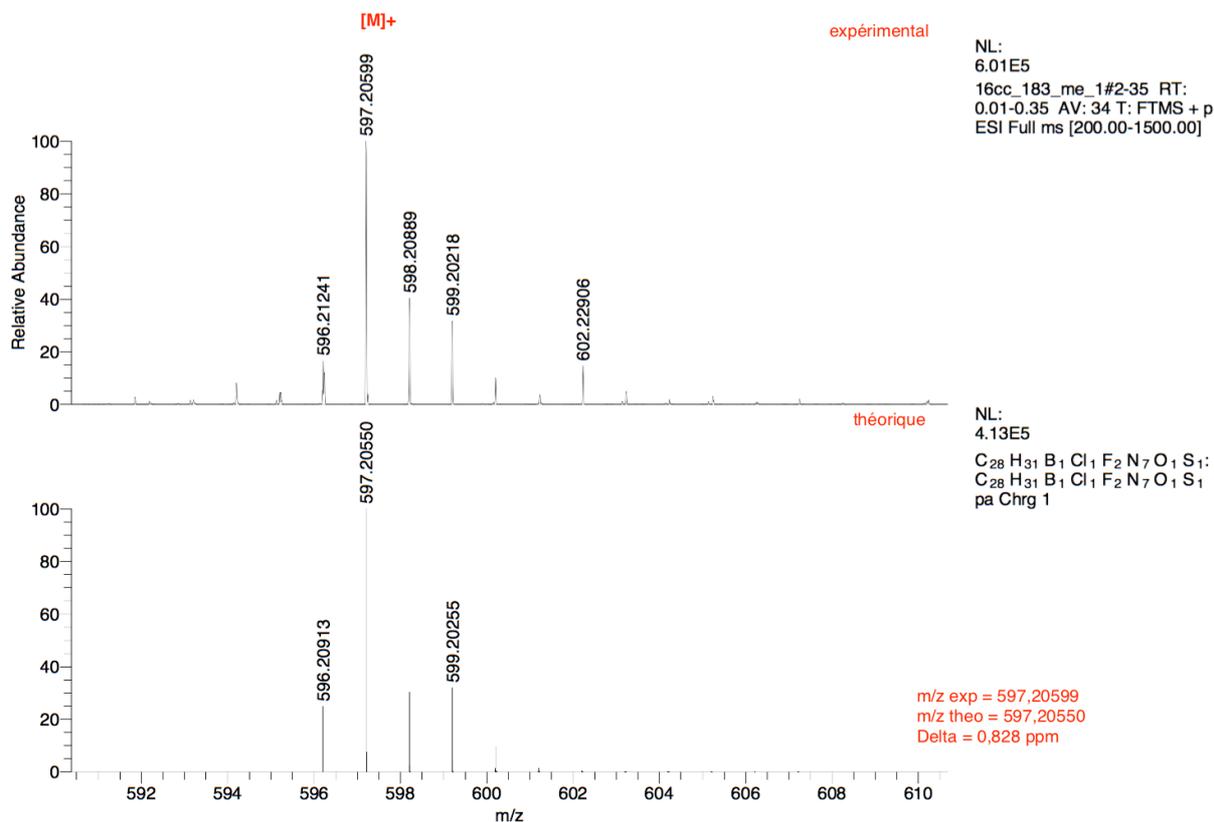
^{13}C NMR spectrum of BODIPY-S-Tz-Cl **25**:



HRMS spectrum of BODIPY-S-Tz-Cl **25** and comparison with simulated spectrum:

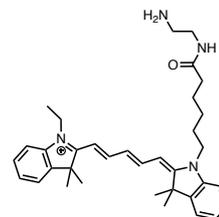
16cc_183_me_1 #2-35 RT: 0.01-0.35 AV: 34 NL: 6.01E5
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-1500.00]





2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2-aminoethyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium, Cyanine 5.0-NH₂ 26.

Cyanine 5.0-COOH·1TFA (20.0 mg, 32.7 μmol), TSTU (11.8 mg, 39.3 μmol, 1.2 eq) and DIPEA (6.9 μL, 39.3 μmol, 1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (700 μL). The solution was stirred 1 h at room temperature and ethylene diamine (21.8 μL, 327 μmol, 10.0 eq) and DIPEA (57.1 μL, 327 μmol, 10.0 eq) were added. After 25 min at room temperature, solvents were eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluent: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) afforded cyanine 5.0-NH₂·2TFA **26** as a blue powder (11.1 mg, 38%, purity: 85%).

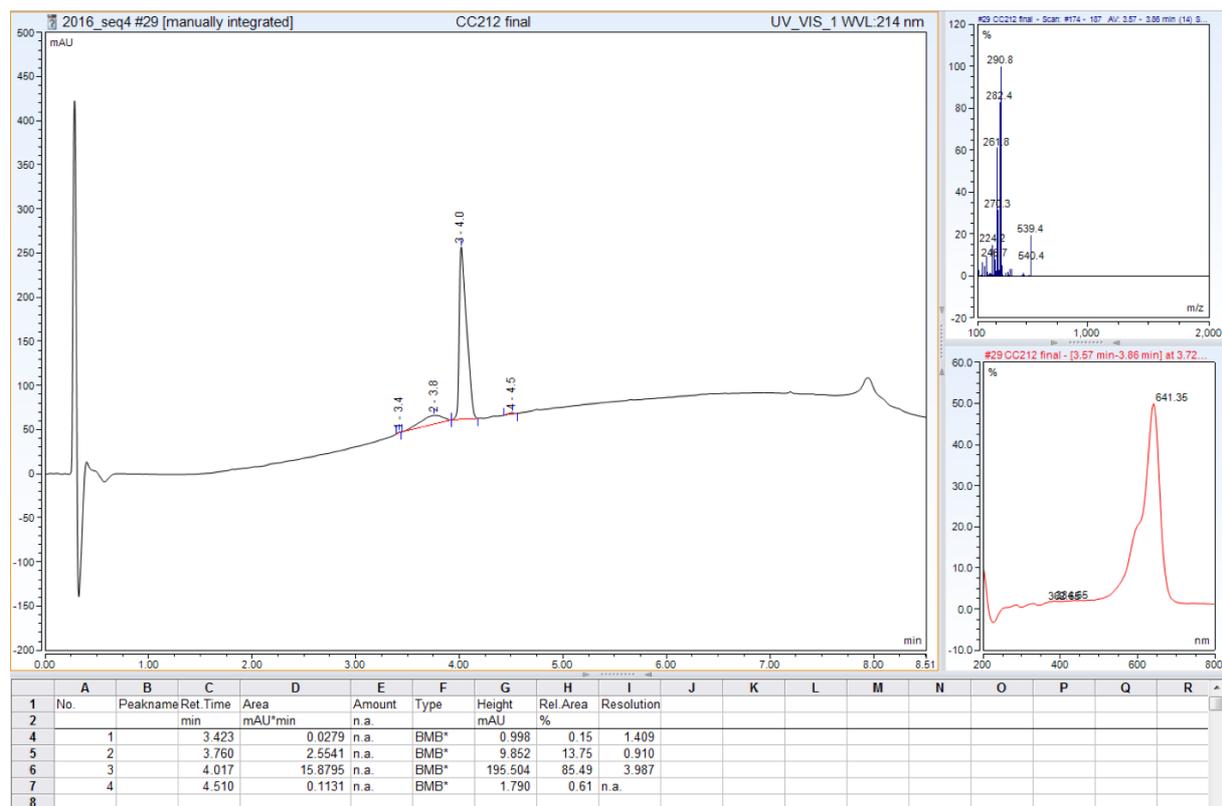


¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.36 (t, ³J = 7.3 Hz, 3H; CH₃), 1.41 (m, 2H; CH₂), 1.64 (s, 6H; CH₃), 1.65 (s, 6H; CH₃), 1.67 (m, 2H; CH₂), 1.74 (m, 2H; CH₂), 2.24 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H; CH₂), 3.13 (m, 2H; CH₂), 3.51 (m, 2H; CH₂), 3.94 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H; CH₂), 4.01 (q, ³J = 7.3 Hz, 2H; CH₂), 6.13 (d, ³J = 13.5 Hz, 1H; CH), 6.16 (d, ³J = 13.5 Hz, 1H; CH), 6.58 (t, ³J = 13.0 Hz, 1H; CH), 7.07 (m, 2H; CH), 7.19 (m, 2H; CH), 7.32 (m, 4H; CH), 7.81 (dd, ³J = 13.0, 13.5 Hz, 2H; CH), 8.26 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H; CONH), 8.38 (m, 3H; NH₃⁺);

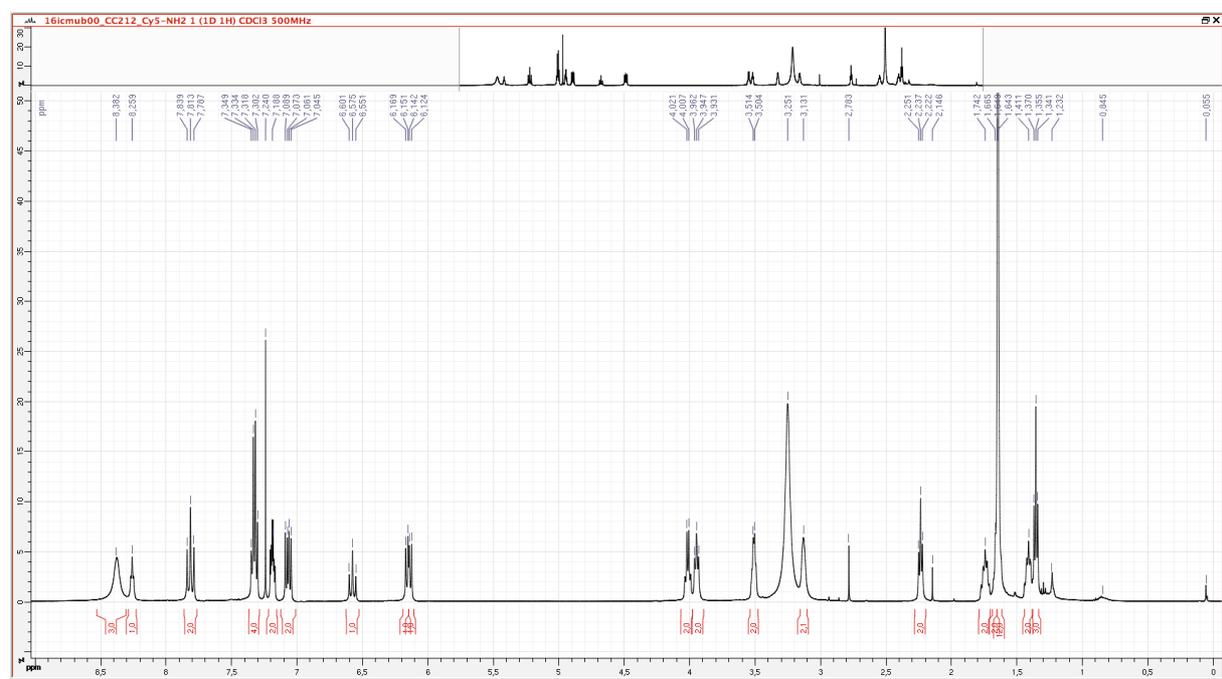
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 12.3, 25.1, 26.4, 27.2, 28.1, 28.1, 35.8, 37.5, 39.4, 40.1, 44.4, 49.4 (2C), 49.5 (2C), 103.2, 103.8, 110.5, 111.1, 116.7 (q, ¹J = 290.6 Hz, TFA), 122.3, 122.4, 125.3, 125.5, 125.8, 128.9, 129.0, 141.2, 141.3, 141.8, 142.1, 153.2, 153.3, 161.6 (q, ²J = 37.2 Hz, TFA), 172.4, 173.2, 175.2;

LRMS: C₃₅H₄₇N₄O⁺ ([M]⁺) m/z calculated: 539.4, found: 539.4.

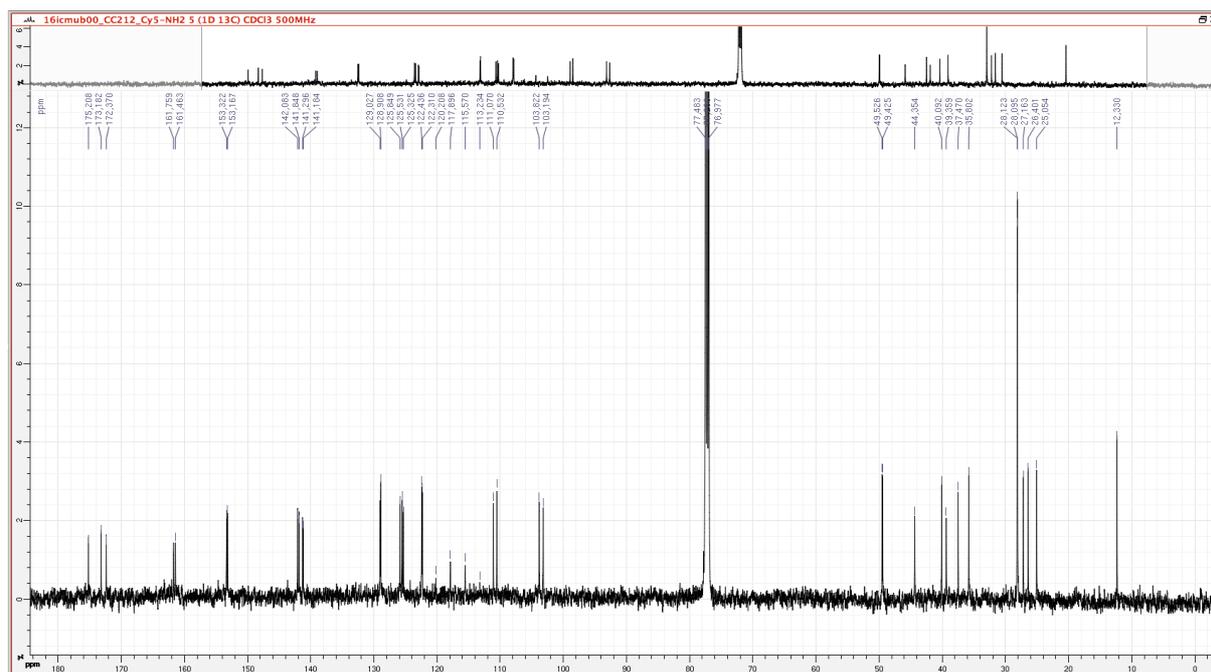
RP-HPLC-LRMS analysis of Cyanine 5.0-NH₂ 26:



¹H NMR spectrum of Cyanine 5.0-NH₂ 26:

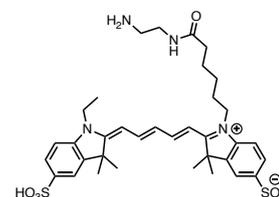


^{13}C NMR spectrum of Cyanine 5.0-NH₂ **26**:



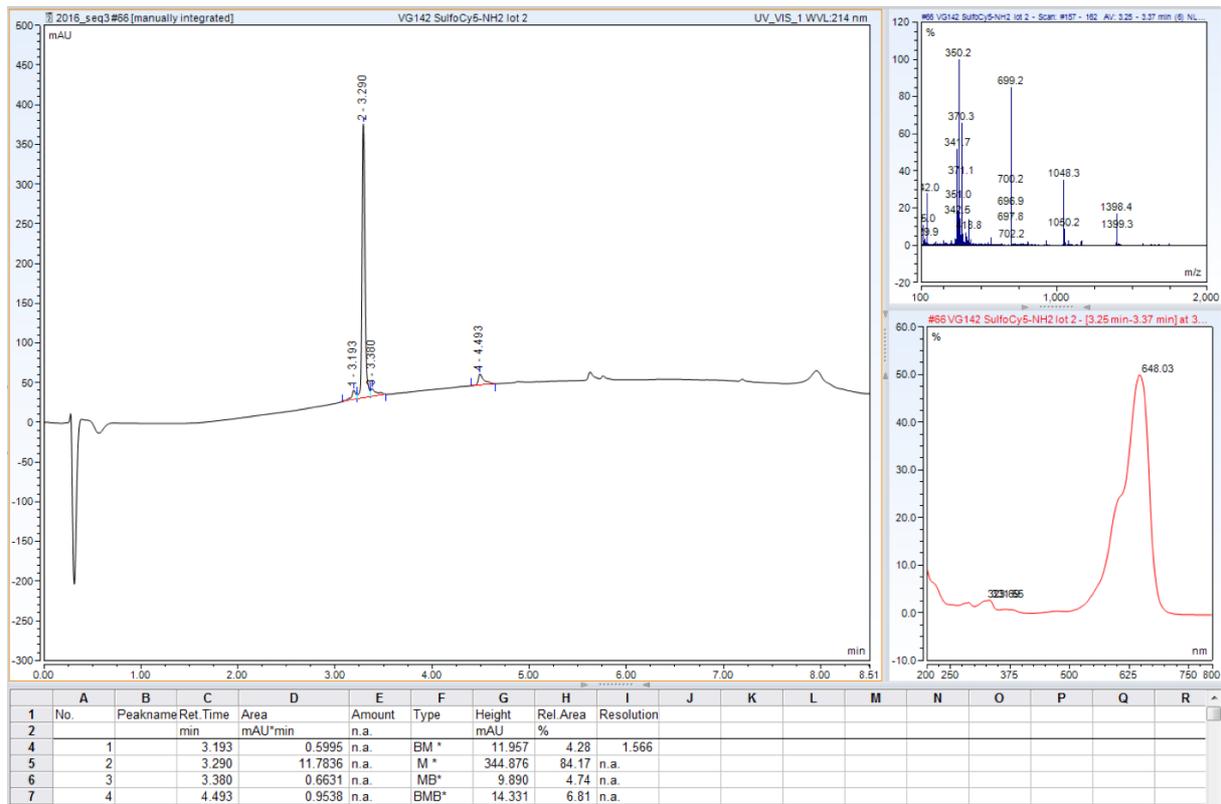
1-(6-((2-aminoethyl)amino)-6-oxohexyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate, sulfonated Cyanine 5.0-NH₂ **27**.

Sulfonated Cyanine 5.0-COOH at 63% of purity (57.0 mg, 86.7 μmol), TSTU (31.3 mg, 104.1 μmol , 1.2 eq) and DIPEA (75.0 μL , 433.0 μmol , 5.0 eq) were dissolved in anhydrous DMF (3 mL). The solution was stirred 1 h at room temperature and ethylene diamine (58.0 μL , 868.6 μmol , 10.0 eq) was added. After 25 min at room temperature, solvents were eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a SiliaChrom[®] dt C18 column (eluent: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) afforded sulfonated Cyanine 5.0-NH₂·1TFA **27** as a blue powder (6.8 mg, 8%, purity: 84%).

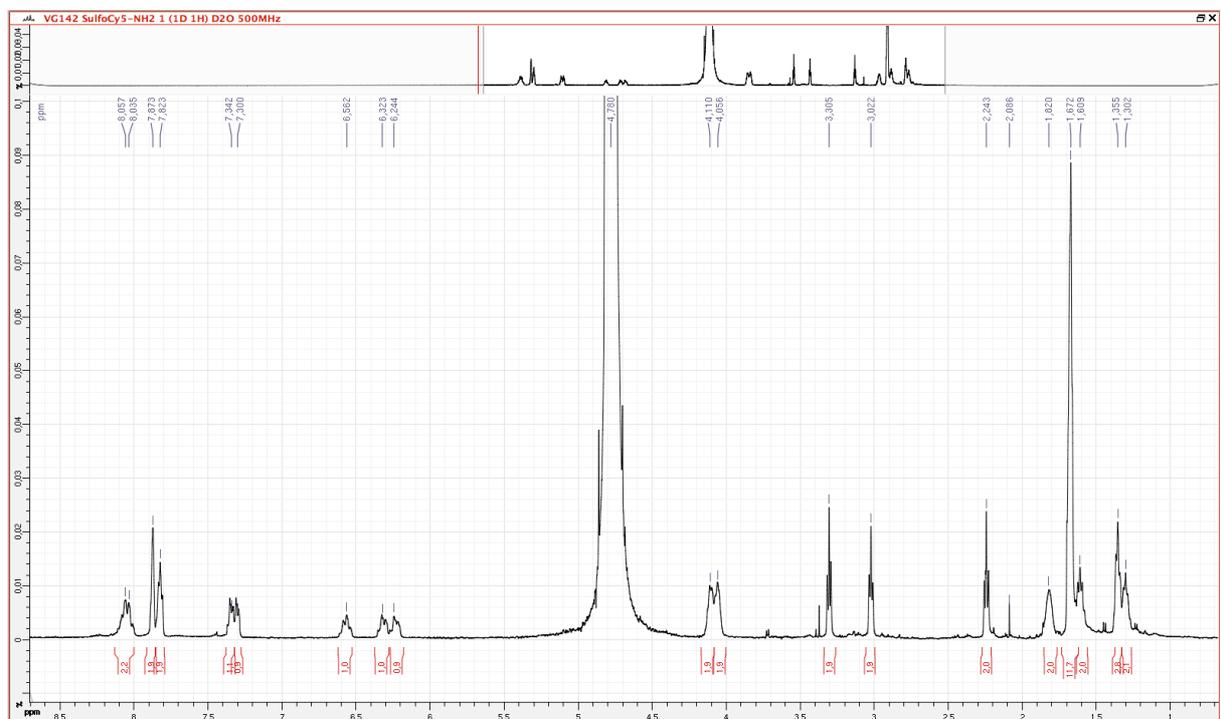


^1H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.30 (m, 2H; CH₂), 1.36 (m, 3H; CH₃), 1.61 (m, 2H; CH₂), 1.67 (s, 12H; CH₃), 1.82 (m, 2H; CH₂), 2.24 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H; CH₂), 3.02 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H; CH₂), 3.31 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H; CH₂), 4.06 (m, 2H; CH₂), 4.11 (m, 2H; CH₂), 6.24 (m, 1H; CH), 6.32 (m, 1H; CH), 6.56 (m, 1H; CH), 7.30 (m, 1H; CH), 7.34 (m, 1H; CH), 7.82 (m, 2H; CH), 7.87 (m, 2H; CH), 8.06 (m, 2H; CH);
The low amount of product available did not allow us to perform proper ^{13}C NMR;
LRMS: C₃₅H₄₇N₄O⁺ ([M]⁺) m/z calculated: 699.3, found: 699.2.

RP-HPLC-LRMS analysis of sulfonated Cyanine 5.0-NH₂ 27:

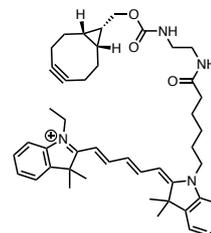


¹H NMR spectrum of sulfonated Cyanine 5.0-NH₂ 27:



2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-(((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium, Cyanine 5.0-BCN **28.**

Cyanine 5.0-NH₂·2TFA (25.7 mg, 33.5 μmol) and BCN-NHS (16.3 mg, 55.8 μmol, 1.7 eq) were dissolved in anhydrous MeCN (1 mL) and DIPEA (8.41 μL, 48.6 μmol, 1.5 eq) was added. After 40 min at room temperature, the solvent was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) gave cyanine 5.0-BCN·1TFA **28** as a blue powder (11.5 mg, 36%, purity: 87%).

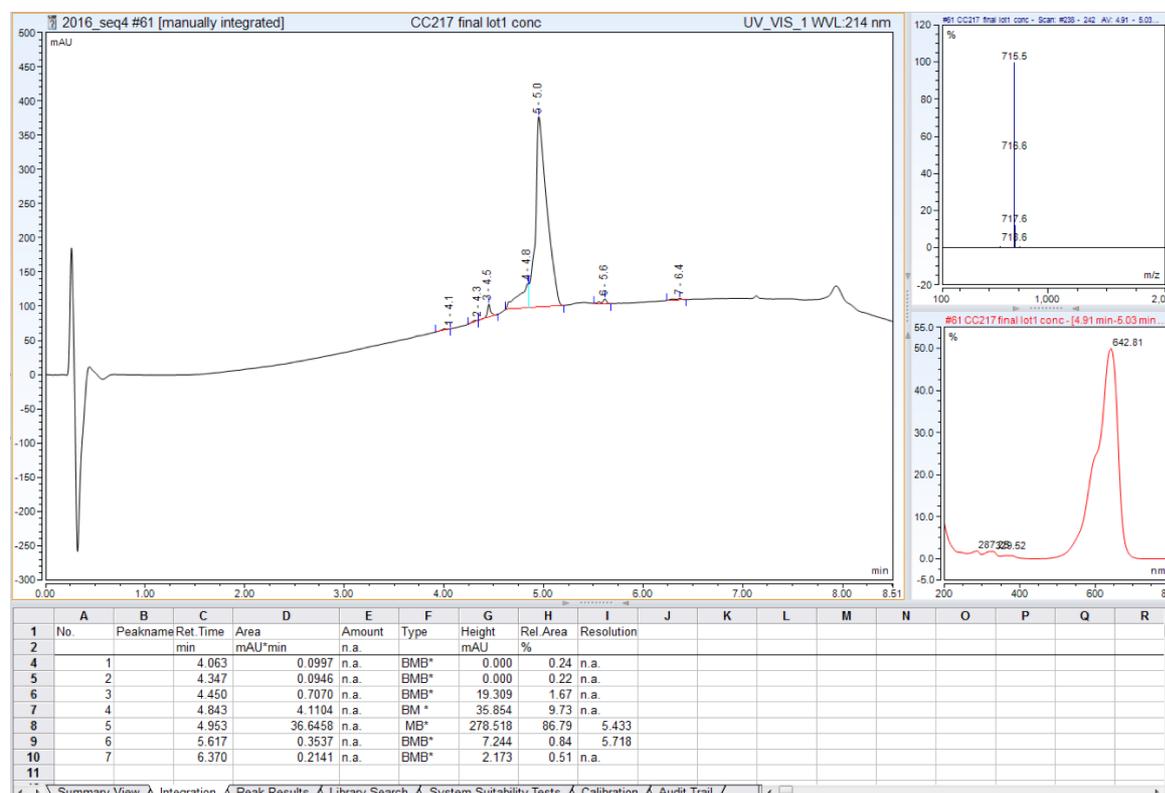


¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.86 (m, 2H; CH), 1.31 (m, 1H; CH), 1.39 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H; CH₃), 1.47 (m, 2H; CH₂), 1.53 (m, 2H; CH₂), 1.66 (s, 6H; CH₃), 1.67 (s, 6H; CH₃), 1.71 (m, 2H; CH₂), 1.79 (m, 2H; CH₂), 2.08 to 2.27 (m, 6H; CH₂), 2.30 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H; CH₂), 3.31 (m, 2H; CH₂), 3.54 (m, 2H; CH₂), 3.99 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H; CH₂), 4.04 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H; CH₂), 4.07 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H; CH₂), 6.11 (m, 1H; OCONH), 6.17 (d, ³J = 13.5 Hz, 1H; CH), 6.26 (d, ³J = 13.5 Hz, 1H; CH), 6.66 (t, ³J = 12.5 Hz, 1H; CH), 7.05 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H; CH), 7.10 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H; CH), 7.22 (m, 2H; CH), 7.35 (m, 4H; CH), 7.78 (dd, ³J = 12.5, 13.5 Hz, 1H; CH), 7.79 (dd, ³J = 12.5, 13.5 Hz, 1H; CH), 7.97 (m, 1H; CONH);

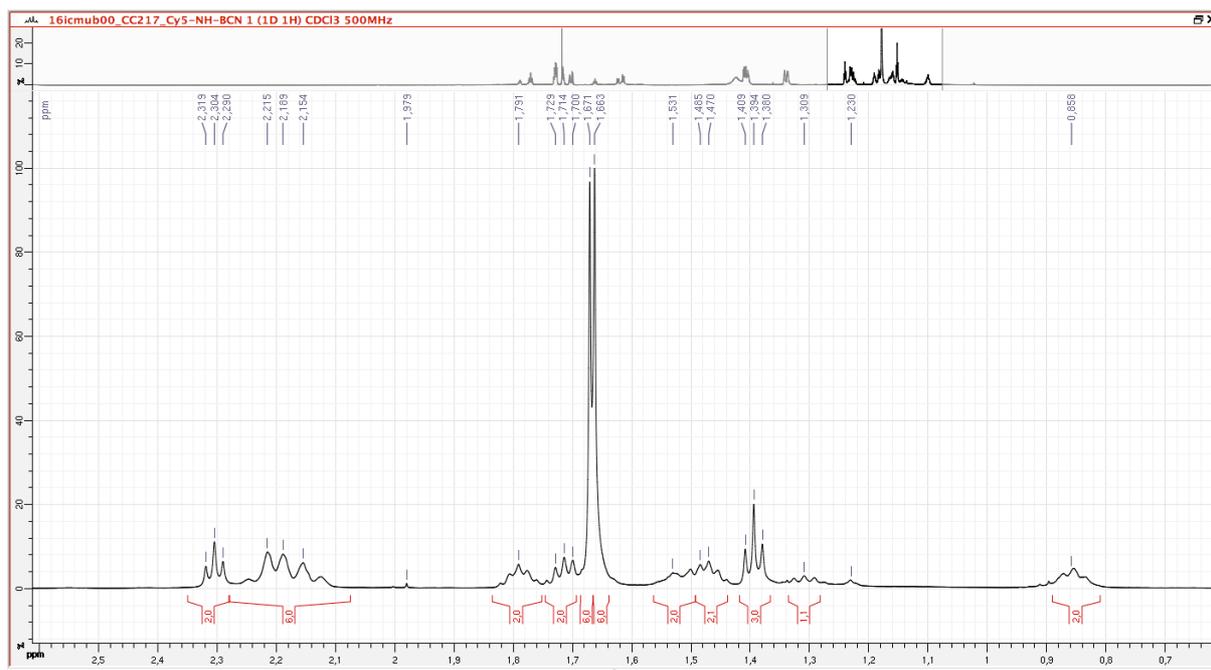
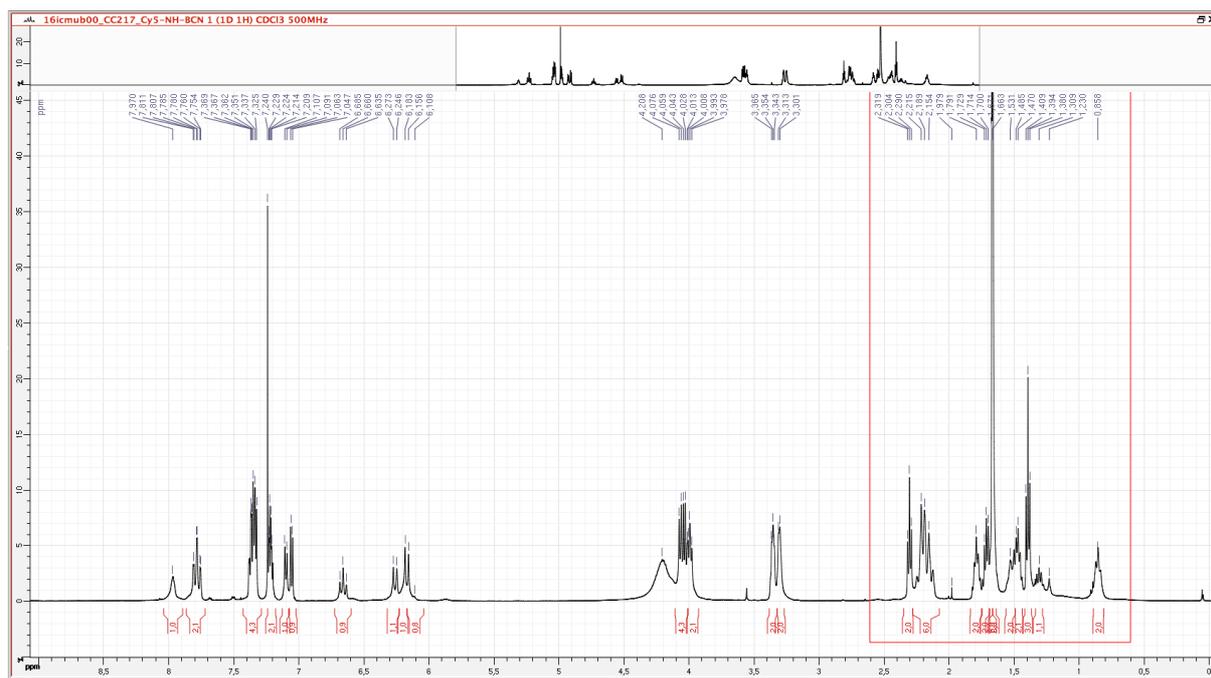
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 12.2, 17.8, 20.1, 21.5, 25.1, 26.3, 26.9, 28.0, 29.1, 35.8, 39.2, 39.9, 41.1, 44.4, 49.2, 49.4, 62.4, 98.9, 103.0, 104.1, 110.2, 110.9, 116.5 (q, ¹J = 290.6 Hz, TFA), 122.1, 122.3, 125.1, 125.5, 126.0, 128.8, 128.9, 141.0, 141.7, 141.9, 152.7, 153.1, 157.4, 160.8 (q, ²J = 36.4 Hz, TFA), 171.9, 173.1, 174.6;

HRMS: C₄₆H₅₉N₄O₃⁺ ([M]⁺) m/z calculated: 715.45817, found: 715.45752.

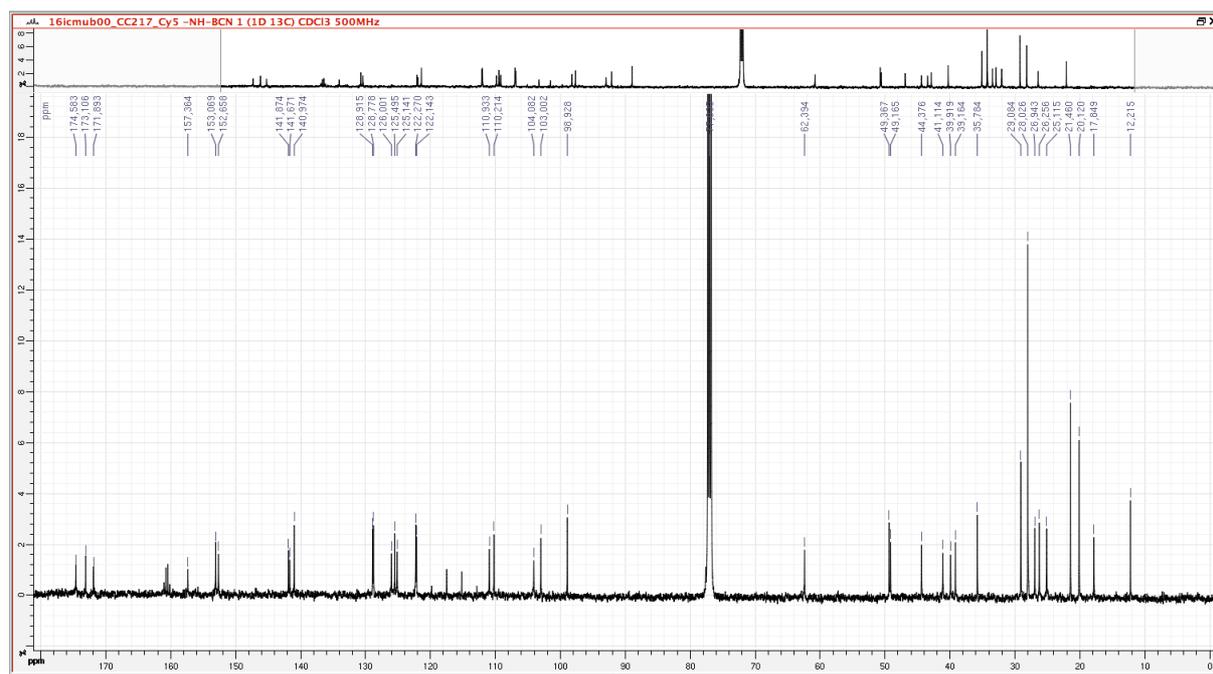
RP-HPLC-LRMS analysis of Cyanine 5.0-BCN **28**:



^1H NMR spectrum of Cyanine 5.0-BCN **28** and magnification of the region between 0.6 and 2.6 ppm:

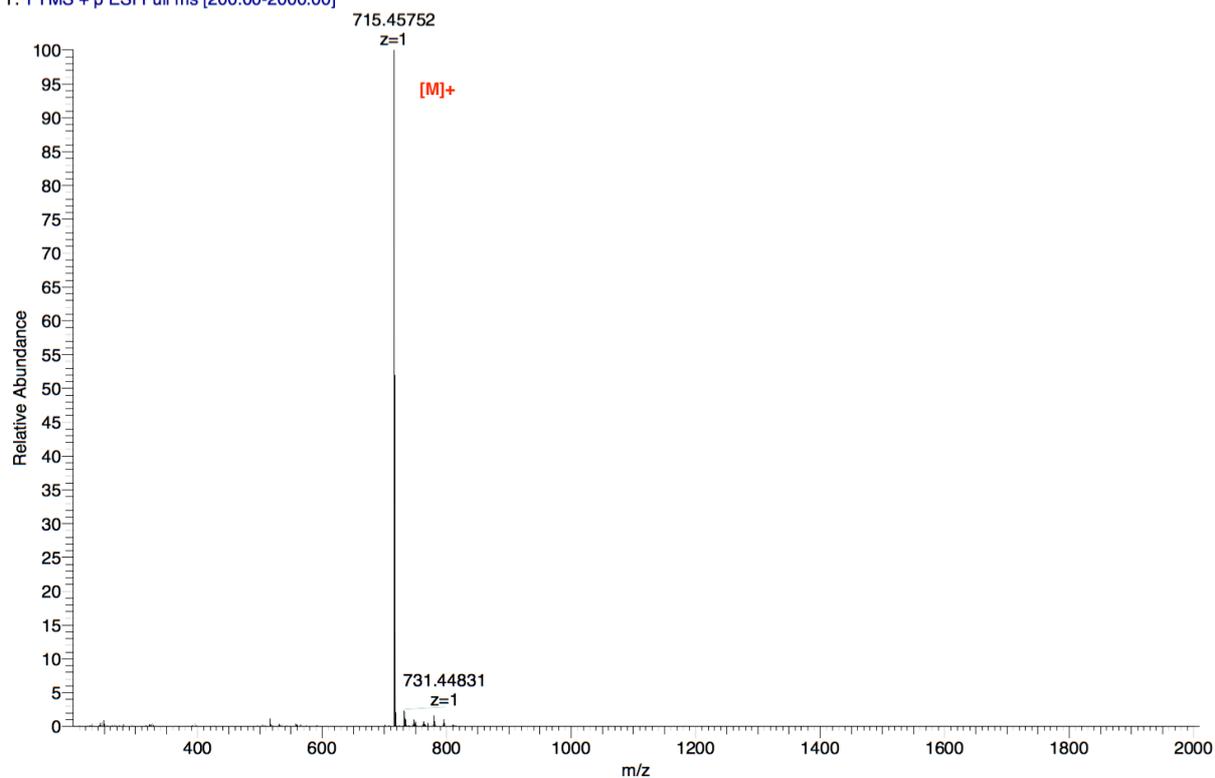


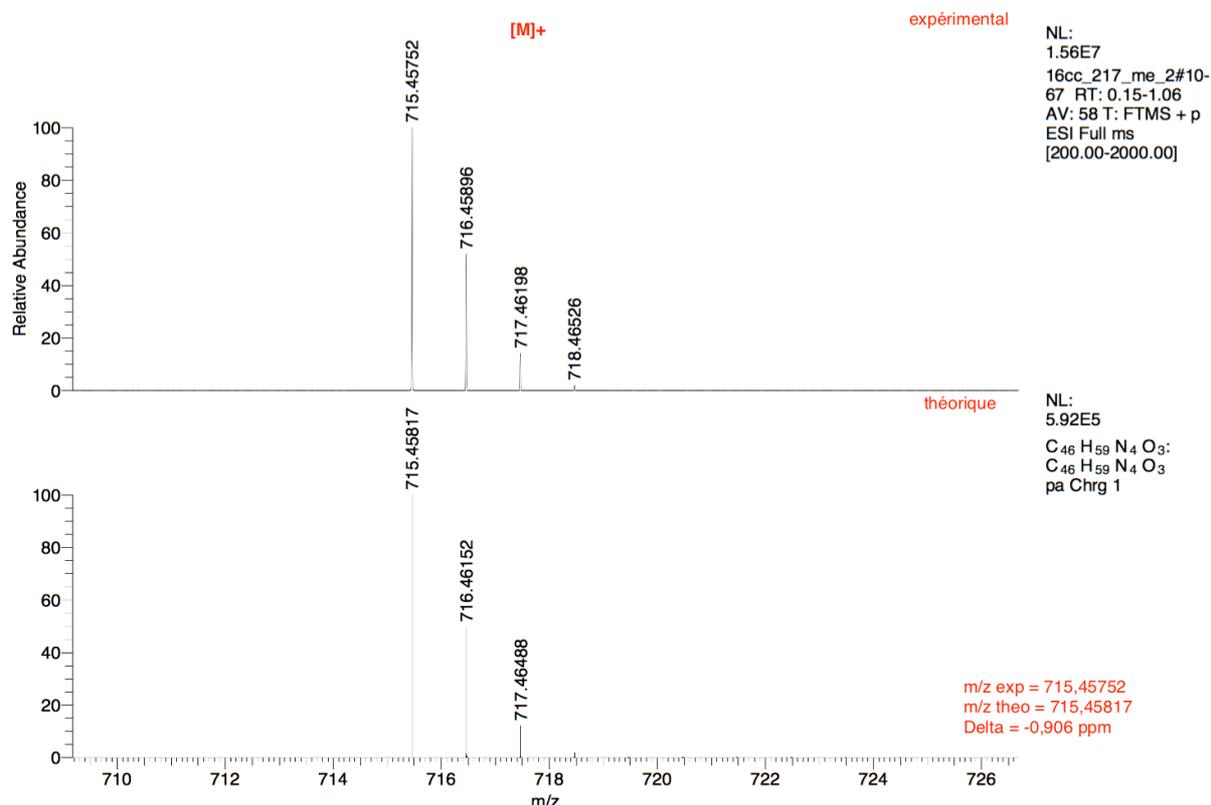
^{13}C NMR spectrum of Cyanine 5.0-BCN **28**:



HRMS spectrum of Cyanine 5.0-BCN **28** and comparison with simulated spectrum:

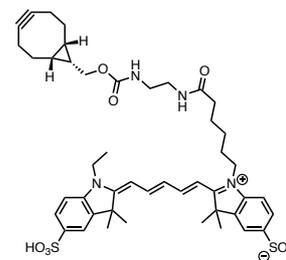
16cc_217_me_2 #10-67 RT: 0.15-1.06 AV: 58 NL: 1.56E7
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]





1-(6-((2-(3-((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)propanamido)ethyl)amino)-6-oxohexyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate, sulfonated Cyanine 5.0-BCN **29.**

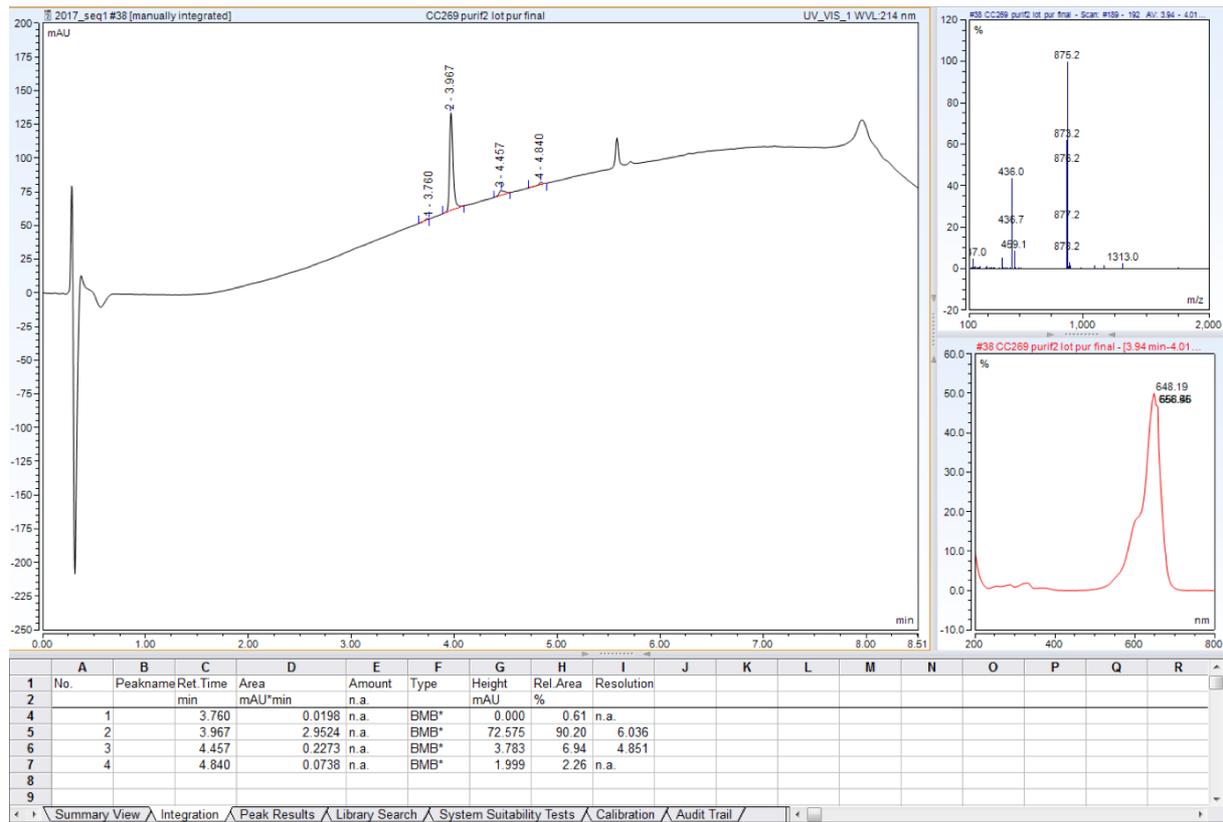
The intermediate sulfonated Cyanine 5.0-NH₂·1TFA **27** (15.5 mg, 18.5 μmol) and BCN-NHS (7.0 mg, 24.0 μmol, 1.3 eq) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL) and DIPEA (7.66 μL, 64.6 μmol, 3.5 eq) was added. After 45 min at room temperature, the solvent was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a SiliaChrom® dt C18 column (eluent: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) gave sulfonated Cyanine 5.0-BCN **29** as a blue powder (2.2 mg, 12%, purity: 90%).



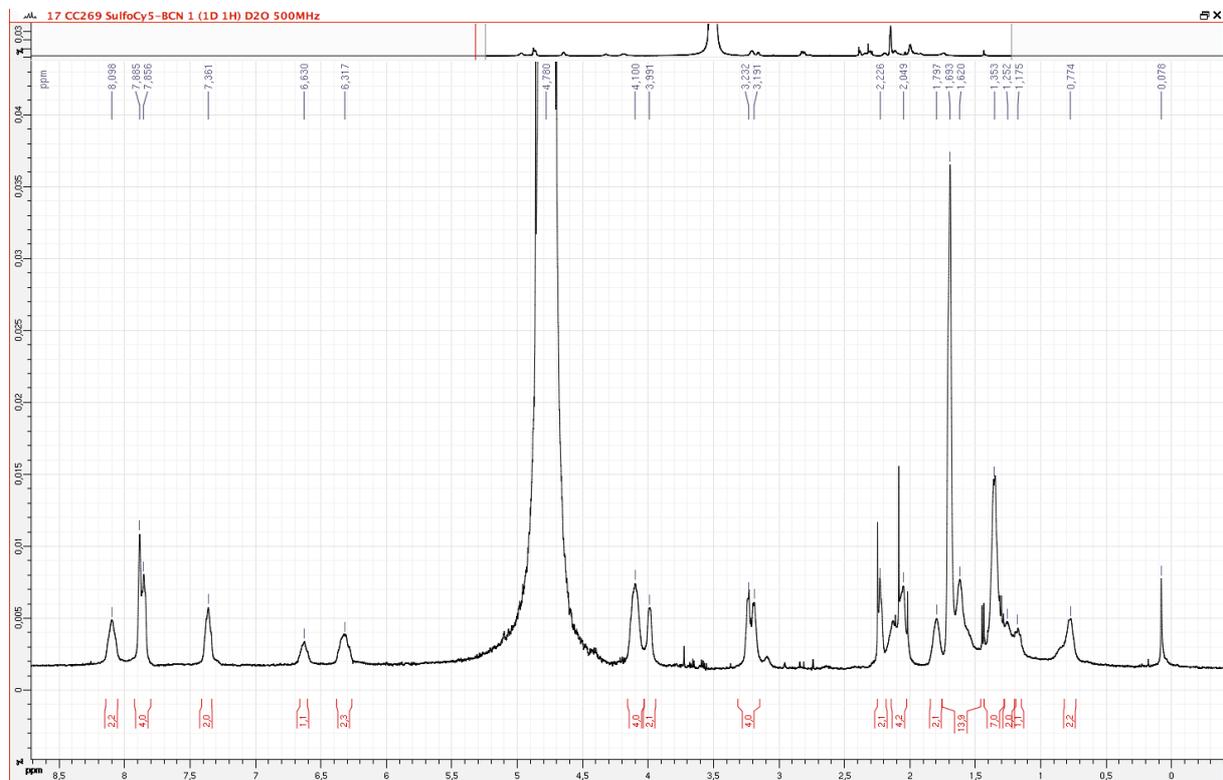
¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 0.77 (m, 2H; CH), 1.18 (m, 1H; CH), 1.25 (m, 3H; CH₃), 1.35 (m, 6H; CH₂), 1.62 (m, 2H; CH₂), 1.45 to 1.75 (m, 14H; CH₃, CH₂), 1.80 (m, 2H; CH₂), 2.05 (m, 4H; CH₂), 2.23 (m, 2H; CH₂), 3.19 (m, 2H; CH₂), 3.23 (m, 2H; CH₂), 3.99 (m, 2H; CH₂), 4.10 (m, 4H; CH₂), 6.32 (m, 2H; CH), 6.63 (m, 1H; CH), 7.36 (m, 2H; CH), 7.86 (m, 2H; CH), 7.89 (m, 2H; CH), 8.10 (m, 2H; CH);

The low amount of product available did not allow us to perform proper ¹³C NMR;
HRMS: C₄₆H₅₇N₄O₉S₂⁻ ([M-H]⁻) m/z calculated: 873.35724, found 873.36104.

RP-HPLC-LRMS analysis of the sulfonated Cyanine 5.0-BCN 29:

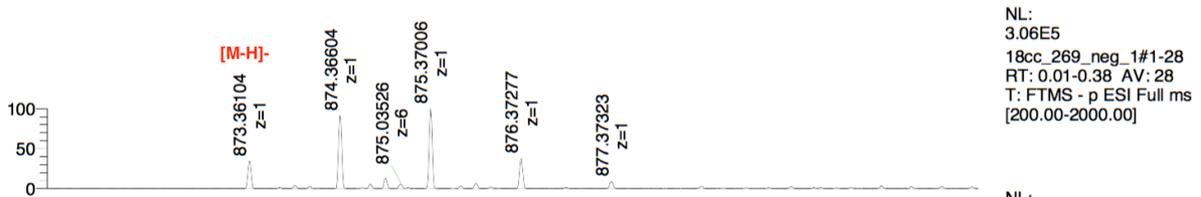
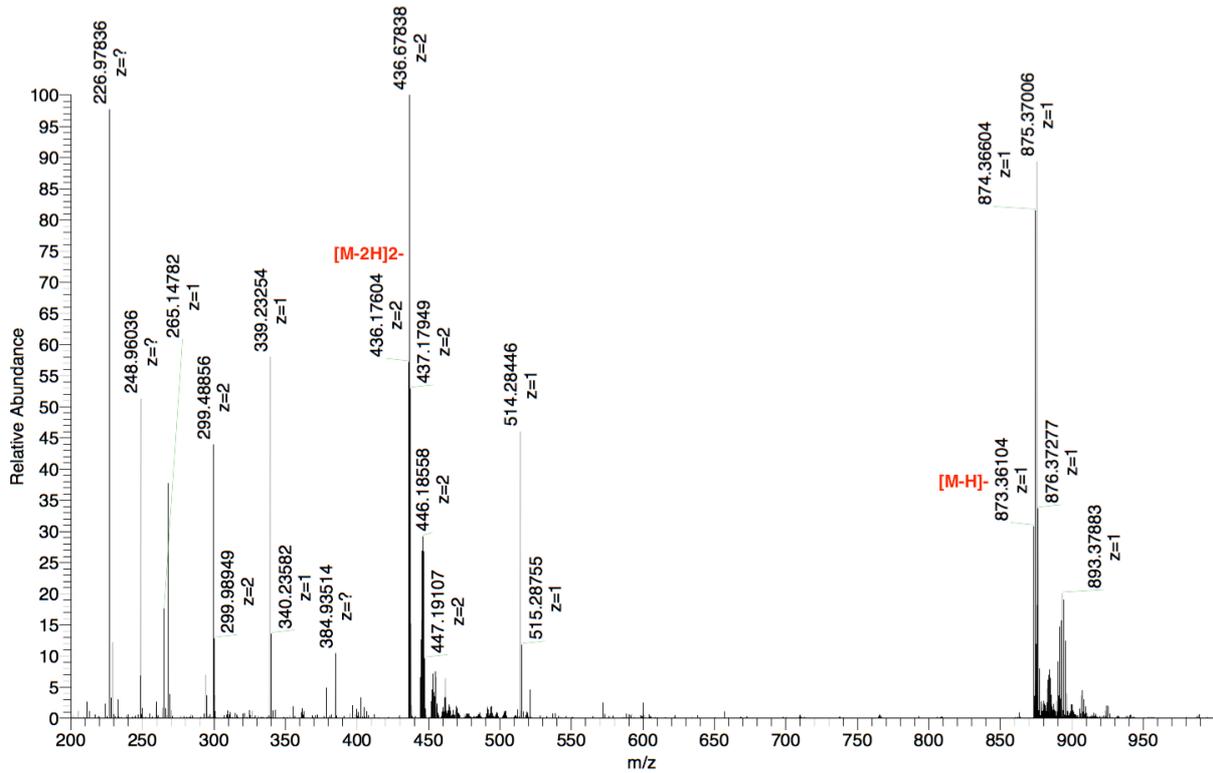


¹H NMR spectrum of the sulfonated Cyanine 5.0-BCN 29:

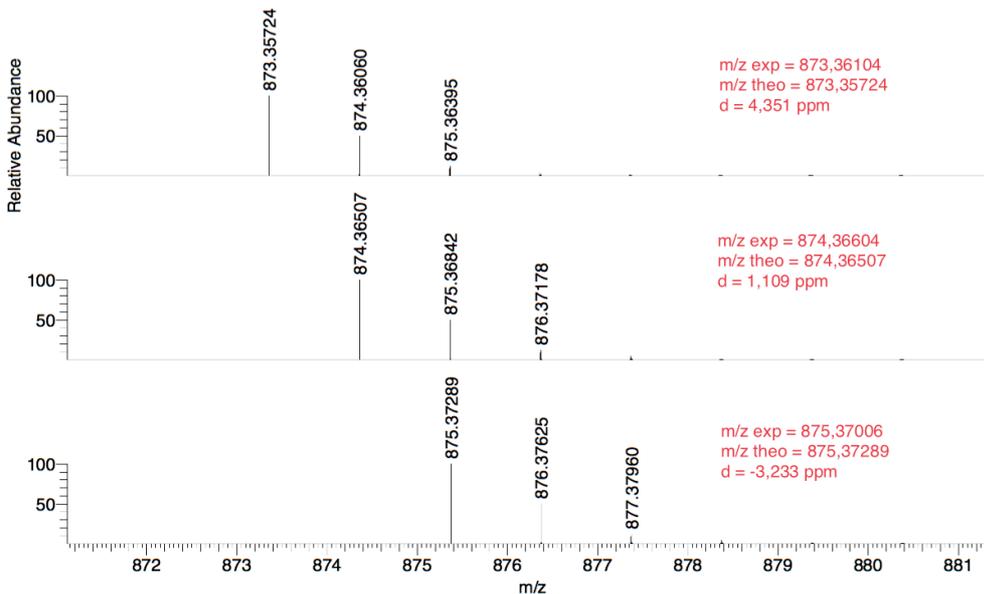


HRMS spectrum of the sulfonated Cyanine 5.0-BCN **29** recorded in negative mode and comparison with simulated spectrum:

18cc_269_neg_1 #1-28 RT: 0.01-0.38 AV: 28 NL: 3.42E5
T: FTMS - p ESI Full ms [200.00-2000.00]



NL:
3.06E5
18cc_269_neg_1#1-28
RT: 0.01-0.38 AV: 28
T: FTMS - p ESI Full ms
[200.00-2000.00]



NL:
5.26E5
C₄₆H₅₇N₄O₉S₂:
C₄₆H₅₇N₄O₉S₂
pa Chrg -1

NL:
5.26E5
C₄₆H₅₈N₄O₉S₂:
C₄₆H₅₈N₄O₉S₂
pa Chrg -1

NL:
5.26E5
C₄₆H₅₉N₄O₉S₂:
C₄₆H₅₉N₄O₉S₂
pa Chrg -1

Sequential dual labeling of bovine serum albumin

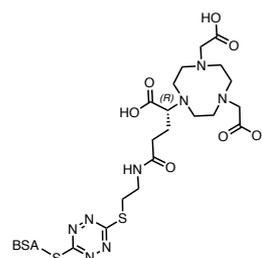
Quantification of free sulfhydryls in bovine serum albumin by Ellman's assay²:

The procedure used to perform Ellman's assay was based on a Thermo scientific protocol. 250 μL of BSA solution at 300 μM and 50 μL of DTNB solution at 10 mM were added to 2.5 mL of borate buffer (0.05 M, pH 8.0) to obtain a BSA concentration of 26.8 μM and a DTNB concentration of 178 μM (6.6 eq). After 15 min of reaction at room temperature, the absorbance at 412 nm was measured in 5 replicates. The experiment was repeated with cysteine as a control (calculated error < 3%). The absorbance at 412 nm was 0.196 and the concentration in free sulfhydryl was calculated thanks to the extinction coefficient of the 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid ($14150 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) and was equal to 13.8 μM , corresponding to a ratio of 0.5 free sulfhydryl per BSA molecule.

Preparation of compounds 30:

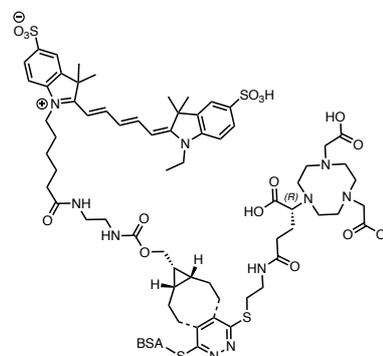
BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA.

30.3 μL of a 5 mM stock solution of (R)-NODAGA-S-Tz-Cl **17** in DMF (152 nmol, 10.0 eq) was added to a 1 mg/mL solution of BSA (1.0 mg, 15.2 nmol) in ammonium acetate buffer (0.11 M, pH 5.2). The solution was stirred in a thermomixer (800 rpm, 25 °C) and monitored by RP-HPLC-LRMS on an RSLCnano UltiMate 3000 system (Thermo Scientific) equipped with a DAD detector and coupled to a high-resolution mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) using an ESI source. The separation was achieved on a Thermo Scientific™ MAbPac™ column (4 μm , 50 \times 2.1 mm) with the following eluents: A: H₂O, 0.1% FA, 0.02% TFA and B: MeCN/H₂O (90/10), 0.1% FA, 0.02% TFA, and a gradient from 5% to 100% of B in 15 min at 80 °C. Multicharged mass spectra were deconvoluted with the Protein Deconvolution 2.0 software (Thermo Scientific). After 1.5 h, the excess of probe **17** was removed by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel-30 kDa (Merck Millipore). This ultrafiltration step allowed for the buffer exchange from acetate to PB (66 mM, pH 7.1) and for the concentration of the product. This intermediate showed limited shelf stability in solution at room temperature, and was engaged rapidly in the preparation of compound **30**.



BSA-S-Tz(BCN-SulfoCy5)-S-(R)-NODAGA, **30**.

15.15 μL of a 10 mM stock solution of the probe sulfoCy5-BCN **29** in H₂O (151.5 nmol, 10.0 eq) was added to the intermediate BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA (1.0 mg, 15.15 nmol) in PB (66 mM, pH 7.1). The solution was stirred in a thermomixer (800 rpm, 37 °C) during 14.5 h. The product **30** was purified by FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) on a Hitrap desalting column (Sephadex G-25 Superfine resin, cross-linked

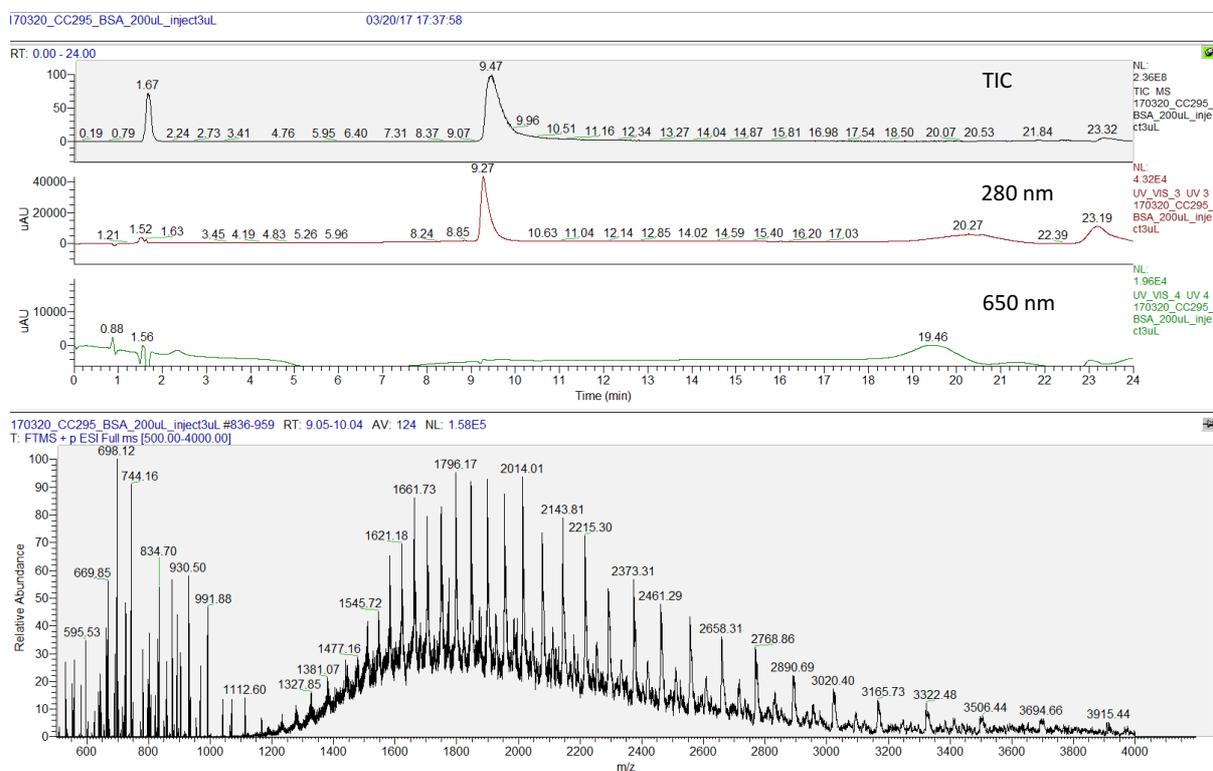


² Eyer, P.; Worek, F.; Kiderlen, D.; Sinko, G.; Stuglin, A.; Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E. *Anal. Biochem.* **2003**, 312, 224–227

dextran, bead size 15-70 μm , 16 \times 25 mm, 5 mL) with PB (20 mM, pH 7.3) as eluent, at 2.5 mL/min, and then by size exclusion separation on a Superdex™ 75 10/300 GL column (cross-linked agarose and dextran, 13 μm , 10 \times 300-310 mm, 24 mL), at 0.8 mL/min, with PB (20 mM, pH 7.3) as eluent. The pure dually-labeled BSA **30** was obtained as a 4.27 mg/mL solution in PB (protein recovery = 68%). Based on the spectroscopy measurements, the ratio of labeling (amount of sulfoCy5 per BSA) was determined to be 0.5, in good agreement with the number of free sulfhydryl available in BSA.*

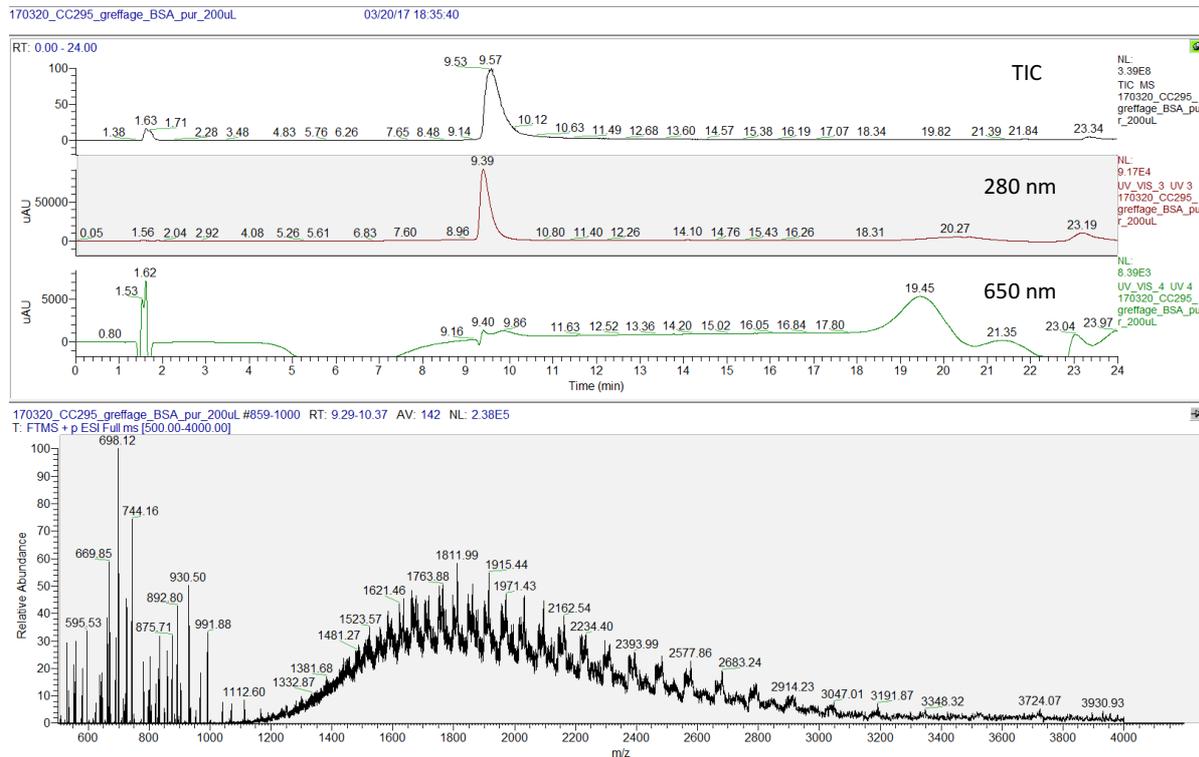
* *note*: the concentration of BSA in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of BSA at 280 nm ($42925 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, value from ExPASy). A correction factor $(0.05)^3$ was introduced to account for the contribution of the fluorophore absorbance at 280 nm. The molar concentration of the fluorophore was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of the sulfonated Cyanine 5.0 in PBS ($250000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).³

RP-HPLC chromatograms (total ion chromatogram, 280 nm and 650 nm) and total mass spectrum of native BSA:

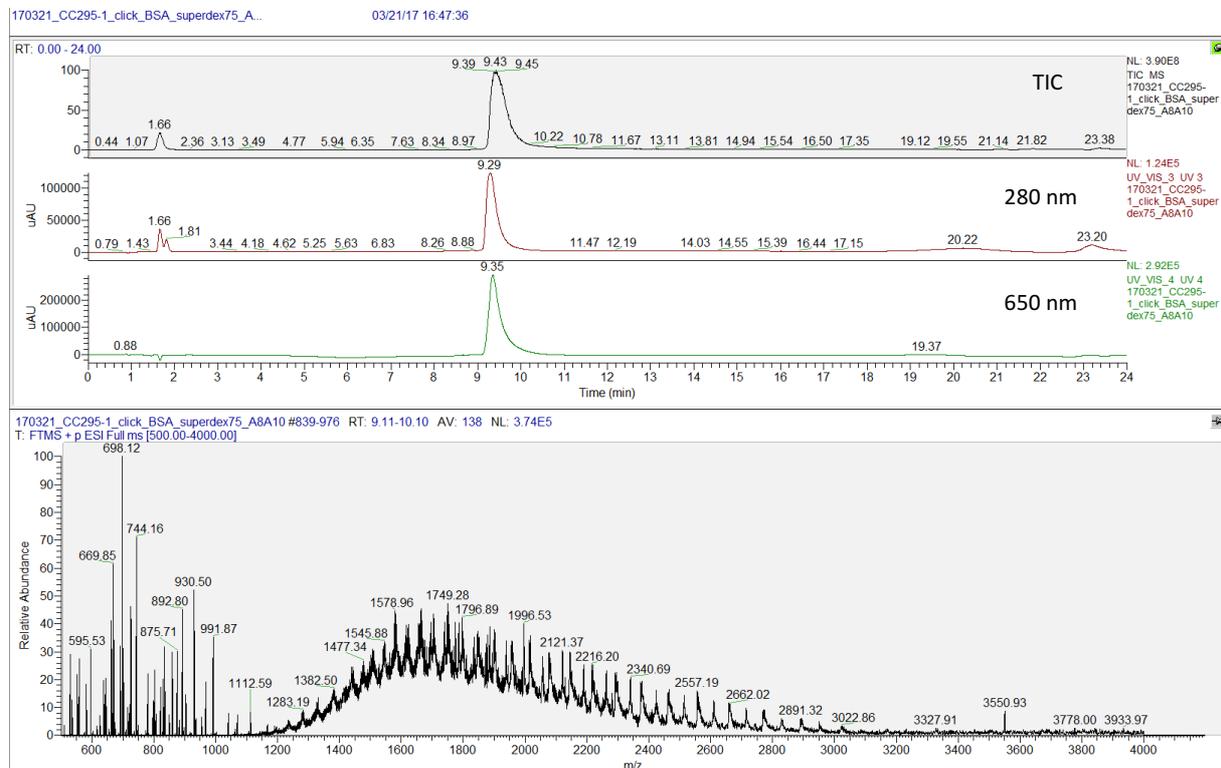


³ Ballou, B.; Fisher, G. W.; Hakala, T. R.; Farkas, D. L. *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*, 649–658

RP-HPLC chromatograms (total ion chromatogram, 280 nm and 650 nm) and total mass spectrum of BSA-S-Tz-S-(R)-NODAGA:



RP-HPLC chromatograms (total ion chromatogram, 280 nm and 650 nm) and total mass spectrum of BSA-S-Tz(BCN-SulfoCy5)-S-(R)-NODAGA 30:



Characterization of the bioconjugate **30**

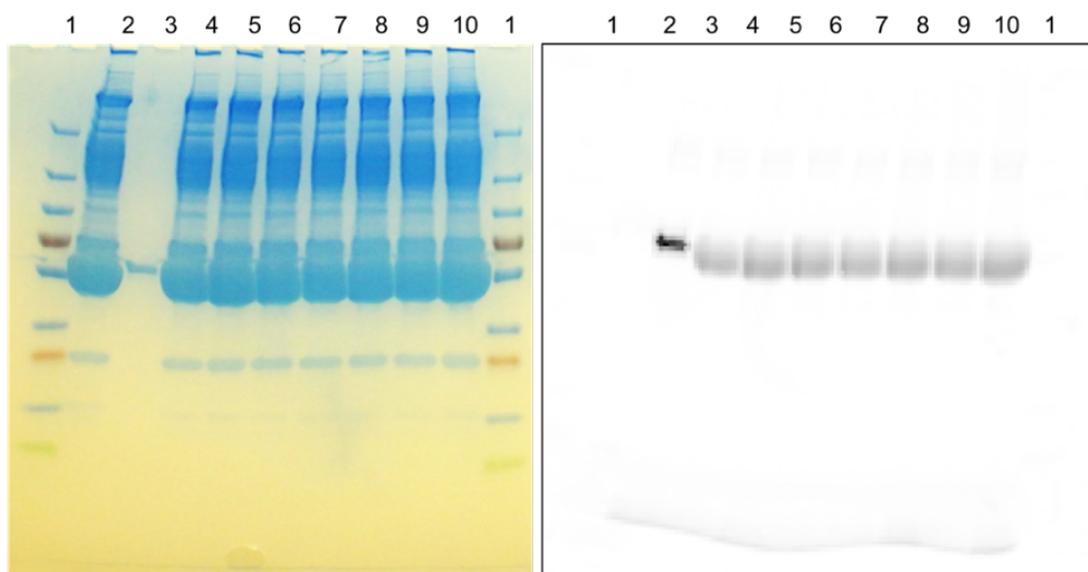
Spectral properties of the bioconjugate **30**:

UV-Vis absorbance and fluorescence spectra of the bioconjugate **30** in PB (20 mM, pH 7.3) were recorded on a CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH). The excitation spectrum was measured from 320 nm to 690 nm with a fixed emission wavelength at 715 nm. The emission spectrum was measured from 625 nm to 740 nm with a fixed excitation wavelength at 600 nm. Values for $\lambda_{Abs, max}$, $\lambda_{Ex, max}$ and $\lambda_{Em, max}$ were respectively 655 nm, 655 nm, 670 nm.

In vitro stability in human plasma:

10.82 μ L of a stock solution of **30** at 2.31 mg/mL in PB (25 μ g) were stirred in a thermomixer (400 rpm, 37 °C, dark) with 25 μ L of human plasma and 14.2 μ L of water. The final concentration in **30** was 0.5 mg/mL. After 1, 2, 4, 8, 24 or 48 h the reactions were stopped and 5 μ L samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (Mini-PROTEAN® TGX™ 4 to 20 % Precast gel, Biorad), in non-reductive conditions. The samples were not denatured at 90 °C prior to the electrophoresis to avoid unsuitable degradation.

SDS-PAGE analysis of **30**, 1: Protein ladder, 2: human plasma, 3: bioconjugate **30** without incubation in human plasma, 4 to 10: bioconjugate **30** with incubation in human plasma during respectively 0, 1, 2, 4, 8, 24 and 48 h, (left) Coomassie blue staining; (right) Fluorescence analysis, pair filter mode (620/670 nm):



***In vivo* evaluation of the bioconjugate 30 by fluorescence imaging**

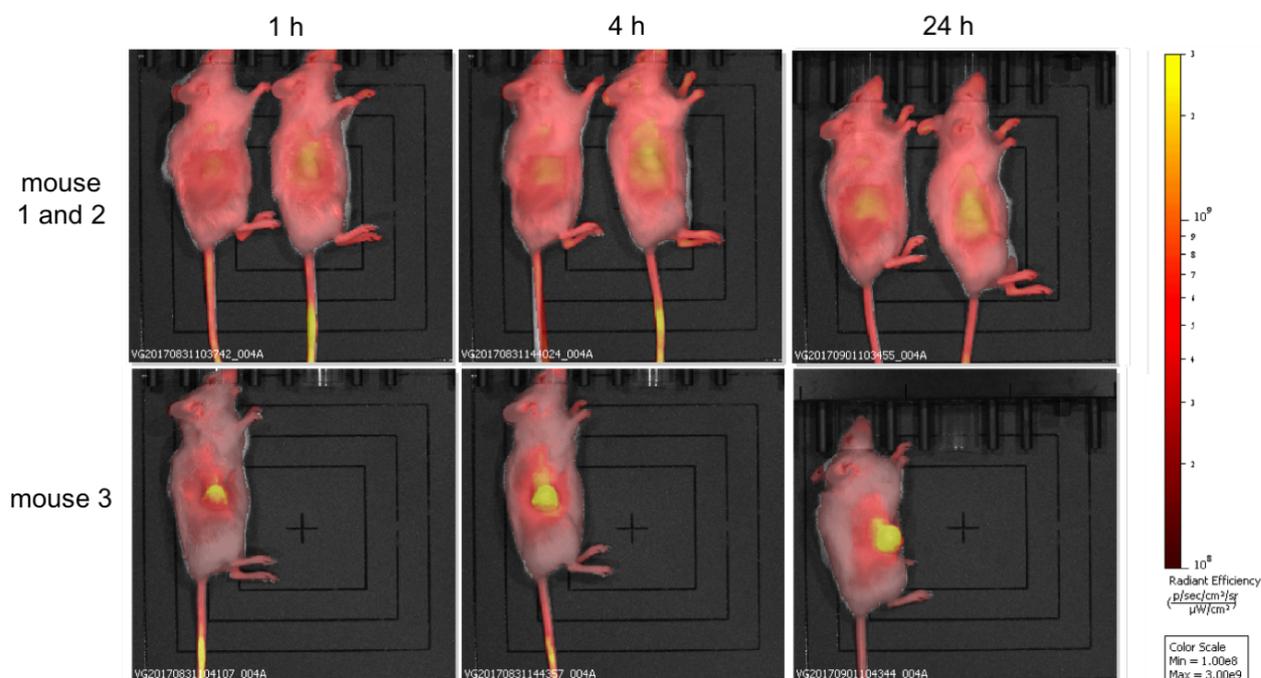
Note: the cell culture, preparation of animal models and animal handling for *in vivo* imaging experiments were performed by our collaborators at Georges-Francois LECLERC Cancer Center – UNICANCER.

The cancer cell line (BT-474) and animal model (xenograft on BALB/c nude mice) were prepared as described in the experimental part of Chapter I.

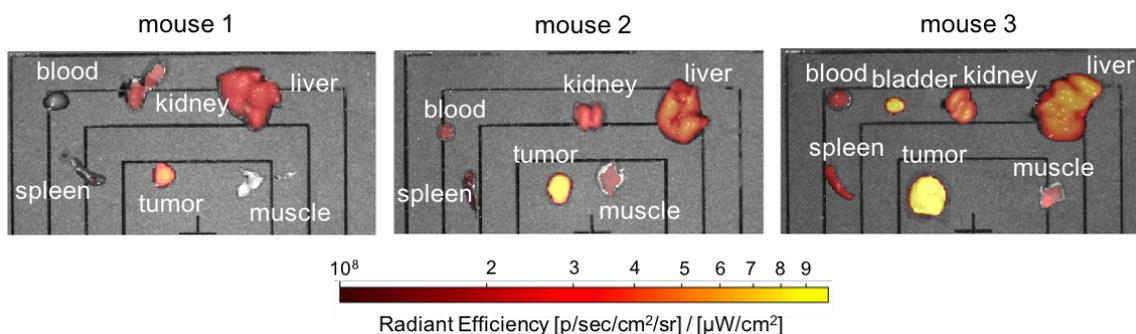
After tumor growth, the bioconjugate **30** was injected intravenously in the lateral tail vein as a 0.9 mg/mL solution in PBS (100 μ L).

For all imaging procedures, mice were anesthetized under isoflurane. The fluorescence signal was monitored using the Perkin Elmer Ivis Lumina III system. Whole body imaging was acquired at 1 h, 4 h and 24 h time points using the following excitation/emission settings: 620 nm/670 nm. All imaging data were analyzed with the Living Image[®] software. Values are reported as radiant efficiency, allowing direct comparison of images from each experiment. After the last imaging, the mice were euthanized and organs collected for *ex vivo* imaging at 24 h post-injection. Fluorescence intensities were measured and normalized to photon per second per cm^2 using the region of interest (ROI) function of the Living Image[®] software. The ROI covers the entire tissue.

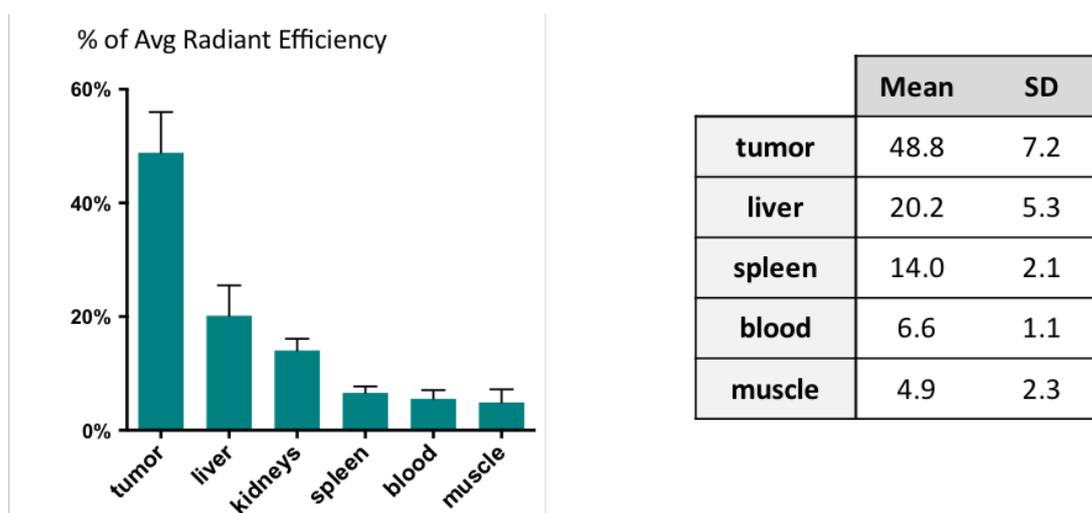
Fluorescence acquisition of the mice 1, 2 and 3 at 1 h, 4 h and 24 h post-injection; radiant efficiency values with logarithmic scale:



Fluorescence acquisition of the isolated organs of the mice 1, 2 and 3 at 24 h post-injection; radiant efficiency values with logarithmic scale:



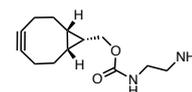
Biodistribution values: table of mean values and SD (n = 3) expressed in percentage related to the sum of average radiant efficiency ([p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]) for each collected organs; graph, means and SD were obtained with Prism 6 software (GraphPad):



Application of the strategy to the preparation of a theranostic agent

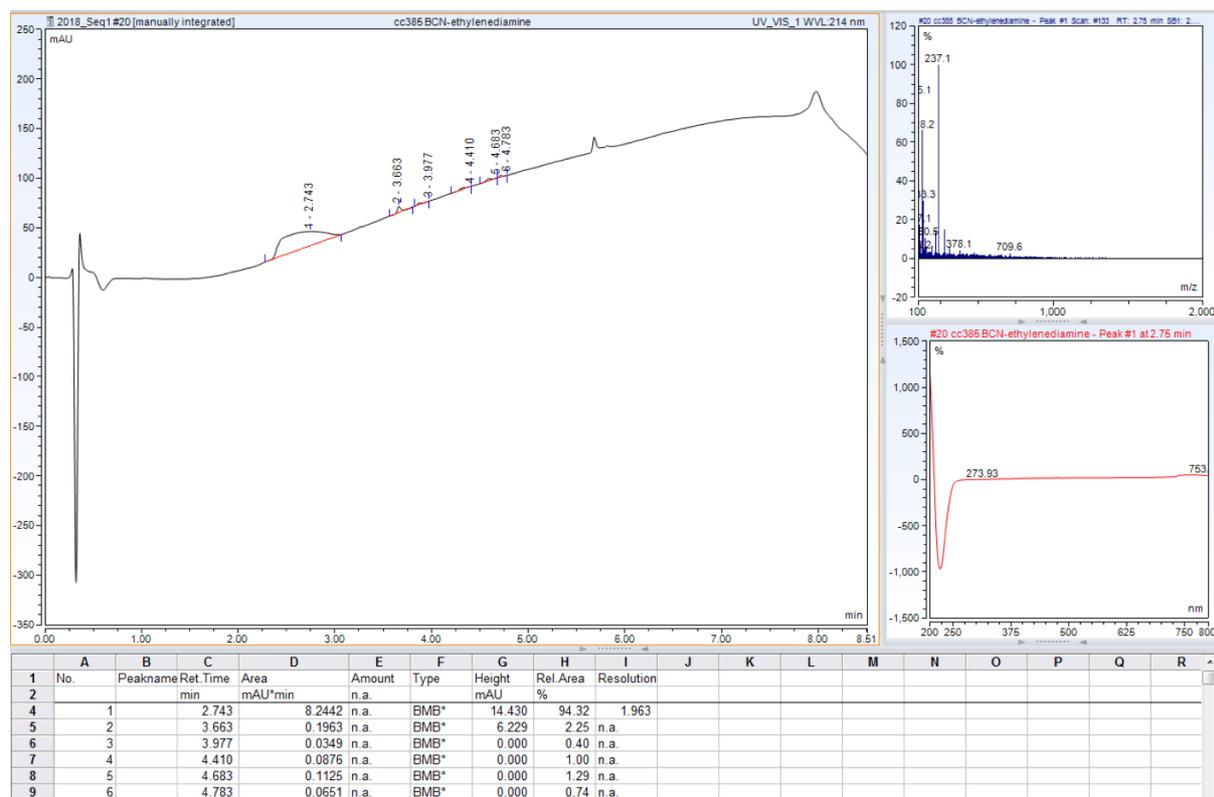
((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (2-aminoethyl)carbamate, BCN-NH₂ **31**.

endo-((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate (BCN-*p*-NPC) (315.3 mg, 317.14 μmol) and ethylene diamine (190.6 mg, 3.17 μmol, 10 eq) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). The reaction was stopped after 2.5 h at room temperature and DMF was eliminated under reduced pressure. Purification by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluent: H₂O 0.1% FA, MeCN 0.1% FA) afforded BCN-NH₂ **31** as a pale-yellow mixture of powder and oil (67.8 mg, 85%, purity: 94%).



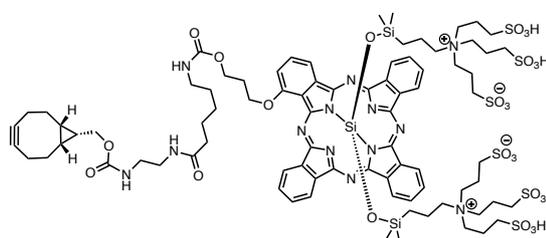
LRMS: C₁₃H₂₁N₂O₂⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 237.2, found 237.1.

RP-HPLC-LRMS analysis of BCN-NH₂ **31**:

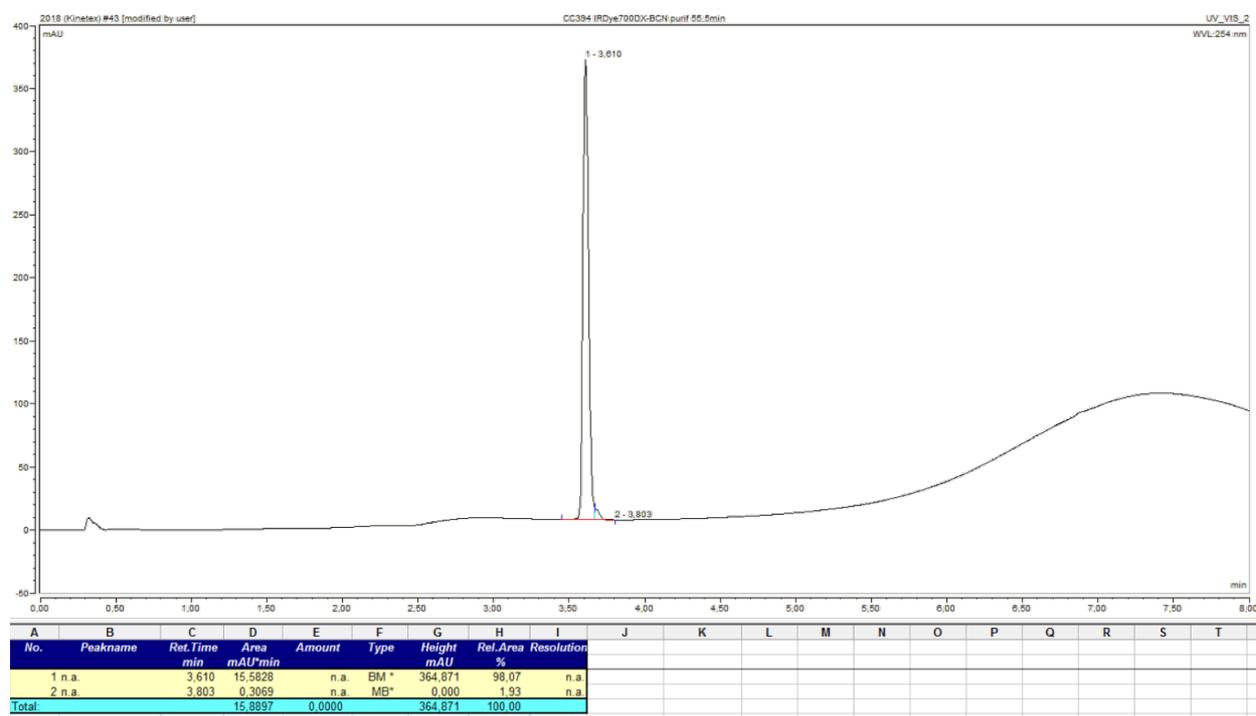


3,3'-((((4-(((1-((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)-3,8,15-trioxo-2,16-dioxo-4,7,14-triazanonadecan-19-yl)oxy)-19H-6,11-(azeno)-17,21-(azeno[3]episoindoloazeno)benzo[7,8][1,3,5,10]tetraaza[2]silacycloundecino[4,3-a:11,1-a']diisoindole-19,19-diyl)bis(oxy))bis(dimethylsilanediy))bis(propane-3,1-diy))bis(bis(3-sulfopropyl)ammoniumdiy))bis(propane-1-sulfonate), IRDye700DX-BCN **32.**

3,3'-((((4-(3-(((6-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-6-oxohexyl)carbonyl)oxy)propoxy)-19H-6,11-(azeno)-17,21-(azeno[3]episoindoloazeno)benzo[7,8][1,3,5,10]tetraaza[2]silacycloundecino[4,3-a:11,1-a']diisoindole-19,19-diyl)bis(oxy))bis(dimethylsilanediy))bis(propane-3,1-diy))bis(bis(3-sulfopropyl)ammoniumdiy))bis(propane-1-sulfonate) (IRDye700DX-NHS) (5 mg, 2.56 μmol) and BCN-NH₂ **31** (2.29 mg, 9.69 μmol, 3.8 eq) were dissolved in anhydrous DMSO (400 μL) and DIPEA (21.73 μL, 128.0 μmol, 50.0 eq) was added. The achievement of the reaction was confirmed by RP-HPLC analysis (eluent A: triethylammonium bicarbonate (TEAB) buffer 50 mM pH 7.5, eluent B: MeCN). After 1 h at room temperature, the product was purified by semi-preparative RP-HPLC on a SiliaChrom® dt C18 column (eluent A: TEAB buffer 50 mM pH 7.5, eluent B: MeCN). The fractions of interest were pooled, concentrated under reduced pressure to remove organic solvents and freeze-dried to give IRDye700DX-BCN-4TEA **32** as a blue powder (5.1 mg, 82%, purity determined by RP-HPLC at 254 nm: 98%). HRMS: C₈₃H₁₁₂N₁₃O₂₆S₆Si₃³⁻ ([M-3H]³⁻) m/z calculated: 660.84966, found 660.85085.

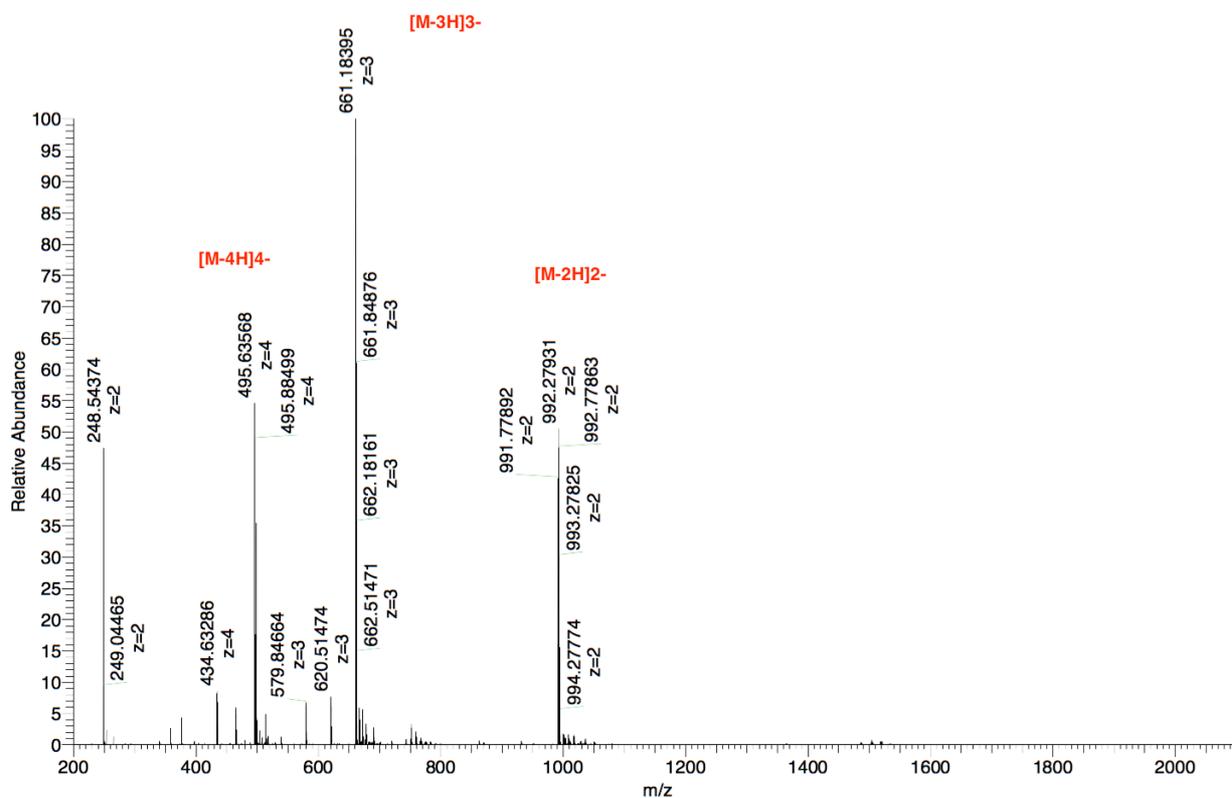


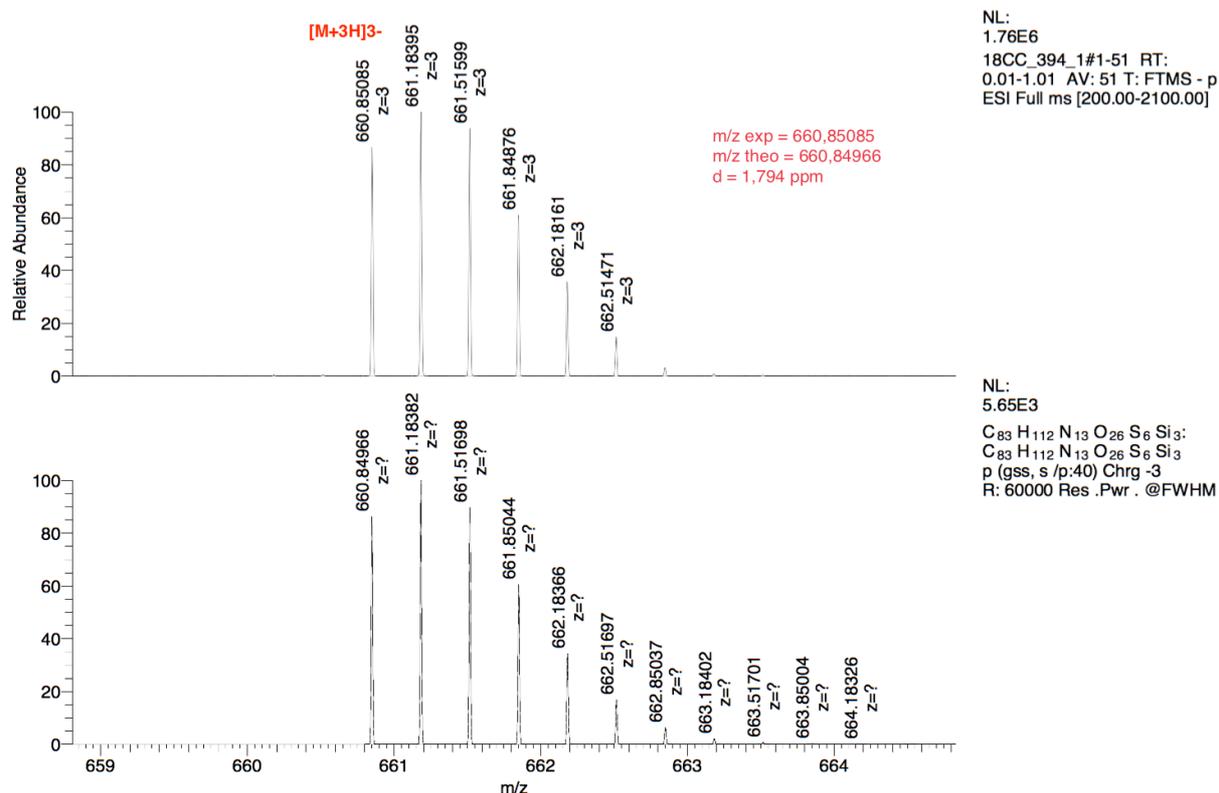
RP-HPLC analysis of IRDye700DX-BCN **32** (eluent A: TEAB buffer 50 mM pH 7.5, eluent B: MeCN):



HRMS spectrum of IRDye700DX-BCN **32** recorded in negative mode and comparison with simulated spectrum:

18CC_394_1 #1-51 RT: 0.01-1.01 AV: 51 NL: 1.76E6
T: FTMS - p ESI Full ms [200.00-2100.00]





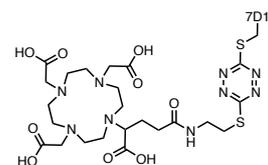
Reduction of 7D12:

4 mL of the 0.47 g/L stock solution of 7D12 in PBS with 10% (v/v) glycerol (1.88 mg, 105.5 nmol) were reduced by the addition of 511 μ L of a 20 mM stock solution of TCEP, HCl (10.5 μ mol, 100 eq). The reaction was monitored by RP-HPLC-LRMS on an UltiMate 3000 system (Thermo Scientific) equipped with a DAD detector and coupled to a high-resolution mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) using an ESI source. After 45 min at room temperature, the separation was achieved on a Thermo Scientific™ MAbPac™ column (4 μ m, 50 \times 2.1 mm) with the following eluents: A: H₂O, 0.1% FA, 0.02% TFA and B: MeCN/H₂O (90/10), 0.1% FA, 0.02% TFA, and a gradient from 5% to 100% of B in 15 min at 80 °C. Multicharged mass spectra were deconvoluted with the Protein Deconvolution 2.0 software (Thermo Scientific). After 45 min at room temperature the excess of reducing agent was removed by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel-10 kDa (Merck Millipore). This ultrafiltration step allowed for the buffer exchange from PBS with 10% glycerol to PB (20 mM, pH 7.1) with EDTA (5 mM). The pure reduced 7D12 was obtained as a 1.4 g/L solution (protein recovery = 85%) based on the spectroscopy measurements.*

* *note:* the concentration of the 7D12 in g/L was calculated by UV spectrophotometry, by using the extinction coefficient of 7D12 at 280 nm (35535 L.mol⁻¹.cm⁻¹, value from ExPASy).

Synthesis of the intermediate 7D12-Tz-S-DOTAGA:

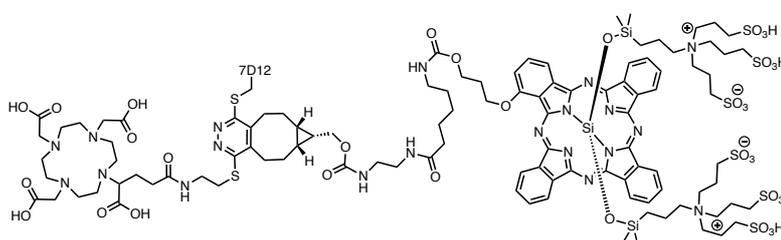
133 μL of a 30 mM stock solution of DOTAGA-S-Tz-Cl-4TFA **23** in DMSO (3.98 μmol , 48.0 eq) was added to a 1 g/L solution of reduced 7D12 (1.48 mg, 83.0 nmol) in PB (20 mM, pH 7.3) with EDTA (5 mM). The reaction was monitored by RP-HPLC-LRMS (LTQ Orbitrap XL). After 30 min at room temperature, the excess of probe was removed by ultrafiltration.



The solution of bioconjugate showed limited shelf stability at room temperature, so IRDye700DX-BCN had to be rapidly added to the tetrazine.

Synthesis of 7D12-Tz(IRDye700DX)-S-DOTAGA **33**:

120 μL of a 16 mM stock solution of the probe IRDye700DX-BCN-4TEAB **32** in DMSO (4.6 mg, 1.92 μmol , 23.0 eq) was added to 7D12-Tz-S-DOTAGA (1.48 mg, 83.0 nmol) in PB (20 mM, pH 7.3) with EDTA (5 mM). The solution

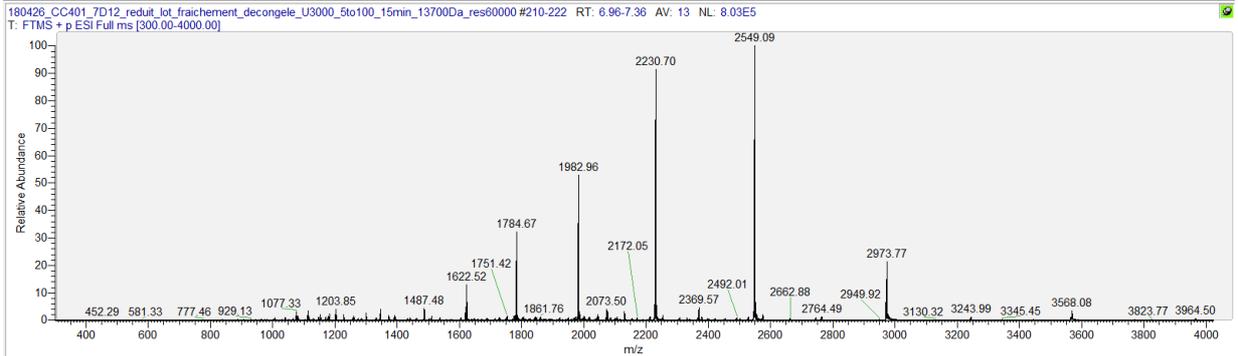
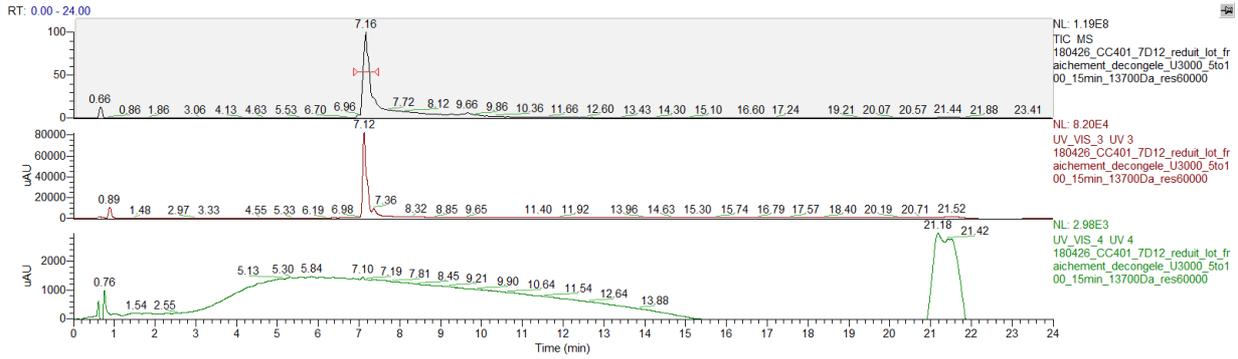


was stirred in a thermomixer (800 rpm, 37 °C) during 1 h. The product was purified by FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) by size exclusion on a SuperdexTM 75 10/300 GL column (cross-linked agarose and dextran, 13 μm , 10 \times 300-310 mm, 24 mL), at 0.8 mL/min, with PB (20 mM, pH 7.3) with NaN_3 (0.05%) as eluent. The pure dually-modified 7D12 **33** was obtained as a 2.4 g/L solution in PB (protein recovery = 86%). Based on spectroscopy measurements, the ratio of labeling (amount of IRDye700DX per 7D12) was determined to be 1.3.*

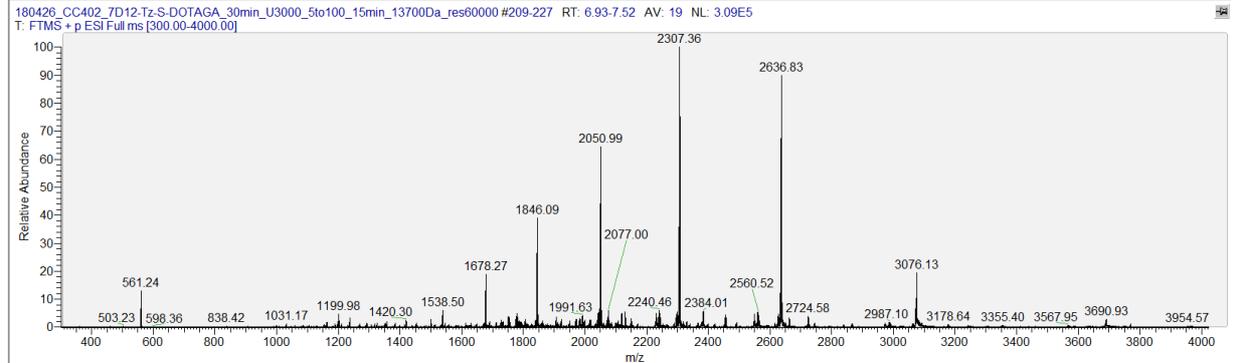
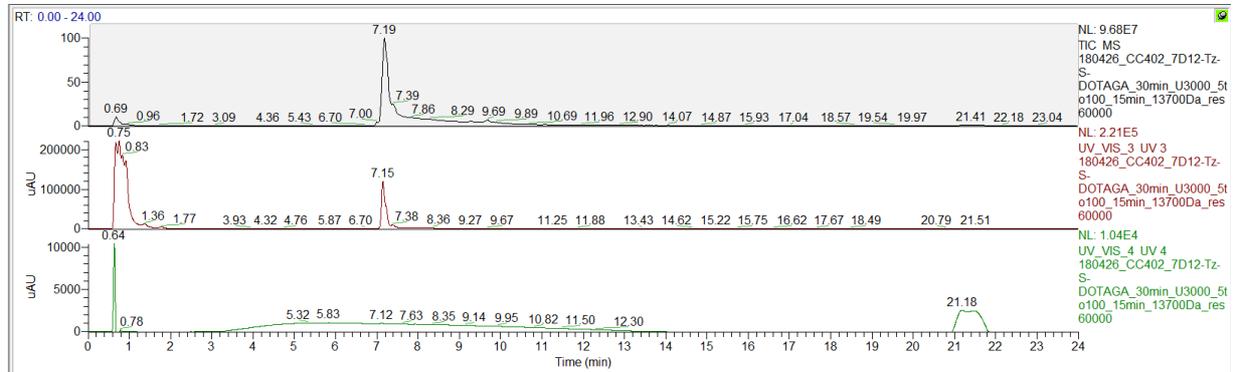
* *note*: a correction factor (0.1)⁴ was introduced to account for the contribution of the phthalocyanine absorbance at 280 nm. The molar concentration of the fluorophore was calculated by UV spectrophotometry by using the extinction coefficient of IRDye700DX at 689 nm in PBS (165000 L.mol⁻¹.cm⁻¹).⁴

⁴ LICOR - IRDye 700DX NHS Ester. https://www.licor.com/bio/products/reagents/irdye/700dx/nhs_ester.html (accessed Sep 08, 2018)

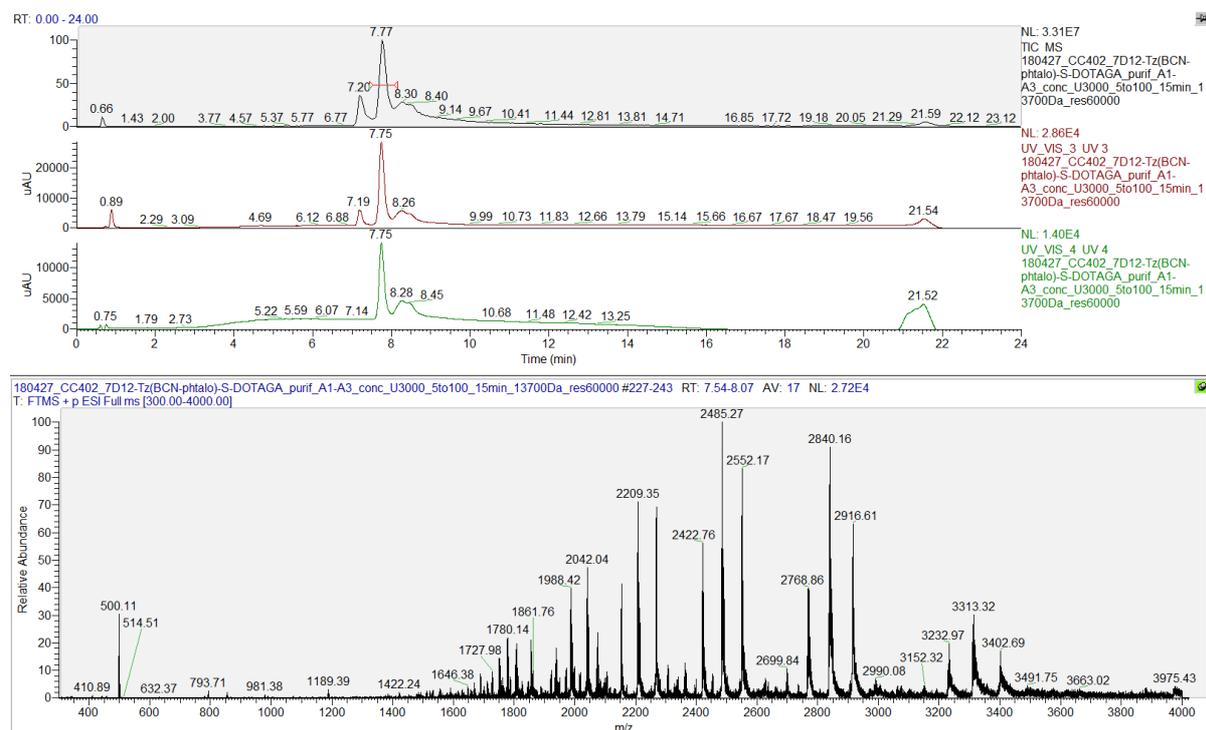
RP-HPLC chromatograms (total ion chromatogram, 280 nm and 650 nm) and total mass spectrum of reduced 7D12:



RP-HPLC chromatograms (total ion chromatogram, 280 nm and 650 nm) and total mass spectrum of 7D12-Tz-S-DOTAGA:



RP-HPLC chromatograms (total ion chromatogram, 280 nm and 650 nm) and total mass spectrum of 7D12-Tz(BCN-IRDye700DX)-S-DOTAGA **33**:



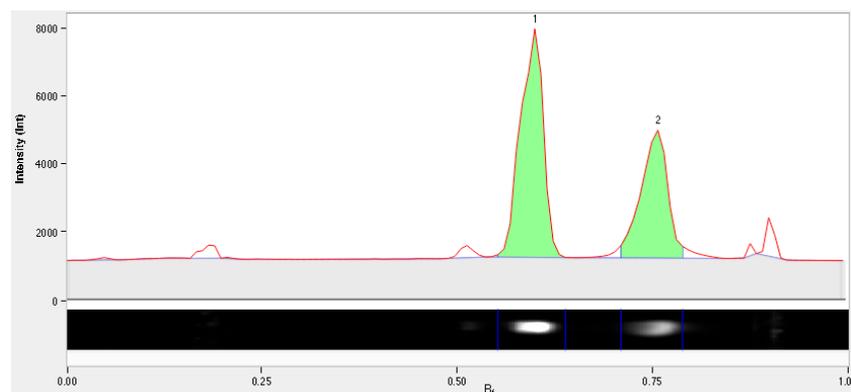
Spectral properties of **33**:

The normalized UV-Vis absorbance and fluorescence spectra in PB (20 mM, pH 7.3) were recorded on a CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH). The excitation spectrum was measured from 320 nm to 700 nm with a fixed emission wavelength at 725 nm. The emission spectrum was measured from 645 nm to 740 nm with a fixed excitation wavelength at 620 nm. Values for $\lambda_{Abs, max}$, $\lambda_{Ex, max}$ and $\lambda_{Em, max}$ were respectively 689 nm, 691 nm, and 705 nm.

SDS-PAGE analysis of **33**:

The bioconjugate **33** was analyzed by electrophoresis on a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE analysis by following the procedure indicated in material and method part. Quantification of the SDS-PAGE were performed by using Image Lab 6.0.1 software (Biorad).

SDS-PAGE analysis of the bioconjugate **33** and quantification of the corresponding chromatogram:



Band n° 1	60.7%
Band n° 2	39.3%

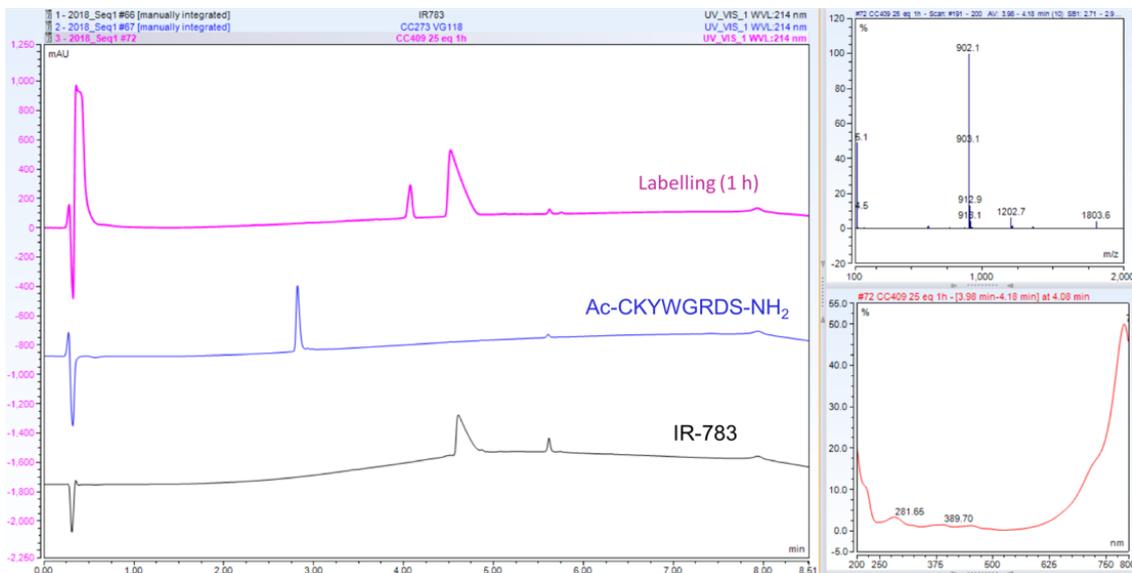
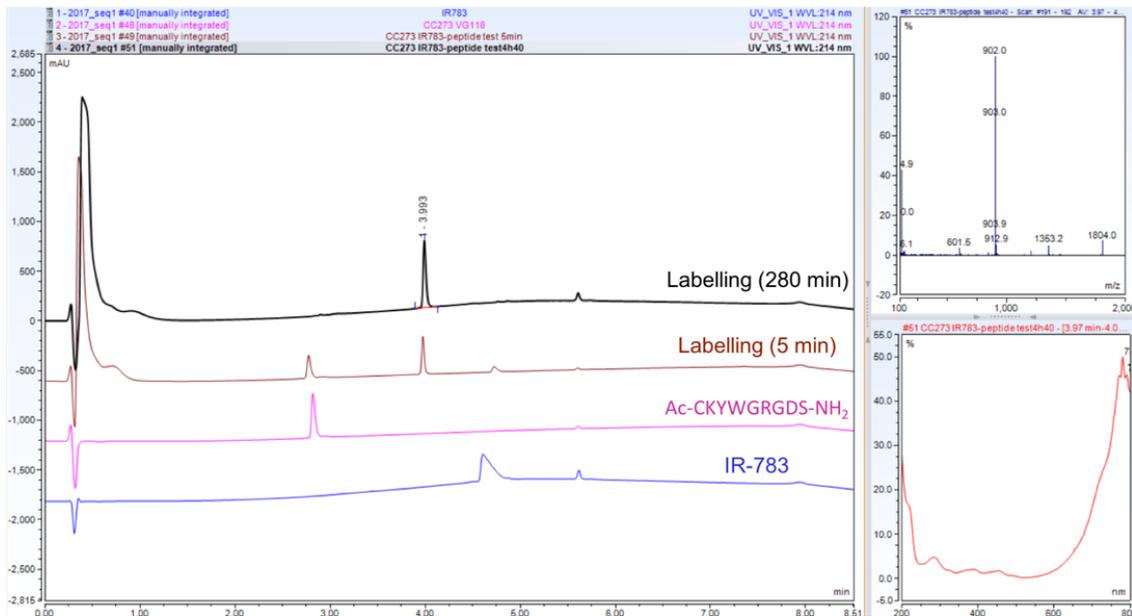
CHAPTER III – EXPERIMENTAL PART

Validation of the labeling strategy on a model peptide

Monitoring of the reaction between a model peptide and IR783:

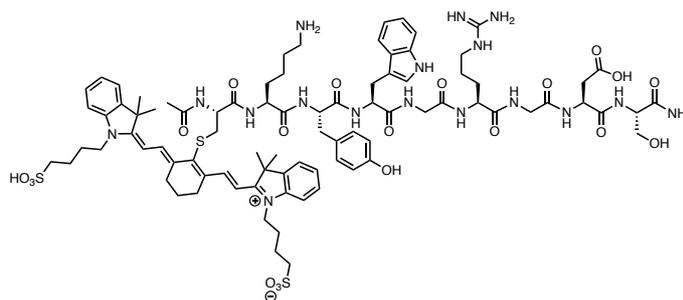
4/10 μL of IR783 solution at 5/20 mM in DMF (20/200 nmol, 2.5/25 eq) were added to 400 μL of a peptide solution at 0.02 mM in PB (0.66 M, pH 7.1). The resulting solution was stirred at room temperature, in the dark, and monitored by RP-HPLC-LRMS analysis.

RP-HPLC-LRMS analyses of the crude labeling reaction with 2.5 eq (top) and 25 eq (bottom) of IR783:



Synthesis of the fluorescent conjugate Ac-C(IR783)KYWGRGDS-NH₂ **34**:

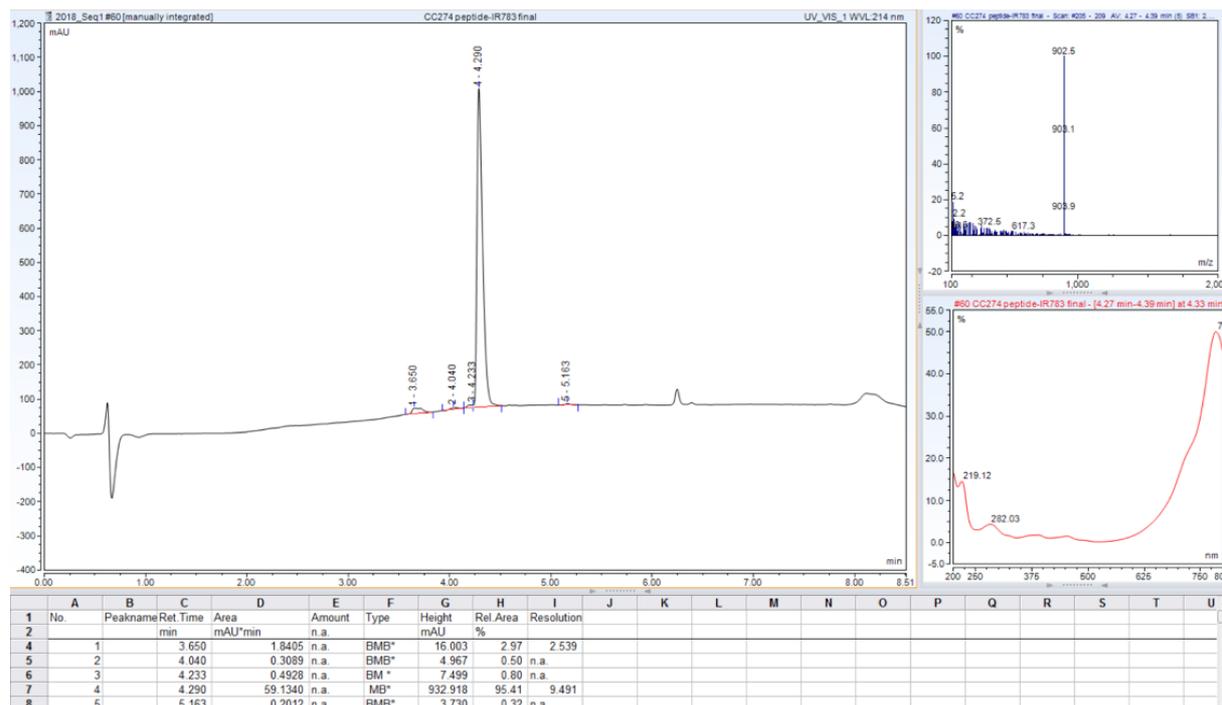
The peptide Ac-C₁YWGRGDS-NH₂ **18** (11.0 mg, 8.2 μmol) and IR783 (10.3 mg, 12.0 μmol, 1.5 eq) were dissolved in 3 mL of PB (0.66 M, pH 7.1). The resulting solution was stirred at room temperature, in the dark, for 50 min. The crude peptide was purified on an UltiMate 3000 semi-preparative



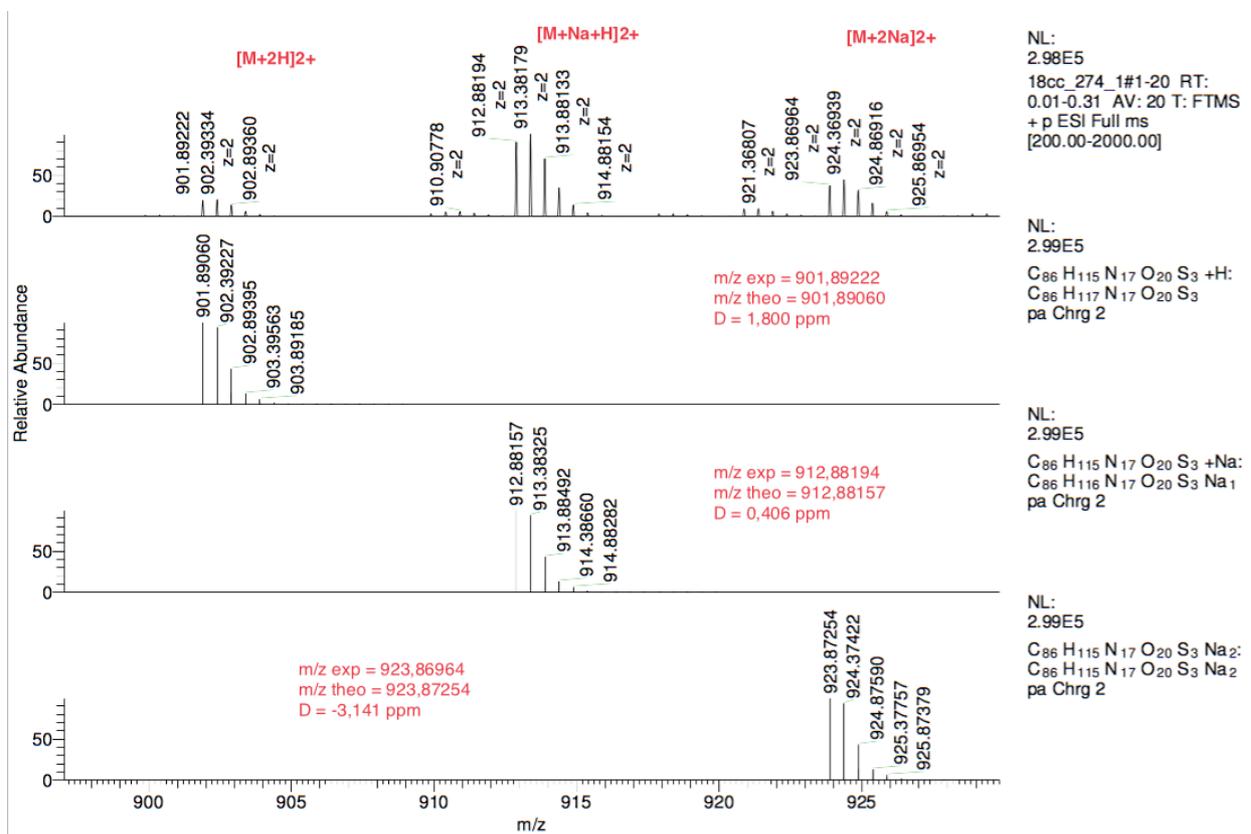
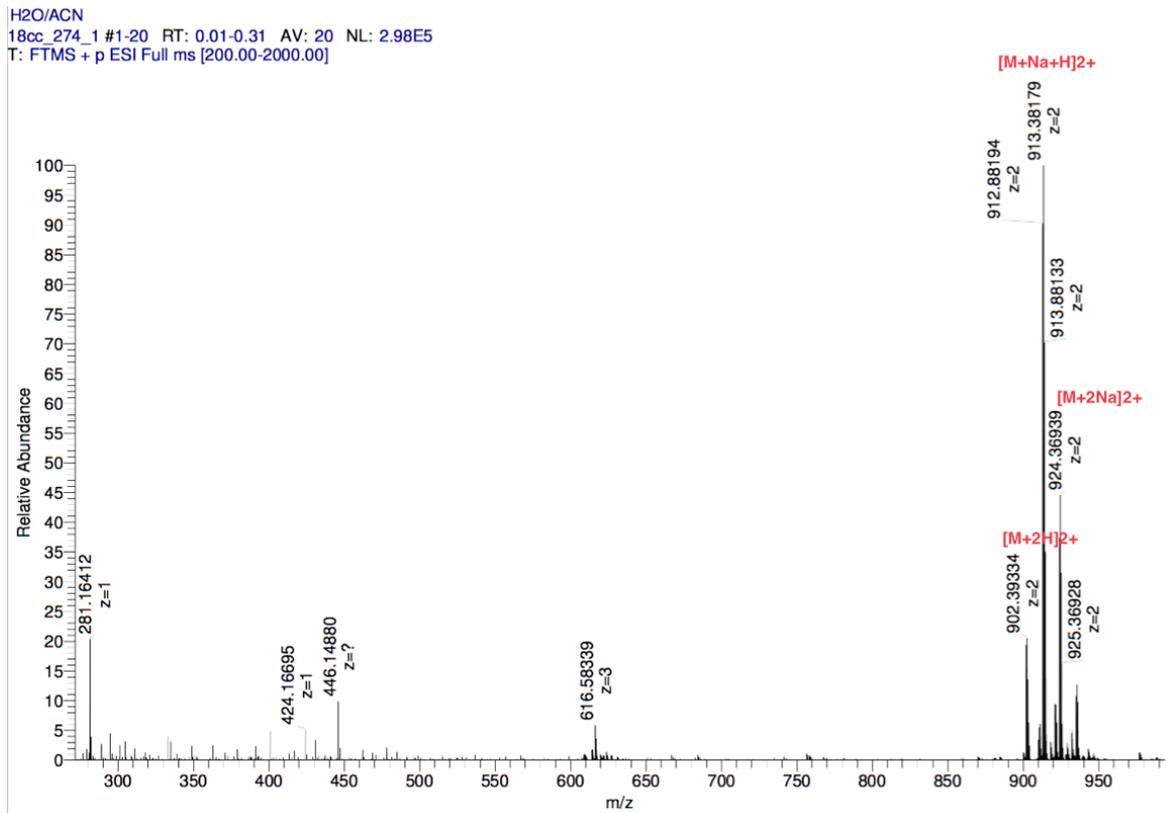
RP-HPLC system by using dtC18 SiliaChrom column as described in materials and methods part. The peptide Ac-C(IR783)KYWGRGDS-NH₂.2TFA **34** was isolated as a green amorphous powder (14.4 mg, 86%, purity: 95%).

HRMS: C₈₆H₁₁₇N₁₇O₂₀S₃²⁺ ([M + 2H]²⁺) m/z calculated: 901.89060, found: 901.89222; C₈₆H₁₁₆N₁₇O₂₀S₃Na²⁺ ([M + H + Na]²⁺) m/z calculated: 912.88157, found: 912.88194; C₈₆H₁₁₅N₁₇O₂₀S₃Na₂²⁺ ([M + 2Na]²⁺) m/z calculated: 923.87254, found: 923.86964.

RP-HPLC-LRMS analysis of the fluorescent conjugate **34**:



HRMS spectrum of the fluorescent conjugate **34** recorded and comparison with simulated spectrum:



Evaluation of the spectral properties of the conjugate **34** and comparison with IR783:

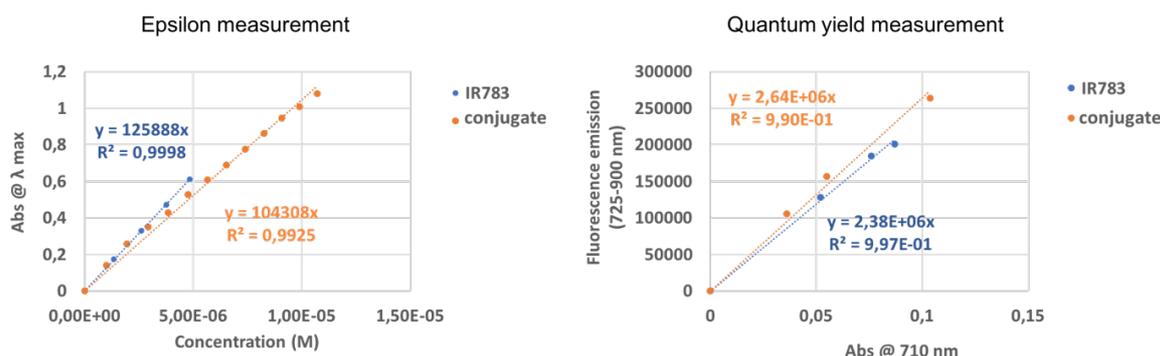
UV-visible spectra were obtained on an Agilent Cary 5000 UV-VIS-NIR (double beam) spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Hellma, 100-QS, 45 × 12.5 × 12.5 mm, pathlength: 10 mm, chamber volume: 3.5 mL), at 25 °C. Fluorescence spectroscopic studies were performed with a HORIBA Jobin Yvon Fluorolog spectrofluorometer (software FluorEssence) at 25 °C, with a standard fluorometer cell (Labbox, LB Q, light path: 10 mm, width: 10 mm, chamber volume: 3.5 mL). The absorption spectra of cyanine dye IR783 and related conjugate were recorded (220-900 nm) in PBS (pH 7.4) with concentrations in the micromolar range. Emission spectra were recorded in the range 725-900 nm upon excitation at 710 nm (shutter: Auto Open, Ex. Slit = 5 nm and Em. slit = 5 nm). Excitation spectra were recorded in the range 240-830 nm upon emission measurement at 840 nm (shutter: Auto Open, Ex. slit = 12 nm and Em. slit = 5 nm). All fluorescence spectra were corrected until 850 nm but emission spectra cannot be corrected in the range 850-900 nm, which explains the artefact observed at 850 nm.

Fluorescence quantum yields were measured in PBS (pH 7.4) at 25 °C by a relative method using cyanine dye IR783 ($\Phi_{Fl} = 6.5\%$ in PBS pH 7.4)¹ as standard (dilution by a factor of 3 between absorption and fluorescence measurements). The following equation was used:

$$\Phi_{Fl}(x) = (A_S/A_X)(F_X/F_S)(n_X/n_S)^2\Phi_{Fl}(s)$$

where A is the absorbance (in the range of 0.01-0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts S and X represent standard and unknown, respectively. The refractive index value was 1.337 for PBS.

Measure of the ϵ and Φ_{Fl} of IR783 and of the conjugate **34**. Top left: absorbance = f(concentration); top right: integration of emission spectra = f(absorbance); bottom: values obtained for $\lambda_{Abs, max}$, $\lambda_{Em, max}$, ϵ and Φ_{Fl} :



	IR-783	conjugate
$\lambda_{Abs, max}$ (nm)	775	792
$\lambda_{Em, max}$ (nm)	792	825
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	126 000	104 000
Φ_{Fl} (%)	6.5	7

¹ Wang, L.; Jin, J.; Chen, X.; Fan, H.-H.; Li, B. K. F.; Cheah, K.-W.; Ding, N.; Ju, S.; Wong, W.-T.; Li, C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 5366–5370

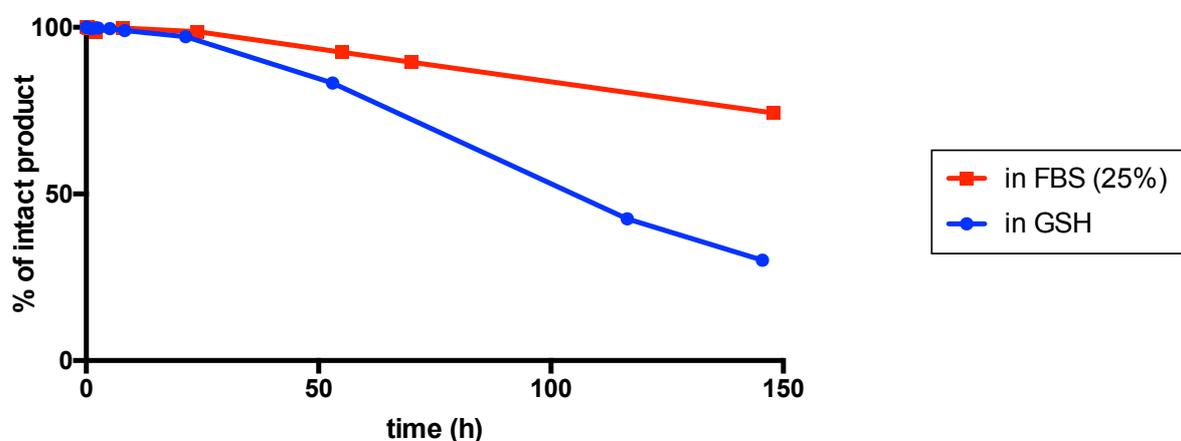
Stability studies of the conjugate **34** in FBS/RPMI (25 : 75, v/v):

6.67 μL of a 30 mM stock solution of fluorescent conjugate **34** in DMF (200 nmol) were stirred in a thermomixer (1000 rpm, 37 °C, dark) with 145 μL of FBS/RPMI (25 : 75, v/v). Final concentration in conjugate **34** was 1 mM. After 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 55 h, 70 h and 148 h, a sample of 15 μL of solution was collected and diluted with 60 μL of absolute EtOH. Samples were vortexed and centrifuged (11700 rpm, 15 min) to remove the precipitated proteins. The supernatant was analyzed by RP-HPLC-LRMS (UV detection at 214 nm).

Stability studies of the fluorescent conjugate **34** in the presence of GSH:

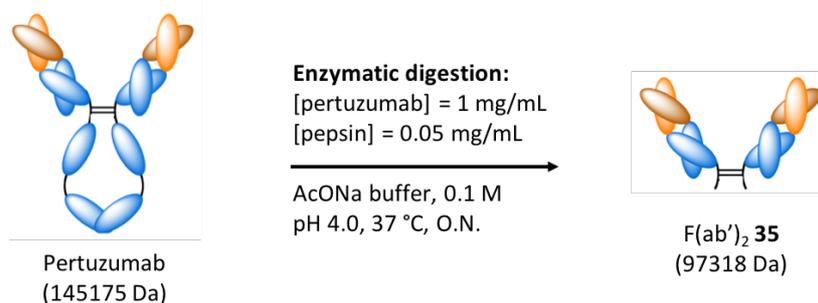
10.0 μL of a 5 mM stock solution of fluorescent conjugate **34** in ultrapure water containing 6.7% of DMF (50 nmol) were stirred in a thermomixer (1000 rpm, 25 °C, dark) with 0.3 mM solution of GSH in PBS (480 μL). Final concentration in conjugate **34** was 0.1 mM. After 10 min, 1.3 h, 2.6 h, 5.1 h, 8.3 h, 21.4 h, 2 days, 5 days and 6 days the reaction was analyzed by RP-HPLC-LRMS (UV detection at 214 nm) and degradation products were identified thanks to the m/z values.

Time-dependent changes in the amount of intact fluorescent conjugate **34** upon incubation in FBS (25%, v/v in RPMI) (red curve) or in the presence of GSH (0.3 mM) (blue curve):



Labeling of a Fab' fragment of pertuzumab

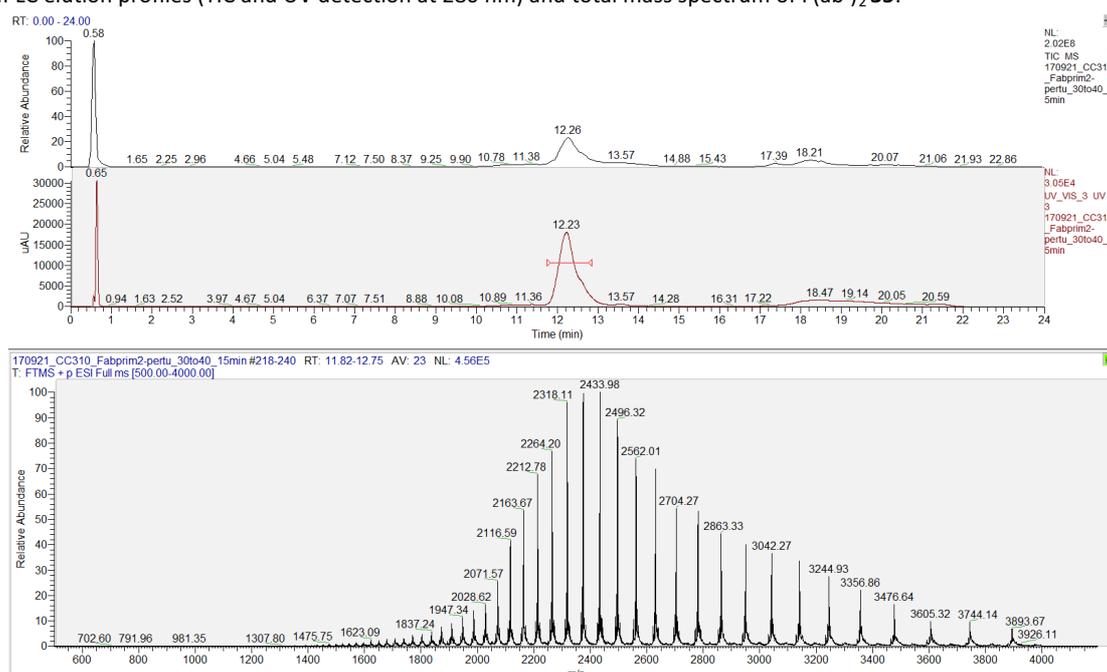
Synthesis of the pertuzumab fragment F(ab')₂ 35:



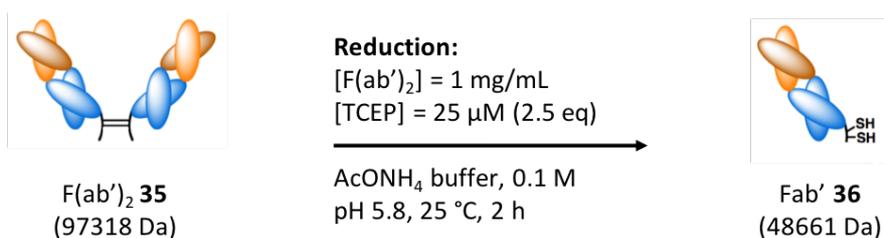
Pertuzumab (10 mg) was digested by the pepsin protease from porcine gastric mucosa (Sigma Aldrich) in sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4.0). Antibody concentration was 1 mg/mL and pepsin concentration, 0.05 mg/mL. After 15 h at 37 °C, the enzymatic digestion was stopped by adding Tris buffer (1.0 M, pH 9.0, 2 mL). The buffer was exchange from NaOAc to PB and the reaction was concentrated on an Amicon Ultra Ultracel-30 kDa (Merck Millipore). The fragment F(ab')₂ was purified by FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) on a Hitrap Protein L column (Capto L resin, 7 × 25 mm, 1 mL) with AcOH buffer (0.05 M, pH 3.0) as eluent, and then by size-exclusion separation on a Superdex™ 200 10/300 GL column (cross-linked agarose and dextran, 13 μm, 10 × 300-310 mm, 24 mL), at 0.8 mL/min, with PB (20 mM, pH 7.3) as eluent. The fragment was then concentrated by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel-30 kDa to obtain a solution of F(ab')₂ at 4.98 mg/mL* in PB (0.02 M, pH 7.3). The pure F(ab')₂ 35 was characterized by RP-HPLC-HRMS (Orbitrap). (protein recovery = 69%, HPLC purity at 280 nm = 95%).

**note*: the concentration of the F(ab')₂ in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry using the extinction coefficient of the F(ab')₂ at 280 nm (1.45 L.g⁻¹.cm⁻¹, value from ExPASy).

RP-HPLC elution profiles (TIC and UV detection at 280 nm) and total mass spectrum of F(ab')₂ 35:



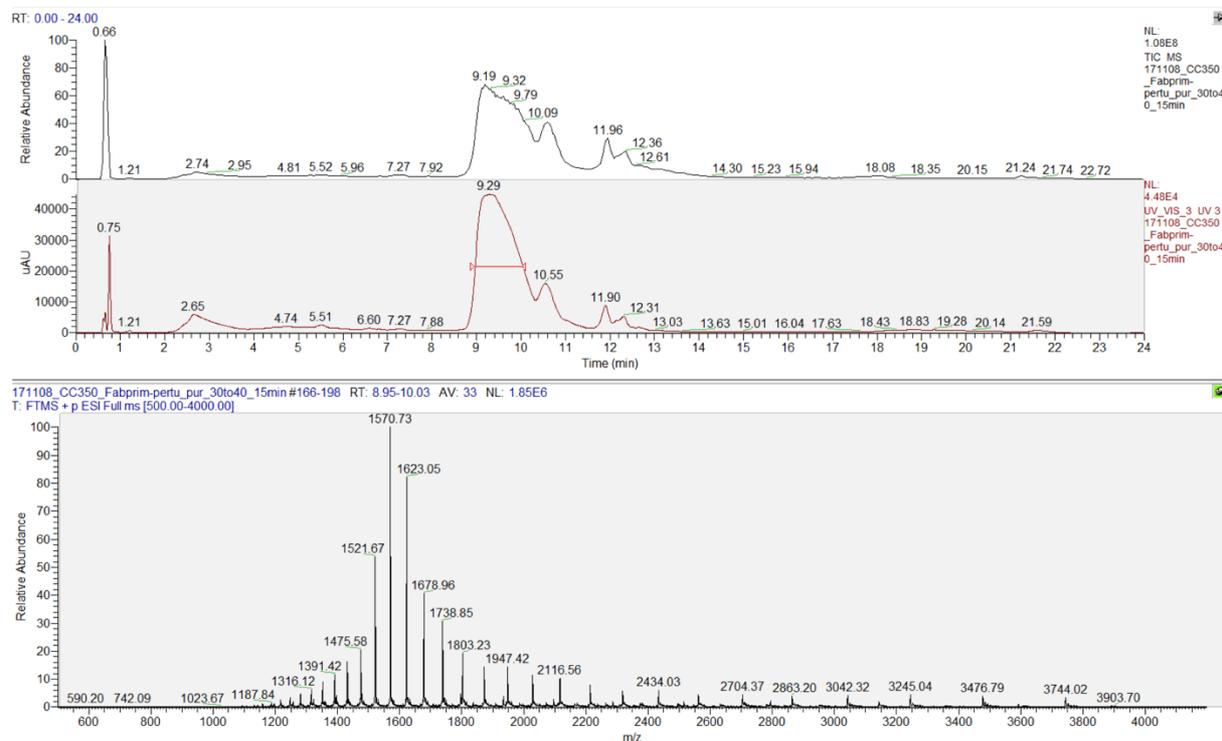
Synthesis of Fab' 36:



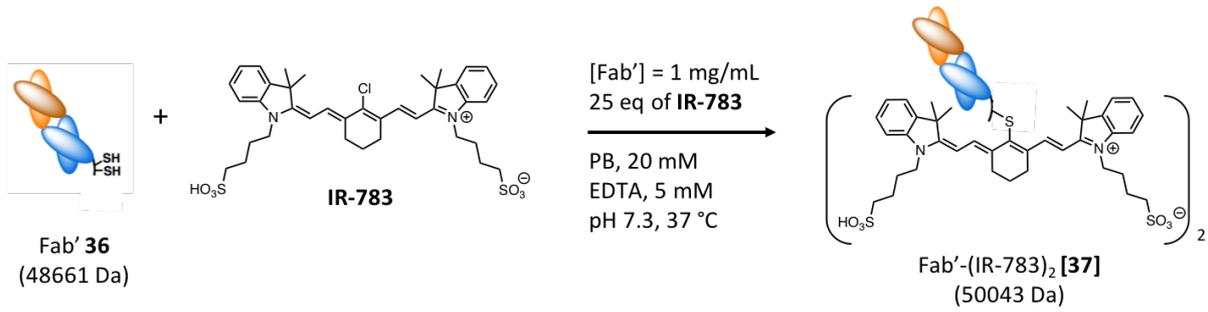
F(ab')₂ **35** (400 μg) was reduced with TCEP (HCl salt, 2.5 eq) in ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 5.8). F(ab')₂ concentration was 1 mg/mL. The reaction was monitored by RP-HPLC-HRMS (Orbitrap). After 2 h of incubation at 25 °C, the fragment Fab' was purified by FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) by size exclusion chromatography on a Superdex™ 75 10/300 GL column (cross-linked agarose and dextran, 13 μm, 10 × 300-310 mm, 24 mL), at 0.8 mL/min, with PB (20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.3) as eluent. The fragment was then concentrated by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel-30 kDa (Merck Millipore) to obtain a solution of Fab' at 1.26 mg/mL* in PB (20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.3) (protein recovery = 68%, HPLC purity at 280 nm = 77%). The Fab' fragment **36** is relatively stable at -18 °C but should be kept at a concentration <2 mg/mL in PB with EDTA (5 mM) to avoid spontaneous cysteine oxidation.

**note*: the concentration of the Fab' in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry using the extinction coefficient of the Fab' at 280 nm (1.45 L.g⁻¹.cm⁻¹, value from ExpASY).

RP-HPLC elution profiles (TIC and UV detection at 280 nm) and total mass spectrum of the pure Fab' **36**:

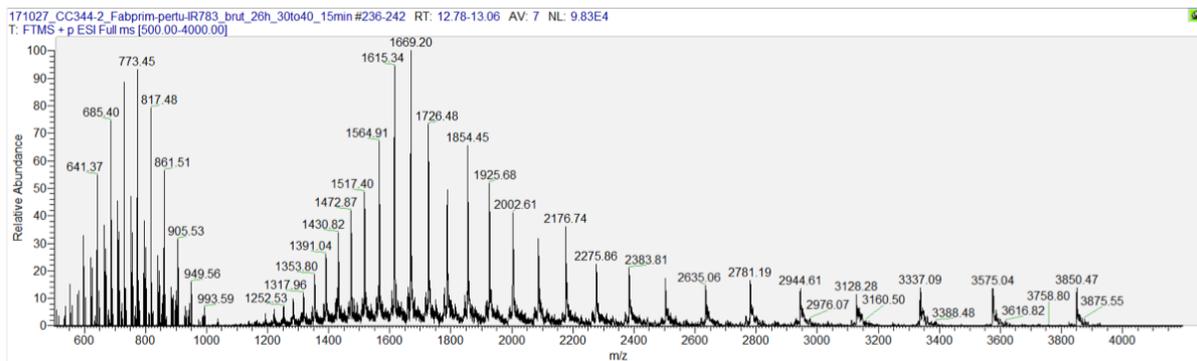
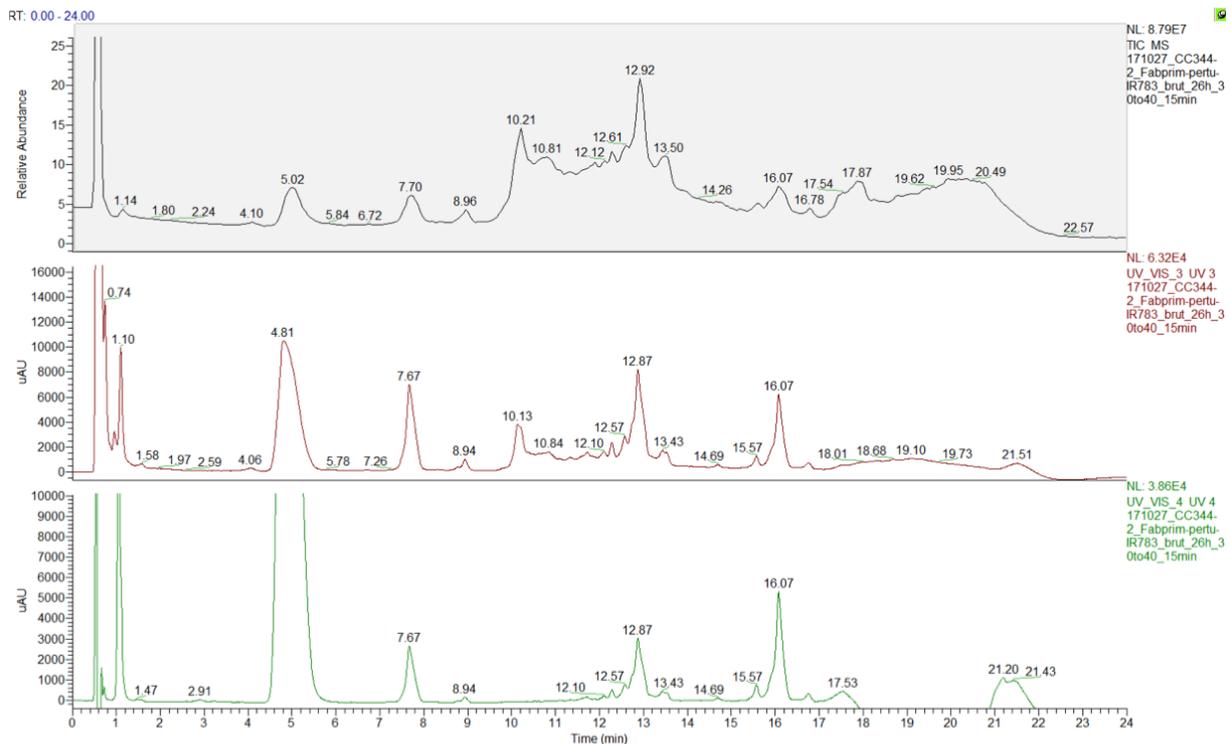


Fluorescent labeling of Fab':

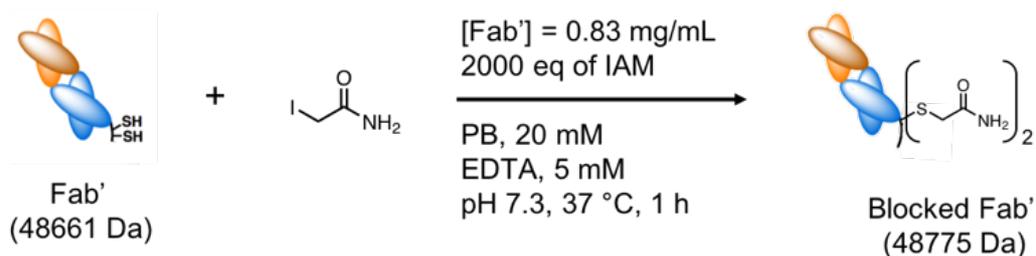


2.5 μ L of 5 mM stock solution of IR783 in DMF (12.5 nmol, 25 eq) were added to a 1 mg/mL solution of Fab' 36 (25.0 μ g, 0.5 nmol) in PB (20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.3). The solution was stirred in a thermomixer (1000 rpm, 37 °C). The reaction was monitored by RP-HPLC-HRMS (Orbitrap).

RP-HPLC elution profiles (TIC and dual UV-Vis detection at 280 nm and 650 nm) and total mass spectrum of the Fab' labeling reaction after 26 h:



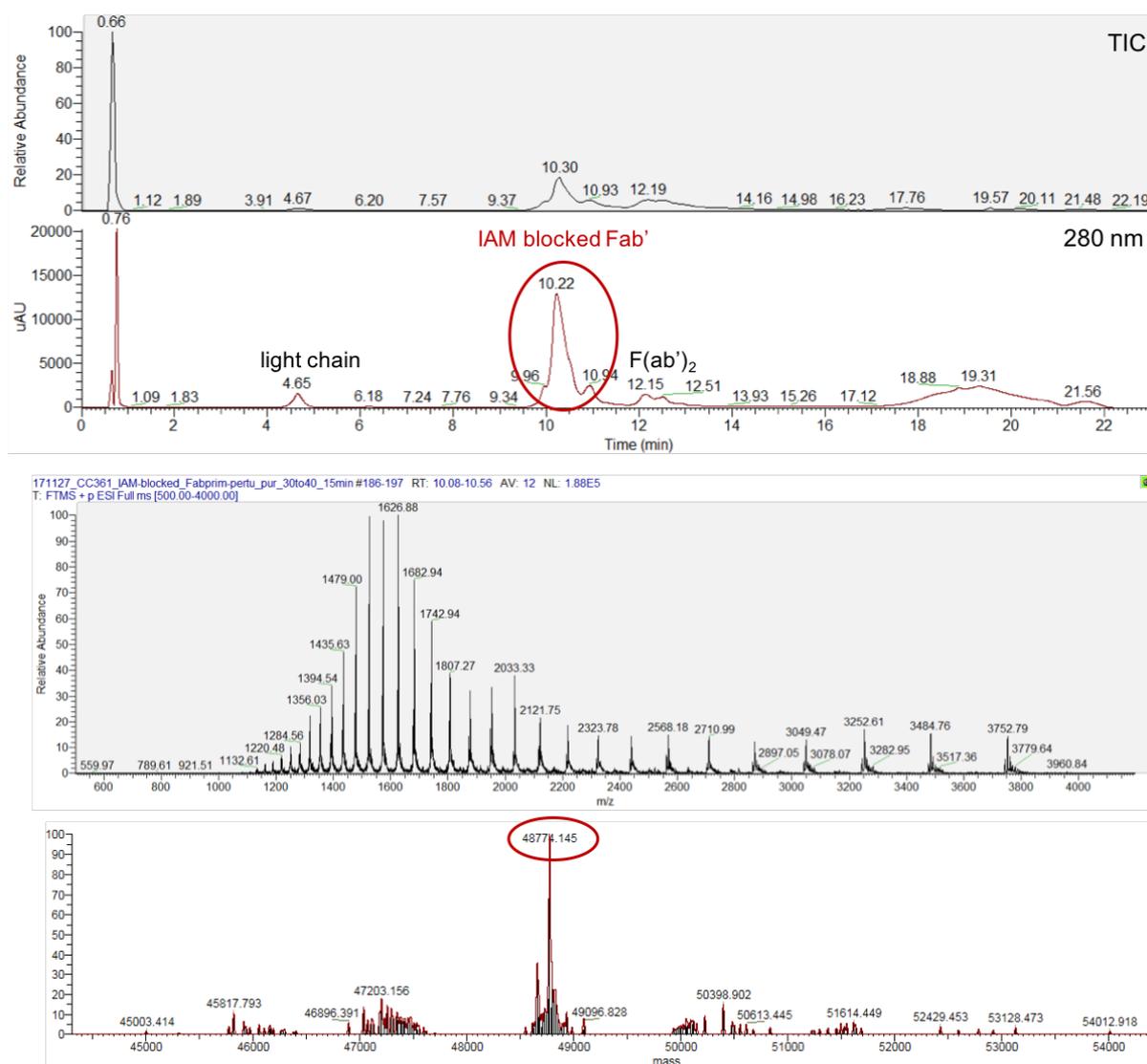
Blocking of Fab' cysteine residues with iodoacetamide:



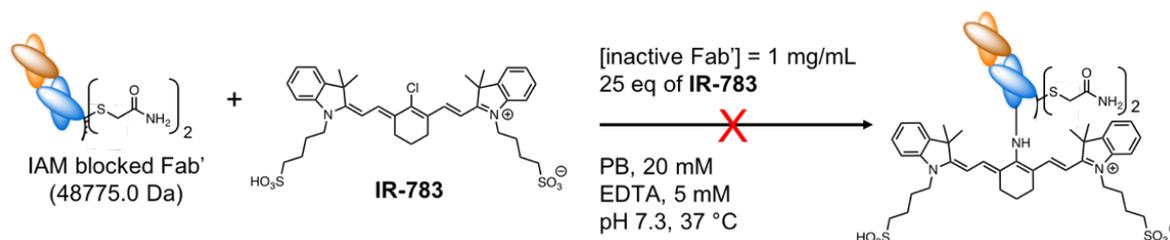
30 μ L of 100 mM stock solution of iodoacetamide (IAM) in ultrapure water (3 μ mol, 2000 eq) were added to a 0.83 mg/mL solution of Fab' **36** (75.0 μ g, 1.5 nmol) in PB (20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.3). The resulting solution was stirred in a thermomixer 1000 rpm, at 37 °C and for 1 h. The blocked fragment Fab' was purified with FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) by size-exclusion chromatography on a Hitrap desalting column (Sephadex G-25 Superfine resin, cross-linked dextran, bead size 15-70 μ m, 16 \times 25 mm, 5 mL) with PB 20 mM (pH 7.3) as eluent, at 2.5 mL/min. Concentration by ultrafiltration on an Amicon Ultra Ultracel-30 kDa gave a solution of IAM-blocked Fab' at 1.16 mg/mL* in PB 20 mM (pH 7.3) (protein recovery = 57%, HPLC purity at 280 nm = 67%).

**note*: the concentration of the blocked Fab' in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry using the extinction coefficient of the Fab' at 280 nm (1.45 L.g⁻¹.cm⁻¹, value from ExPASy).

RP-HPLC elution profiles (TIC and UV detection at 280 nm), total and deconvoluted mass spectra of the IAM blocked Fab':

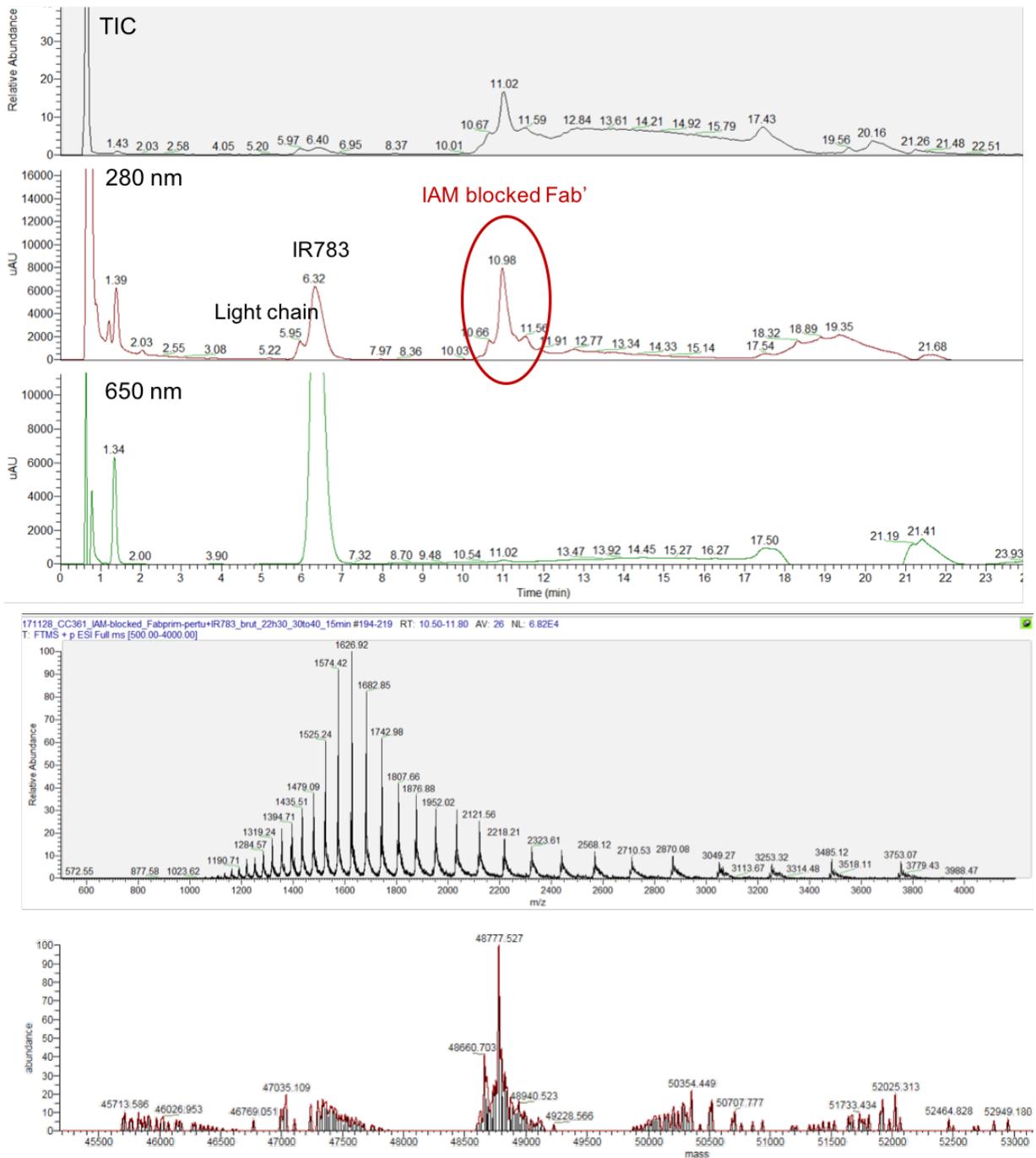


Control experiment on the blocked Fab':



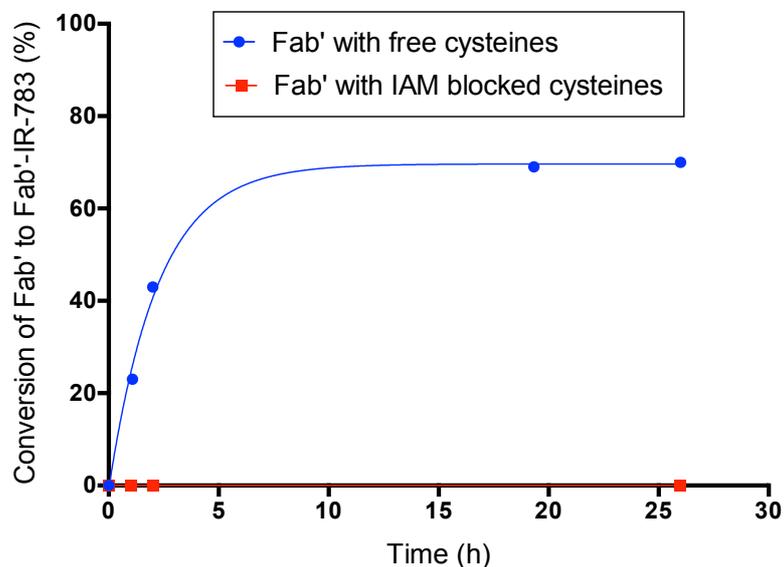
2.5 μ L of 5 mM stock solution of IR783 in DMF (12.5 nmol, 25 eq) were added to a 1 mg/mL solution of IAM-blocked Fab' (25.0 μ g, 0.5 nmol) in PB (20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.3). The resulting solution was stirred in a thermomixer (1000 rpm, 37 °C). The reaction was monitored by RP-HPLC-HRMS (Orbitrap).

RP-HPLC elution profiles (TIC and dual UV-Vis detection at 280 nm and 650 nm), total and deconvoluted mass spectra of the crude reaction after approximately 24 h:

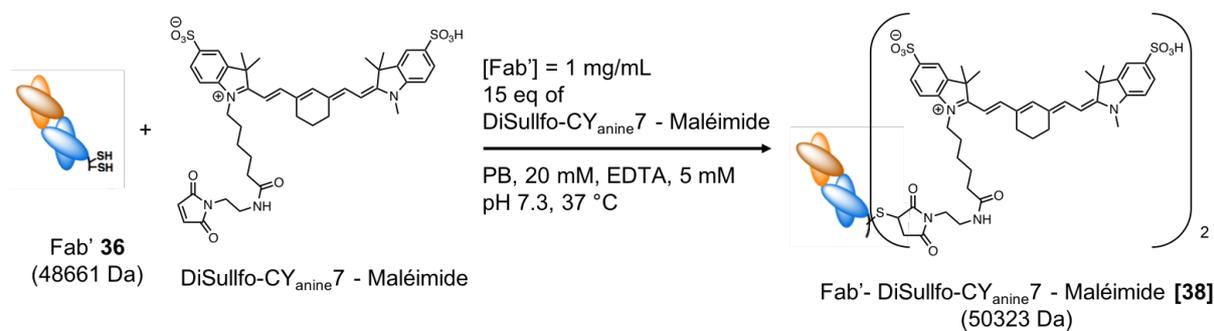


Monitoring of the progress of the labeling reaction:

Evolution of the advancement of the coupling reaction between IR783 and Fab' **36** with free cysteines (blue) or iodoacetamide-blocked Fab' (red); conversion was calculated from peaks integration in the RP-HPLC chromatograms at 280 nm:

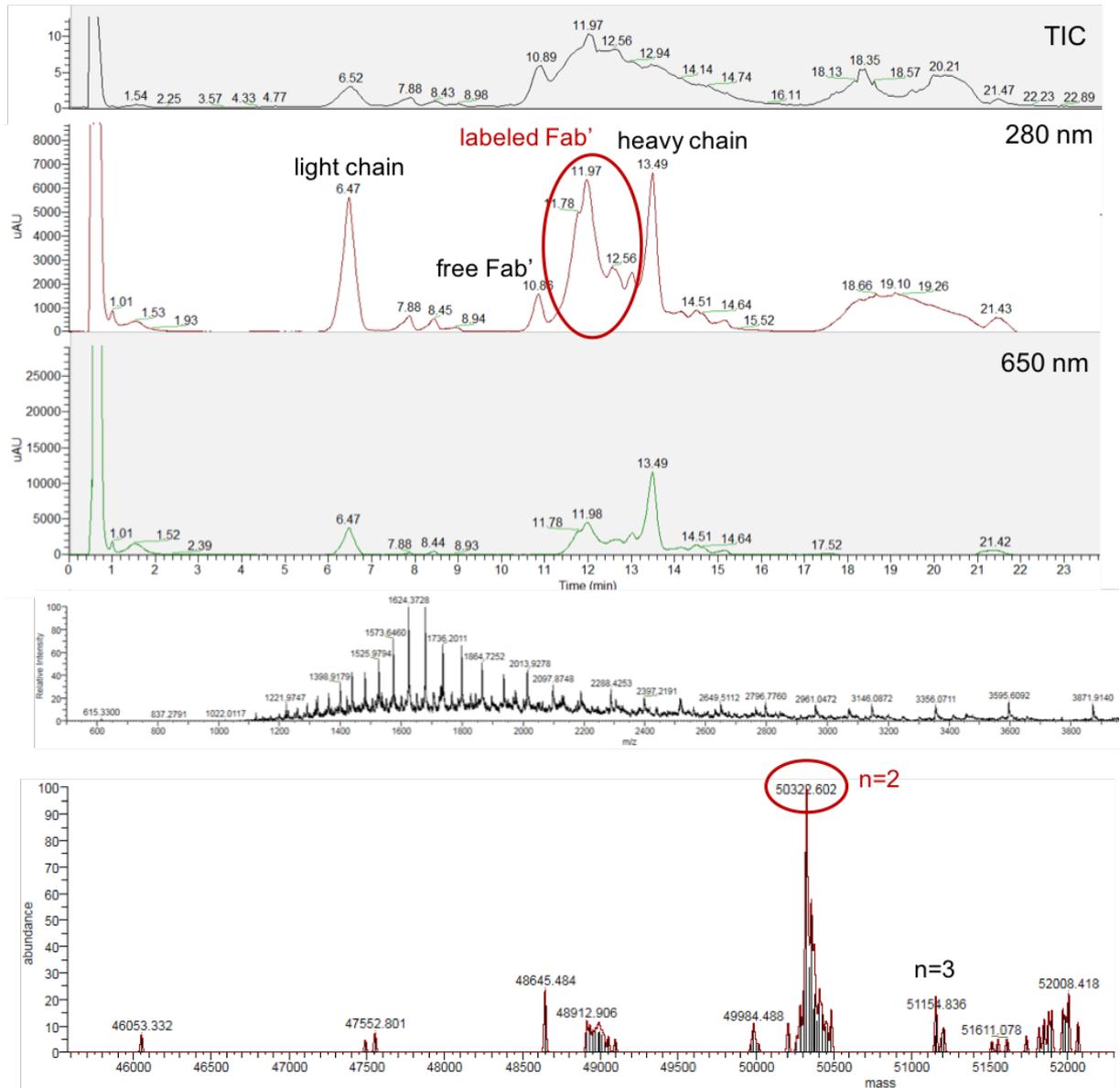


Labeling of Fab' with the commercially available DiSulfo-CY_{anine7} – Maleimide:



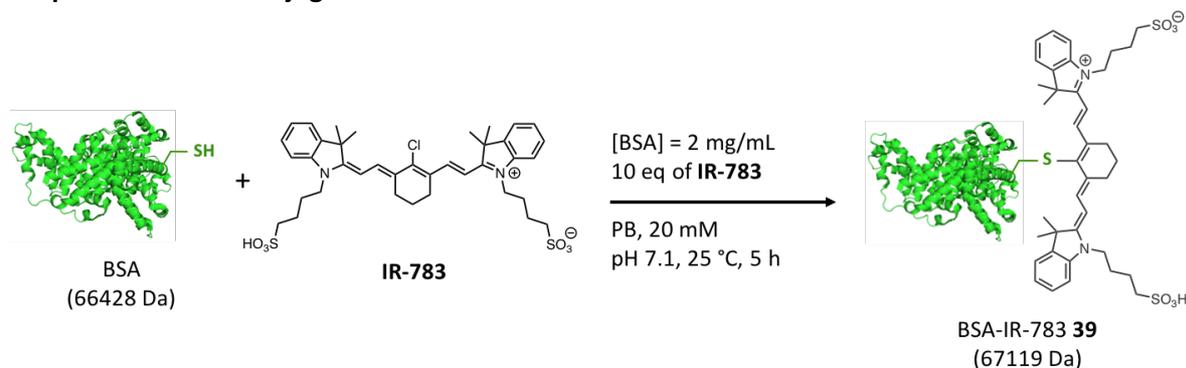
1.5 μ L of 5 mM stock solution of DiSulfo-CY_{anine7} - Maleimide derivative in DMF (7.5 nmol, 15 eq) was added to a 1 mg/mL solution of Fab' **36** (25.0 μ g, 0.5 nmol) in PB (20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.3). The resulting solution was stirred in a thermomixer (1000 rpm, 37 °C). The reaction was monitored by RP-HPLC-HRMS (Orbitrap).

RP-HPLC elution profiles (TIC and dual UV-Vis detection at 280 nm and 650 nm), total and deconvoluted mass spectrum of the reaction mixture after 1 h:



Labeling of bovine serum albumin

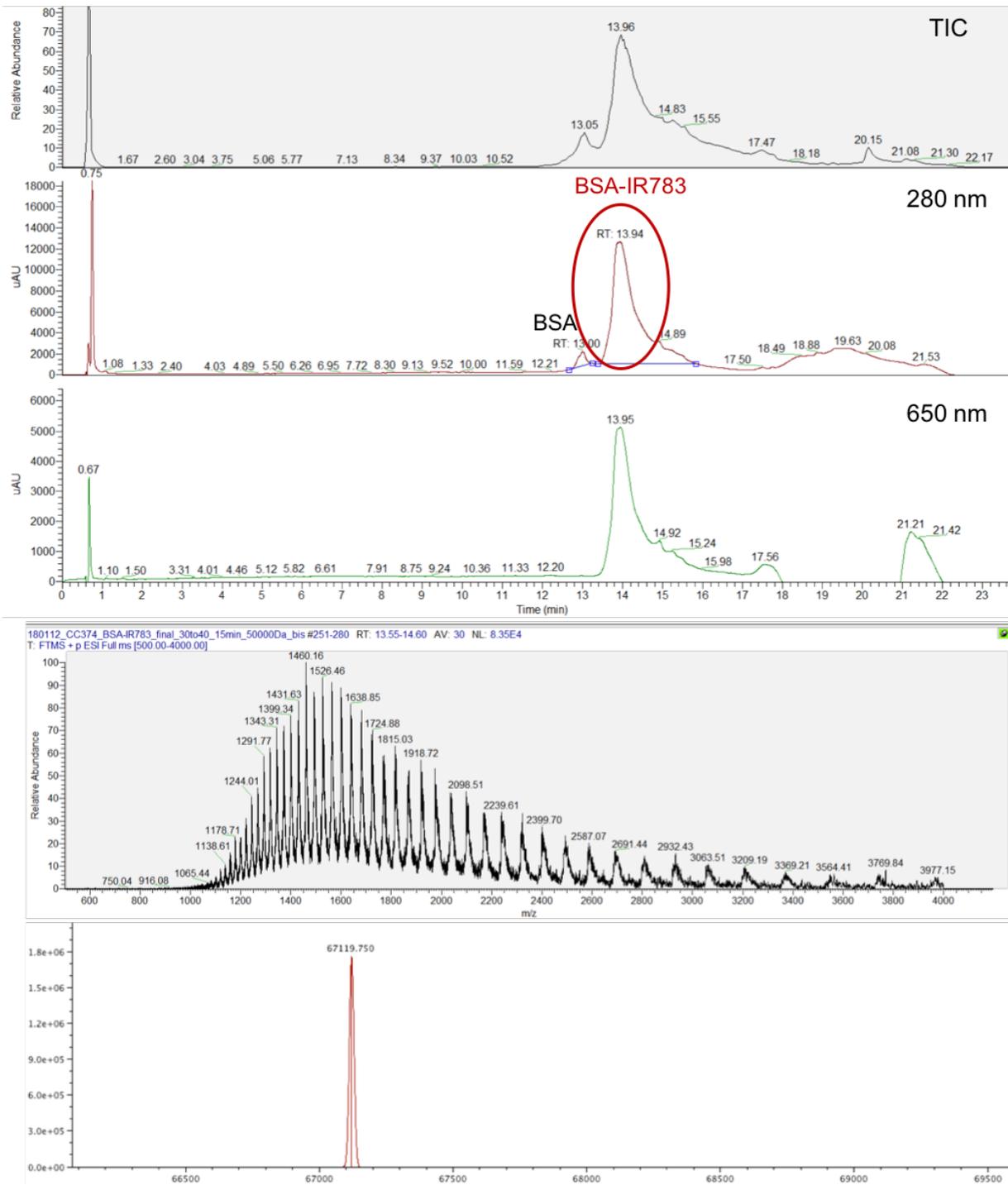
Preparation of the conjugate **39**



30.1 μL of a 5 mM stock solution of IR783 in DMF (150 nmol, 10.0 eq) was added to a 2 mg/mL solution of BSA (1 mg, 15 nmol) in PB (20 mM, pH 7.3). The solution was stirred in a thermomixer (800 rpm, 25 °C). The reaction was monitored by RP-HPLC-HRMS (Orbitrap). After ca. 5 h, the product was purified by FPLC (Äkta Pure 25 M chromatography system, GE Healthcare Life Sciences) on a Hitrap desalting column (Sephadex G-25 Superfine resin, cross-linked dextran, bead size 15-70 μm , 16 \times 25 mm, 5 mL) with PB (20 mM, pH 7.3) as eluent, at 2.5 mL/min, and then by size-exclusion separation on a SuperdexTM 75 10/300 GL column (cross-linked agarose and dextran, 13 μm , 10 \times 300-310 mm, 24 mL), at 0.8 mL/min, with PB (20 mM, pH 7.3) as eluent. The pure fluorescently labeled BSA **39** was obtained as a 4.54 mg/mL* solution in PBS (protein recovery = 39%, HPLC purity at 280 nm > 90%).

**note*: the concentration of the BSA in mg/mL was calculated by UV spectrophotometry using the extinction coefficient of the BSA at 280 nm ($0.65 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, value from ExPASy). A correction factor (0.04) was used for taking account for the contribution of the IR783 absorbance at 280 nm.

RP-HPLC elution profiles (TIC and dual UV-Vis detection at 280 nm and 650 nm), total and deconvoluted mass spectrum of the fluorescent BSA conjugate **39**:



Characterization of the bioconjugate 39

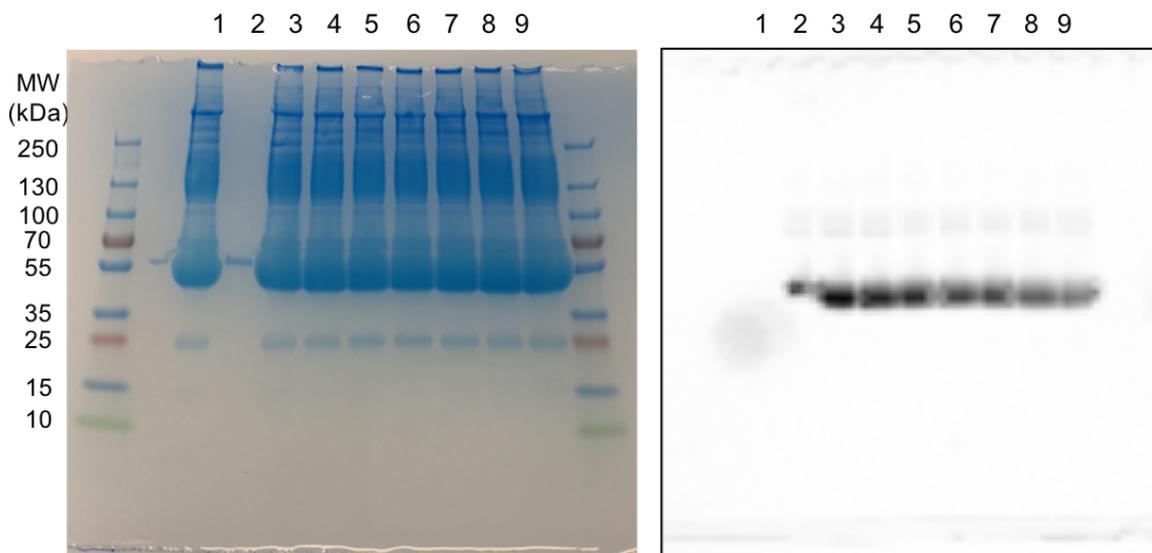
UV-Vis absorption spectrum of the bioconjugate 39

UV-Vis absorption spectrum of the fluorescent BSA conjugate **39** was recorded on a CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH) in PBS pH 7.4 at 25 °C by using an Lvis plate (BMG LVis MicroDrop, wavelength step width: 1.0 nm, with a concentration in the micromolar range). The measured $\lambda_{Abs, max}$ was 795 nm.

In vitro stability of the bioconjugate 39 in human plasma

9.7 μ L of a stock solution of the conjugate **39** at 2.06 mg/mL in PBS pH 7.4 (20 μ g) was stirred in a thermomixer (800 rpm, 37 °C, dark) with 20 μ L of human plasma and 10.3 μ L of PBS pH 7.4. The final concentration in **39** was 0.5 mg/mL. After 1, 2, 4, 8, 24 or 48 h 5 μ L of the mixture were sampled and frozen. Then, each sample was analysed by SDS-PAGE (Mini-PROTEAN® TGX™ 4 to 20% Precast gel, Biorad), in non-reductive conditions. The samples were not denatured at 90 °C prior to the electrophoresis to avoid unsuitable degradation.

SDS-PAGE analysis of human plasma (line 1), conjugate **39** without incubation in human plasma (line 2), conjugate **39** after incubation in human plasma during respectively 0, 1, 2, 4, 8, 24 and 48 h (lines 3 to 9) after Coomassie blue staining (left panel) and by fluorescence analysis, pair filter mode (740/845 nm) (right panel):



***In vivo* evaluation of the fluorescent BSA conjugate 39**

Mouse model

Note: the preparation of the animal model and the experiments on animals were performed by Dr. Pierre-Simon Bellaye at Georges-Francois LECLERC Cancer Center - UNICANCER (Dijon, France).

A syngeneic mouse model of colorectal cancer was used. BALB/c mice (8 weeks old, n = 9) were randomized into 2 groups with 1/ mice xenografted with CT26 murine tumor cells (ATCC, CRL-2639, n = 5) and 2/ non-injected mice (healthy mice (n = 4)). Briefly, 1×10^6 CT26 cells were resuspended in non-supplemented RPMI culture medium and injected subcutaneously (100 μ l, 27G needle) on the right flank of the mice. Tumor volume was monitored daily from D8 post-injection. Imaging was performed at D14 with tumor volume ranging from 600 to 1400 mm³.

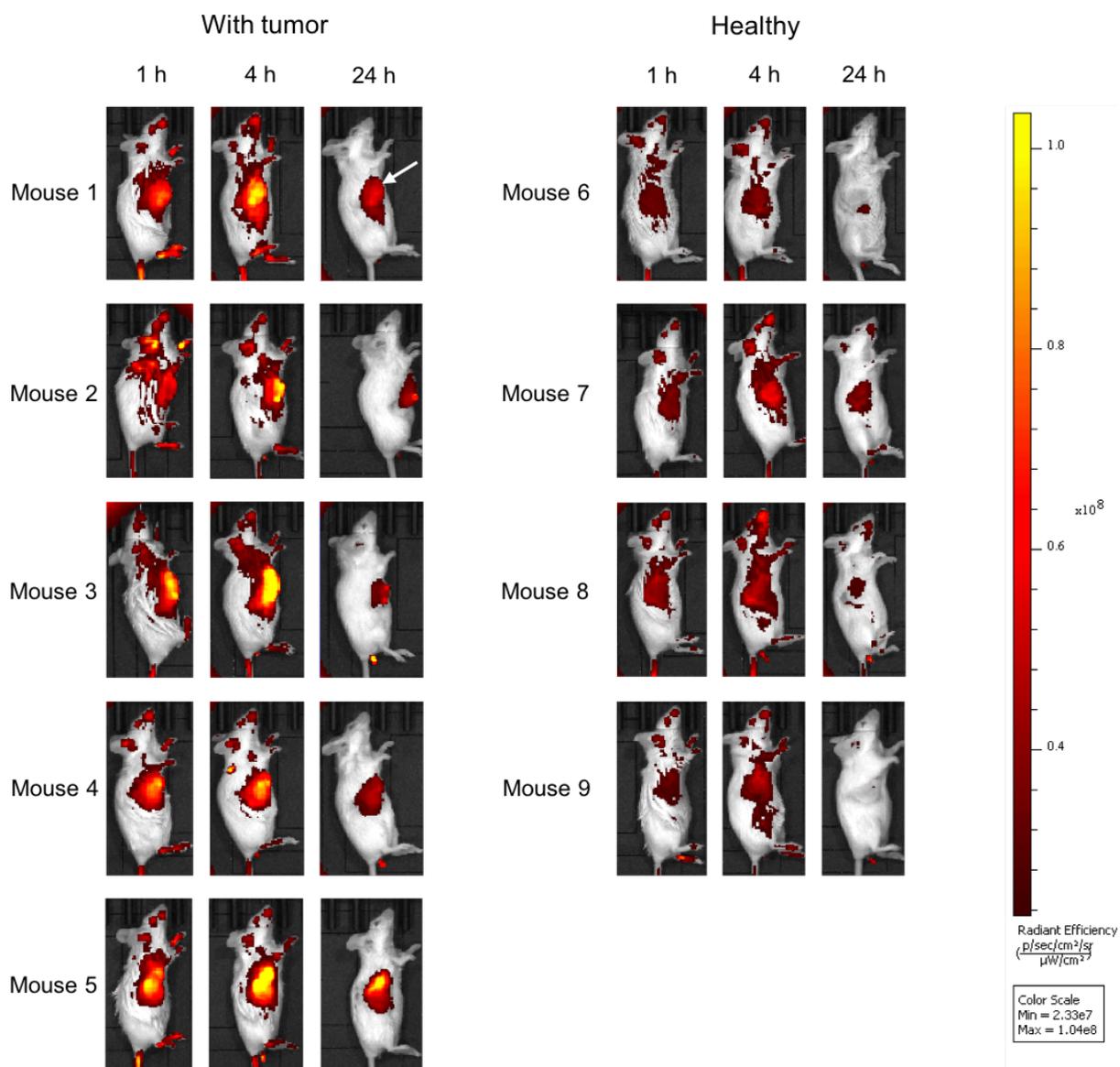
Table of the tumor volume evolution in mm³; tumor implantation at D0:

Mice	Tumor volume (mm ³)						
	D4	D6	D8	D11	D12	D13	D14
1	0	69.1	127.0	292.9	701.8	796.0	869.8
2	0	95.5	119.6	293.2	481.8	580.6	613.2
3	0	75.5	111.6	264.5	722.3	835.4	931.4
4	0	0.0	163.6	426.4	884.4	1351.8	1428.6
5	0	0.0	159.5	345.6	466.6	680.8	1218.2

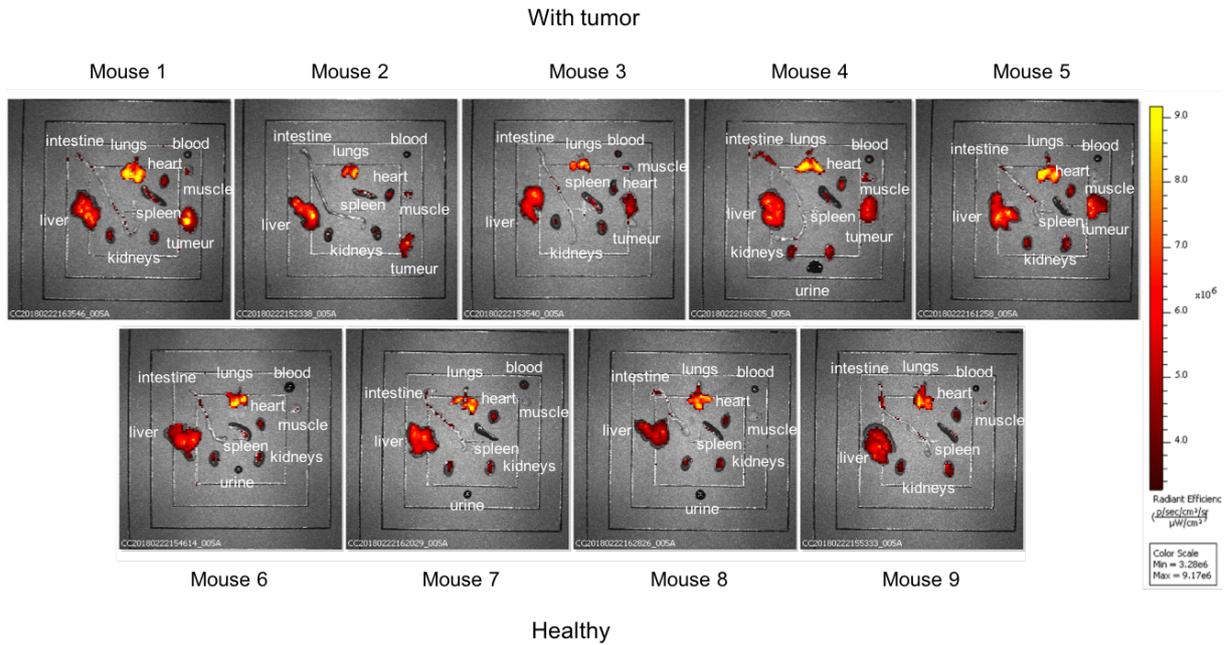
Biodistribution study by NIR fluorescence imaging

Compound **39** (30 μ g, 100 μ l in PBS) was administered by intravenous injection in the mouse tail vein under anesthesia (isofluorane 2%). Whole animal imaging was performed at 1 h, 4 h and 24 h post-injection by acquisition of the fluorescence on an IVIS Lumina III In Vivo Imaging System (PerkinElmer), in pair filter mode (760/845 nm). All imaging data were analyzed with the Living Image[®] software. Values are reported as radiant efficiency, allowing direct comparison of images from each experiment. After the last imaging (24 h post-injection) mice were euthanized and organs (tumor, liver, kidneys, lungs, blood, muscle, urine, spleen, heart, intestine) were collected for *ex vivo* fluorescence imaging. Fluorescence intensities were measured and normalized to photon per second per cm² using the region of interest (ROI) function of the Living Image[®] software. The ROI covers the entire tissue.

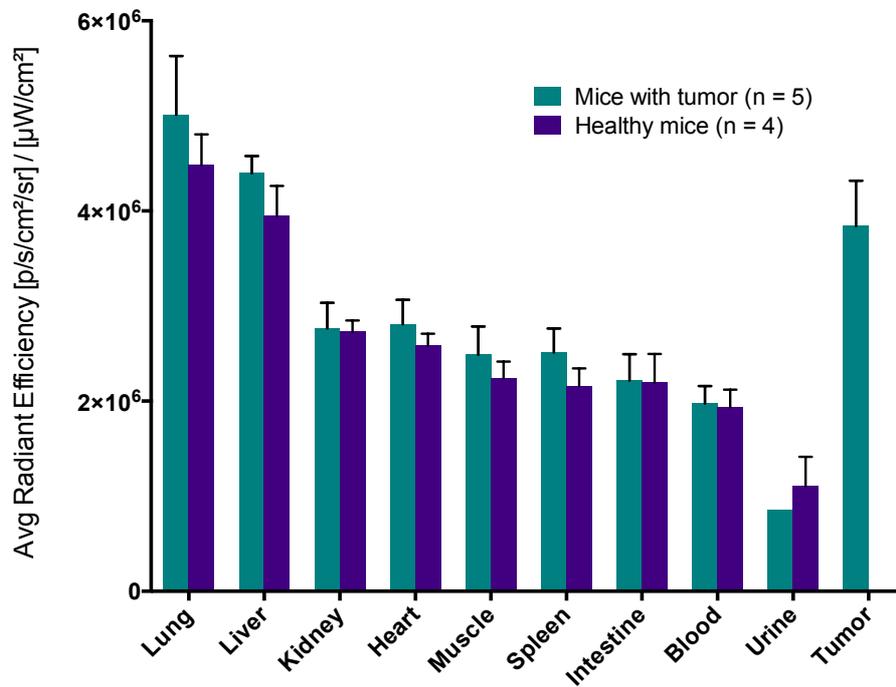
Images of the biodistribution of the fluorescent BSA conjugate **39** by the measurement of fluorescence (filter mode Ex./Em. 760/845 nm) in living mice at 1 h, 4 h and 24 h p.i. Fluorescence signal, displayed as radiant efficiency, is superimposed to white light images. Tumor position is shown by a white arrow:



Fluorescence imaging of organs (tumor, liver, kidneys, lungs, blood, muscle, urine, spleen, heart, intestine) after euthanasia of the mice at 24 h p.i. (filter pair mode Ex./Em. 760/845 nm):



Biodistribution values expressed as average radiant efficiency ($[p/s/cm^2/sr] / [\mu W/cm^2]$) for each collected organ (Prism 6 software - GraphPad):

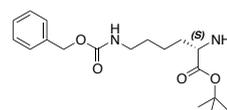


CHAPTER IV – EXPERIMENTAL PART

Synthesis of the precursors **40** to **44** and of the final compound **CC34**

H-Lys(Cbz)-OtBu, **40**:

A solution of perchloric acid in water (60%, v/v) (2.3 mL, 38.1 mmol, 2.1 eq) was added to a suspension of H-Lys(Cbz)-OH (5.0 g, 17.8 mmol) in *tert*-butyl acetate (60 mL, 447.0 mmol, 25 eq). The mixture was stirred at room temperature during 20 h and the achievement of the reaction was confirmed by RP-HPLC-LRMS analysis. The product was extracted from organic phase with 4 × 30 mL of water and 4 × 25 mL of a 0.5 M HCl solution. Then, 150 mL of a K₂CO₃ solution at 10% (m/v) were added to the aqueous phase and extraction of the product was performed by addition of 4 × 250 mL of DCM. The organic phase was dried with MgSO₄ and DCM was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on a silica column (80 g, eluent A: DCM, B: MeOH in DCM (10% v/v), gradient: 0 to 10% B in 16 column volumes). After evaporation of the solvents, the product H-Lys(Cbz)-OtBu **40** was obtained as a colorless oil (3.99 g, 50%, purity: 88%).

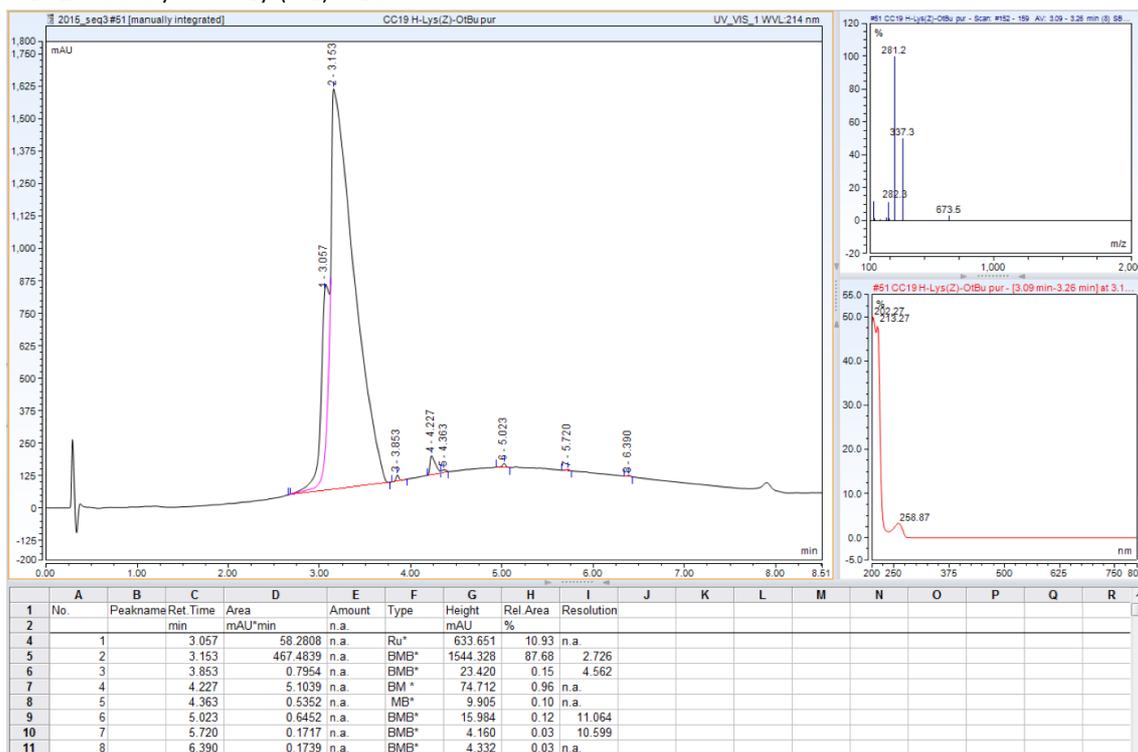


¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.42 to 1.32 (m, 2H; CH₂), 1.44 (s, 9H; CH₃), 1.56 to 1.48 (m, 3H; CH₂ + CH(CH₂ diast.)), 1.66 (m, 1H; CH(CH₂ diast.)), 3.18 (td, ³J = 6.2, 6.2 Hz, 2H; CH₂), 3.27 (dd, ³J = 5.5, 7.2 Hz, 1H; CH), 4.89 (bs, 1H; NH), 5.01 (s, 2H; CH₂), 7.28 to 7.24 (m, 5H; CH);

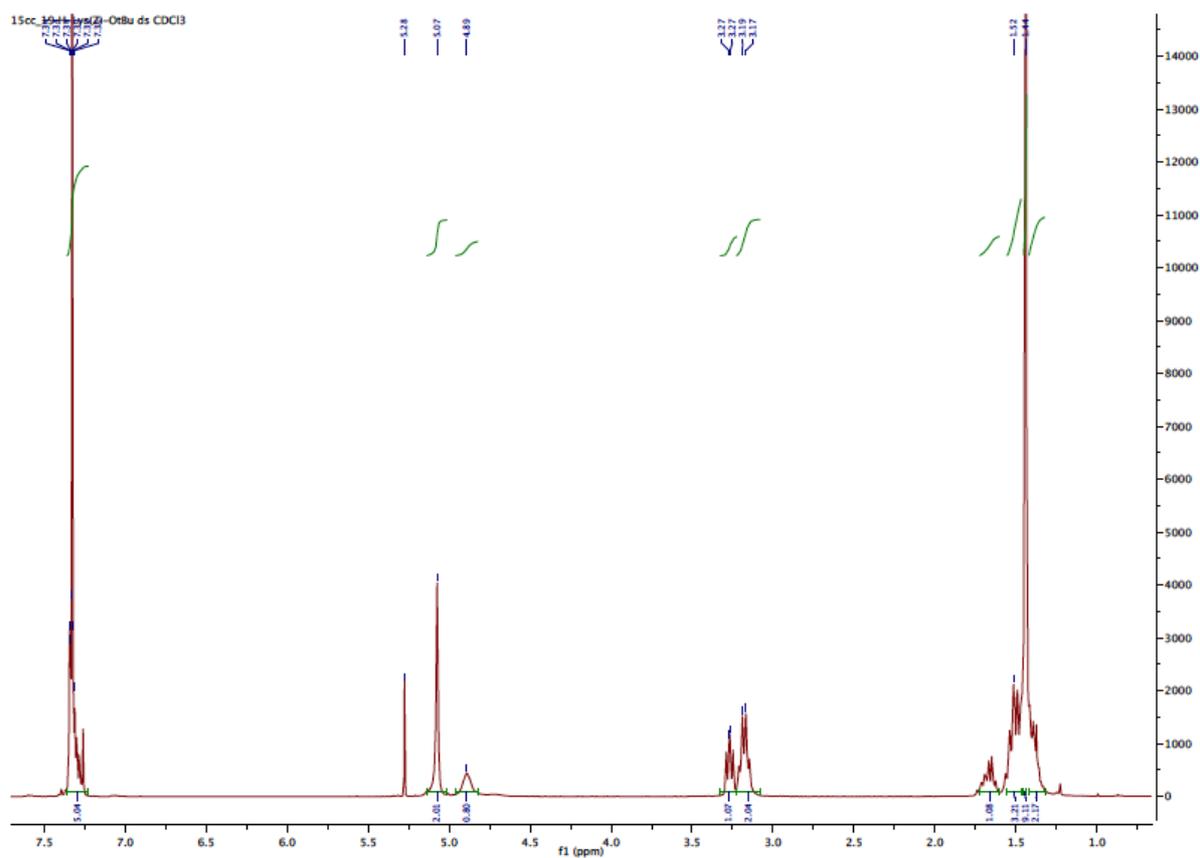
¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 23.0, 28.2 (2C), 29.9, 34.7, 41.0, 55.0, 66.7, 81.1, 128.2, 128.6, 136.8, 156.6, 175.5;

LRMS: C₁₈H₂₉N₂O₄⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 337.2, found: 337.3.

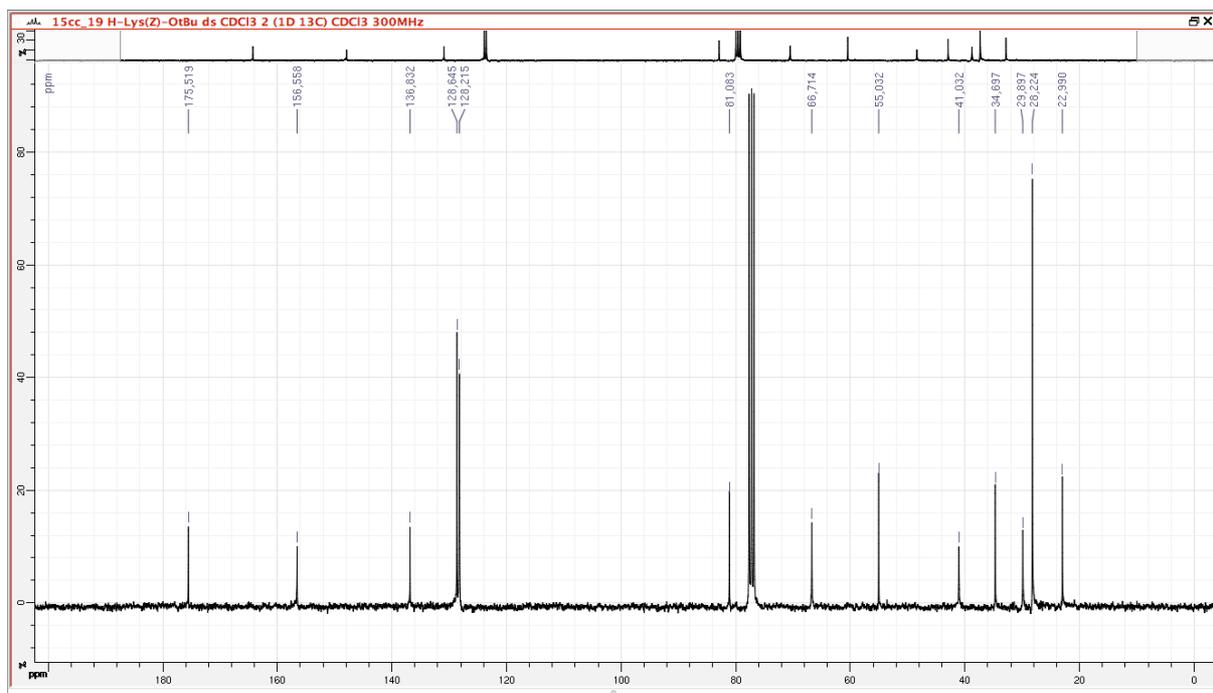
RP-HPLC-LRMS analysis of H-Lys(Cbz)-OtBu **40**:



^1H NMR spectrum of H-Lys(Cbz)-OtBu **40**:

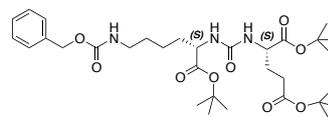


^{13}C NMR spectrum of H-Lys(Cbz)-OtBu **40**:



tBuO-(Cbz)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu, 41:

Triphosgene (0.29 g, 1.0 mmol, 0.37 eq) was dissolved in 5 mL of DCM and the reaction mixture was cooled to 0°C. The compound **40** (0.91 g, 2.7 mmol, 1 eq) and DIPEA (1.04 mL, 6.0 mmol, 2.22 eq) in solution in 5 mL of DCM were then added dropwise over 1h40. H-Glu(OtBu)-OtBu, HCl (0.8 g, 2.7 mmol, 1 eq) and DIPEA (1.04 mL, 6.0 mmol, 2.22 eq) dissolved in 5 mL of DCM were finally added. The temperature of the reaction was maintained at 0 °C for 20 min. After 1 h at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting solid was dissolved in EtOAc and the organic phase was washed with a 10% citric acid solution (v/v) and then with brine. The organic phase was dried over MgSO₄ and EtOAc was then evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on a silica column (24 g, eluent A: heptane, B: EtOAc, gradient: 0% to 50% B in 20 column volumes). Finally, evaporation of the solvents under reduced pressure afforded the product tBuO-(Cbz)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **41** as a pale-yellow oil (1.15 g, 65%, purity: 95%).



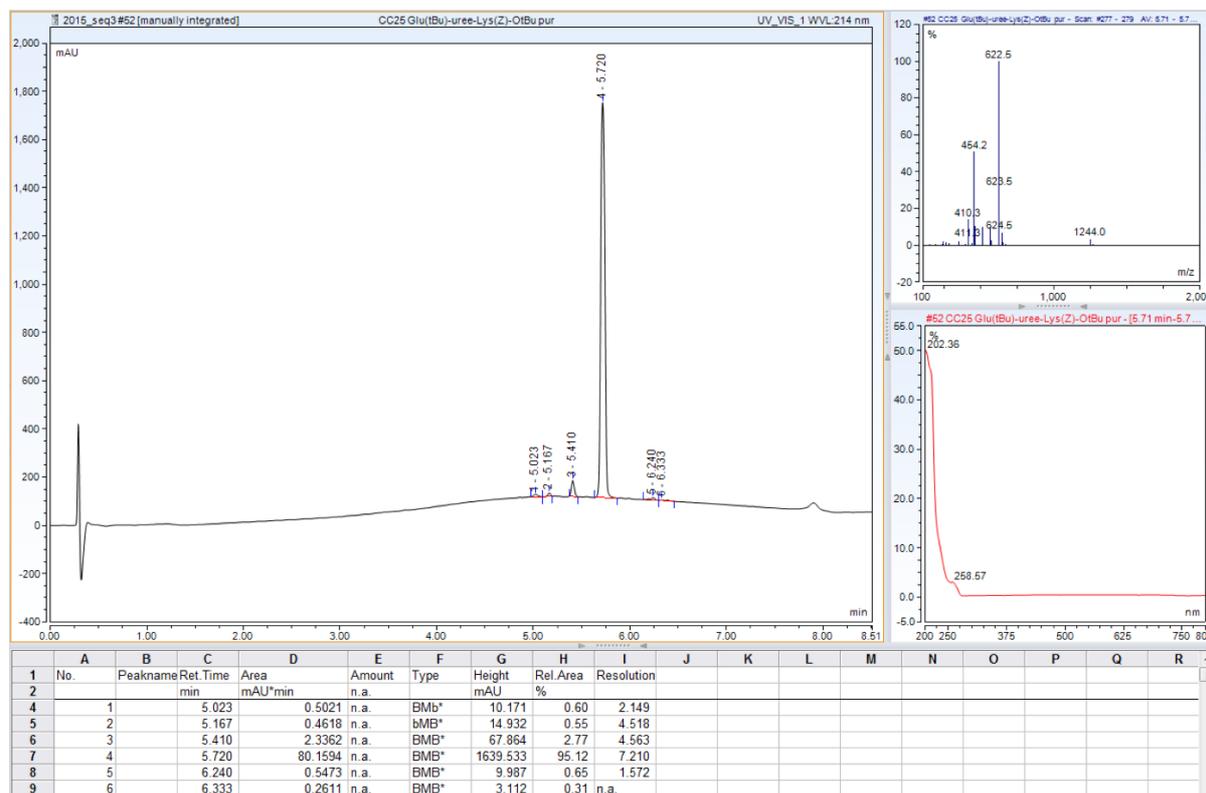
Rf = 0.5 (EtOAc/heptane 50 : 50, v/v);

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.25 to 1.37 (m, 2H; CH₂), 1.40 to 1.46 (s, 27H; CH₃), 1.47 to 1.65 (m, 3H; CH₂ + CH(CH₂ diast.)), 1.70 to 1.90 (m, 2H; CH(CH₂ diast.)), 1.95 to 2.12 (m, 1H; CH(CH₂ diast.)), 2.20 to 2.40 (m, 2H; CH₂), 3.16 (m, 2H; CH₂), 4.34 (m, 2H; CH), 5.09 (s, 2H; CH₂), 5.20 to 5.38 (m, 3H; NH), 7.28 to 7.40 (m, 5H; CH);

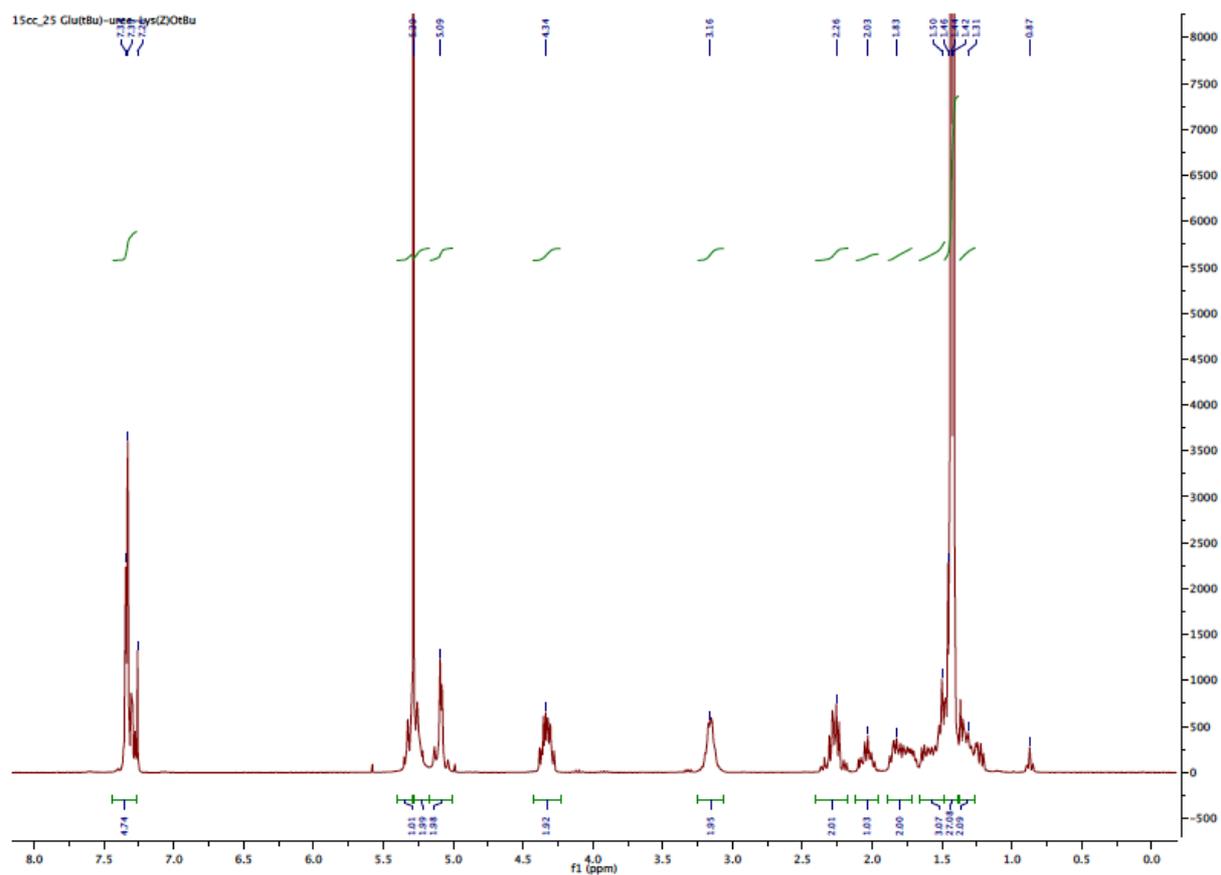
¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 22.5, 28.2 (2C), 28.3, 28.6, 29.6, 31.8, 32.9, 40.9, 53.2, 53.5, 66.7, 80.7, 81.9, 82.3, 128.2 (2C), 128.7, 136.9, 148.1, 156.8 (2C), 157.1, 172.6;

LRMS: C₃₂H₅₂N₃O₉⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 622.4, found: 622.5.

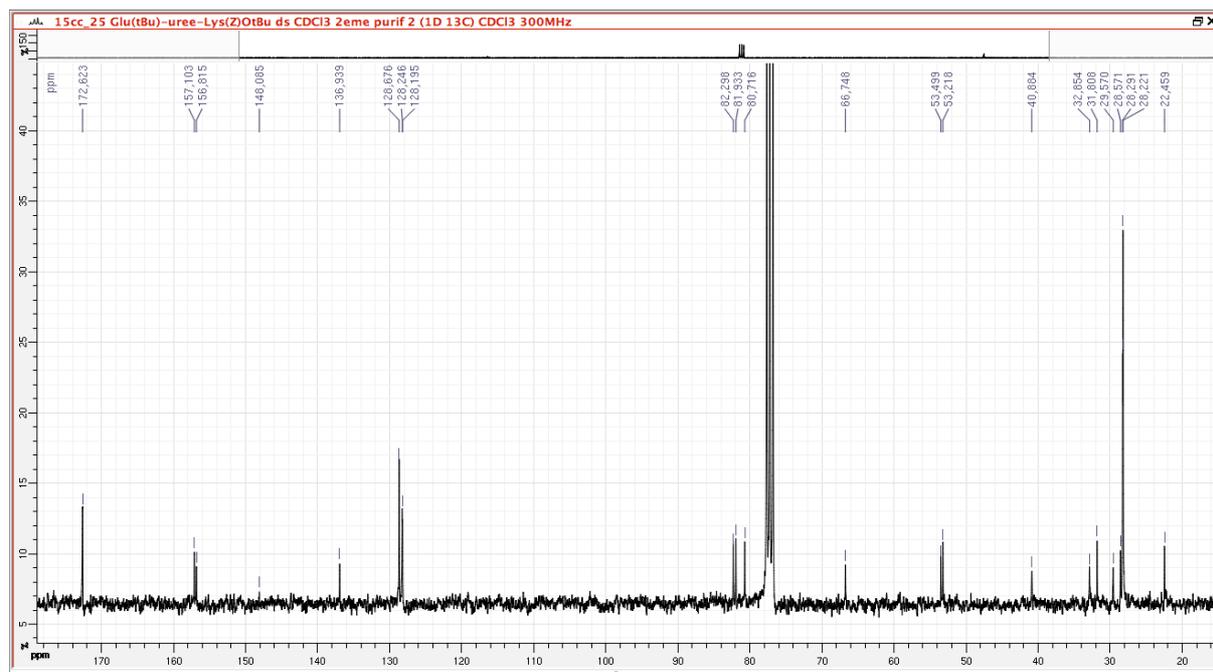
RP-HPLC-LRMS analysis of tBuO-(Cbz)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **41**:



¹H NMR spectrum of *t*BuO-(Cbz)Lys-urea-Glu(*Ot*Bu)-*Ot*Bu **41**:

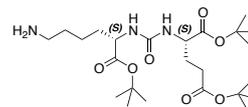


¹³C NMR spectrum of *t*BuO-(Cbz)Lys-urea-Glu(*Ot*Bu)-*Ot*Bu **41**:



tBuO-Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu, 42:

The compound **41** (1.05 g, 1.67 mmol) was dissolved in 40 mL of absolute EtOH and palladium on charcoal (Pd/C) catalyst (0.126 g – 12 % by mass) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature under hydrogen atmosphere (1 atm) overnight. The progress of the reaction was monitored by TLC (EtOAc/heptane (50 : 50, v/v), by using ninhydrine to detect the presence of the amine group (Rf = 0). Once the starting compound was totally consumed, Pd/C was removed by filtration on dicalite and EtOH was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on a silica column (12 g, eluent A: DCM, B: MeOH, gradient: 5 to 50% B in 40 column volumes). The evaporation of the solvents under reduced pressure gave the compound tBuO-Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **42** as a yellow oil (383 mg, 40%, purity: 84%).

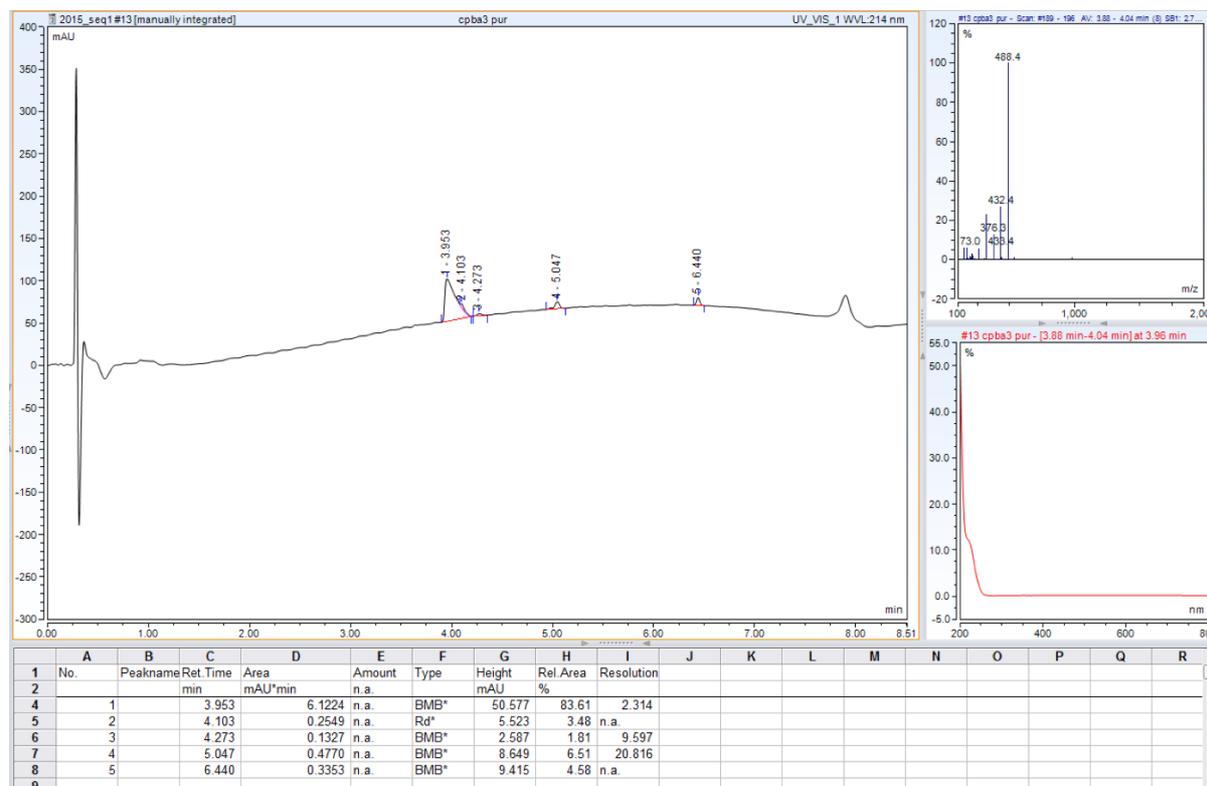


¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.30 to 1.40 (m, 2H; CH₂), 1.42 to 1.47 (s, 27H; CH₃), 1.51 to 1.70 (m, 3H; CH₂ + CH(CH₂ diast.)), 1.70 to 1.95 (m, 2H; CH(CH₂ diast.)), 2.00 to 2.15 (m, 1H; CH(CH₂ diast.)), 2.20 to 2.40 (m, 2H; CH₂), 2.67 (m, 2H; CH₂), 4.32 (m, 2H, CH), 5.06 (m, 1H; NH), 5.08 (m, 1H, NH);

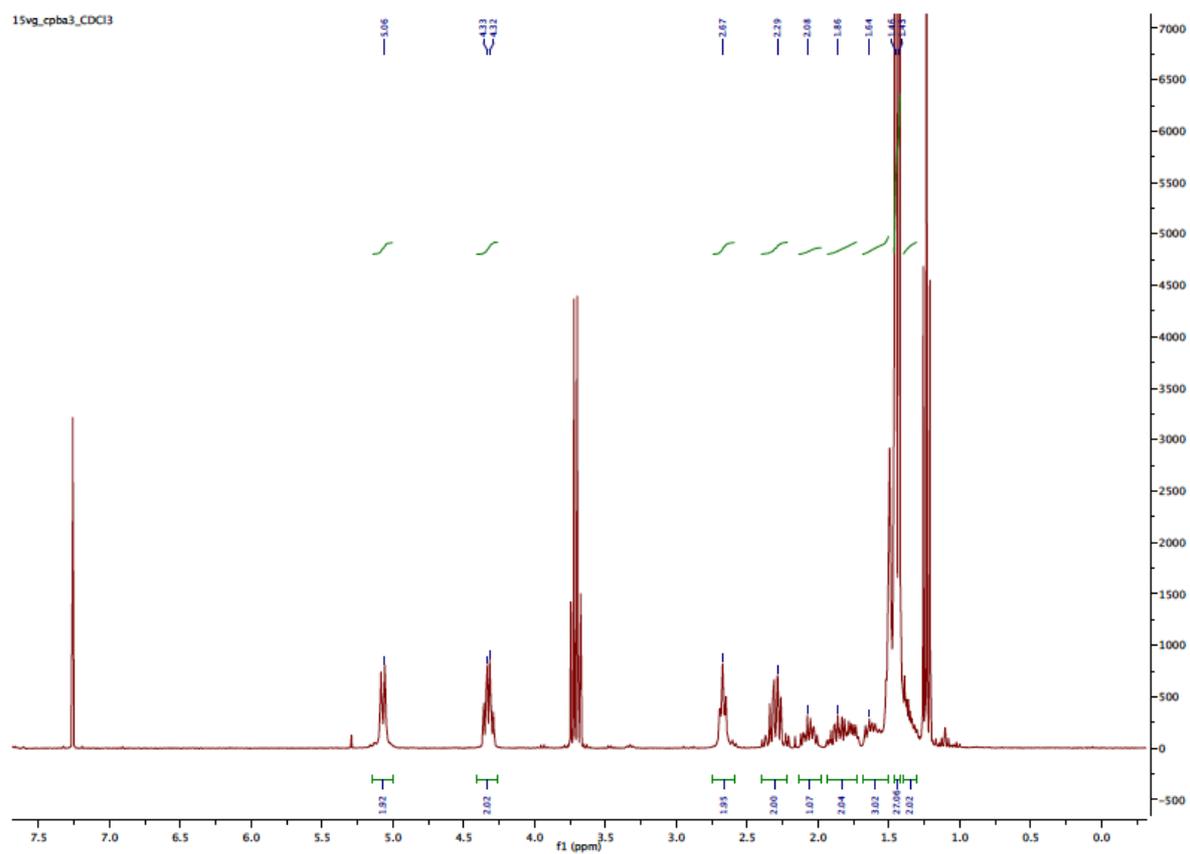
¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 22.5, 28.2 (2C), 28.3, 28.6, 31.8, 33.1 (2C), 41.9, 53.2, 53.7, 80.7, 81.9, 82.2, 157.1, 172.5, 172.6, 172.8;

LRMS: C₂₄H₄₆N₃O₇⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 488.3, found 488.4.

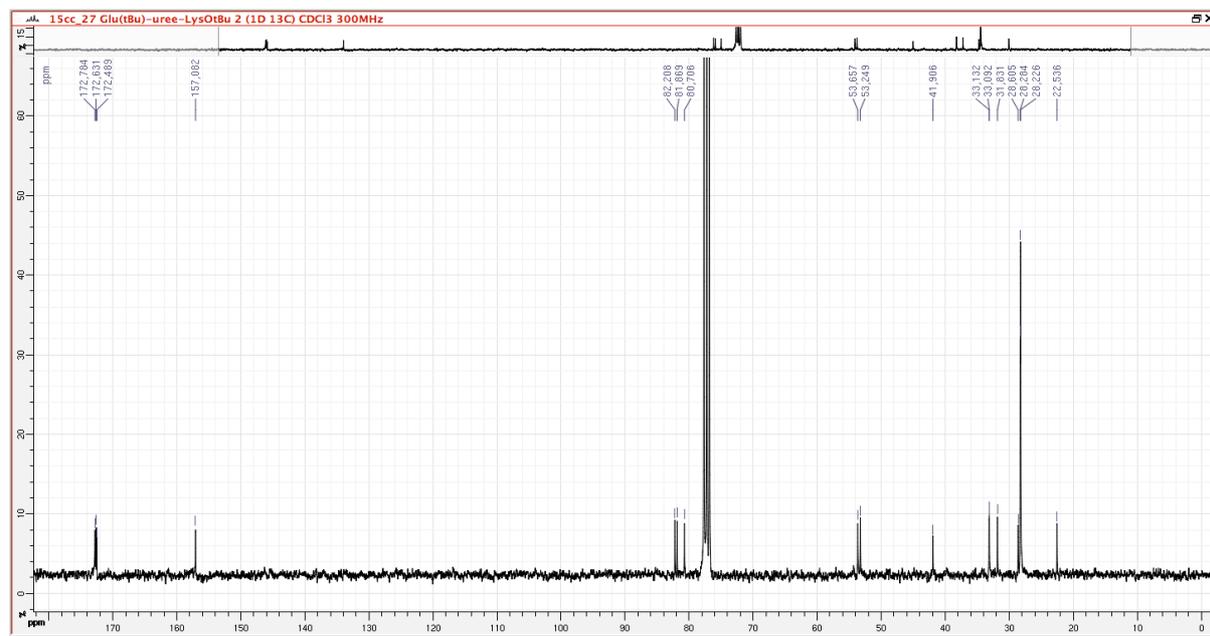
RP-HPLC-LRMS analysis of tBuO-Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **42**:



^1H NMR spectrum of *t*BuO-Lys-urea-Glu(O*t*Bu)-O*t*Bu **42**:

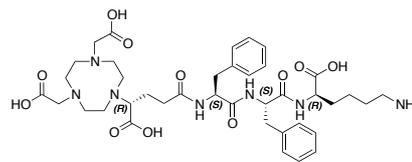


^{13}C NMR spectrum of *t*BuO-Lys-urea-Glu(O*t*Bu)-O*t*Bu **42**:



(R)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-OH, 43:

The tripeptide H-Phe-Phe-D-Lys(Boc)-resin was synthesized via solid phase peptide synthesis on a Liberty Blue™ Automated Microwave Peptide Synthesizer (CEM, USA). Peptide couplings were performed by using predefined Fmoc chemistry protocols, on 417 mg (0.25 mmol) of preloaded Wang resin with Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (loading 0.6 mmol/g, 100-200 Mesh, Iris Biotech). DIC/OxymaPure in DMF were used as the activating reagents and a solution of piperidine (20% in DMF) was used for Fmoc groups deprotection. Then (R)-NODAGA(*t*Bu)₃ (317.0 mg, 0.583 mmol, 2.3 eq) was manually coupled to the peptidyl-resin in the presence of HATU (74.8 mg, 0.583 mmol, 2.3 eq) and DIPEA (101 μL, 0.583 mmol, 2.3 eq) in DMF (5 mL) over 15 h at room temperature. After the coupling reaction, the resin was extensively washed with DMF, DCM and diethyl ether and dried under vacuum. Cleavage and deprotection of the peptide were performed by treating the resin with 7 mL of a solution of TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v) at room temperature. A prolonged reaction time (6 h) was required to obtain the complete hydrolysis of the *t*Bu ester groups of the macrocycle. The filtrate from the cleavage mixture was concentrated by bubbling nitrogen gas, precipitated in cold Et₂O and collected by centrifugation (twice). The traces of solvents were removed by desiccation overnight. The crude peptide was purified by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) to afford pure (R)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-OH·4TFA **43** as a white powder (155 mg, 44%, purity: 90%).



LRMS: C₃₉H₅₆N₇O₁₁⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 798.4, found 798.5.

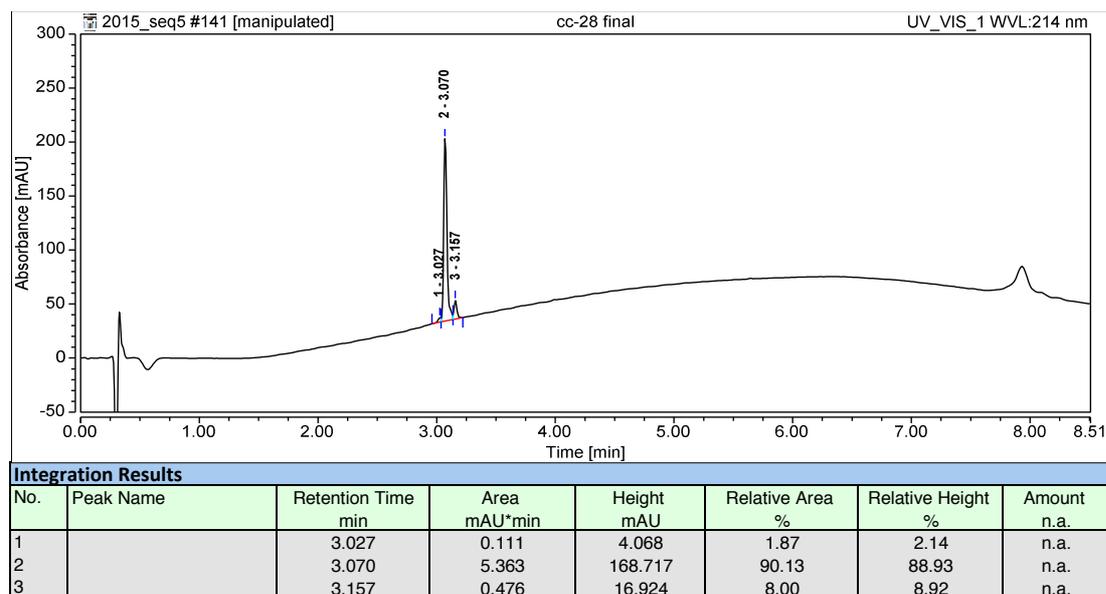
Standard protocol used for Fmoc groups deprotection:

Stage	Temp (°C)	Power (W)	Time (sec)	Delta T
1	75	180	15	2
2	90	30	50	1

Standard protocol used for coupling reactions:

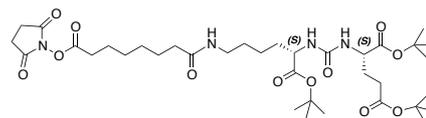
Stage	Temp (°C)	Power (W)	Time (sec)	Delta T
1	75	175	15	2
2	90	30	110	1

RP-HPLC analysis of (R)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-OH **43**:



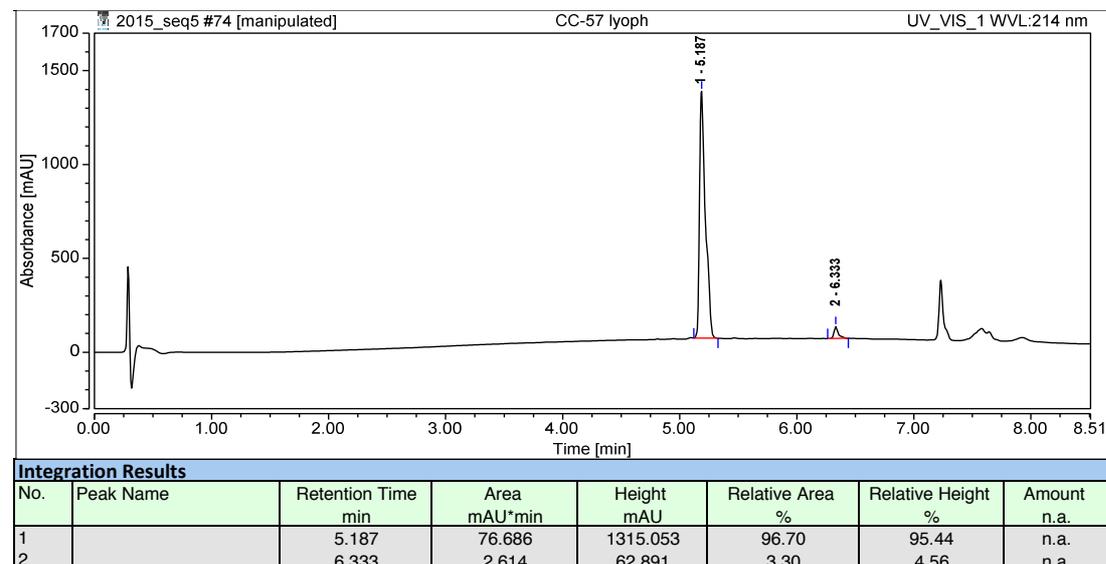
tBuO-(NHS-suberoyl)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu, 44:

The disuccinimidyl suberate (90.2 mg, 245.0 μmol , 3 eq) was introduced in an oven-dried round bottom flask and anhydrous DMF (1.5 mL) was added. A solution of compound **42** (39.7 mg, 81.0 μmol) dissolved in anhydrous DMF (3 mL) was added dropwise over 30 min. After stirring during 2 h at room temperature, the DMF was evaporated under reduced pressure and the product was purified by semi-preparative RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA). The product **tBuO-(NHS-suberoyl)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu 44** was obtained as a colorless oil (21 mg, 34%, purity: 97%).



LRMS: C₃₆H₆₁N₄O₁₂⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 741.4, found 741.5.

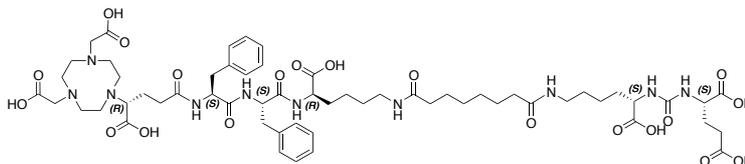
RP-HPLC analysis of **tBuO-(NHS-suberoyl)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu 44**:



(R)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-suberoyl-Lys-urea-Glu, CC34.

The compound *t*BuO-(NHS-suberoyl)Lys-urea-Glu(*Ot*Bu)-*Ot*Bu

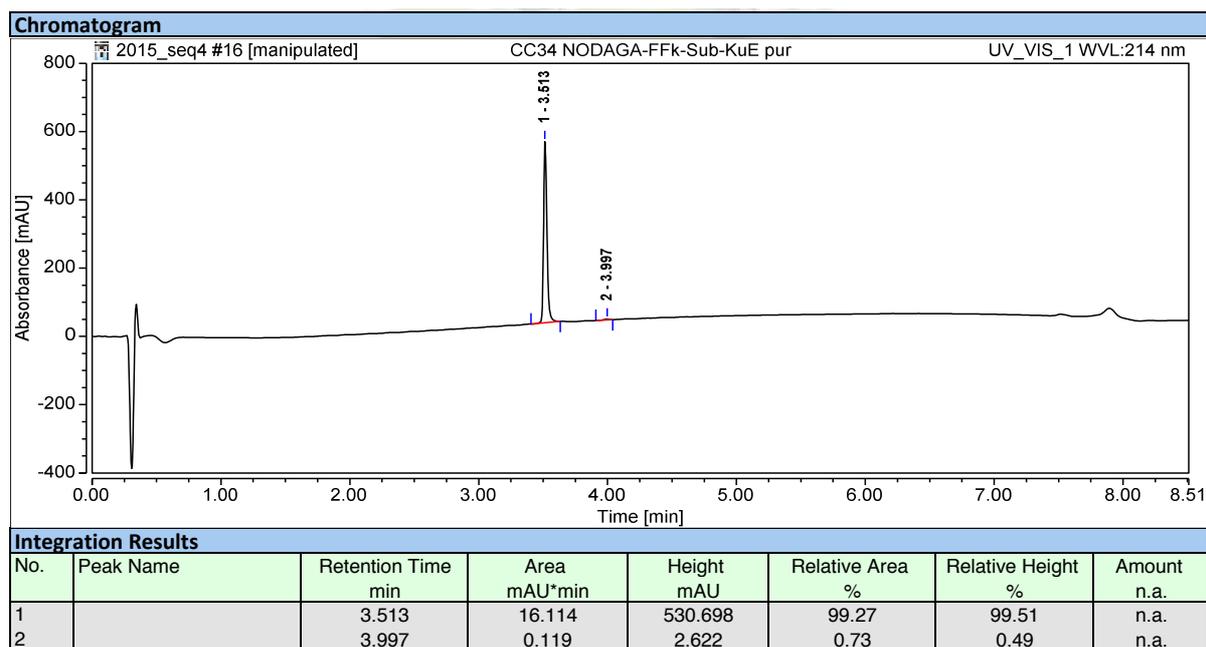
44 (26.9 mg, 21.5 μmol) was dissolved in DMF (2 mL) and (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-OH·4TFA **43**



(22.7 mg, 30.6 μmol, 1.4 eq) and triethylamine (23.5 μL, 168.3 μmol, 7.8 eq) were added. The solution was stirred during 4 h at room temperature and then evaporated to dryness under reduced pressure. The hydrolysis of the *t*Bu ester groups was performed in the presence of 2 mL of a solution of TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v) at room temperature. After 1 h, the product was concentrated by bubbling nitrogen gas, precipitated in cold Et₂O and collected by centrifugation (twice). The crude product was purified by RP-HPLC on a BetaBasic-18 column (eluents: H₂O 0.1% TFA, MeCN 0.1% TFA) to give (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-suberoyl-Lys-urea-Glu·3TFA **CC34** as a white powder (15.6 mg, 46%, purity >99%).

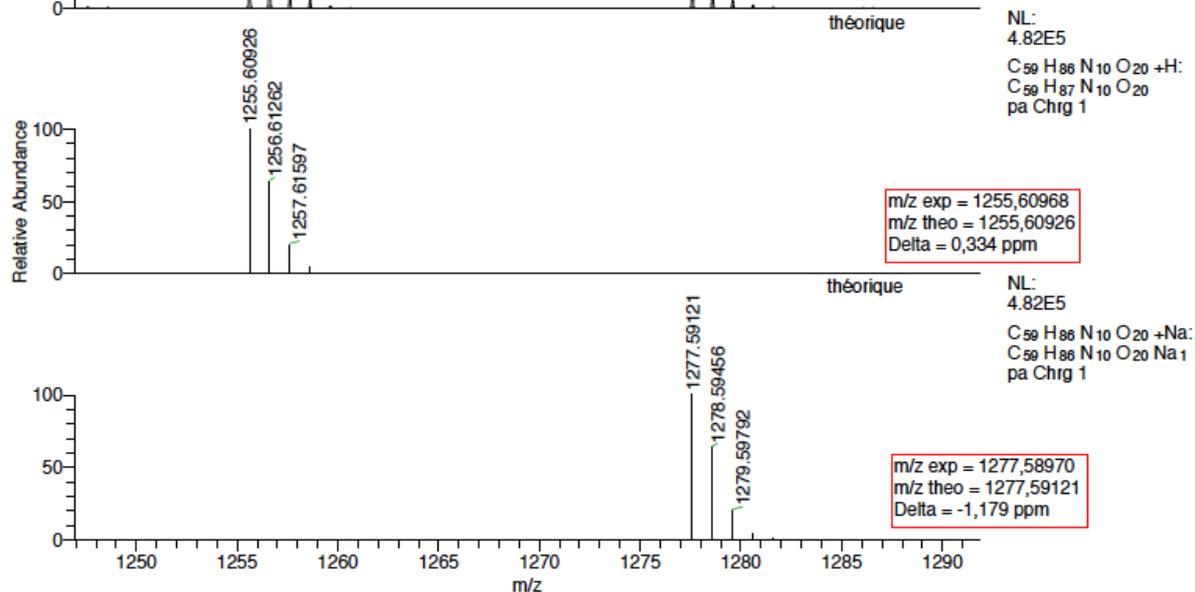
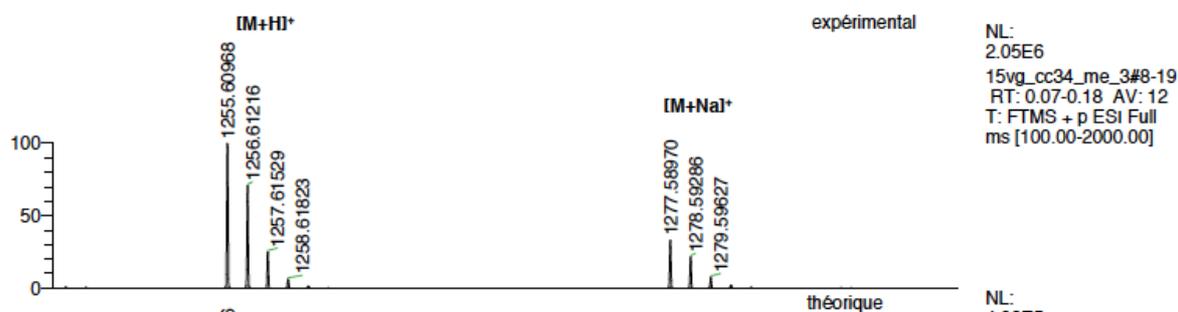
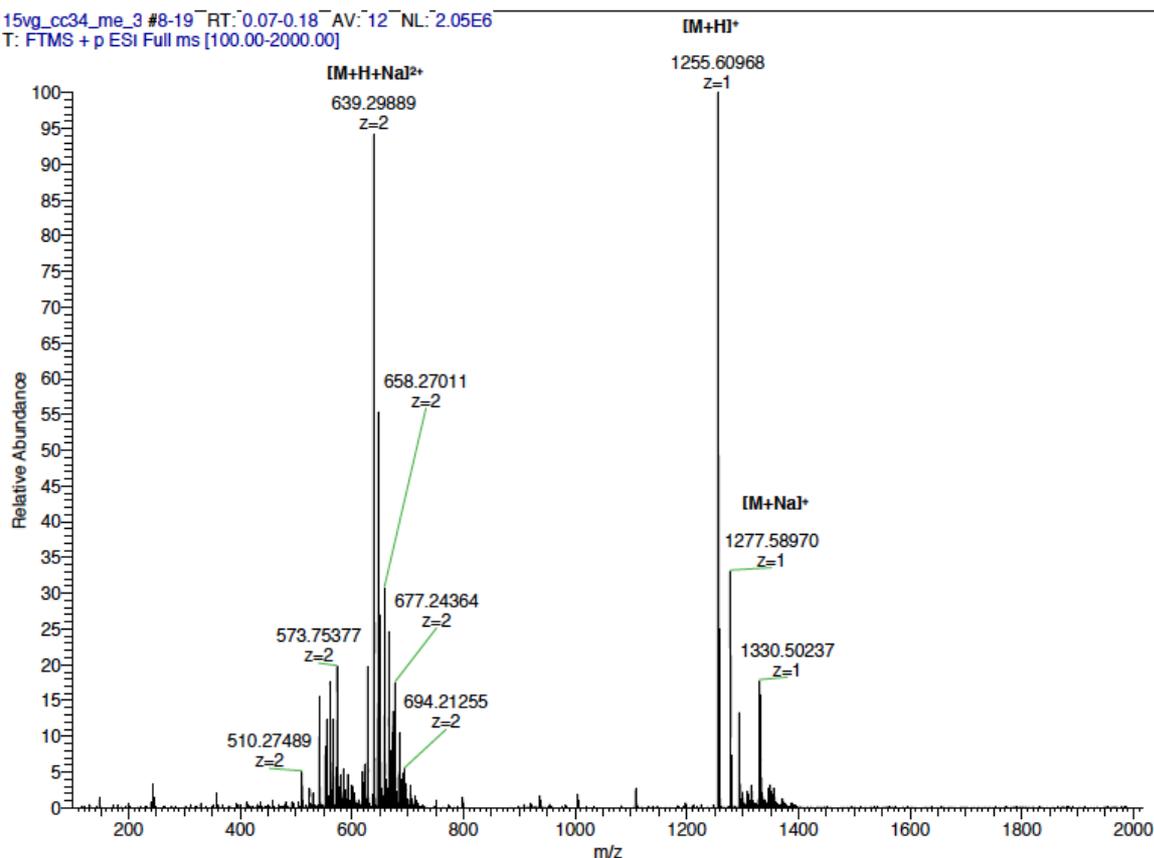
HRMS: C₅₉H₈₆N₁₀O₂₀⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 1255.60926, found 1255.60968; C₅₉H₈₅N₁₀O₂₀Na²⁺ ([M+Na]²⁺) m/z calculated: 1277.59121, found 1277.58970.

RP-HPLC analysis of (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-D-Lys-suberoyl-Lys-urea-Glu **CC34**:



HRMS spectrum of (*R*)-NODAGA-Phe-Phe-*D*-Lys-suberoyl-Lys-urea-Glu **CC34** and comparison with simulated spectrum:

15vg_cc34_me_3 #8-19 RT: 0.07-0.18 AV: 12 NL: 2.05E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

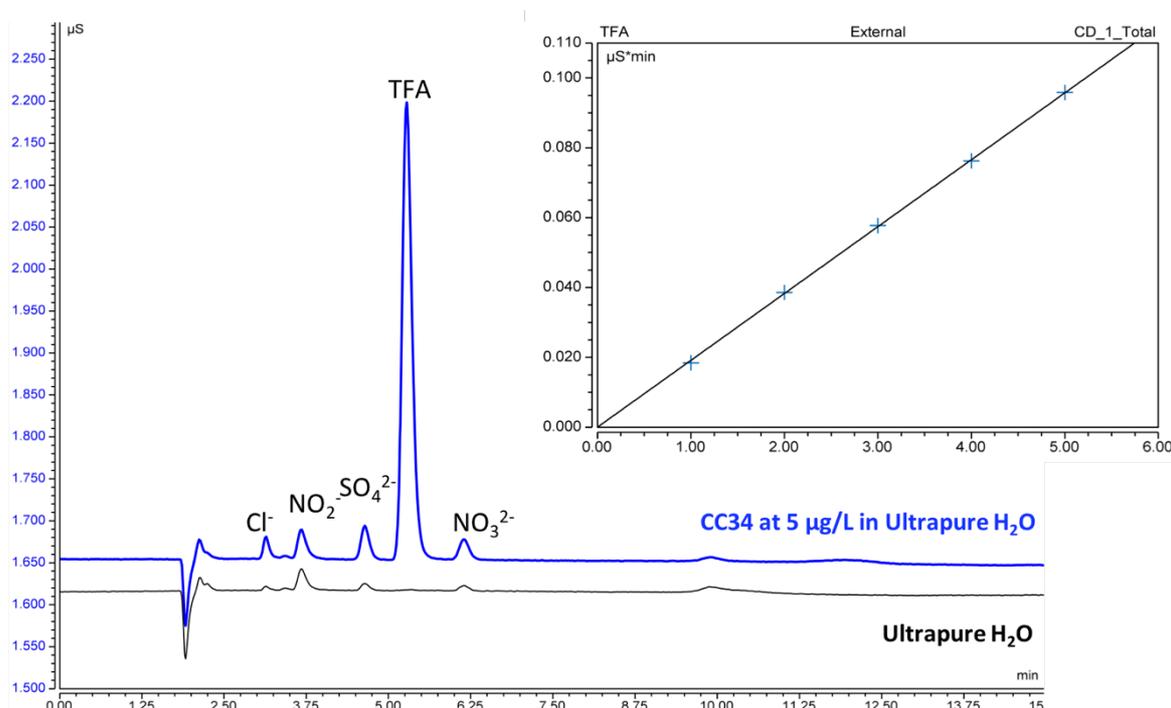


Further characterization of CC34

Quantification of the number of TFA counterions by ionic chromatography:

Ionic chromatography analyses were performed by Dr. Myriam Laly (PACSMUB, Dijon). Analysis were performed in duplicates. A TFA signal ($t_R = 5.28$ min) was detected in the ionic chromatography analysis of **CC34** solution in MeOH and the correlation with a calibration curve indicated an amount of 3 TFA per **CC34** molecule.

Chromatogram of **CC34** at 5 $\mu\text{g/L}$ in ultrapure water (top left); calibration curve (top right) traced from values resulting of ionic chromatography analyses of TFA solutions in ultrapure water at know concentrations (bottom):

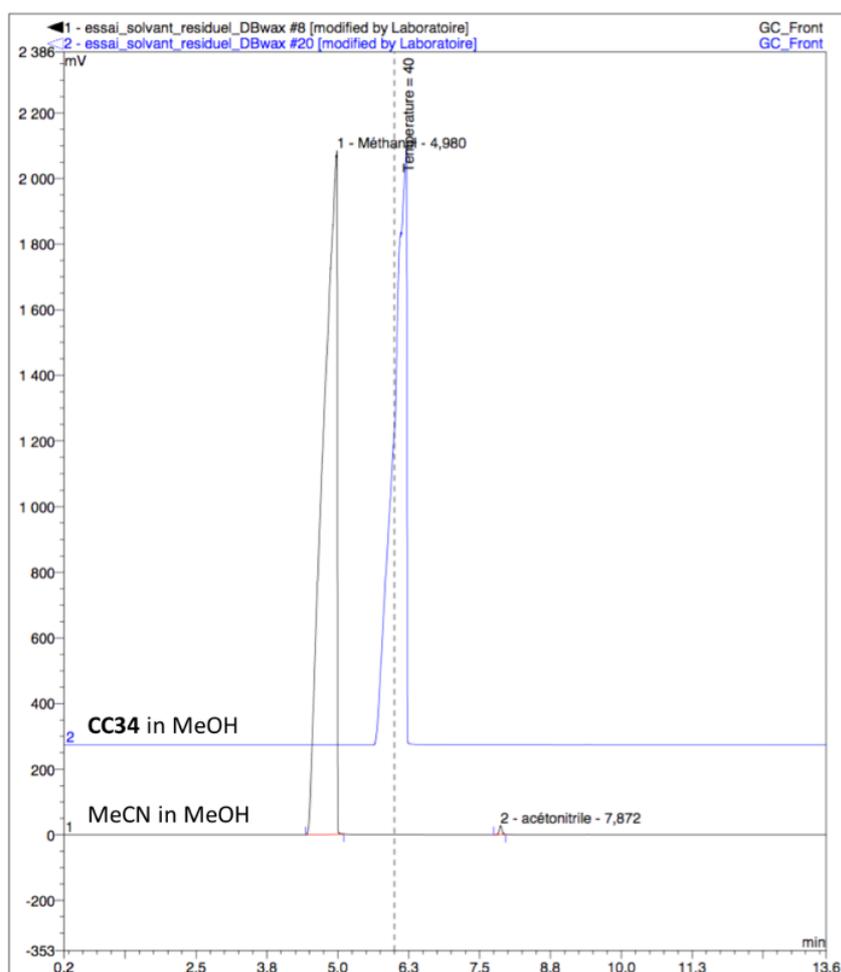


Inj. No.	Injection Name Selected Peak:	Type	Ret. Time	Amount	Rel. Area	Area	Height	Type	Width (50% Asym. Resol. Plates			
			min	CD_1_Total	%	$\mu\text{S}\cdot\text{min}$	μS		min	EP	EP	EP
			CD_1_Total	CD_1_Total	CD_1_Total	CD_1_Total	CD_1_Total	CD_1_Total	CD_1_Tot	CD_1_T	CD_1_TD	CD_1_TD_1_Total
			TFA	TFA	TFA	TFA	TFA	TFA	TFA	TFA	TFA	TFA
1	blanc	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	TFA_1mg/L	Calibration ξ	5.290	0.9624	100.00	0.0184	0.10	BMB*	0.162	1.22	n.a.	5873
3	TFA_2mg/L	Calibration ξ	5.290	2.0146	100.00	0.0386	0.22	BMB*	0.162	1.21	n.a.	5917
4	TFA_3mg/L	Calibration ξ	5.280	3.0154	100.00	0.0577	0.33	BMB*	0.162	1.22	n.a.	5919
5	TFA_4mg/L	Calibration ξ	5.277	3.9832	100.00	0.0763	0.43	BMB*	0.161	1.24	n.a.	5954
6	TFA_5mg/L	Calibration ξ	5.277	5.0059	100.00	0.0958	0.54	BMB*	0.161	1.23	n.a.	5936
7	blanc	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
8	CC34_20mg/L	Unknown	5.277	4.0566	100.00	0.0777	0.44	BMB*	0.161	1.25	n.a.	5933
9	lavage	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10	arrêt	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Maximum			5.290	5.0059	100.00	0.0958	0.54		0.162	1.25	0.00	5954
Average			5.282	3.1730	100.00	0.0607	0.34		0.162	1.23	n.a.	5922
Minimum			5.277	0.9624	100.00	0.0184	0.10		0.161	1.21	0.00	5873
Standard Deviation			0.007	1.4866	0.00	0.0285	0.16		0.001	0.01	n.a.	27
Relative Standard Deviation			0.12%	46.85%	0.00%	46.85%	47.09%		0.34%	1.12%	n.a.	0.46%

Detection of the residual MeCN in CC34 by gas chromatography analysis:

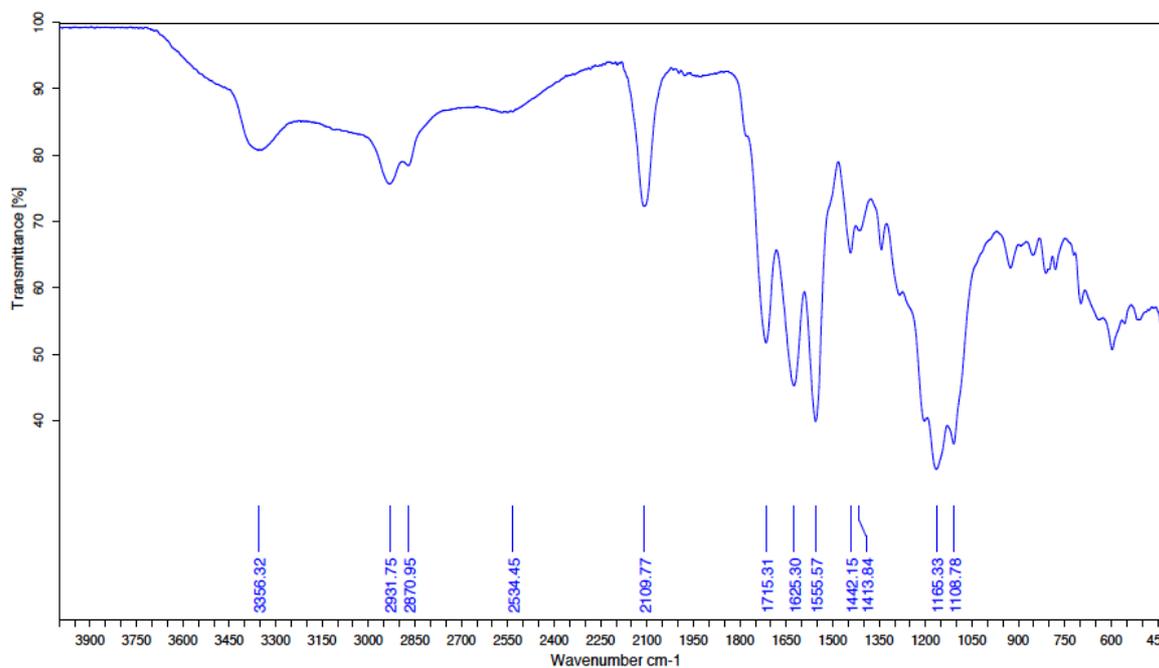
The gas chromatography flame ionization detector (GC FID) analysis was performed by Dr. Fanny Chauh (PACSMUB, Dijon) on a Varian CP-3800 system equipped with Schmidlin-DBS AG NM-H2 160 hydrogen generator. Separation was achieved by using WCOT fused Silica column (Varian), CP-WAX 52CB, 25 m × 0.32 mm, PEG phase 1.2 µm with nitrogen as vector gas. Analyses were performed with the following temperature gradient program: 40 °C during 6 min, 40 °C to 230 °C in 13.6 min (14 °C/min) and 230 °C during 11 min. Presence of MeCN in the compound **CC34** was not detected (sensitivity of the system was around 10 µL/L).

Gas chromatography profile of **CC34** at 200 µg/L in MeOH, and of MeCN at 10 µL/L in MeOH:



Characterization of CC34 by IR spectroscopy:

IR transmittance spectrum of **CC34**, recorded on IR FT Bruker Alpha spectrophotometer by using the ATR mode:



Determination of inhibitory potency on a fluorescent assay with hsPSMA

Assay buffer: HEPES (50 mM, 0.1 M NaCl, NaN_3 0.02% (m/v), pH 7.5-7.6)

OPA buffer: NaOH (0.2 M, 2-mercaptoethanol 0.1% (v/v))

The experiments were performed in a 96-well, black, flat bottom polystyrene microplate (Greiner Bio-One). The tests were performed in duplicate as described hereafter. Seven different inhibitor concentrations were evaluated.

In each well, 20 μL of aqueous inhibitor solution, 40 μL of NAAG in the assay buffer and 40 μL of hsPSMA (R&D Systems) in the assay buffer were successively added (final concentrations: [NAAG] = 10 μM ; [PSMA] = 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, [Inh] = 10^{-5} to 10^{-11} M). The positive control was determined by replacing the inhibitor with 20 μL of water. The negative control was determined by replacing the inhibitor with 20 μL of water and NAAG with 40 μL of assay buffer. The microplate was incubated at 37 °C for 30 min. Then, 100 μL of a 15 mM solution of *o*-phthalaldehyde (OPA) in the OPA buffer were added. The microplate was incubated at room temperature for 10 min and the fluorescence measurements were performed on Clariostar microplate reader (BMG Labtech) (λ excitation = 350 - 10 nm, λ emission = 455.0 - 20 nm).

The percentage of remaining PSMA activity was defined as:

$$\% \text{ activity} = (\text{measured signal} - \text{negative control}) \times 100 / (\text{positive control} - \text{negative control})$$

The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was determined by non-linear regression by using Prism 6 software (GraphPad). The inhibition constant, K_i , was calculated from IC_{50} values by using the Cheng-Prussoff equation:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [NAAG] / K_m)$$

where K_m is the Michaelis constant of the enzyme, experimentally determined as $K_m = 1.98 \mu\text{M}$.

Radiolabeling

The radiolabeling of the derivatives of **CC34** was performed by Dr. Eleni Gourni (Department of Nuclear Medicine, University Hospital Freiburg, Germany). HBED-CC-PSMA and PSMA-617 were purchased from ABX GmbH, Germany. The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator IGG100 was from Eckert & Ziegler (Berlin, Germany). $^{64}\text{CuCl}_2$ was purchased from Acom (Italy). All culture reagents were from Gibco BRL, Life Technologies (Grand Island, NY). The radiolabeling and quality control were performed by Dr Eleni Gourni (Department of Nuclear Medicine, University Hospital Freiburg, Germany).

^{68}Ga -CC34 and ^{68}Ga -HBED-CC-PSMA:

The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator was eluted with 7 mL HCl 0.1 M and the eluate (~ 450 MBq) was loaded onto a cation exchange column (Strata-XC, Phenomenex). ^{68}Ga was eluted with 800 μL of a mixture of acetone/HCl (97.6%/0.02 M) directly in a vial containing 2 mL sodium acetate buffer (0.2 M, pH 4.0), 20 μL ascorbic acid (500 mg / 5 mL) and 10.0 μg of the **CC34** or HBED-CC-PSMA, followed by SepPak C-18 purification to remove uncomplexed radiometal.

^{64}Cu -CC34:

The ^{64}Cu -labeled radiotracer was prepared by dissolving 10.0 μg (approximately 8 nmol) of **CC34** in 250 μL ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 8.0), followed by incubation with $^{64}\text{CuCl}_2$ (180-200 MBq) for 30 min at 95 °C and was used without any further purification step.

^{111}In -CC34 and ^{111}In -PSMA-617:

The ^{111}In -labeled radiotracers were prepared by dissolving 5.0 μg (approximately 4 nmol) of **CC34** or PSMA-617 in 250 μL ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 8.0), followed by incubation with $^{111}\text{InCl}_3$ (40 MBq) for 30 min at 95 °C and were used without any further purification step.

The quality control of the radiolabeled compounds was performed by analytical RP-HPLC on an 120-5 C18 Nucleosil column (250 x 4.5 mm), applying a linear gradient of 15-90% solvent B in 25 min at a flow rate of 1 mL/min. (solvent A, H₂O 0.1% TFA; solvent B, MeCN 0.1%TFA). Ultraviolet detection was performed using a Knauer detector at 280 nm. For radioactivity measurement, a Na(Tl) well-type scintillation Gina star was used. Quantitative γ -counting was performed with a COBRA 5003 γ -system well counter from Packard Instrument (USA). All *in vitro* experiments were carried out 2 times in triplicate.

The radiotracer solutions were prepared by dilution with 0.9% NaCl.

Lipophilicity studies

The lipophilicity studies of the different radiolabeled derivatives of **CC34** was performed by Dr. Eleni Gourni (Department of Nuclear Medicine, University Hospital Freiburg, Germany).

The lipophilicity (LogD, pH 7.4) was estimated by the “shake-flask” method. The labeled conjugates (10 μ L of 100 nM, 6.3 MBq / nmol) were added to a solution of 1-octanol (500 μ L) and PBS (500 μ L, pH 7.4). The mixture was vortexed for 1 h to reach the equilibrium and then centrifuged (3000 rpm) for 10 min. From each phase, an aliquot (100 μ L) was pipetted out and measured in a γ -counter. Each measurement was repeated five times. Care was taken to avoid cross-contamination between the phases. The partition coefficient was calculated as the average log ratio of the radioactivity in the organic fraction and the PBS fraction.

LogD values (octanol/PBS pH 7.4) of the five radiotracers:

	⁶⁸ Ga- CC34	¹¹¹ In- CC34	⁶⁴ Cu- CC34	⁶⁸ Ga-HBD-CC-PSMA	¹¹¹ In-PSMA-617
LogD (octanol/PBS)	-3.54 \pm 0.06	-3.32 \pm 0.05	-3.01 \pm 0.06	-4.06 \pm 0.10	-4.06 \pm 0.06

Evaluation of ⁶⁸Ga-, ⁶⁴Cu- and ¹¹¹In-labeled **CC34** on LNCaP cells

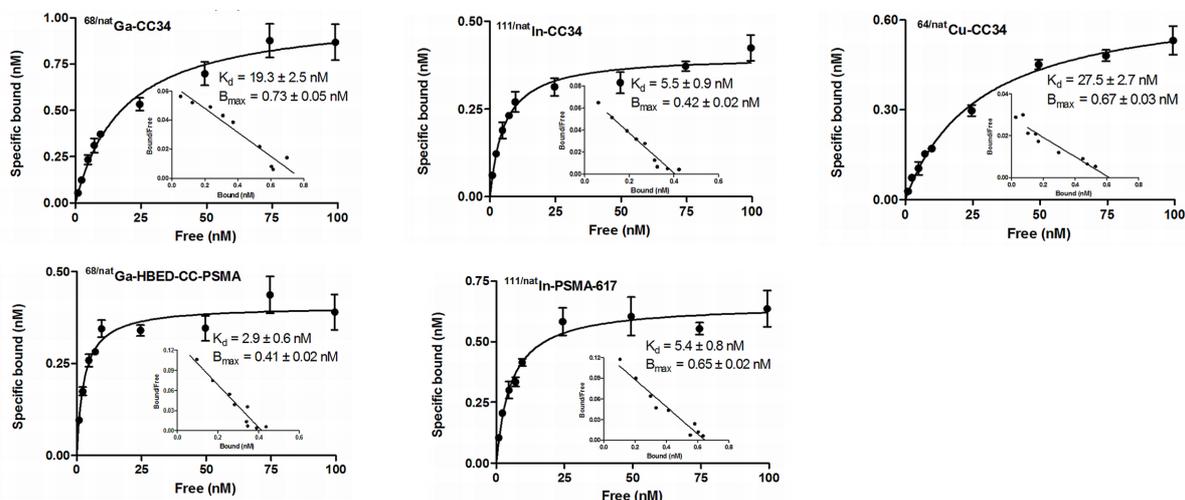
The *in vitro* evaluation of the different radiolabeled derivatives of **CC34** was performed by Dr. Eleni Gourni (Department of Nuclear Medicine, University Hospital Freiburg, Germany).

Saturation binding concentration and affinity evaluation:

For receptor saturation analysis, PSMA positive LNCaP cells (metastatic lesion of human prostatic adenocarcinoma, ATCC) were seeded at a density of 0.8–1 million cells per well in 6-well poly-L-lysine PLL-coated plates and incubated overnight with medium (RPMI Medium 1640 – GlutaMAX containing 1% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, sodium pyruvate 1 mM). The next day, the medium was removed, the cells washed and incubated for 1 h at 37°C with fresh binding buffer (RPMI Medium 1640 – GlutaMAX containing 1% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, 50 mM HEPES, 50 μ g/mL bacitracin, 0.5% BSA). Afterwards, the plates were placed on ice for 30 min followed by incubation with increasing concentrations of either ⁶⁸Ga-HBED-CC-PSMA, ⁶⁸Ga-**CC34**, ⁶⁴Cu-**CC34**, ¹¹¹In-**CC34** and ¹¹¹In-PSMA-617 (1–100 nM) in phosphate-buffered saline binding buffer pH 7.4. After the addition of the radioligands, the cells were incubated for 120 min at 4°C. Non-specific binding was determined in the presence of 2-(phosphonomethyl)-pentanedioic acid (2-PMPA) at a final concentration of 1 μ M. The cells were washed twice with ice-cold PBS, followed by solubilization with 1 M NaOH and the cell-associated radioactivity was measured using a gamma-counter. Specific binding was plotted against the total molar concentration of the added radiotracer. The K_d values and the concentration of the radiotracers required to saturate the receptors (B_{max})

were determined by nonlinear regression using Prism 5 software (GraphPad). For all the cell studies the values are normalized for 1×10^6 cells per well and all data are from two independent experiments with triplicates in each experiment.

Saturation binding and affinity studies on intact LNCaP cells, values of B_{max} and K_d for each radiolabeled tracer:



Internalization studies:

For internalization experiments, LNCaP cells were seeded into 6-well plates and treated as described above. Approximately 0.25 pmol of the radiopeptides ($^{64}\text{Cu-CC34}$, $^{68}\text{Ga-CC34}$, $^{111}\text{In-CC34}$, $^{68}\text{Ga-HBED-CC-PSMA}$ and $^{111}\text{In-PSMA-617}$) were added to the binding buffer and the cells were incubated (in triplicates) for 0.5, 1, 2, 4 and 6 h at 37°C, 5% CO_2 in case of $^{64}\text{Cu-CC34}$, $^{111}\text{In-CC34}$ and $^{111}\text{In-PSMA-617}$ and for 10, 30, 60, 90, 120 and 180 min at 37°C, 5% CO_2 in case of $^{68}\text{Ga-CC34}$ and $^{68}\text{Ga-HBED-CC-PSMA}$. To determine nonspecific membrane binding and internalization, excess of 2-PMPA (final concentration 1 μM) was added to selected wells. At each time point, the internalization was stopped by removing the medium and washing the cells twice with ice-cold PBS. To remove the receptor-bound radioligand, an acid wash was carried out twice with a 0.1 M glycine buffer pH 2.8 for 5 min on ice. Finally, cells were solubilized with 1.0 M NaOH. The radioactivity of the culture medium, the receptor-bound, and the internalized fractions were measured in a γ -counter.

Metabolic stability studies:

Normal female athymic BALB/c nude mice ($n = 2$) were injected with approximately 80 pmol / 9 MBq of $^{68}\text{Ga-CC34}$ in a total volume of 0.1 mL of PBS and sacrificed 15 min p.i.. Blood was collected in heparinized tubes and centrifuged (5 min, 1700 g) for plasma isolation. Sample of plasma (300 μL) was transferred to an ultrafiltration device (Vivacon 500; 30 kDa molecular weight cut-off [Sartorius Stedium Biotech GmbH]), followed by centrifugation (10 min, 9660 g) for the separation of proteins. Samples from the ultrafiltrate and $^{68}\text{Ga-CC34}$ solution were analyzed by RP-HPLC.

***In vivo* evaluation of radiolabeled CC34**

The *in vivo* evaluation of the different radiolabeled derivatives of **CC34** was performed by Dr. Eleni Gourni (Department of Nuclear Medicine, University Hospital Freiburg, Germany).

Cell line and animal model:

The PSMA+ LNCaP cell line was cultured at 37°C and 5% CO₂ in RPMI Medium 1640 - GlutaMAX containing 1% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, sodium-pyruvate 1 mM.

Female athymic BALB/c nude mice (age: 4–6 weeks, weight: 17–20 g) were purchased from Janvier, France. For implantation, the tumor cells were harvested by trypsinization and 5 x 10⁶ cells in 50% Matrigel (Corning Matrigel Matrix, 354230) and were inoculated subcutaneously into the right shoulder of the mice. After an average of four weeks, tumor size reached 200 to 300 mg and the animals were used for biodistribution and PET imaging studies. All animal experiments were conducted in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animals Experiments of the University Medical Center of Freiburg, Germany (Permit Number: G-13/30).

Biodistribution:

Ten pmol of ⁶⁸Ga-**CC34** or ⁶⁸Ga-HBED-CC-PSMA (0.7–0.8 MBq / 100 µL), ⁶⁴Cu-**CC34** (0.2– 0.3 MBq / 100 µL), ¹¹¹In-**CC34** or ¹¹¹In-PSMA-617 (0.09–0.1 MBq / 100 µL) in 100 µL NaCl 0.9% were injected intravenously into the tail vein of LNCaP mice. Animals were sacrificed by isoflurane anesthesia at 1 and 2 h after injection of the ⁶⁸Ga-labeled tracers and at 1, 4, 24 and 48 h after the injection of the ⁶⁴Cu- and ¹¹¹In-labeled tracers. The organs of interest were dissected and weighted, and the radioactivity in tissue samples was counted in a γ-counter. Biodistribution data are given as percent of injected activity per gram of tissue (%IA/g) and are means ± SD (n = 4). To demonstrate the specificity of binding, LNCaP mice were co-injected with 10 pmol of the radiotracers along with 20 nmol of 2-PMPA. Animals were sacrificed at 1 h after injection by isoflurane anesthesia.

PET imaging:

For the ⁶⁸Ga-labeled compounds static images were acquired for a time period of 15 min at 1 and 2 h p.i., and for ⁶⁴Cu-**CC34** at 1, 4, 24 and 48 h p.i. PET blocking studies of the ⁶⁸Ga- and ⁶⁴Cu-labeled radioconjugates were performed as described above and static scans were obtained by using a small-animal PET scanner (Focus 120 microPET scanner; Concorde Microsystems Inc.). PET-images were corrected for ⁶⁸Ga or ⁶⁴Cu decay and reconstructed with an ordered-subset expectation maximization algorithm provided by the manufacturer. PET images were generated by the AMIDE software. Tracer uptake is expressed as percent of decay-corrected %IA/g, with a color scale set from 0% to 250% for qualitative comparison among the images.

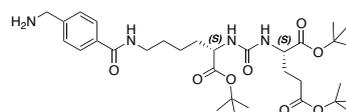
Statistical analysis:

All data are expressed as the mean of values \pm standard deviation (mean \pm SD). Prism 5 Software (GraphPad Software) was used to determine statistical significance at the 95% confidence level, with a P value of less than 0.05 being considered significantly different.

Spacer optimization

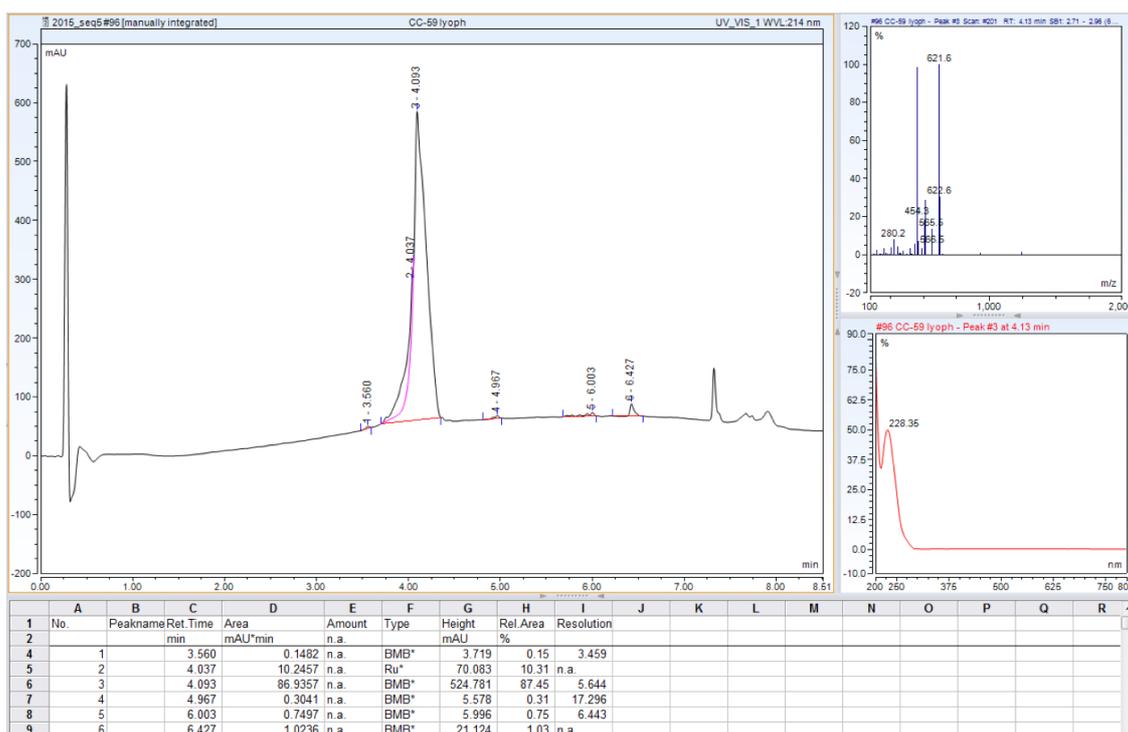
tBuO-(AMBA)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu, 45:

Fmoc-4-aminomethylbenzoic acid (21.1 mg, 56.6 μ mol, 1.1 eq) and TSTU (18.6 mg, 61.7 μ mol, 1.2 eq) were dissolved in DMF (approximately 250 μ L) then DIPEA (10.8 μ L, 61.7 μ mol, 1.2 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for approximately 30 min until complete conversion of the carboxylic acid (determined by RP-HPLC-LRMS analysis). The compound **42** (20.2 mg, 51.5 μ mol, 1 eq) in solution in DMF (350 μ L) was then added to the activated NHS ester. The solution was stirred at room temperature for 30 min. Then, the Fmoc group was eliminated by addition of 150 μ L of piperidine to obtain a mixture of DMF/piperidine (80 : 20, v/v). After stirring 1 h at room temperature, DMF and piperidine were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product tBuO-(AMBA)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu·1TFA **45** was obtained as an orange oil (24.8 mg, 57%, purity: 87%).



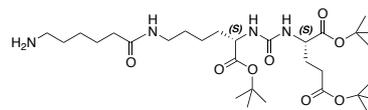
LRMS: $C_{32}H_{54}N_4O_8^+$ ($[M+H]^+$) m/z calculated: 621.4, found: 621.6.

RP-HPLC-LRMS analysis of tBuO-(AMBA)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **45**:



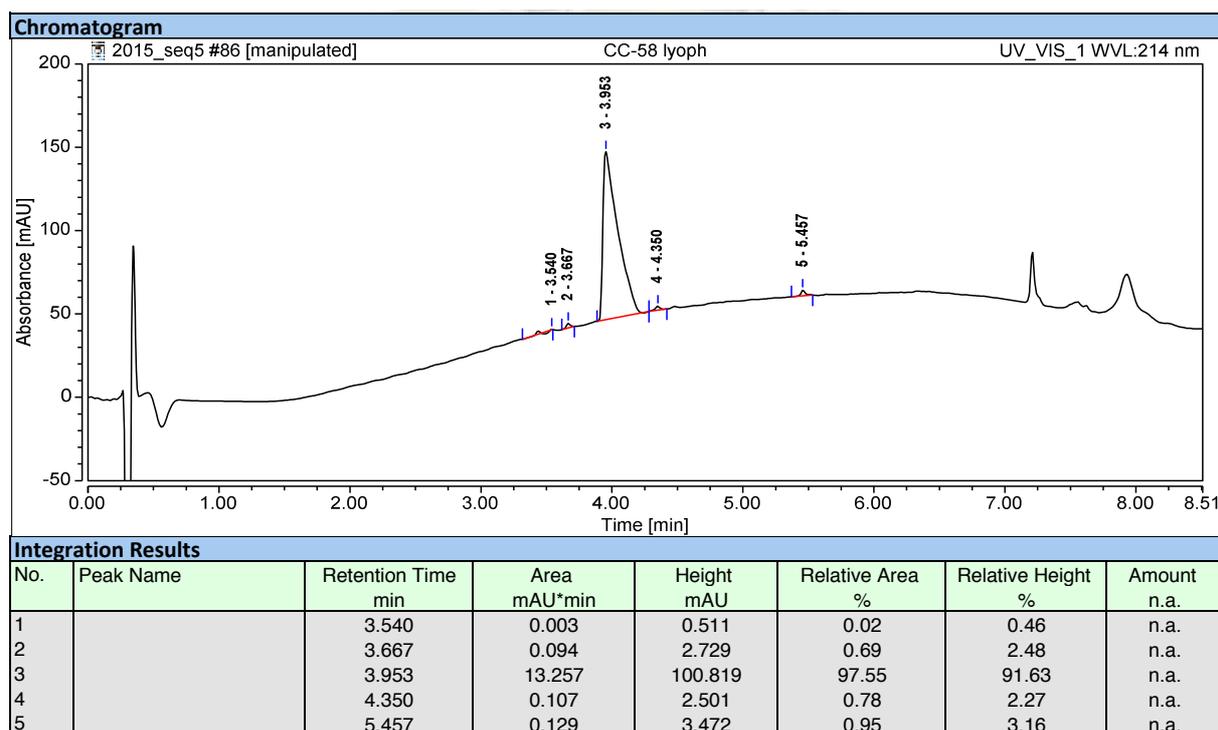
tBuO-(Ahx)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu, 46:

Fmoc-6-aminohexanoic acid (20 mg, 56.6 μmol , 1.1 eq) and TSTU (18.6 mg, 61.7 μmol , 1.2 eq) were dissolved in DMF (approximately 250 μL) and DIPEA (10.8 μL , 61.7 μmol , 1.2 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for approximately 30 min until complete conversion of the carboxylic acid (determined by RP-HPLC-LRMS analysis). The compound **42** (20.2 mg, 51.5 μmol , 1 eq) in solution in DMF (250 μL) was then added to the activated NHS ester. The reaction medium was stirred at room temperature for 30 min. DMF was evaporated under reduced pressure and 600 μL of a solution of DMF/piperidine (80 : 20, v/v) were added to remove the Fmoc protecting group. After stirring 1 h at room temperature, DMF and piperidine were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product tBuO-(Ahx)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu-1TFA **46** was obtained as an orange oil (17.0 mg, 45%, purity: 97%).



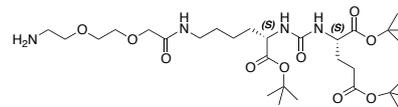
LRMS: $\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{N}_4\text{O}_8^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z calculated: 601.4, found: 601.5.

RP-HPLC analysis of tBuO-(Ahx)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **46**:



tBuO-(AEEAc)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu, 47:

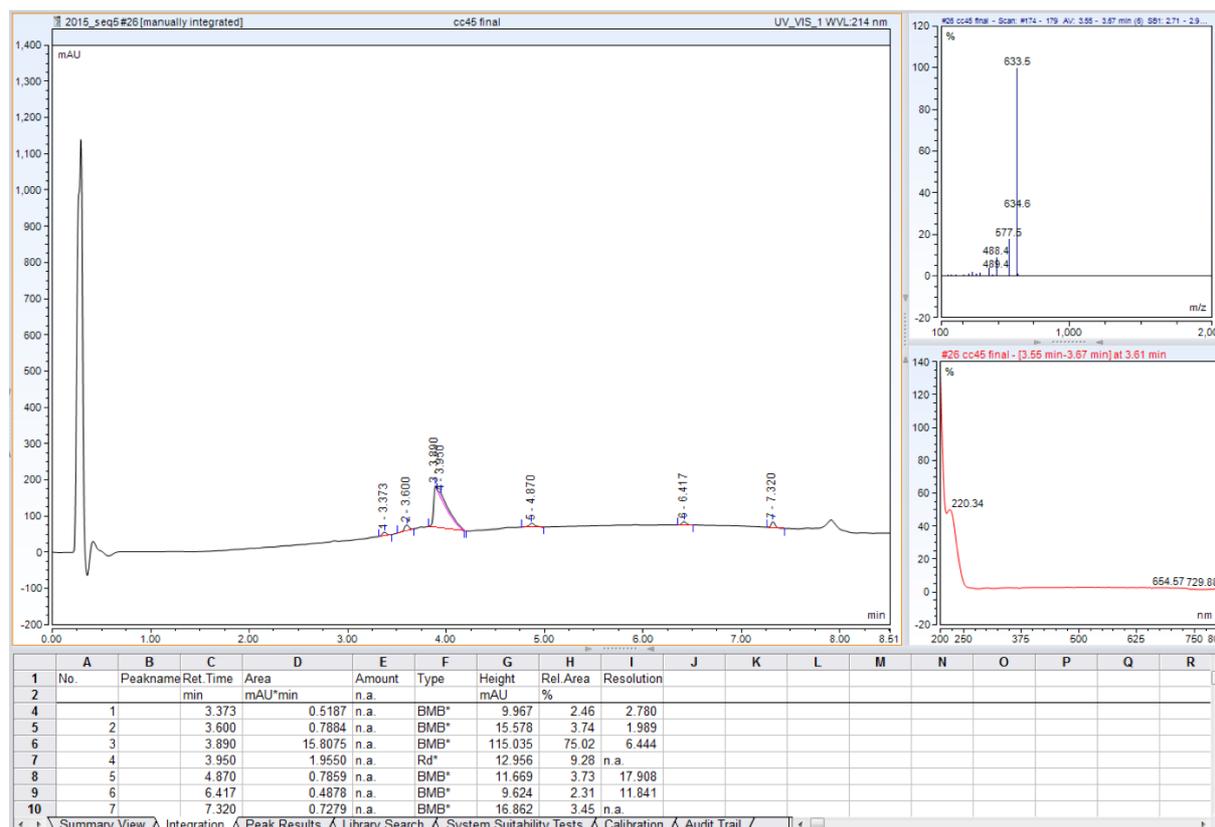
1-(9H-fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10-trioxo-4-azadodecan-12-oic acid (Fmoc-AEEAc-OH) (42.6 mg, 111 μ mol, 1 eq) and TSTU (37.3 mg, 124 μ mol, 1.1 eq) were dissolved in DMF (approximately 500 μ L)



and DIPEA (15.9 μ L, 123 μ mol, 1.1 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for approximately 1 h until complete conversion of the carboxylic acid (determined by RP-HPLC-LRMS analysis). The compound **42** (76.0 mg, 160 μ mol, 1.4 eq) in solution in DMF (1 mL) was then added to the activated NHS ester. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. Then, the Fmoc group was removed by addition of 375 μ L of piperidine to obtain a mixture of DMF/piperidine (80 : 20, v/v). After stirring 3 h, at room temperature, DMF and piperidine were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product tBuO-(AEEAc)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu-1TFA **47** was obtained as a yellow oil (82.8 mg, 75%, purity: 75%).

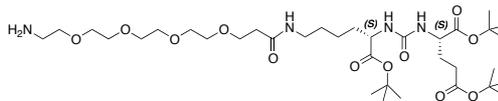
LRMS: $C_{30}H_{57}N_4O_{10}^+$ ($[M+H]^+$) m/z calculated: 633.4, found: 633.5.

RP-HPLC-LRMS analysis of tBuO-(AEEAc)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **47**:



tBuO-(NH₂-PEG₄)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu, 48:

1-(9H-fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-
 azanonadecan-19-oic acid (Fmoc-dPEG4-COOH)

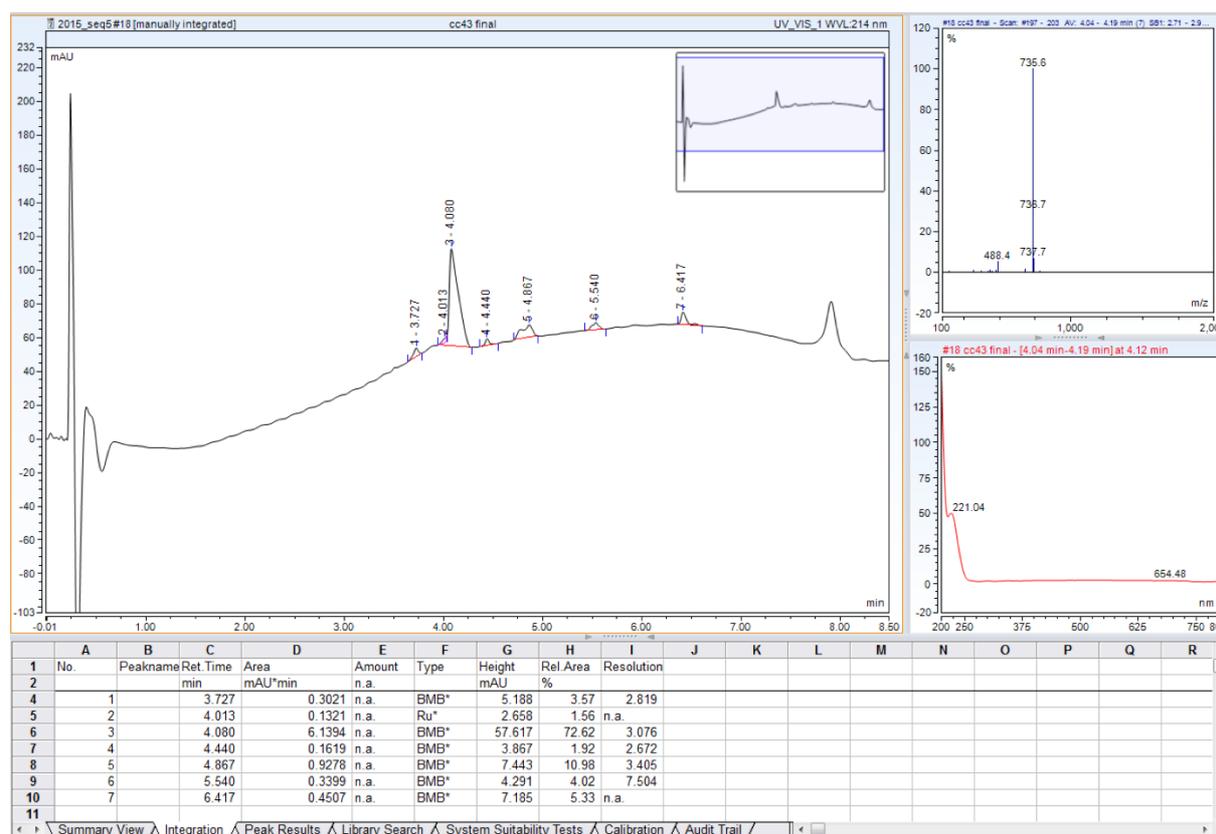


(48.0 mg, 98.5 μmol, 1 eq) and TSTU (34.1 mg,
 113.0 μmol, 1.2 eq) were dissolved in DMF

(approximately 1 mL) and DIPEA (19.7 μL, 113.0 μmol, 1.2 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for approximately 15 min until complete conversion of the carboxylic acid. The compound **42** (53.8 mg, 110.0 μmol, 1.1 eq) in solution in DMF (1 mL) was then added to the activated NHS ester. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. Then, the Fmoc group was eliminated by addition of 500 μL of piperidine to obtained a mixture of DMF/piperidine (80 : 20, v/v). After stirring overnight, at room temperature, DMF and piperidine were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product tBuO-(NH₂-PEG₄)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu·1TFA **48** was obtained as a yellow oil (51.8 mg, 46%, purity: 73%).

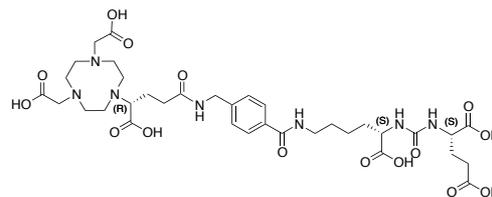
LRMS: C₃₅H₆₇N₄O₁₂⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 735.5, found: 735.6.

RP-HPLC-LRMS analysis of tBuO-(NH₂-PEG₄)Lys-urea-Glu(OtBu)-OtBu **48**:



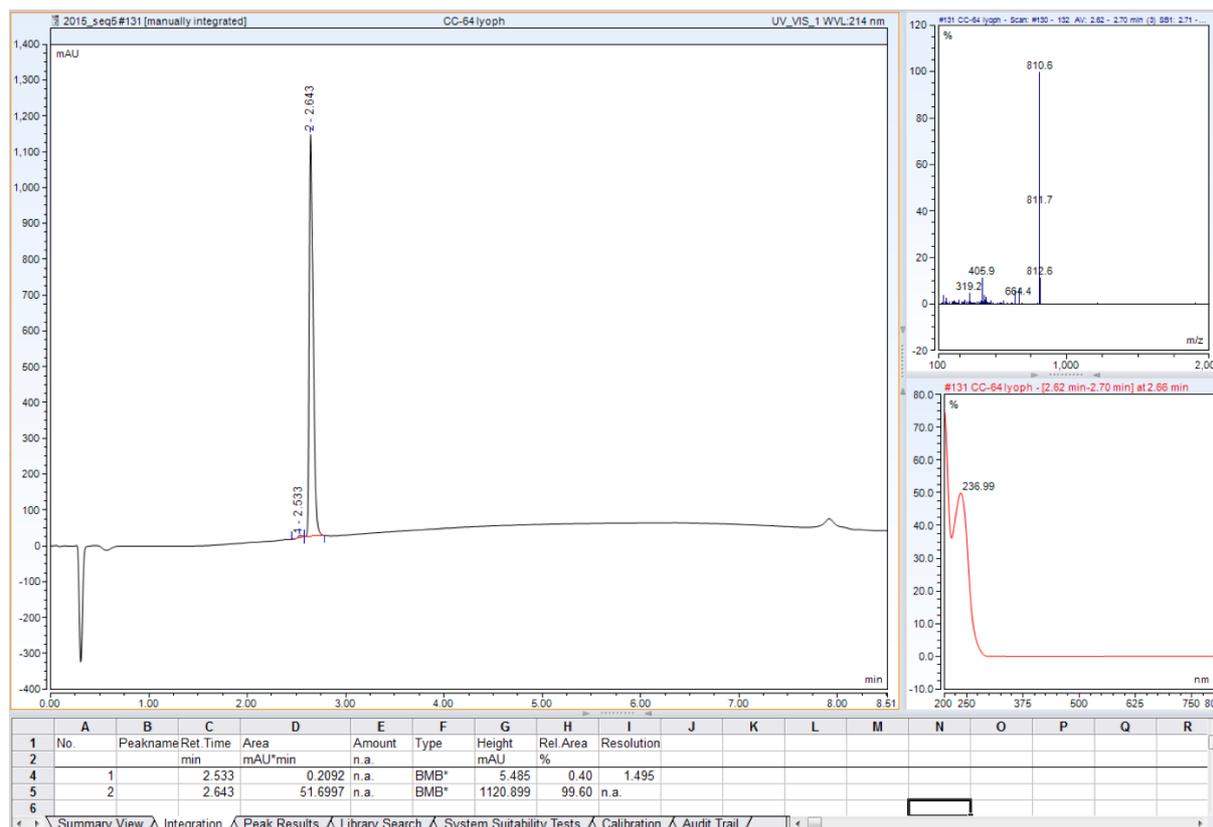
(R)-NODAGA-AMBA-Lys-urea-Glu-3TFA, 49:

The compound **45** (19.7 mg, 26.8 μmol) was dissolved in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (46.7 μL , 268.0 μmol , 10 eq) was added to the solution. The macrocycle (R)-NODAGA-NHS-HPF₆·TFA (25.6 mg, 34.8 μmol , 1.3 eq) was then added. After stirring during 4 h, at room temperature, DMF was evaporated under reduced pressure. The *tert*-butyl esters were deprotected by addition of 1 mL of a solution TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v). The reaction mixture was stirred at room temperature for about 2 h. Then, the solution was concentrated. The product was precipitated in 10 mL of diethyl ether at 4 ° C, isolated by centrifugation for 10 min at 4000 rpm and 4 ° C, and dried in a desiccator. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product (R)-NODAGA-AMBA-Lys-urea-Glu-3TFA **49** was obtained as a white solid (9.8 mg, 32%, purity: >99%).



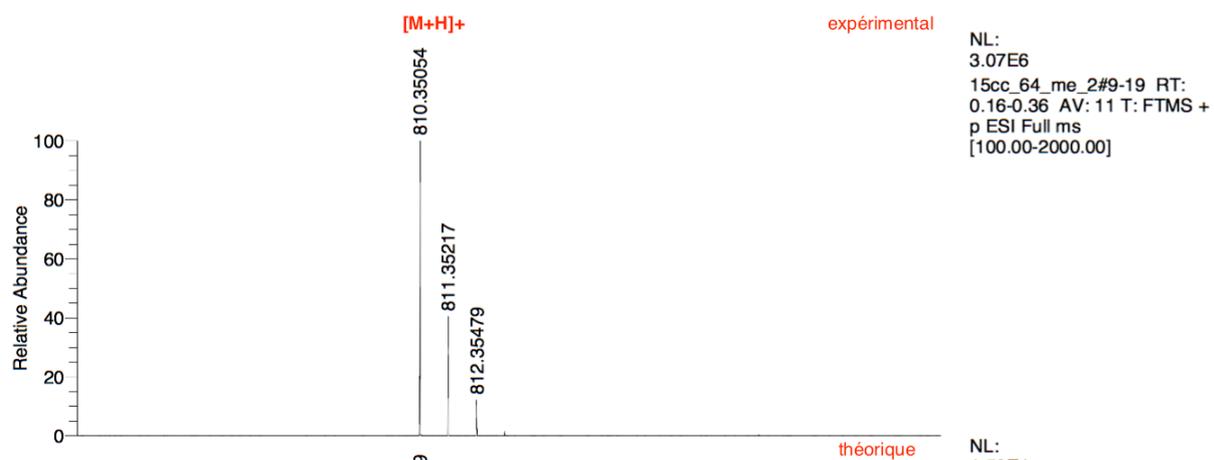
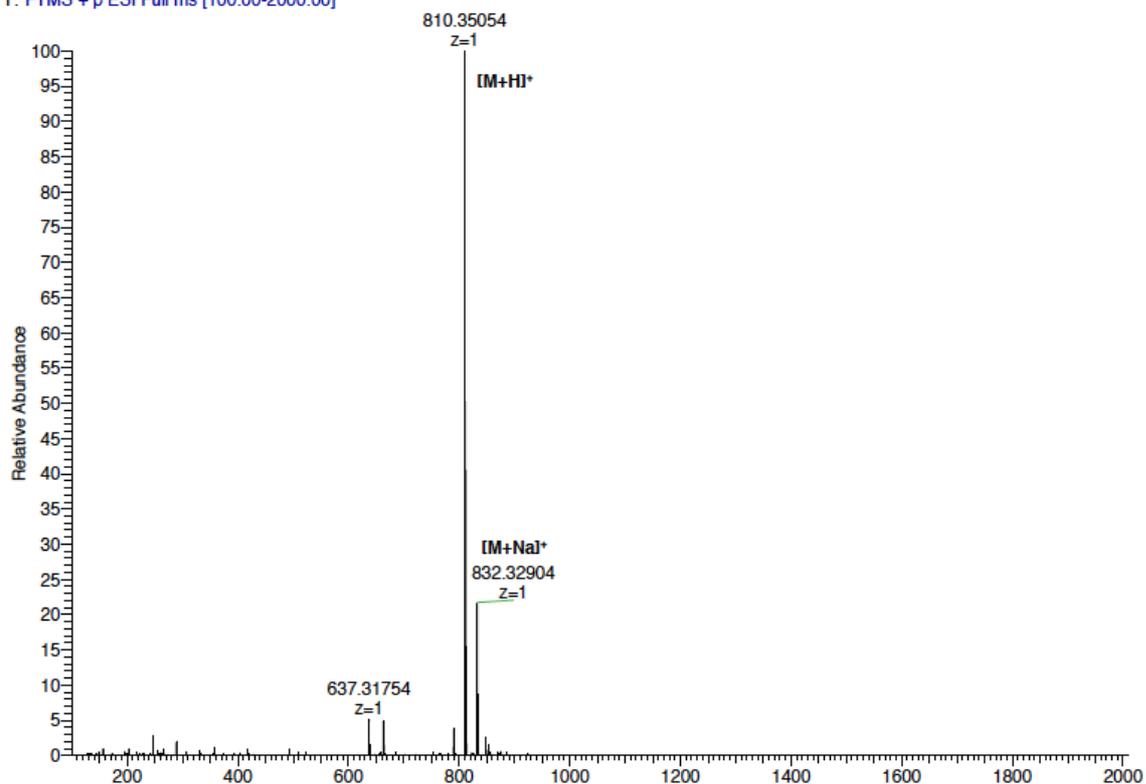
HRMS: C₃₅H₅₂N₇O₁₅⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 810.35159, found: 810.35054.

RP-HPLC-LRMS analysis of (R)-NODAGA-AMBA-Lys-urea-Glu **49**:



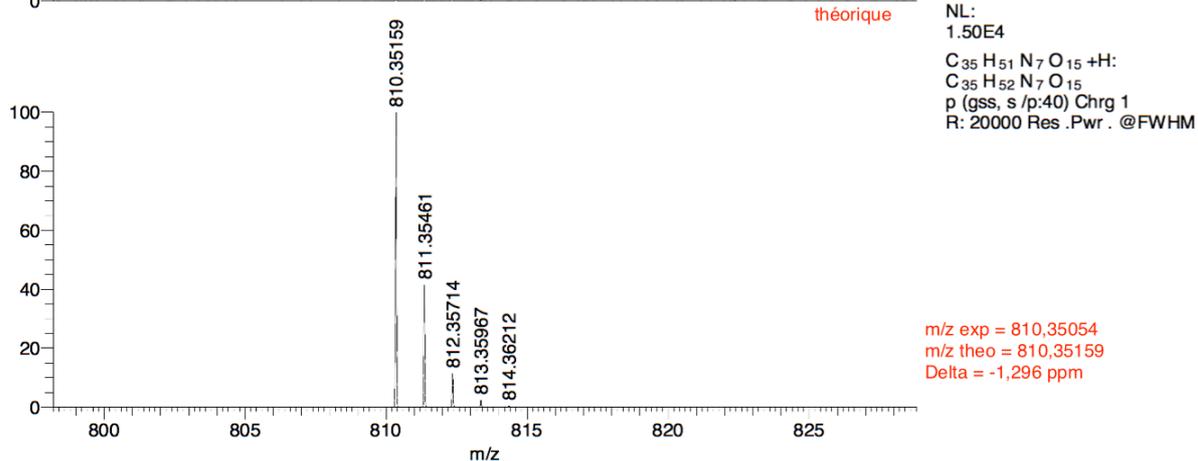
HRMS spectrum of (*R*)-NODAGA-AMBA-Lys-urea-Glu **49**:

15cc_64_me_2 #9-19 RT: 0.16-0.36 AV: 11 NL: 3.07E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



expérimental

NL:
3.07E6
15cc_64_me_2#9-19 RT:
0.16-0.36 AV: 11 T: FTMS +
p ESI Full ms
[100.00-2000.00]



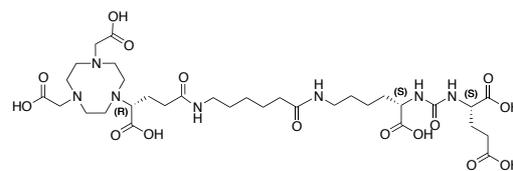
théorique

NL:
1.50E4
C₃₅ H₅₁ N₇ O₁₅ +H:
C₃₅ H₅₂ N₇ O₁₅
p (gss, s /p:40) Chrg 1
R: 20000 Res .Pwr . @FWHM

m/z exp = 810.35054
m/z theo = 810.35159
Delta = -1,296 ppm

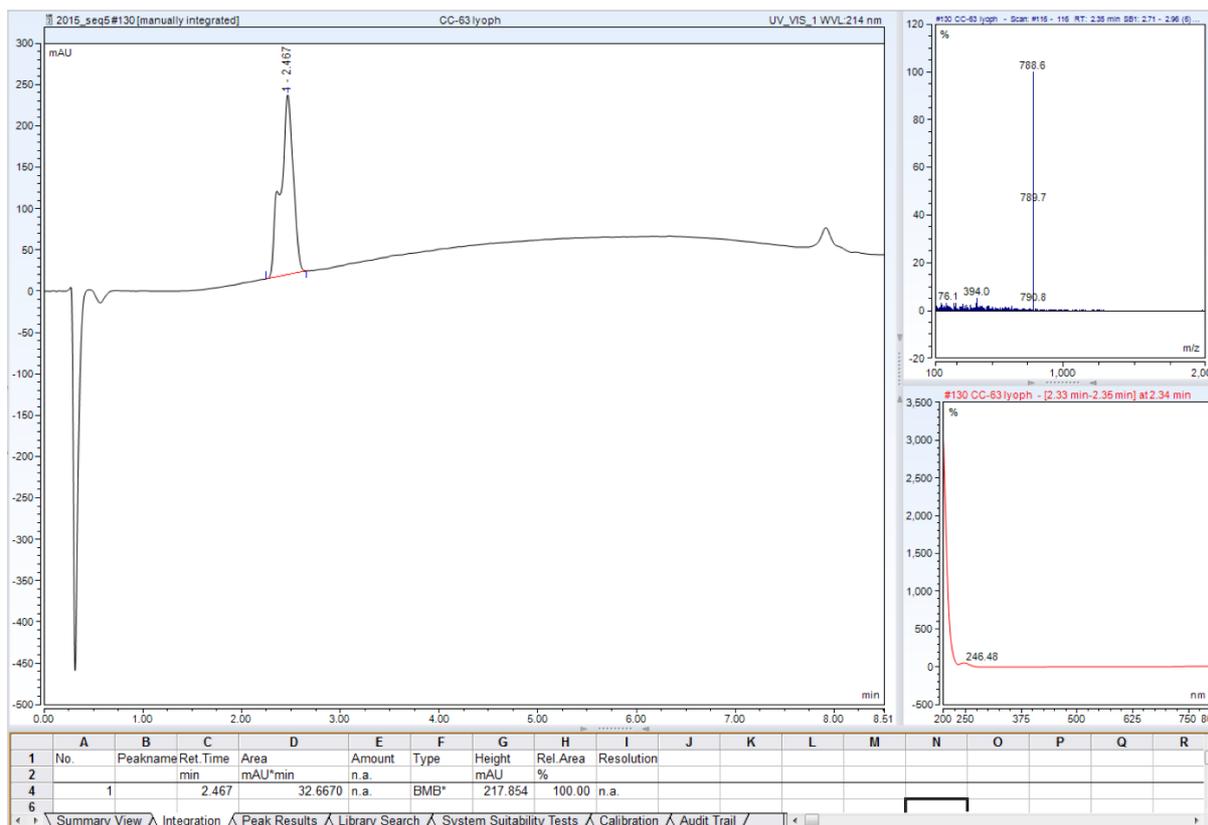
(R)-NODAGA-Ahx-Lys-urea-Glu, 50:

The compound **46** (17.0 mg, 23.8 μmol) was dissolved in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (41.5 μL , 238 μmol , 10 eq) was added to the solution. The macrocycle (R)-NODAGA-NHS-HPF₆·TFA (22.7 mg, 30.9 μmol , 1.3 eq) was then added. After stirring during 2 h, at room temperature, DMF was evaporated under reduced pressure. The *tert*-butyl esters were deprotected by addition of 1 mL of a solution TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v). The reaction mixture was stirred at room temperature for about 3 h. Then, the solution was concentrated by bubbling nitrogen. The product was precipitated in 10 mL of diethyl ether at 4 ° C, isolated by centrifugation for 10 min at 4000 rpm and 4 ° C, and dried in a desiccator. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product (R)-NODAGA-Ahx-Lys-urea-Glu·3TFA **50** was obtained as a white solid (16.6 mg, 62%, purity: >99%).



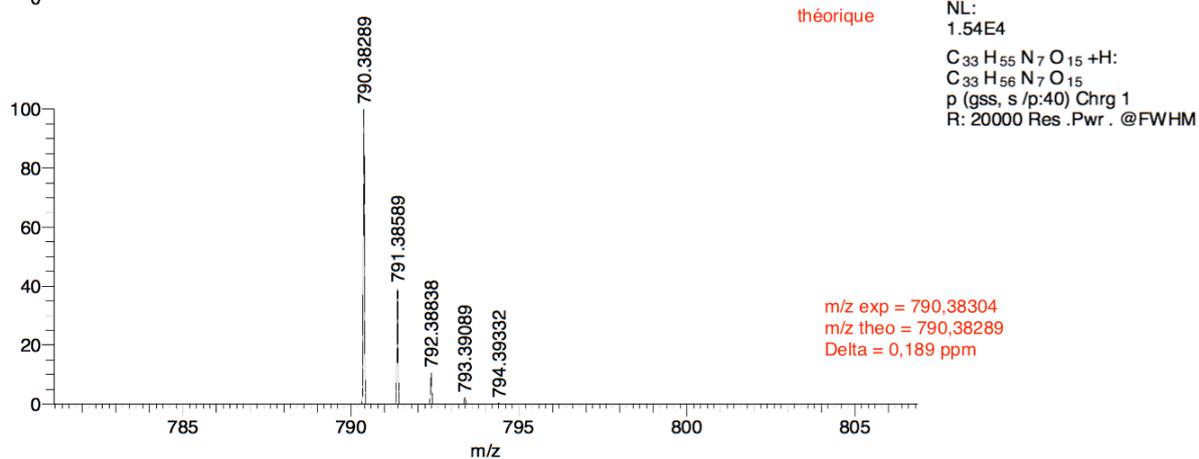
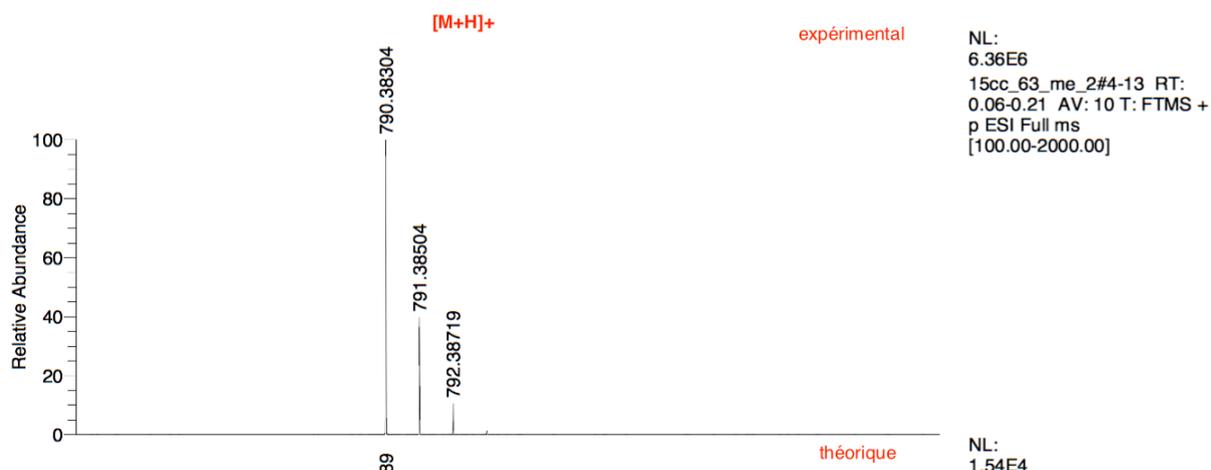
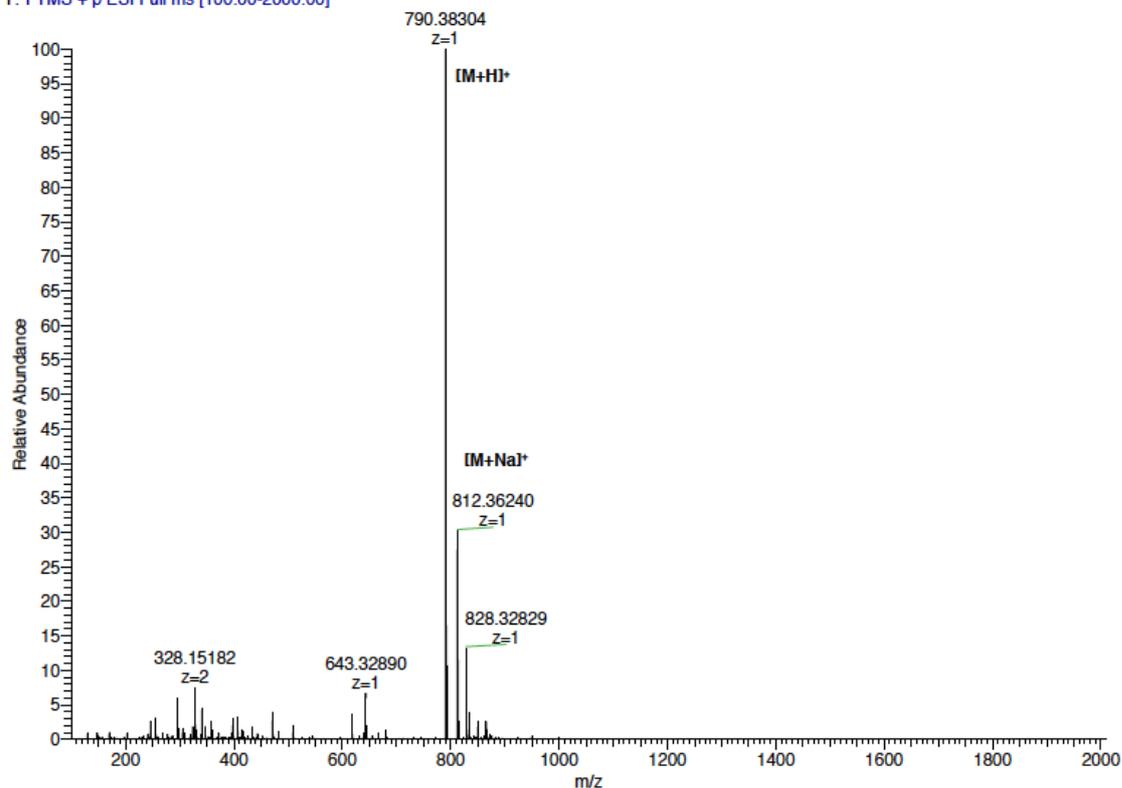
HRMS: C₃₃H₅₆N₇O₁₅⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 790.38289, found: 790.38304.

RP-HPLC-LRMS analysis of (R)-NODAGA-Ahx-Lys-urea-Glu **50**:



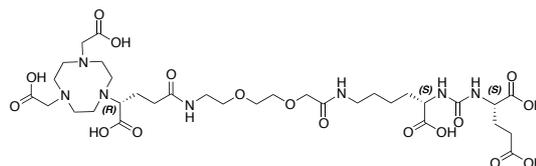
HRMS spectrum of (R)-NODAGA-Ahx-Lys-urea-Glu **50**:

15cc_63_me_2 #4-13 RT: 0.06-0.21 AV: 10 NL: 6.36E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

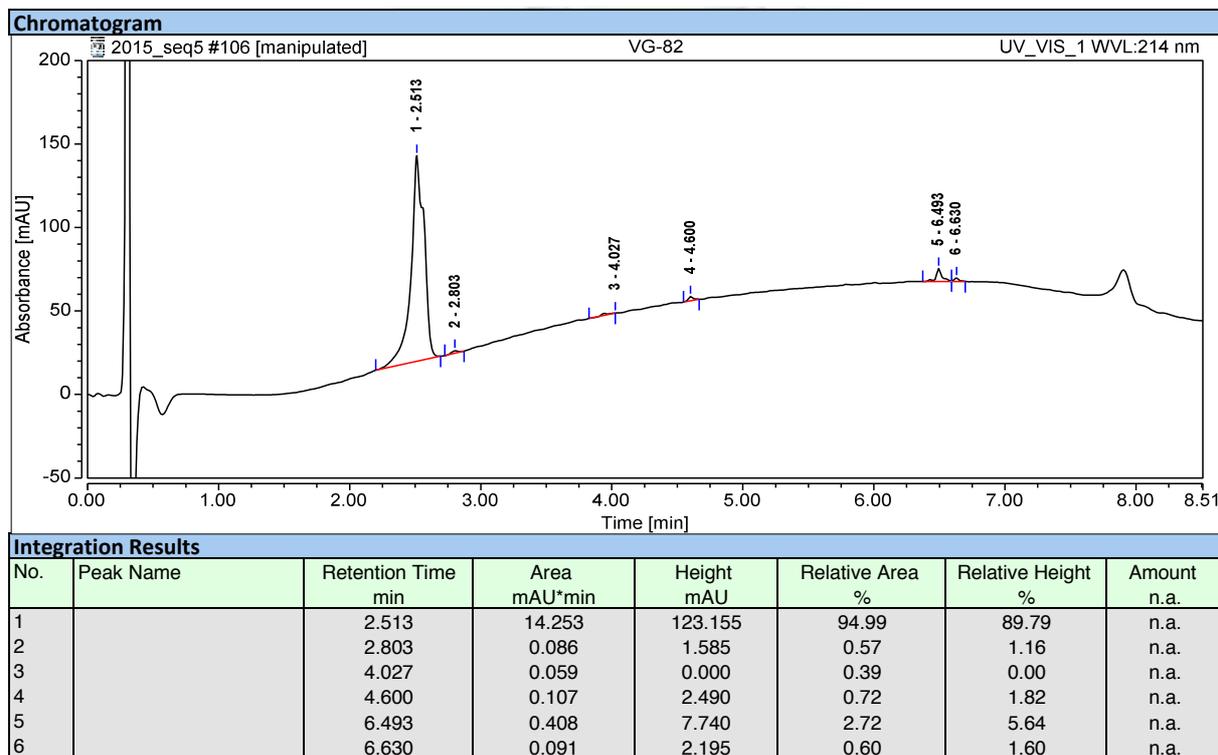


(R)-NODAGA-AEEAc-Lys-urea-Glu, 51:

The compound **47** (15.5 mg, 20.8 μmol) was dissolved in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (36.1 μL , 208.0 μmol , 10 eq) was added to the solution. The macrocycle (R)-NODAGA-NHS-HPF₆·TFA (18.3 mg, 25.0 μmol , 1.2 eq) was then added. After stirring during 2 h, at room temperature, DMF was evaporated under reduced pressure. The *tert*-butyl esters were deprotected by addition of a solution TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v). The reaction mixture was stirred at room temperature for about 3 h. Then, the solution was concentrated. The product was precipitated in 10 mL of diethyl ether at 4 ° C, isolated by centrifugation for 10 min at 4000 rpm and 4 ° C, and dried in a desiccator. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product (R)-NODAGA-AEEAc-Lys-urea-Glu-3TFA **51** was obtained as a white solid (16.6 mg, 59%, purity: 95%).
 HRMS: C₃₃H₅₅N₇O₁₇⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 822.37372, found: 822.37274.

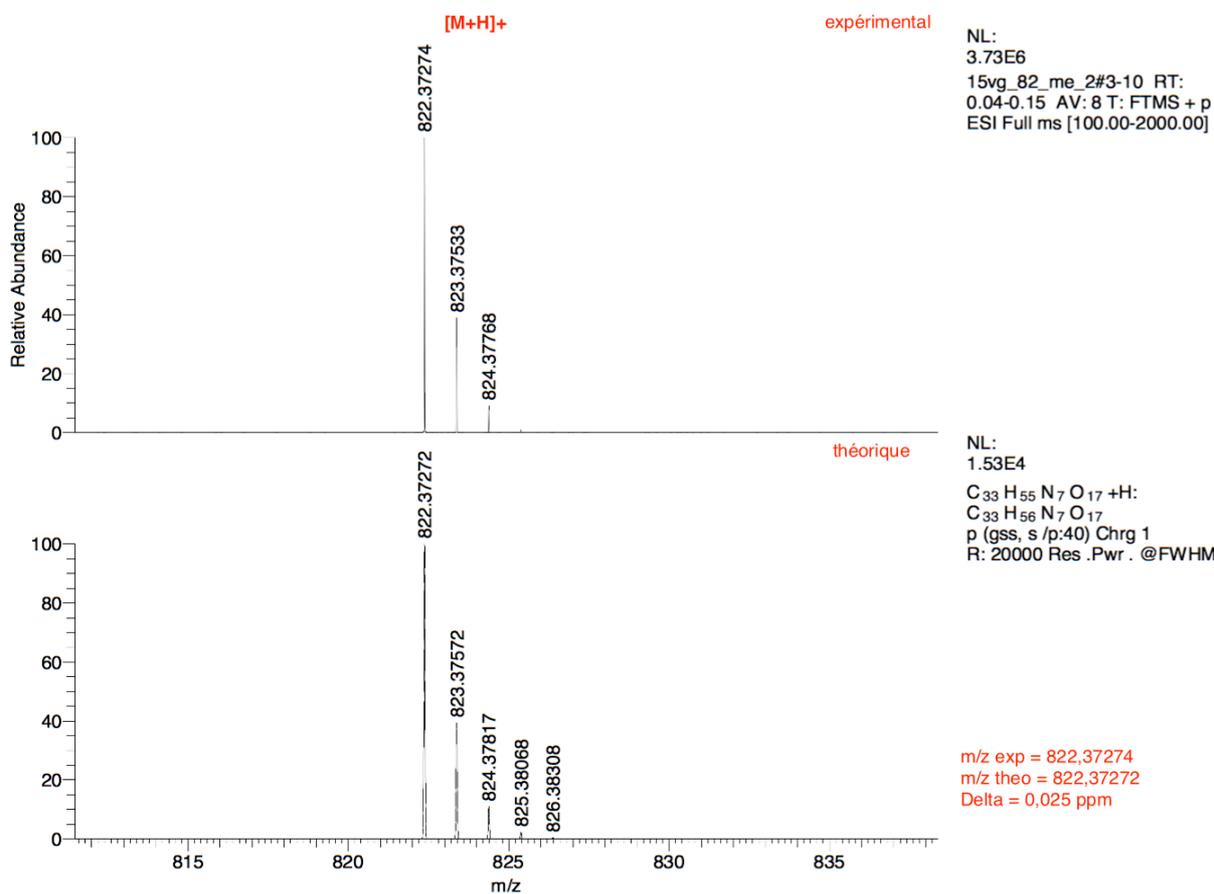
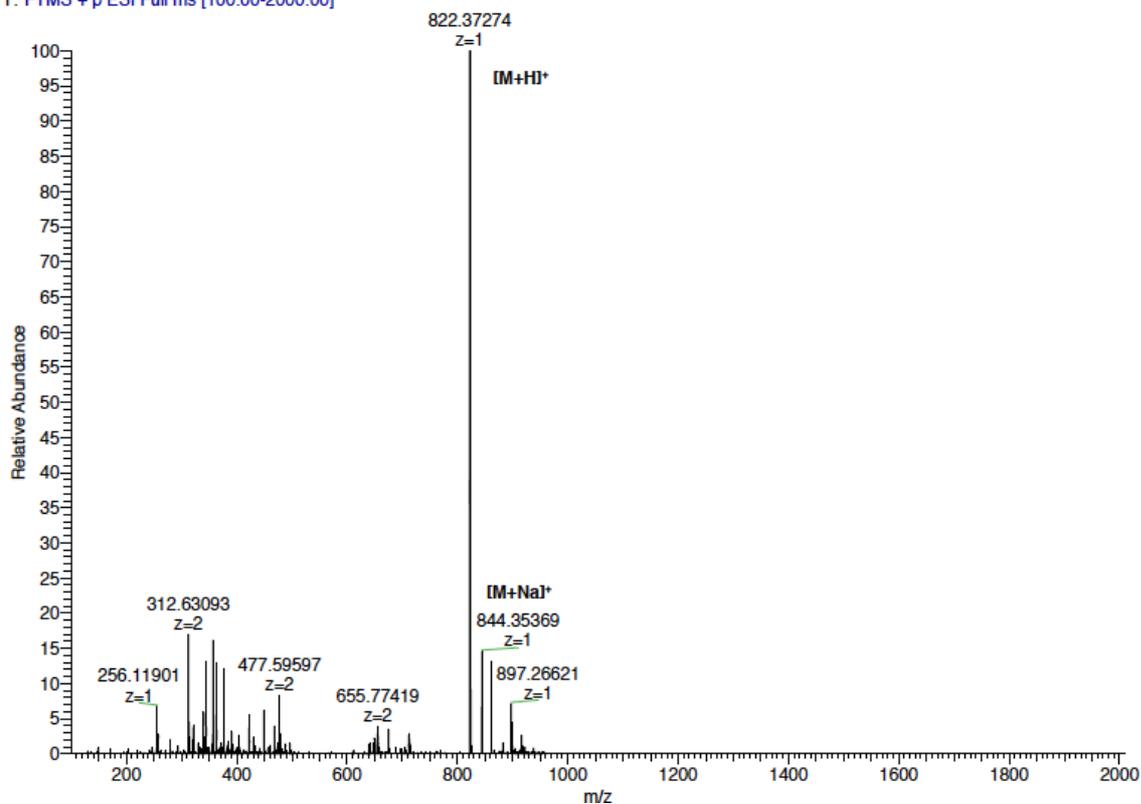


RP-HPLC analysis of (R)-NODAGA-AEEAc-Lys-urea-Glu **51**:



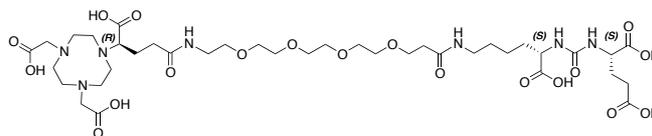
HRMS spectrum of (*R*)-NODAGA-AEEAc-Lys-urea-Glu **51**:

15vg_82_me_2 #3-10 RT: 0.04-0.15 AV: 8 NL: 3.73E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



(R)-NODAGA-PEG₄-Lys-urea-Glu 52:

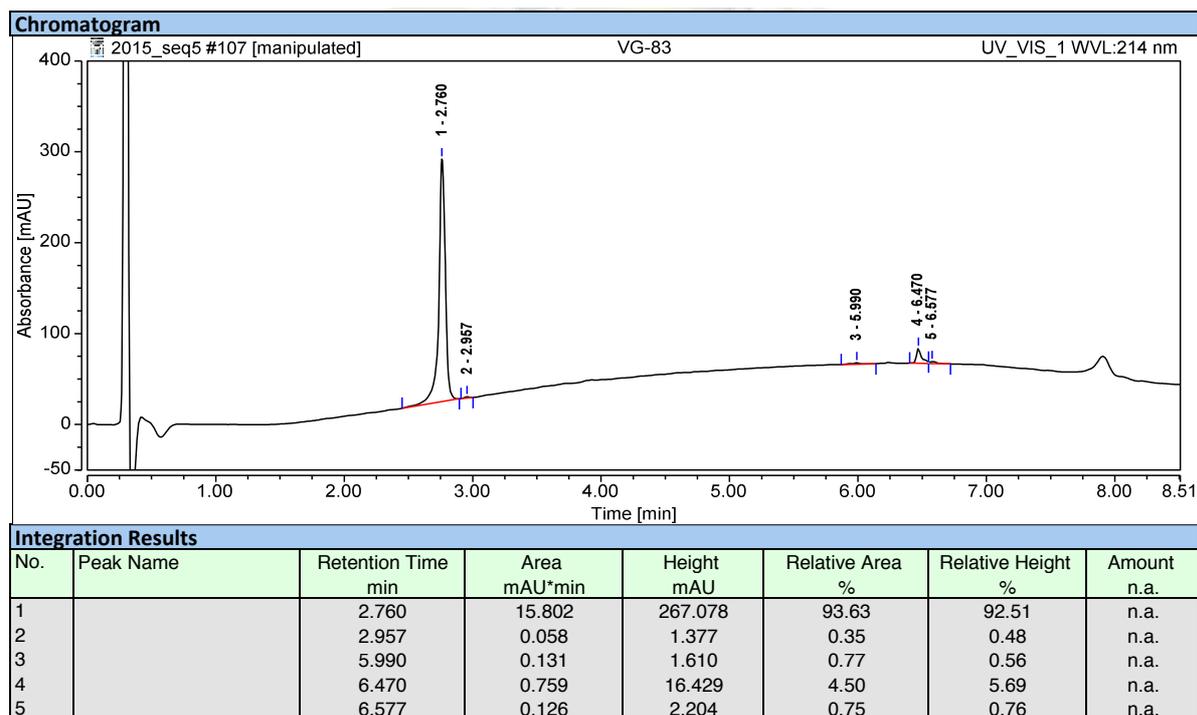
The compound **48** (19.4 mg, 22.6 μmol) was dissolved in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (39.4 μL, 226.0 μmol, 10 eq) was added to the solution. The macrocycle



(*R*)-NODAGA-NHS·HPF₆·TFA (19.9 mg, 27.1 μmol, 1.2 eq) was then added. After stirring during 2 h, at room temperature, DMF was evaporated under reduced pressure. The *tert*-butyl esters were deprotected by addition of a solution TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v). The reaction mixture was stirred at room temperature for about 3 h. Then, the solution was concentrated. The product was precipitated in 10 mL of diethyl ether at 4 ° C, isolated by centrifugation for 10 min at 4000 rpm and 4 ° C, and dried in a desiccator. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product (*R*)-NODAGA-PEG₄-Lys-urea-Glu·3TFA **52** was obtained as a white solid (14.6 mg, 48%, purity: 93%).

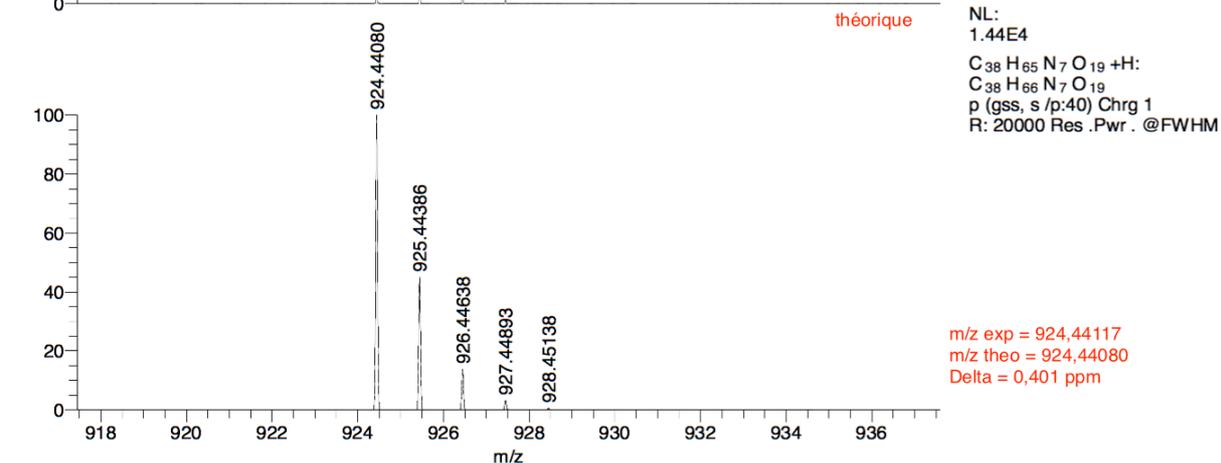
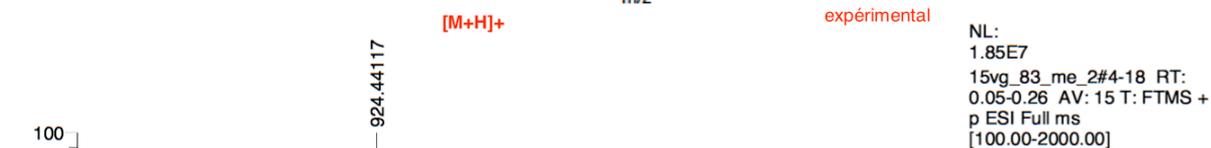
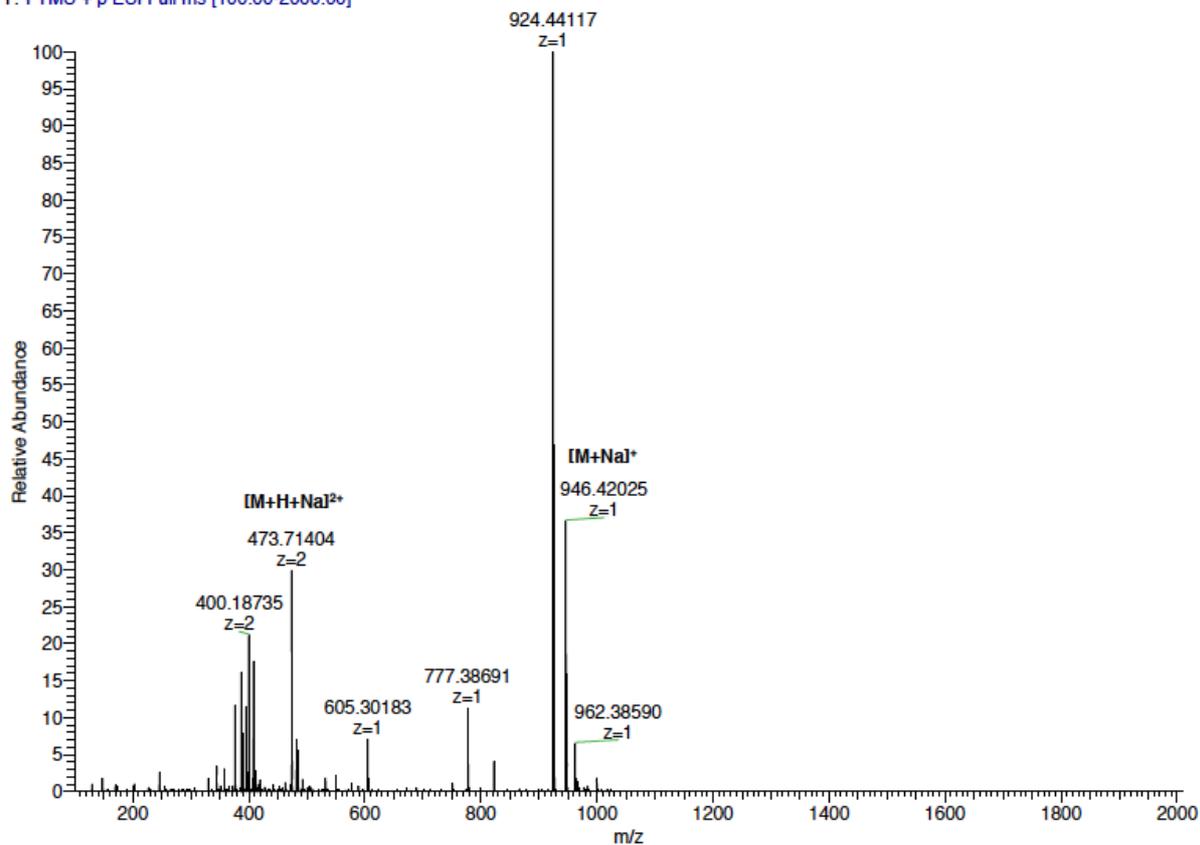
HRMS: C₃₈H₆₆N₇O₁₉⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 924.44080, found: 924.44117.

RP-HPLC analysis of (*R*)-NODAGA-PEG₄-Lys-urea-Glu **52**:



HRMS spectrum of (R)-NODAGA-PEG₄-Lys-urea-Glu **52**:

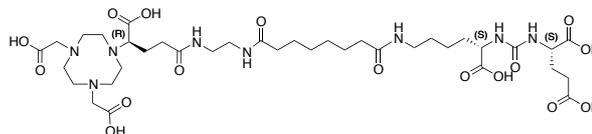
15vg_83_me_2 #4-18 RT: 0.05-0.26 AV: 15 NL: 1.85E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



m/z exp = 924.44117
m/z theo = 924.44080
Delta = 0,401 ppm

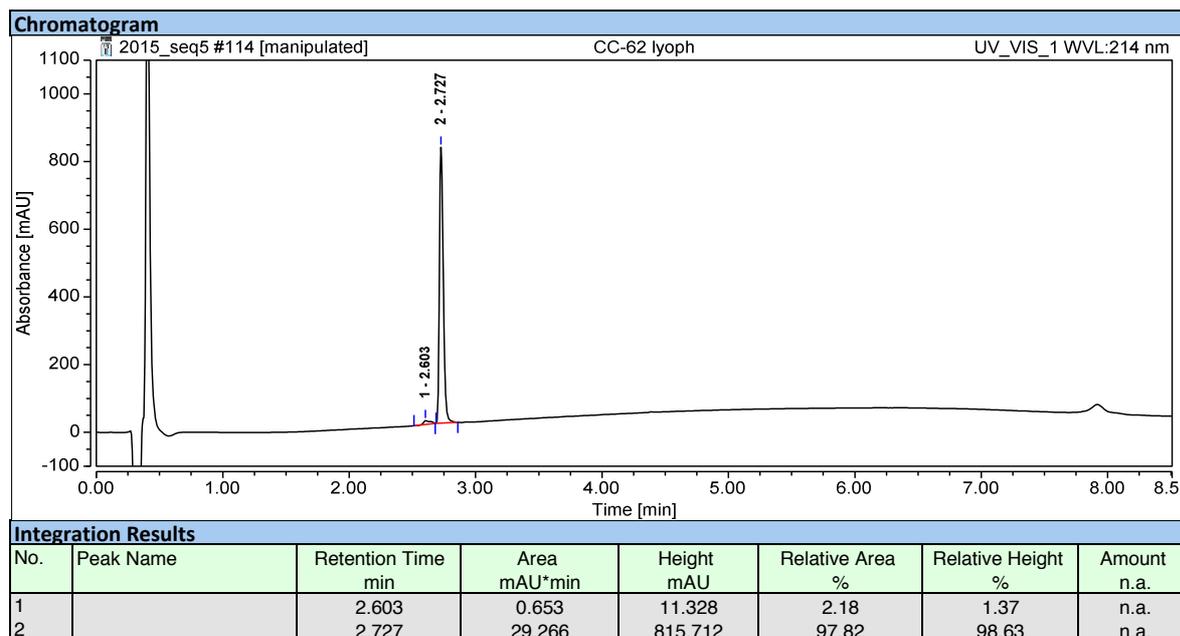
(R)-NODAGA-ethylene diamine-suberoyl-Lys-urea-Glu, 53:

The compound **44** (20.8 mg, 24.3 μmol) was dissolved in anhydrous DMF (1.5 mL) and DIPEA (55.0 μL , 316.5 μmol , 13 eq) was added to the solution. The macrocycle (R)-NODAGA-NH₂·3TFA (19.0 mg, 31.7 μmol , 1.3 eq) was then added. After stirring during 2 h, at room temperature, DMF was evaporated under reduced pressure. The *tert*-butyl esters were deprotected by addition of 2 mL of a solution TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v). The reaction mixture was stirred at room temperature for about 2 h. Then, the solution was concentrated. The product was precipitated in 10 mL of diethyl ether at 4 ° C, isolated by centrifugation for 10 min at 4000 rpm and 4 ° C, and dried in a desiccator. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC. After lyophilization, the product (R)-NODAGA-ethylene diamine-suberoyl-Lys-urea-Glu-3TFA **53** was obtained as a white solid (10.4 mg, 34%, purity: 98%).



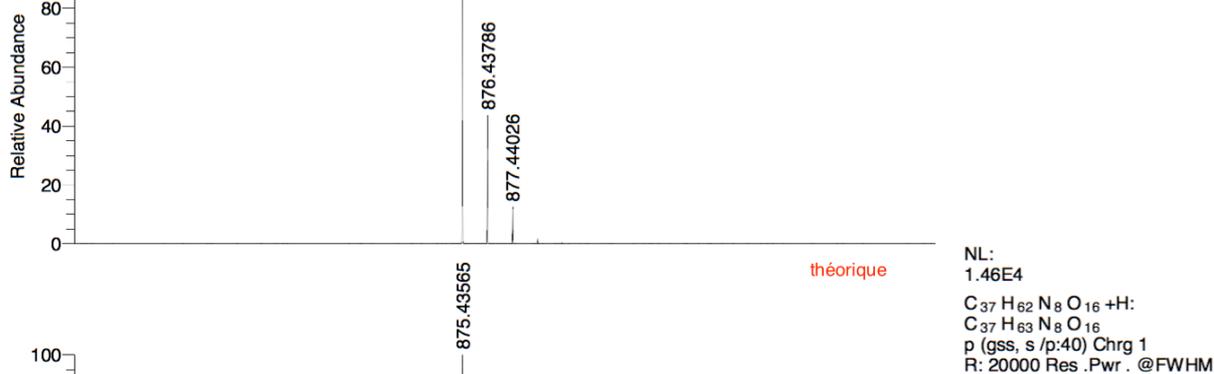
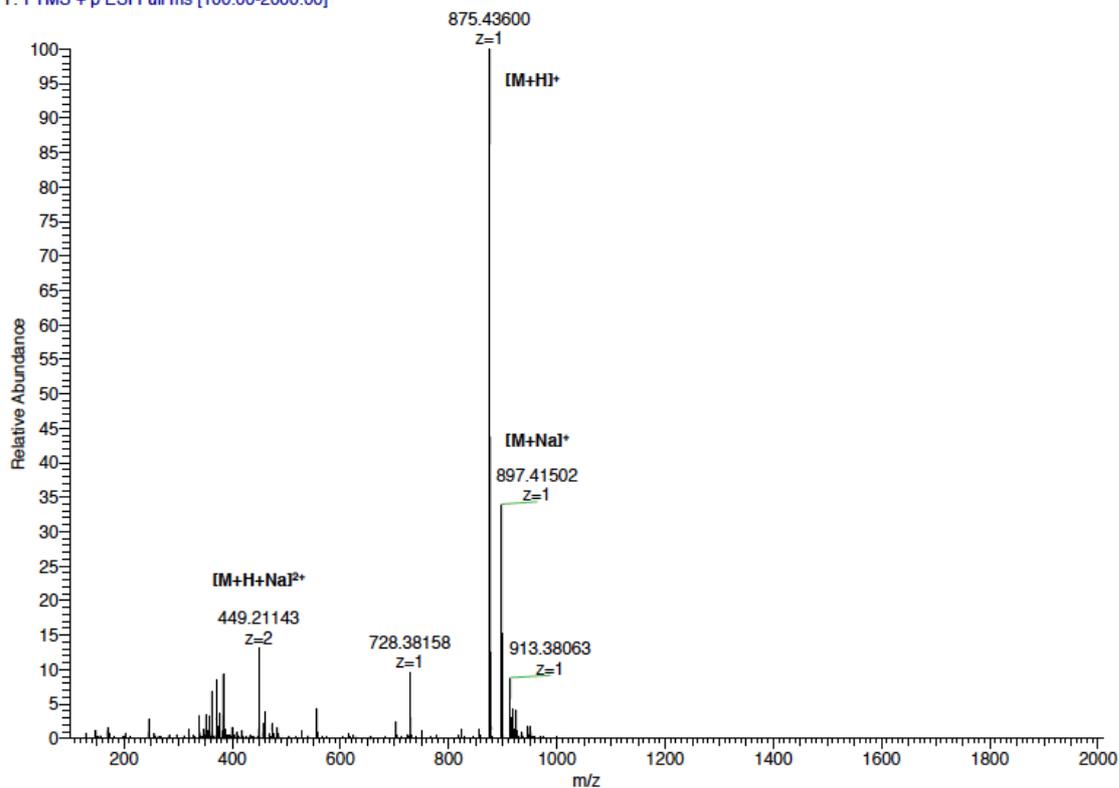
HRMS: C₃₇H₆₃N₈O₁₆⁺ ([M+H]⁺) m/z calculated: 875.43565, found: 875.43600.

RP-HPLC analysis of (R)-NODAGA-ethylene diamine-suberoyl-Lys-urea-Glu **53**:



HRMS spectrum of (*R*)-NODAGA-ethylene diamine-suberoyl-Lys-urea-Glu **53**:

15cc_62_me_1 #9-19 RT: 0.13-0.28 AV: 11 NL: 1.26E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

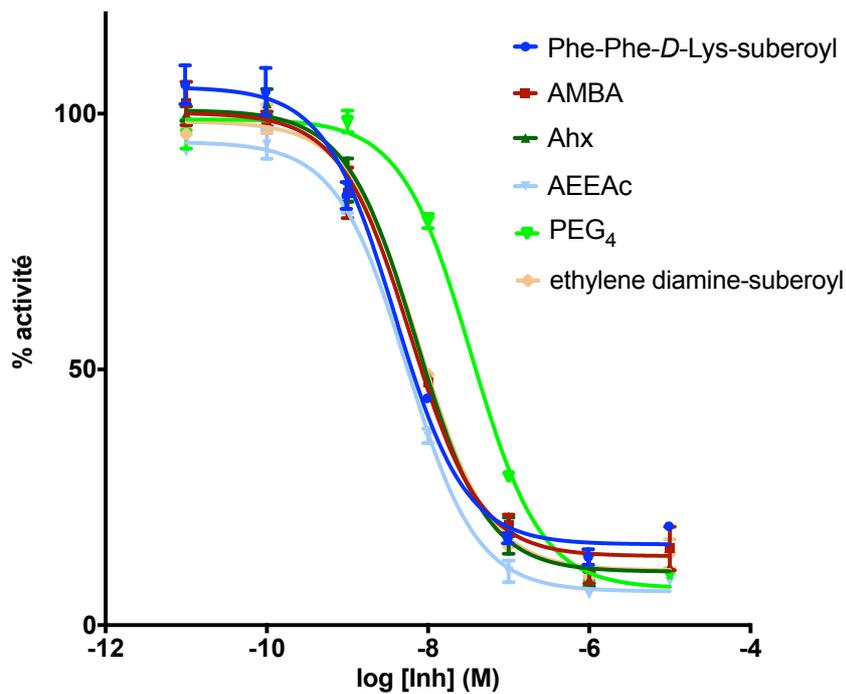


m/z exp = 875.43600
m/z theo = 875.43565
Delta = 0,395 ppm

Inhibition of PSMA enzymatic activity by compounds 49 to 53

Inhibition constants of compounds 49 to 53 were determined by using the enzymatic assay described previously.

Percentage of PSMA enzymatic activity in the presence of different inhibitors (CC34 and compounds 49 to 53). IC₅₀ were determined after non-linear regression analysis, using Prism 6 software (GraphPad):



- *VALORISATION DES RÉSULTATS* -

Publications

- *Site-Specific Near-Infrared Fluorescent Labelling of Proteins on Cysteine Residues with meso-Chloro-Substituted Heptamethine Cyanine Dyes.*

Coline Canovas, Pierre-Simon Bellaye, Mathieu Moreau, Anthony Romieu, Franck Denat, Victor Goncalves

Org. Biomol. Chem. **2018**, 16 (45), 8831 - 8836

- *Site-Specific Dual-Labeling of Proteins on Cysteine Residues with Chlorotetrazines.*

Coline Canovas, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Alexandra Oudot, Mélanie Guillemin, Franck Denat, Victor Goncalves

Angew. Chem. Int. Ed. **2018**, 57 (33), 10646 - 10650

- *(R)-NODAGA-PSMA: A Versatile Precursor for Radiometal Labeling and Nuclear Imaging of PSMA- Positive Tumors.*

Eleni Gourni, Coline Canovas, Victor Goncalves, Franck Denat, Phillippe Meyer, Helmut Maecke
PLoS One, **2015**, 10 (12), e0145755

- *Titanium Imido Complexes Stabilised by Bis(iminophosphoranyl)methanide Ligands : The Influence of N-substituents on Solution Dynamics and Reactivity.*

Adrien Normand, Alexandre Massard, Philippe Richard, Coline Canovas, Cédric Balan, Michel Picquet, Audrey Auffrant, Pierre Le Gendre

Dalton Transactions, **2014**, 43 (40), 15098 - 15110

Brevet

- *Plateforme tétrazine modulaire biocompatible*

Victor Goncalves, Franck Denat, Claire Bernhard, Coline Canovas

FR 17 52451

FR 17 59851

PCT/EP2018/057520

Communications orales

- *Site specific bimodal labeling of proteins on cysteine residues with chlorotetrazines.*

Coline Canovas*, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Alexandra Oudot, Mélanie Guillemin, Franck Denat, Victor Goncalves

Journées des Écoles Doctorales Carnot-Pasteur - Besançon - 2018

Prix Communication décerné par le club jeune de la section régionale de la Société Chimique de France

- *Site specific bimodal labeling of proteins on cysteine residues with chlorotetrazines.*

Coline Canovas*, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Alexandra Oudot, Mélanie Guillemain, Franck Denat, Victor Goncalves

Rencontres en chimie organique biologique - RECOB17 - Aussois – 2018

- *Site specific bimodal labeling of proteins on cysteine residues with chlorotetrazines.*

Coline Canovas*, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Alexandra Oudot, Mélanie Guillemain, Franck Denat, Victor Goncalves

Journées « Fluorescence : de la paillasse à l'utilisation clinique » - Dijon – 2018

- *Innovative tools for the site-specific labeling of proteins for multimodal imaging.*

Coline Canovas, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Franck Denat, **Victor Goncalves***

9th Barrande-Vltava - French-Czech Chemistry Meeting – Strasbourg - 2018

- *s-Tetrazine: a “clickable” platform for the site-specific dual-labeling of proteins.*

Coline Canovas, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Marine Cordonnier, Jessica Gobbo, Alexandra Oudot, Franck Denat, **Victor Goncalves***

Annual Meeting of the European Association of Nuclear Medicine - EANM – Vienne (Autriche) – 2017

- *Synthesis and preclinical evaluation of a ⁶⁴Cu-labeled ligand of the prostate specific membrane antigen (PSMA).*

Coline Canovas*, Eleni Gourni, Franck Denat, Victor Goncalves, Phillip Meyer, Helmut Maecke

Atelier « New chemical and biological tools for targeting in cancer imaging and therapy » organisé par le Cancéropole Grand-Ouest - Vannes – 2016

- *Synthesis and preclinical evaluation of a ⁶⁴Cu-labeled ligand of the prostate specific membrane antigen (PSMA): A promising radiopharmaceutical for prostate cancer imaging.*

Coline Canovas, Eleni Gourni, Franck Denat, **Victor Goncalves***, Phillip Meyer, Helmut Maecke

Medicinal flavor of metal complexes: diagnostic and therapeutic applications - Le Studium - Orléans - 2015

**Le nom de la personne qui a effectué la communication est en gras.*

Communications par poster

- *Site specific bimodal labeling of proteins on cysteine residues with chlorotetrazines.*

Coline Canovas*, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Alexandra Oudot, Mélanie Guillemain, Franck Denat, Victor Goncalves

Young Research Fellows meeting of the SCT - Orléans – 2018

- *s-Tetrazine: a “clickable” platform for the site-specific dual-labeling of proteins.*

Coline Canovas, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Marine Cordonnier, Jessica Gobbo, Alexandra Oudot, Franck Denat, **Victor Goncalves***

Groupement de Recherche : Agents d'imagerie moléculaire - Orléans - 2018

- *Site specific bimodal labeling of proteins on cysteine residues with chlorotetrazines.*

Coline Canovas*, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Alexandra Oudot, Mélanie Guillemin, Franck Denat, Victor Goncalves

Annual Meeting of the European Association of Nuclear Medicine - EANM – Vienne (Autriche) – 2017

- *s-Tetrazine: a “clickable” platform for the site-specific dual-labeling of proteins.*

Coline Canovas*, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Marine Cordonnier, Jessica Gobbo, Alexandra Oudot, Franck Denat, Victor Goncalves

Antibody Industrial Symposium - Tours - 2017

- *s-Tetrazine: a “clickable” platform for the site-specific dual-labeling of proteins.*

Coline Canovas*, Mathieu Moreau, Claire Bernhard, Marine Cordonnier, Jessica Gobbo, Alexandra Oudot, Franck Denat, Victor Goncalves

Journées des Écoles Doctorales - Dijon - 2017

Prix Poster décerné par la section régionale de la Société Chimique de France

- *Synthesis and preclinical evaluation of a ⁶⁴Cu-labeled ligand of the prostate specific membrane antigen (PSMA).*

Coline Canovas*, Eleni Gourni, Franck Denat, Victor Goncalves, Phillip Meyer, Helmut Maecke

International Symposium on Metal Complexes - ISMEC - Dijon – 2017

- *Synthesis and preclinical evaluation of a ⁶⁴Cu-labeled ligand of the prostate specific membrane antigen (PSMA).*

Coline Canovas*, Eleni Gourni, Franck Denat, Victor Goncalves, Phillip Meyer, Helmut Maecke

Young Research Fellows meeting of the SCT - Lille - 2016

- *Synthesis and preclinical evaluation of a ⁶⁴Cu-labeled ligand of the prostate specific membrane antigen (PSMA).*

Coline Canovas*, Eleni Gourni, Franck Denat, Victor Goncalves, Phillip Meyer, Helmut Maecke

Medicinal flavor of metal complexes: diagnostic and therapeutic applications - Le Studium - Orléans - 2015

- *Synthesis and preclinical evaluation of a ⁶⁴Cu-labeled ligand of the prostate specific membrane antigen (PSMA).*

Coline Canovas*, Eleni Gourni, Franck Denat, Victor Goncalves, Phillip Meyer, Helmut Maecke

Conference on Nitrogen Ligands - EuCheMS - Beaune - 2015

**Le nom de la personne qui a présenté le poster est en gras.*

- *REMERCIEMENTS* -

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'équipe Porphyrines, Polyamines, Développement et Applications (P2DA), à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), Unité Mixte de Recherche (UMR 6302) entre l'Université de Bourgogne et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Je tiens tout d'abord à remercier les professeurs Franck Denat et Claude Gros, respectivement directeur de l'ICMUB et responsable de P2DA, pour m'avoir accueillie pendant ces trois ans. Parmi les différents organismes qui m'ont permis d'accomplir ces travaux de recherche, je citerai également l'école doctorale Carnot-Pasteur de l'Université de Bourgogne et son directeur Hans Jauslin.

Avant tout, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie le Pr. Marie-Claude Viaud-Massuard, enseignante-chercheuse à l'Université de Tours et responsable du groupe Innovation moléculaire et thérapeutique, ainsi que le Dr. Cyrille Sabot, chargé de recherche CNRS au laboratoire COBRA de l'Université de Rouen, d'avoir accepté avec enthousiasme de participer à mon jury en tant que rapporteurs. Je remercie le Prof. Tony Lahoutte, directeur du département de médecine nucléaire de l'Hôpital Universitaire de Bruxelles, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Et enfin, j'adresse un grand merci au Pr. Anthony Romieu qui a également accepté de participer à ce jury.

Je remercie chaleureusement le Pr. Franck Denat et le Dr. Victor Goncalves, qui ont respectivement, dirigé et co-dirigé ces travaux et dont j'ai beaucoup apprécié l'encadrement ainsi que l'ambiance de travail qu'ils ont su créer. Je tiens tout particulièrement à exprimer ma gratitude à Victor qui m'a accordé une grande partie de son temps et qui m'a conseillé et guidé sans jamais perdre son enthousiasme et sa motivation durant ces trois années.

Je souhaite remercier tous les collaborateurs et associés qui ont pris part de près ou de loin aux différents projets abordés.

En particulier, j'adresse mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes du Centre régional de lutte contre le cancer G.-F. Leclerc (CGFL) qui m'ont accueillie à maintes reprises et initiée au domaine bien spécifique de la radiochimie. Je cite en particulier le Dr. Bertrand Collin, le Dr. Alexandra Oudot, Camille Drouet et bien évidemment le Dr. Mathieu Moreau. J'aimerais également mentionner les différentes personnes qui ont réalisé les expérimentations animales, Mélanie Guillemain et le Dr. Pierre-Simon Bellaye.

J'aimerais également remercier le département de médecine nucléaire de Freiburg et l'équipe du Pr. Helmut Maecke soutenue par l'organisme Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK). Je citerai en particulier le Dr. Eleni Gourni qui a pris en charge les études in vitro et in vivo indispensables à l'avancée de notre projet sur l'élaboration d'agents de traçage du cancer de la prostate.

J'aimerais aussi remercier le Pr. Carmen Garrido, le Dr. Jessica Gobbo, le Dr. Guillaume Marcion, le Dr. Renaud Seigneuric, Marine Cordonnier et Gaëtan Chanteloup, qui travaillent au sein de l'unité Lipides, Nutrition, Cancer (UMR 866 - LNC) à l'Inserm et avec lesquels nous sommes en collaboration pour un projet qui n'a malheureusement pas pu être développé dans ce mémoire.

Je voudrais remercier la société CheMatech et son directeur Frédéric Boschetti qui m'a généreusement fourni les chélateurs macrocycliques et qui a ainsi rendu possible l'élaboration des différentes sondes radiotraçables.

J'aimerais aussi exprimer toute ma reconnaissance envers les membres de la Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne (PACSMUB) qui ont consacré une partie de leur temps à l'analyse de mes composés. Je pense notamment à Marie-José Penouilh que j'ai très souvent sollicitée pour les analyses par spectrométrie de masse Orbitrap et qui a patiemment résolu nombres des problèmes rencontrés. Je tiens à mentionner également Fanny Chaux et surtout Myriam Heydel qui ont gentiment accepté de réaliser les analyses par chromatographie ionique et GC (même lorsque demandées au dernier moment...), et enfin, Quentin Bonnin, nouvellement arrivé sur la plateforme mais envers lequel je ne me sens pas moins redevable pour autant.

Je remercie encore une fois Mathieu Moreau qui, en plus de m'avoir formé à la manipulation de la radioactivité, a pris le temps de m'expliquer la plupart (pour ne pas dire la totalité !) des techniques et dispositifs que j'ai utilisés afin de mener à bien les différents projets de bioconjugaison. Merci pour le temps que tu as passé avec moi devant la FPLC, l'Orbitrap, le MALDI, les gels d'électrophorèse et j'en passe.

J'adresse un merci tout particulier à Claire Bernhard qui gère les aspects (parfois très complexes) de propriété intellectuelle et qui a effectué un travail impressionnant pour l'écriture et la soumission des brevets.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres de l'ICMUB que j'aurai du mal à tous citer. Je nommerai en particulier Anthony Romieu, personne multitâche qui gère avec succès nombre de choses au laboratoire (merci notamment de faire la veille bibliographique de l'ensemble des thématiques du laboratoire !) et qui m'a fourni les fluorophores cyanines. Je voudrais également remercier Christine Goze qui m'a fourni le BODIPY. Je voudrais aussi remercier Christine Stern pour son efficacité et sa bienveillance, ainsi que l'ensemble des secrétaires. Je citerai également Ewen Bodio, Pierre Legendre, Souheila Amor, Ibai Valverde, Adrien Normand, Marcel Soustelle, Raluca Malacea, Vivek Thakare, David Monchaud, ...

Je souhaite aussi faire part de ma gratitude à tous les stagiaires qui ont synthétisé nombre de précurseurs : Alexis Hervaux, Alex Moerman, Aurélien Gibier, Aymeric Dajnak, Maryne Duval, Véronique Tran, Patrick Désirée, Chloé Pernin, Antonina Bebishina, Mylène Bonnier...

Je voudrais également remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au laboratoire pendant ces trois ans et qui sont passées du rang de collègue à celui d'ami : Jacques, Adrien, Valentin, Marc Pirrotta (merci pour les séances jeux de société, entre autres), Alix, ainsi que mes chers collègues et

amis de bureau/labo/paillasse : Mathieu (va pour une troisième fois !), Laurène (merci pour tes conseils avisés), Emma, Garance, Vivian, Sergei... et Anne (je ne t'ai pas oublié cette fois). Et aussi les loustiques qui se cachent dans les étages de l'ICMUB : Léa, Jojo, Julie, Mathieu, Micka, Robin, Océane, Clève, Floriane, Joaquim, Ben... Ainsi que les générations précédentes qui ont maintenant déserté le navire pour d'autres contrées : Sophie (merci pour les séances de psy), Flo et Baptiste (merci pour les nombreuses soirées passées en votre compagnie).

J'adresse un très gros merci à mes amis de longue date, Faustine, Audrey et Antoine, qui ont parcouru avec moi le long chemin plein d'embûches pour arriver, enfin, jusqu'à ce fameux « +8 ». Faustine, qui fait également partie du clan des déserteurs, mais après plus de douze ans d'amitié, ce n'est pas ça qui changera grand-chose ! Audrey, merci pour ces trois super années, sans toi ça n'aurait pas été pareil.

Je remercie ma famille proche et éloignée, mes tontons et cousins/cousines, ainsi que ma belle-famille. Et bien que les mots ne soient pas nécessaires, je remercie mes parents, toujours présents et de bon conseil. Et en particulier, mon papa qui s'est impliqué à fond et s'est creusé la tête pour essayer de solutionner mes problèmes scientifiques (i.e. cinétique de réactions, etc...) ! Et bien sûr, ma petite Lola, merci pour tout.

Enfin, Vivien, toi qui m'a soutenue, motivée, supportée... pendant toutes ces années, sans jamais défaillir, merci à toi.

Développement de stratégies de bioconjugaison innovantes : application à l'élaboration d'agents d'imagerie moléculaire

Mots clés : Bioconjugaison, imagerie nucléaire, site-spécifique, bimodalité, fluorescence, tétrazine

Résumé : L'élaboration d'agents de ciblage pour le diagnostic du cancer repose sur le couplage d'une molécule imageante à un vecteur, souvent une protéine, capable de cibler spécifiquement les tissus cancéreux. Cette étape de bioconjugaison peut se révéler complexe et très délicate à contrôler. En effet, les protéines vectrices sont constituées d'un grand nombre de fonctions chimiques, potentiellement réactives, qui peuvent interférer lors du greffage. Ces travaux de thèse ont pour finalité l'élaboration de stratégies de bioconjugaison sélective innovantes afin de faciliter la préparation des agents d'imagerie moléculaire.

Nos efforts ont notamment abouti à la mise au point d'une approche simple et efficace permettant la modification d'une protéine par un fluorophore, au moyen d'une réaction de bioconjugaison site-spécifique. Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir des agents fluorescents proche infrarouge en une seule étape.

Nous nous sommes également intéressés à la conception d'agents imageants bimodaux nucléaires/fluorescents vectorisés.

Cette génération de traceurs possède un fort potentiel dans le domaine de l'imagerie médicale. Cependant, leur synthèse requiert le couplage de deux molécules imageantes à la protéine, ce qui rend l'étape de bioconjugaison particulièrement critique. Nous avons répondu à cette problématique par la mise au point de stratégies permettant la double modification site-spécifique de protéines. Les approches développées sont basées sur l'utilisation d'une plateforme trifonctionnelle, la dichlorotétrazine, et sont ainsi très versatiles. Nous avons pu obtenir et tester en préclinique, plusieurs agents imageants bimodaux nucléaires/optiques.

Ce mémoire présente également l'élaboration d'un radiotracer capable de détecter le cancer de la prostate par ciblage spécifique de la PSMA. Les résultats prometteurs obtenus lors de l'évaluation préclinique de ce composé, métallé au cuivre-64, en font un candidat intéressant pour le diagnostic du cancer de la prostate par tomographie par émission de positons chez l'homme.

New site-specific bioconjugation strategies and their application to the development of molecular imaging agents for cancer diagnostic

Keywords: Bioconjugation, site-specific, bimodal imaging, nuclear imaging, fluorescence, tetrazine

Abstract: The preparation of targeted imaging agents suitable for cancer diagnostic involves the coupling of an imaging probe to a vector, generally a protein, able to specifically target cancerous tissues. Unfortunately, this bioconjugation step is often problematic. Indeed, proteins present a large variety of reactive functions that can potentially interfere with the coupling reaction. The purpose of this work is the design of innovative selective bioconjugation strategies that can facilitate the synthesis of molecular imaging agents.

Our research led to the development of a simple and efficient approach allowing the modification of a protein with a fluorophore by using a site-specific bioconjugation reaction. Thanks to this technique, it is possible to obtain near infrared fluorescent agents in a single step.

We also focused our work on the design of bimodal nuclear/fluorescent imaging tracers based on protein vectors.

These bimodal imaging agents show high potential for numerous medical applications. However, their synthesis requires the coupling of two distinct imaging molecules to the protein, which makes the bioconjugation step even more challenging. In this context, we developed different strategies suitable for the site-specific dual-modification of proteins. These approaches are based on a highly modular trifunctional platform, dichlorotetrazine. Several bimodal nuclear/optical imaging agents were obtained and shown convenient *in vivo* diagnostic properties.

This thesis also presents the elaboration of a new PSMA-specific radiotracer able to detect prostate cancer. The promising results obtained during the preclinical evaluation of this compound labeled with copper-64, make it an interesting candidate for the diagnosis of prostate cancer by positron emission tomography in human.