



**HAL**  
open science

# Composés mésoioniques pour la libération contrôlée de médicaments

Judith Baudet

► **To cite this version:**

Judith Baudet. Composés mésoioniques pour la libération contrôlée de médicaments. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASF001 . tel-04383993

**HAL Id: tel-04383993**

**<https://theses.hal.science/tel-04383993>**

Submitted on 10 Jan 2024

**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.

# Composés mésoioniques pour la libération contrôlée de médicaments

*Mesoionic compounds for controlled drug release*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571 : sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Médicaments et Technologies pour la Santé (Université Paris-Saclay, CEA, INRAE)**, sous la direction de **Frédéric TARAN**,  
Chef de service.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 09 Janvier 2023, par

**Judith BAUDET**

## Composition du Jury

Membres du jury avec une voix délibérative

<b>Dominique GUIANVARC'H</b> Professeure, Université Paris-Saclay	Présidente
<b>Vincent AUCAGNE</b> Directeur de recherche, CNRS, Université d'Orléans	Rapporteur & Examineur
<b>Cyrille SABOT</b> Chargé de recherche, CNRS COBRA, Université de Rouen	Rapporteur & Examineur
<b>Mélanie ETHEVE-QUELQUEJEU</b> Professeure, Université Paris-Descartes	Examinatrice

**Titre :** Composés mésoioniques pour la libération contrôlée de médicaments

**Mots clés :** chimie bioorthogonale, cycloaddition, acides nucléiques peptidiques, mésoionique

Récemment, notre laboratoire a développé une réaction bioorthogonale entre des composés mésoioniques, les iminosydnone, et des alcynes tendus. Cette réaction dite de ligation coupure permet la libération contrôlée d'un principe actif par un processus en deux étapes : une cycloaddition [3+2] suivi d'une réaction de rétro Diels-Alder, donnant un produit de ligation et un produit de coupure. L'objectif principal de cette thèse est d'accélérer la cinétique de cette réaction, afin de pouvoir l'utiliser comme outil chimobiologique *in vivo*. Pour cela, une stratégie de reconnaissance moléculaire impliquant deux brins d'acides nucléiques peptidiques (PNA) complémentaires a été développée lors de cette thèse. L'utilisation de PNAs permet l'augmentation significative de la

vitesse de réaction de nos composés, y compris à de faibles concentrations de l'ordre du nM. Une fois la preuve de concept obtenue, des essais de libération de principe actif ainsi que de couplages entre protéines, assistés par le système PNA, ont été développés. Dans une deuxième partie, des essais *in cellulo* et *in vivo* pour une application de diagnostic d'une tumeur par imagerie TEP ont été effectués via un système combinant anticorps, PNA et cycloaddition. Enfin dans une dernière partie, une nouvelle voie de synthèse des iminosydnone a été développée. De nouveaux composés d'intérêt ont été obtenus, présentant des cinétiques de cycloaddition atteignant plus de  $500 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

**Title :** Mesoionic compounds for controlled drug release

**Keywords :** Bioorthogonal chemistry, cycloaddition, peptide nucleic acid, mesoionic

**Abstract :** Recently, our laboratory has developed a bioorthogonal reaction between mesoionic compounds, sydnone-imines, and strained alkynes. This click and release reaction allows for controlled release of a compound of interest through a two steps process: a [3+2] cycloaddition followed by a retro Diels-Alder reaction, leading to a click product and a release product. The main objective of this thesis is to accelerate the reaction kinetic so it can be used as a chemical biology tool *in vivo*. Therefore, a molecular recognition strategy relying on complementary peptide nucleic acids (PNA) has been developed. The use of PNA allows for a significant increase of the reaction kinetic of our compounds, including at low concentrations (nM).

Once the proof of concept was obtained, the PNA-click and release system was investigated for some drug release experiments. Protein coupling assisted by molecular recognition between PNA strands has been developed as well. In the second part of this thesis, *in cellulo* and *in vivo* experiments have been developed with the aim of tumor diagnosis by PET imaging, using a combination of antibody, PNA and click reaction. Finally, a new path of synthesis for new sydnone-imines has been developed. New compounds of interest have been obtained, and with click and release kinetics reaching more than  $500 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

---

# Remerciements

---

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA de Saclay, au sein de l'équipe de Marquage au Carbone-14 (LMC) et ont été financés par l'Université Paris-Saclay.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse Pr. Dominique Guianvarc'h, Dr. Cyrille Sabot, Dr. Vincent Aucagne, Pr. Mélanie Ethève-Quellejeu qui a également suivi l'avancée de mes travaux de thèse au cours de ces trois années, et Pr. Gilles Gasser qui a collaboré à ces travaux de recherche.

Je souhaite remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Dr. Frédéric Taran, qui m'a accordé sa confiance sur des projets de recherche ambitieux. Ce sont trois très belles années à tes côtés, tant professionnellement qu'humainement, où tu as pu me transmettre ta passion pour la chimie et ta motivation contagieuse à chaque nouvelle idée sur un projet.

Je souhaite également remercier mon co-encadrant de thèse, Dr. Davide Audisio, toujours présent pour discuter de chimie ou d'orientation avec moi avec sa joie de vivre et son optimisme habituel.

J'adresse également tous mes remerciements aux personnes avec qui j'ai pu collaborer, notamment Dr. Hervé Volland, Dr. Célestine Mairaville et Anaïs Vogel du SPI, grâce à qui j'ai pu me former sur la manipulation de protéines et d'anticorps. Merci également à Dr. Simon Specklin, Dr. Charles Truillet et Dr. Estelle Porret du SHFJ. Enfin merci à Dr. Arnaud Chevalier de l'ICSN, qui a permis d'obtenir des résultats sur cellules pour mon dernier projet, et toujours disponible pour des explications.

Merci à Dr. Karine Porte, qui a commencé le projet avant mon arrivée et qui m'a transmis toutes ses connaissances et astuces de travail à mon arrivée au laboratoire. Tu as rendu mon début de thèse plus simple, et j'ai adoré te revoir à de multiples occasions.

Merci à tous les doctotants de mon année. Joao, j'espère que tu vas bien profiter de la Suisse, Elise, Max, Sophia, Léa, Hugo. On aura vécu cette expérience ensemble et ça va me faire tout drôle de ne plus vous voir au quotidien. Bon courage et pleins de vœux de réussite pour la suite.

Merci à tous les anciens membres du C14 : Expédite, Victor, Séréna, Minghao, Alex, Diana, Carlotta, pour les bons moments passés avec vous, et les conseils que vous avez pu m'apporter.

Merci à tout le C14 et au lab 13 pour tous les moments passés ensemble à rire, décompresser au Hall of Beer et se soutenir. Merci à Manon, Léa les filles du lab 13, avec qui on aura bien rigolé lors des différents congrès, Guillaume toujours chill et là pour aider à déstresser. Merci à Emilie, qui a repris certains de mes projets et a su les débloquer. Merci aussi aux gars du lab 10 : Alexandre, Augustin et Maxime, merci pour le déménagement, on continuera à fêter ça autour d'une bouteille de vin, Clara, Sarah, ça a été un plaisir de t'encadrer en stage, Maylis, Quentin, Emma, Rémi, Juba, Bouchaib, Sébastien, Appoline et bien-sûr Antoine, qui trouve toujours le temps de prêter une oreille attentive malgré un emploi du temps chargé. Bon courage à tous les thésards, je sais que vous allez gérer.

Merci à toute l'équipe de l'analyse pour leur aide précieuse, David, Amélie, Sabrina et Tim, qui se sont pas mal pris la tête sur mes produits capricieux.

Merci à Chantal et son aide précieuse, bonne retraite bien méritée, à Karen, Cristelle, Goulven et Christophe qui aident à faire tourner ce service où on a connu pleins de bons moments.

Enfin, merci à tout les membres du SCBM que j'ai pu croiser et qui participent à cette super ambiance que nous avons.

Je souhaite remercier ma famille qui m'a toujours soutenu tout au long de mes études.

Enfin, Maxime, mon chéri, cette thèse n'aurait pas été la même sans toi. Tu as su me soutenir pendant ces trois ans de thèse, et me motiver dans les moments les plus durs. Nous avons pu collaborer sur des projets ambitieux, et la thèse nous a rapproché pour le meilleur. J'ai hâte de pouvoir continuer la suite de cette aventure à tes côtés.

---

# Abréviations

---

## A

A	Adénine
AChE	Acétylcholinestérase
ADC	Antibody Drug Conjugate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNmi	micro ARN

## B

BARAC	Biarylazacyclooctynone
BCA	Acide Bicinchoninique
BCN	Bi-cyclooctyne
Bhoc	Benzhydryloxy-carbonyle
Boc	tert-Butoxycarbonyle
BSA	Bovine Serum Albumine
Bz	Benzyle

## C

C	Cytosine
Cbz	Carboxybenzyle
CDI	Carbonyldiimidazole
Cit	Citrulline
coum	Coumarine
Ctx	Cetuximab
CuAAC	Copper Catalysed Azide Alkyne Cycloaddition

## D

DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAR	Drug Antibody Ratio (Ratio drogue anticorps)
DBCO	Aza-Dibenzocyclooctyne
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCE	Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
DIFBO	Difluorobenzocyclooctyne
DIFO	Difluorocyclooctyne
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DoC	Degree of Conjugation (Degré de conjugaison)
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde

DOTA	Dodecane tetraacetic acid
DSC	N,N'-Disuccinimidyl carbonate
<b>E</b>	
E.I.	Erichissement isotopique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EOB	End of Bombardment (Fin de Bombardement)
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor (Recepteur du Facteur de Croissance Epidermique)
EIA	Enzyme Immunassays
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
eq.	équivalent
Et	Ethyle
<b>F</b>	
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceine thioisocyanate
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone
FPySH	Fluoropyridine-thiol
<b>G</b>	
G	Guanine
GP	Groupe protecteur
GPNA	PNA-guanidine
<b>H</b>	
h	heure
HATU	hexafluorophosphate de-N, N-diméthylméthaniminium
HOMO	Highest occupied molecular orbital
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<b>I</b>	
IEDDA d'électrons)	Inverse Electron Demand Diels-Alder (Réaction de Diels-Alder à demande inverse
IgG	Immunoglobuline G
IS	Iminosydnone
Isc	Iminosydnone-coumarine
<b>K</b>	
k	Constante de vitesse
$k_{app}$	Constante de vitesse apparente
$k_{off}$	Constante de dissociation
kDa	Kilo Dalton
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
<b>L</b>	

LC-MS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
Lys	Lysine

## M

MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
Me	Méthyle
MEM	2-Methoxyethoxyméthyle ether
MFCO	Mono-Fluorocyclooctyne
min	minute
MOM	Méthoxyméthyl

## N

n.d.	non déterminé
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCL	Native Chemical Ligation (Liaison chimique native)
NHS	N-Hydroxysuccinimide

## O

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Orn	Ornithine

## P

PABC	<i>p</i> -aminobenzyl carbamate
PABOH	<i>p</i> -aminobenzyl alcool
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	polyéthylène glycol
Ph	Phényle
PET	Positron Emission Tomography
PNA	Peptide Nucleic Acid
PNP	<i>p</i> -nitrophénol

## R

RCY	Radiochemical yield (Rendement radiochimique)
rDa	rétro Diels-Alder
ROS	Espèces réactives de l'Oxygène (Reactive Oxygen Species)

## S

SATA	N-succinimidyl S-acetylthioacetate
SEM	2-(trimethylsilyl)ethoxyméthyl
SHFJ	Service Hospitalier Frédéric Joliot
SPAAC	Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition
SPI	Service de Pharmacologie et Immunoanalyse
SPICC	Strain Promoted Iminosydnone Cycloalkyne Cycloaddition
SPSAC	Strain Promoted Sydnone Alkyne Cycloaddition
S <sub>N</sub> Ar	Substitution Nucléophile Aromatique
Syd	Sydnone



## T

T	Thymine
t.a.	Température ambiante
TBDMS	tert-butyldiméthylsilyle
TBDPhS	tert-butylediphénylsilyle
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCO	<i>Trans</i> -cyclooctène
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par Emission de Positron
Tf	Triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
TFMSA	Acide trifluorométhanesulfonique
THF	Tetrahydrofurane
THP	Tétrahydropyrane
THPTA	tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine
TIPS	Triisopropyl silane
TMS	Triméthylsilyle
TMTH	3,3,6,6-tetraméthylthiaheptyne
Ts	Tosyle
TSTU	N,N,N',N'-Tetraméthyl-O-(N-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate
Tz	Tétrazine

## U

UV Ultra-violet

## V

Val Valine  
VBA Acide Vinylique Boronique

---

# Sommaire

---

<b>Abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>I. La chimie bioorthogonale</b> .....	<b>13</b>
<b>A. Définition</b> .....	<b>13</b>
<b>B. Réactions de ligations bioorthogonales</b> .....	<b>15</b>
1. Condensation de cétones et aldéhydes .....	15
2. Ligation de Staudinger.....	15
3. Cycloadditions [3+2] .....	16
a) CuAAC .....	16
b) SPAAC .....	18
c) Réaction avec d'autres dipôles 1,3 .....	21
d) SPSAC.....	21
3. Cycloadditions [4+2].....	23
<b>C. Réactions de coupures bioorthogonales</b> .....	<b>24</b>
1. Coupures catalysées par des métaux .....	24
2. Réactions photoinduites .....	26
<b>D. Réactions « click and release »</b> .....	<b>27</b>
1. Staudinger « click and release » .....	28
2. <i>Trans</i> -cyclooctène + tétrazine .....	28
3. Click and release avec les iminosydnones (SPICC) .....	33
<b>II. Reconnaissance moléculaire</b> .....	<b>36</b>
<b>A. Définition</b> .....	<b>36</b>
<b>B. Acides Nucléiques Peptidiques (PNA)</b> .....	<b>38</b>
1. Définition.....	38
2. Propriétés .....	38
3. Synthèse et modifications des PNAs .....	39
<b>C. Utilisation des PNAs pour accélérer des réactions</b> .....	<b>41</b>
1. Formation de complexes PNA-ADN .....	41
2. Formation de complexes PNA-PNA .....	47
<b>III. Objectifs du projet de thèse</b> .....	<b>49</b>
<b>Chapitre 1. Reconnaissance moléculaire par les PNAs pour accélérer les réactions de « click and release »</b> .....	<b>51</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>51</b>
<b>A. Objectif du projet</b> .....	<b>51</b>
<b>B. Résultats antérieurs du laboratoire</b> .....	<b>51</b>
1. Conception et voies de synthèse des dérivés PNAs .....	51
2. PNAs synthétisés et étudiés précédemment .....	53

<b>II. Synthèse des composés .....</b>	<b>56</b>
<b>A. Synthèse du synthon azoture-iminosydnone-coumarine I-7. ....</b>	<b>56</b>
<b>B. Synthèse des PNAs.....</b>	<b>57</b>
1. Synthèse des PNA-DBCO .....	58
2. Synthèse des PNA-iminosydnone-coumarine .....	60
<b>III. Etudes cinétiques .....</b>	<b>63</b>
<b>A. Influence de la taille des PNAs sur la cinétique de la réaction SPICC.....</b>	<b>64</b>
1. Etude cinétique des couples de PNAs complémentaires .....	64
2. Témoin négatif .....	67
<b>B. Etudes cinétiques complémentaires .....</b>	<b>68</b>
1. Variation de la structure des partenaires de « click and release » .....	68
<b>IV. Applications biologiques.....</b>	<b>71</b>
<b>A. Tentatives de couplage protéines-protéines .....</b>	<b>71</b>
1. Préparation de conjugués protéine-PNA .....	71
a) Bioconjugué BSA-PNA-iminosydnone.....	71
1) Couplage Lysine – acide activé.....	71
2) Purification et caractérisation des bioconjugués .....	73
b) Bioconjugué BSA-PNA-DBCO .....	74
c) Réaction de « click and release » avec les conjugués BSA-PNA .....	76
1) Avec la BSA-PNA-Iminosydnone-coumarine .....	76
2) Avec le bioconjugué BSA-PNA-DBCO .....	77
d) Tentative de couplage BSA-BSA.....	78
2. Nouvelle stratégie de couplage.....	80
3. Deuxième génération de PNA-DBCO.....	84
4. Troisième génération de PNA-DBCO .....	88
<b>B. Libération contrôlée de principes actifs .....</b>	<b>91</b>
1. Introduction .....	91
a) Choix du principe actif : la doxorubicine .....	92
b) Utilisation de l'espaceur Valine-Citrulline .....	92
c) Objectifs.....	94
2. Synthèse du composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine .....	95
3. Synthèse du PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine .....	98
a) CuAAC.....	98
b) Accroche par couplage peptidique.....	102
4. Conclusion .....	105
<b>V. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>106</b>
<b>Chapitre 2. Utilisation des PNAs pour le préciblage au fluor-18 .....</b>	<b>111</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>111</b>
<b>A. L'imagerie médicale radioactive .....</b>	<b>111</b>
1. Principe de l'imagerie médicale en médecine nucléaire.....	111
2. L'imagerie au fluor-18 .....	112
<b>B. Le préciblage <i>in vivo</i>.....</b>	<b>113</b>
1. Principe du préciblage.....	113
2. Exemples de préciblage.....	114

C.	Objectifs du projet .....	118
<b>II.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>120</b>
A.	Synthèse des réactifs.....	120
1.	Synthèse des PNAs .....	120
2.	Synthèse du bioconjugué Anticorps-PNA.....	123
3.	Radio-marquage au fluor-18 du PNA-DBCO.....	125
B.	Etude du marquage de l'anticorps au fluor-18.....	127
1.	Tests cellulaires .....	127
2.	Etude <i>in vivo</i> .....	129
C.	Conclusion et perspectives .....	134
	<b>Chapitre 3. Synthèse de nouvelles iminosydones par stratégie de <math>S_NAr</math>.....</b>	<b>137</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>137</b>
A.	Les iminosydones et leurs voies de synthèse.....	137
B.	Objectifs du projet .....	140
<b>II.</b>	<b>Exploration de la réaction.....</b>	<b>141</b>
A.	Etude du mécanisme .....	141
B.	Optimisation de la $S_NAr$ .....	142
<b>III.</b>	<b>Synthèse et propriétés des 6-N-aryl-iminosydones par réaction <math>S_NAr</math>.....</b>	<b>148</b>
A.	Etendue de la réaction .....	148
B.	Caractérisation et utilisation de la sonde fluorogénique III-11 .....	150
1.	Propriétés physico-chimiques du composé III-11 .....	150
2.	Expériences sur cellules.....	155
<b>IV.</b>	<b>Synthèse et propriétés de 6-N-dialkyl-iminosydones par réaction <math>S_NAr</math>.....</b>	<b>159</b>
A.	Synthèse des 6-N-dialkyl-iminosydones .....	159
B.	Etude de la réaction de cycloaddition .....	160
C.	Perspectives .....	164
<b>V.</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>165</b>
<b>I.</b>	<b>General information .....</b>	<b>171</b>
<b>II.</b>	<b>Experimental part : Chapitre 1.....</b>	<b>172</b>
A.	Synthetic procedure and analytical data .....	172
B.	Kinetic experiments and physical properties.....	219
<b>III.</b>	<b>Experimental part : Chapitre 2.....</b>	<b>229</b>
A.	Synthetic procedure and analytical data .....	229
B.	Kinetic experiments .....	234
<b>IV.</b>	<b>Experimental part : Chapitre 3.....</b>	<b>235</b>
A.	Synthetic procedure and analytical data .....	235

<b>B. Physical properties and kinetic experiments .....</b>	<b>244</b>
1. Physical properties .....	244
2. Kinetic studies .....	246
<b><i>Bibliographie.....</i></b>	<b>253</b>

---

# Introduction

---

## I. La chimie bioorthogonale

### A. Définition

Comprendre les processus biologiques est un défi scientifique majeur. Pour y parvenir, il est nécessaire d'étudier les biomolécules et leur comportement dans leur environnement natif. La visualisation des biomolécules a été rendue possible par le développement de nombreux outils chimobiologiques permettant une modification structurale spécifique des biomolécules. Notamment, l'ajout d'étiquettes chimiques afin de détecter une biomolécule d'intérêt dans son environnement est une méthode désormais couramment employée. C'est dans ce cadre qu'ont été développées les réactions bioorthogonales.

Le concept de réaction bioorthogonale a été développé en 2003 par la Pr. Carolyn R. Bertozzi<sup>1</sup> ce qui lui a valu d'obtenir cette année le prix Nobel de chimie. Une réaction est dite bioorthogonale si elle peut avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans l'altérer (Figure 1). Elle doit être rapide et sélective vis à vis des multiples fonctionnalités du vivant. Les composés impliqués dans une réaction bioorthogonale doivent donc être non toxiques, de petite taille, stables au pH et à la température physiologiques, et ne réagir qu'entre eux. Il est très important que la réaction soit inerte face aux fonctionnalités existantes *in vivo* et qu'elle ait un rendement élevé. C'est cette bio-inertie qui fait tout l'intérêt de la chimie bioorthogonale.

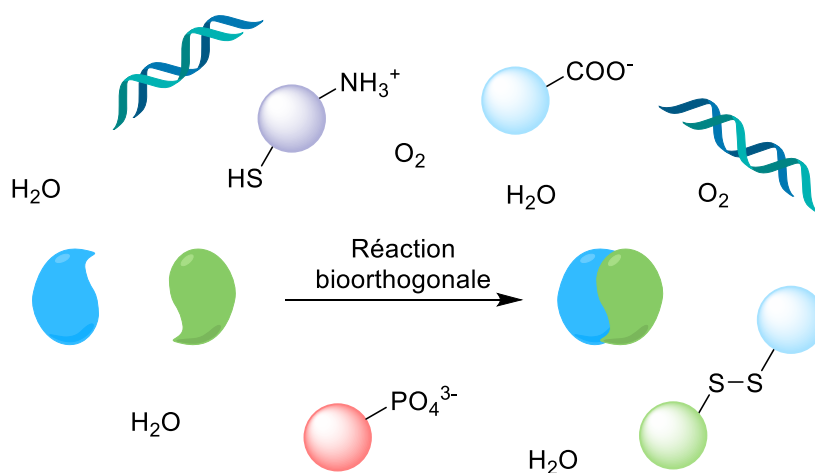


Figure 1. Représentation schématique d'une réaction bioorthogonale dans un milieu biologique

Les réactions bioorthogonales ont initialement été développées pour comprendre les mécanismes fondamentaux du vivant, et leur utilisation s'étend de plus en plus. Elles sont devenues un outil chimobiologique essentiel pour étudier, marquer et modifier les biomolécules. Cette modification sélective des biomolécules a permis de développer de nombreuses applications, notamment pour les domaines du diagnostic et de la thérapie ciblée.

---

<sup>1</sup> H.C.Hang, C.Yu, D.L.Kato, C.R.Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 14846–15851

Les premières réactions bioorthogonales étaient des réactions de ligation permettant la modification sélective de protéines et d'acides aminés.<sup>2</sup> Des réactions bioorthogonales ont ensuite été développées pour marquer différents types de biomolécules et pour libérer des composés d'intérêts sur des cibles spécifiques.

L'un des enjeux de la chimie bioorthogonale est d'avoir des constantes de vitesse élevées, pour que les réactions puissent avoir lieu à très faibles concentrations. Une réaction bioorthogonale fait en général intervenir deux réactifs, sa constante de vitesse est alors d'ordre 2. Il est possible, en connaissant la constante de vitesse d'une réaction et la concentration des réactifs d'estimer la vitesse (Figure 2). La constante de vitesse et la concentration sont deux éléments clés pour évaluer la conversion d'une réaction d'ordre 2. Pour une constante de vitesse de  $k = 5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et une stoechiométrie 1:1, le temps de demi-réaction est de 33 minutes à  $100 \mu\text{M}$ , mais passe à 55 h pour une concentration de  $1 \mu\text{M}$ . Il est donc nécessaire de travailler avec des réactions rapides, en particulier lorsque les concentrations en réactifs sont faibles.

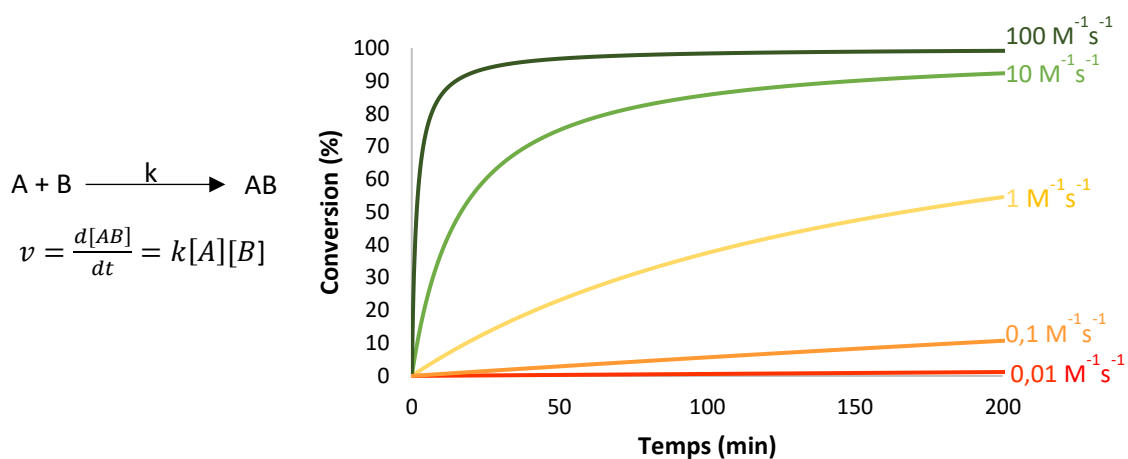


Figure 2. Conversion simulée en fonction du temps pour différentes constantes de vitesse d'ordre 2, à une concentration de  $100 \mu\text{M}$ , stoechiométrie 1:1

En effet, la vitesse est déterminante pour certaines applications, notamment celles ayant lieu *in vivo*. Une meilleure vitesse de réaction permet de travailler à de plus faibles concentrations, évitant ainsi d'utiliser des doses trop importantes de composés potentiellement toxiques dans le corps, comme certains dérivés de principes actifs très puissants. Les concentrations dans le corps des composés sont ainsi diminuées, réduisant leur potentiel effet néfaste. La plupart des biomolécules sont présentes à basses concentrations dans les milieux biologiques, il est donc important de trouver un moyen d'avoir les réactions les plus rapides possibles, en tenant compte des contraintes du vivant.

Il existe 3 grands types de réactions bioorthogonales : les réactions de ligations (souvent appelées « click »), les réactions de coupure et les réactions de ligation/coupure (souvent appelées « click and release »). Les cycloadditions sont parmi les réactions de ligations les plus utilisées dans de nombreuses applications.

Sans vouloir être exhaustifs, nous présenterons dans cette introduction les grands types de réactions bioorthogonales et certaines de leurs applications développées à ce jour. Puis nous

<sup>2</sup> E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974–6998

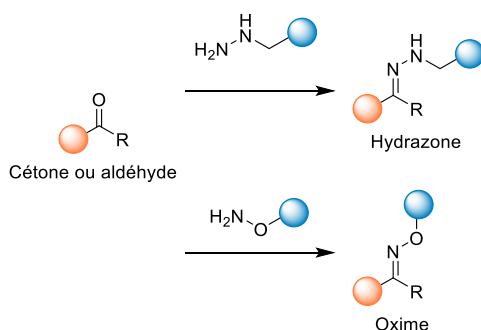
présenterons la reconnaissance moléculaire comme outil chimobiologique, que nous souhaitons utiliser au cours de cette thèse pour améliorer la vitesse des réactions bioorthogonales.

## B. Réactions de ligations bioorthogonales

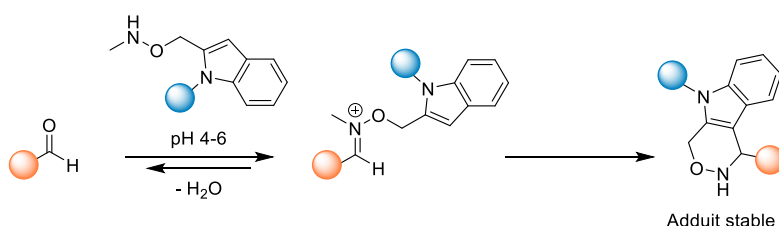
### 1. Condensation de cétones et aldéhydes

Une des premières réactions bioorthogonales développée est la condensation de dérivés carbonyles avec des amines nucléophiles  $\alpha$ . Ces amines sont liées à un hétéroatome en position  $\alpha$ , ce qui les rend plus nucléophiles et permet d'obtenir un produit de condensation plus stable qu'une simple imine. Le produit de condensation est une oxime ou une hydrazone (Schéma 1).

*Condensation entre un carbonyle et une hydrazine ou alcoxy-amine*



*Ligation de Pictet-Spengler*



*Schéma 1. Réaction de condensation entre un carbonyle et une amine nucléophile*

Ces réactions sont intéressantes et sont encore largement employées. Cependant, elles présentent un certain nombre de points faibles qui limitent leurs applications : les cinétiques sont très lentes ( $k$  de l'ordre de  $10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), le pH optimum est acide (pH 5-6), la bioorthogonalité des cétones et aldéhydes n'est pas totale et la liaison oxime ou hydrazone n'est pas totalement stable et peut subir une hydrolyse lente. Ce dernier point a été amélioré par le développement de ligation de Pictet-Spengler par le groupe de Bertozzi.<sup>3</sup> L'adduit formé, résultant d'une attaque intramoléculaire du noyau indole sur l'alkoxyimininium formé suite à l'addition de l'alkoxyamine sur l'aldéhyde, est alors stable et ne s'hydrolyse pas.

### 2. Ligation de Staudinger

La réaction de Staudinger fut reportée pour la première fois en 1919 par Staudinger et Meyer.<sup>4</sup> Elle permet de réduire un azoture en amine : une phosphine s'additionne sur un azoture pour former un iminophosphorane, celui-ci est ensuite hydrolysé pour donner l'amine correspondante. La ligation de

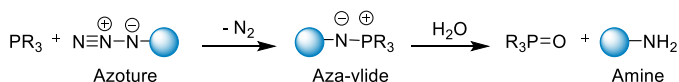
<sup>3</sup> P. Agarwala, J. van der Weijdena, E. M. Slettena, D. Rabuka and C.R. Bertozzi, *P.N.A.S.*, **2013**, 110, 46–51

<sup>4</sup> H. Staudinger, J. Meyer, *J. Helv. Chem. Acta* **1919**, 2, 635

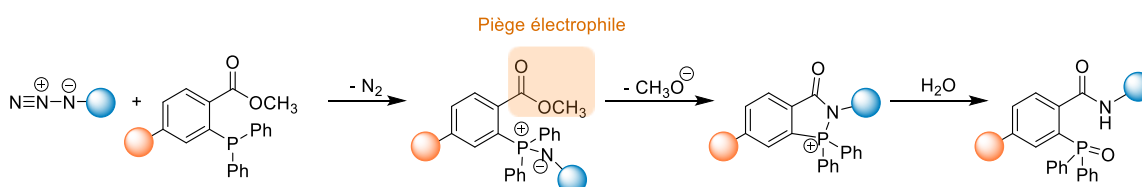


Staudinger est une variation de la réaction de Staudinger, dans laquelle la phosphine utilisée possède un piège électrophile.<sup>5</sup> L'intermédiaire aza-ylure formé réagit avec ce piège électrophile intramoléculaire et une liaison amide est formée, de manière bioorthogonale (Schéma 2). Une version améliorée (dite « traceless ») a été développée plus tard permettant d'éviter d'avoir l'oxyde de phosphine lié au produit de ligation.<sup>6</sup>

a) Réaction de Staudinger



b) Ligature de Staudinger



c) "Traceless" Staudinger

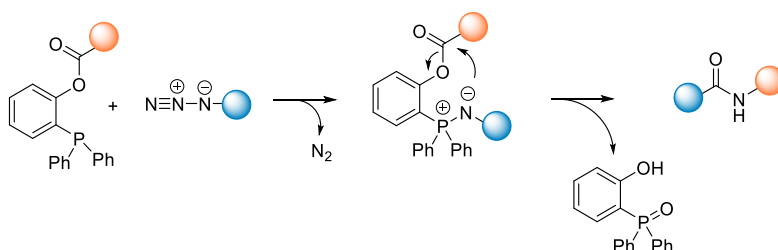


Schéma 2. Réaction de Staudinger et Ligature de Staudinger

Cette réaction semble avoir une grande bioorthogonalité et a montré son efficacité même dans des milieux biologiques très complexes. Deux défauts importants limitent toutefois son emploi : la sensibilité de la phosphine à l'oxydation et la lenteur de la réaction ( $k$  de l'ordre de  $10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

### 3. Cycloadditions [3+2]

Les cycloadditions [3+2], concept introduit dans les années 60 par Rolf Huisgen<sup>7</sup> (Figure 3), sont un type de cycloadditions très répandu. Cette cycloaddition implique un dipôle 1,3 et un dipolarophile. Ce type de réaction est a priori très rare dans la nature et a donc suscité un grand intérêt dans le développement de réactions bioorthogonales.

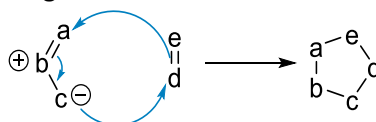


Figure 3. Cycloaddition [3+2]

a) CuAAC

La cycloaddition [3+2] entre un azoture et un alcyne terminal formant un triazole a été étudiée par Huisgen dès les années 60. Cette réaction nécessitait des conditions drastiques de chauffage prolongé

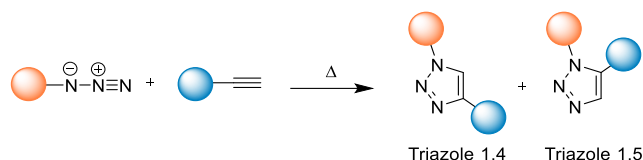
<sup>5</sup> E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007

<sup>6</sup> E. Saxon, J. I. Armstrong, and C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 14, 2141–2143

<sup>7</sup> R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604–637

et n'était pas stéréosélective générant un mélange de composés (triazoles 1,4 et 1,5) (Schéma 3). En 2002, Sharpless et Meldal ont chacun rapporté l'utilisation de sels de cuivre (I) comme catalyseur pour la formation régiosélective d'un seul triazole (régiosomère 1,4) à température ambiante (Schéma 3). Cette réaction se nomme Copper-catalyzed azide-alkyne 1,3 dipolar cycloaddition (CuAAC)<sup>8, 9</sup> et permet de s'affranchir des contraintes thermiques. L'utilisation du cuivre comme catalyseur augmente considérablement la vitesse de réaction de sept ordres de grandeur. Cette découverte est à l'origine du Prix Nobel de chimie attribué à Sharpless et Meldal cette année.

Cycloaddition thermique



Cycloaddition catalysée par le cuivre

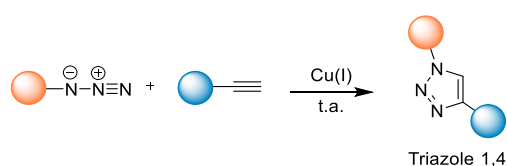


Schéma 3. Cycloaddition 1,3 dipolaire azoture-alcyne

Le mécanisme de la CuAAC a longtemps fait débat, mais en 2013 l'équipe de Fokin a montré que le cycle catalytique faisait intervenir deux atomes de cuivre qui se coordonnent avec l'alcyne ainsi qu'un des azotes de l'azoture (Schéma 4).<sup>10</sup>

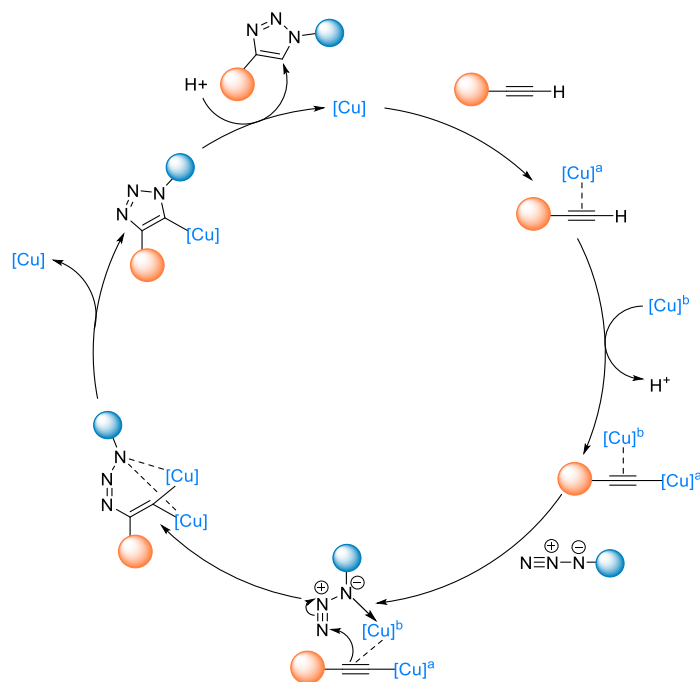


Schéma 4. Mécanisme de la CuAAC

La stabilité du cycloadduit, les conditions douces de réaction, ainsi que la régiosélectivité induite par la catalyse au cuivre rendent la réaction de CuAAC efficace pour de potentielles applications en

<sup>8</sup> C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064

<sup>9</sup> V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599

<sup>10</sup> B. T. Worrell, J. A. Malik, and V. V. Fokin, *Science*, **2013**, 340, 6131, 457–460

biologie. Mais le cuivre induit aussi un certain nombre de limitations, particulièrement dans le cadre d'applications biologiques sur des cellules et *in vivo*. En effet, il contribue à la formation d'espèces actives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) capables d'oxyder et de dénaturer les constituants du milieu biologique (ADN, acides aminés, protéines, bases nucléiques...).

De nombreux efforts ont été déployés pour limiter les contraintes liées à la toxicité du cuivre. Des ligands spécifiques du cuivre ont été développés afin de diminuer la charge catalytique de cuivre et donc sa toxicité. Les ligands développés chélatent les ions cuivre (I) et diminuent sa capacité à former des espèces oxydantes actives tout en augmentant son activité catalytique pour la CuAAC. Les ligands développés en majorité ces dernières années comportent des hétérocycles azotés capables de complexer le cuivre, en particulier des structures azotées tridentates contenant des triazoles (Figure 4).<sup>11</sup>

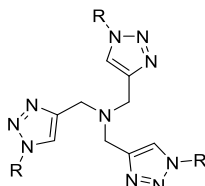


Figure 4. Structure générale des ligands du cuivre les plus utilisés

La source de cuivre (I) utilisée peut grandement varier.<sup>12</sup> Il est possible soit d'introduire directement des sels de cuivre (I) dans le milieu, soit d'en former *in situ* à partir de cuivre (II). L'utilisation de cuivre (II) en présence d'un réducteur comme l'ascorbate de sodium dans un milieu eau/alcool est la plus courante car elle permet de s'affranchir du contrôle de l'atmosphère et est compatible avec la plupart des biomolécules.<sup>9</sup> Les constantes de vitesse pour la CuAAC sont comprises entre 10 et 100 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> selon le système catalytique utilisé pour des concentrations en cuivre de l'ordre de 100 μM.<sup>13</sup>

Cependant, malgré de nombreux efforts accomplis pour rendre cette réaction biocompatible, des inconvénients subsistent. Le cuivre même en quantité catalytique reste toxique et l'efficacité de la CuAAC sur cellules peut varier selon les complexes utilisés.<sup>14</sup> La CuAAC présente des contraintes, notamment de toxicité et de stabilité des complexes de cuivre, difficiles à totalement surmonter pour une utilisation *in vivo*. Cependant, elle est extrêmement utilisée en chémobiologie notamment pour synthétiser des bioconjugués. C'est une réaction très pratique pour coupler des composés chimiques et biologiques complexes, de manière efficace, rapide et sélective. Elle est par exemple fréquemment utilisée pour greffer des composés d'intérêt sur un anticorps.<sup>15</sup>

#### b) SPAAC

Pour rendre la cycloaddition azoture/alcyne plus biocompatible, l'alcyne peut être activé autrement que par catalyse métallique. Il peut être cyclique (principalement dérivé du cyclooctyne), ce qui le rend beaucoup plus réactif qu'un alcyne vrai, à cause de sa tension de cycle. La réaction qui a lieu est alors appelée Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition (SPAAC). Cette réaction, promue par la tension de cycle du cyclooctyne, a été développée initialement avec des azotures comme dipôles 1,3 (Schéma 5).<sup>16</sup>

<sup>11</sup> T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6, 17, 2853–2855

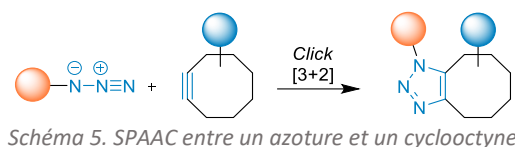
<sup>12</sup> E. Haldón, M. C. Nicasio and P. J. Pérez, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 9528–9550

<sup>13</sup> S. I. Presolski, V. Hong, S. Cho, and M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 41, 14570–14576

<sup>14</sup> D.C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester and J.P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 17993–18001

<sup>15</sup> E. C. Vatansever, J. Kang, A. Tuley, E. S. Ward, W. R. Liu, *Bioorg Med Chem.* **2020**, 28, 115808–115814

<sup>16</sup> N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047



Cette réaction utilisant des alcynes tendus permet de s'affranchir de l'ajout de cuivre en milieu biologique, mais la réaction s'est avérée très lente avec les premiers cyclooctynes développés ( $k$  de l'ordre de  $10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Différents dérivés de cyclooctynes ont ensuite été étudiés pour améliorer leur réactivité dans cette réaction, et tenter d'avoir une cinétique comparable à une CuAAC.<sup>17, 18</sup> La première génération de cyclooctynes étaient aliphatiques. Des groupes électroattracteurs ont été ajoutés à proximité de la fonction alcyne, et plus particulièrement un atome de Fluor en position alpha de la triple liaison du cyclooctyne, ce qui a permis d'augmenter la cinétique de la cycloaddition. La deuxième génération de cyclooctynes implique des dérivés de dibenzocyclooctynes (DBCO), comportant deux benzènes fusionnés au cyclooctyne. Ces composés sont encore plus réactifs, ce qui peut s'expliquer par la présence de carbones  $\text{sp}^2$  dans le cycle à 8 chaînons, le tendant d'autant plus et augmentant sa réactivité. Un équilibre doit cependant être trouvé entre la réactivité des cyclooctynes et leurs stabilités. En effet, le biarylazacyclooctynone (BARAC) est beaucoup plus rapide dans les réactions de click mais n'est pas très stable et se dégrade assez rapidement en présence de nucléophiles. Des composés encore plus réactifs comme le et le 3,3,6,6-tetraméthylthiaheptyne (TMTH), donnent des cinétiques élevées mais peuvent se dégrader rapidement à température ambiante (Figure 5).<sup>19</sup>

Au final, l'un des meilleurs compromis réactivité/stabilité est probablement celui trouvé avec le DBCO qui permet d'obtenir une cinétique de l'ordre de  $0,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  pour la réaction SPAAC ce qui représente une nette amélioration des premiers systèmes décrits.

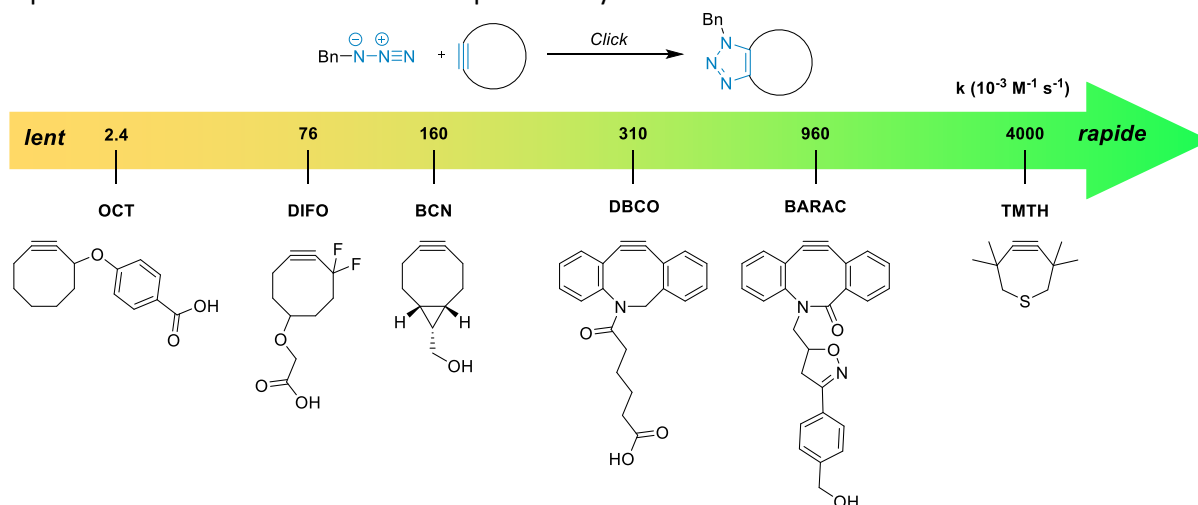


Figure 5. Influence de la structure des cyclooctynes sur la cinétique de la réaction de SPAAC

La réaction de SPAAC a été utilisée de nombreuses fois *in vivo* que ce soit pour des applications de détection ou à des fins thérapeutiques. La petite taille du groupement azoture facilite son incorporation dans des molécules sans modifier leur mécanisme d'action. Par exemple, un sucre peut être modifié par un groupement azoture et être toujours reconnu par les enzymes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides. L'ingénierie métabolique permet la modification de cellules par des groupements chimiques spécifiques. Des biomolécules comme des sucres ou des acides aminés sont modifiés avant d'être métabolisés par la cellule, qui présente alors une fonction chimique pouvant

<sup>17</sup> S. Bernard, R. A. Kumar, K. Porte, P. Thuéry, F. Taran and D. Audisio, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2000–2008

<sup>18</sup> J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374, 16–36

<sup>19</sup> G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 2493–2497

réagir dans des réactions de chimie click.<sup>20</sup> La réaction de SPAAC a été très utilisée en glycoingénierie. En modifiant des sucres par une fonction azoture, il est possible de fonctionnaliser la surface de la cellule avec des azotures. Le pseudo-sucré est additionné au milieu de culture de cellules cancéreuses, incorporé par celles-ci et utilisé dans la biosynthèse des nombreux polysaccharides présents à la surface des cellules. Ainsi, la fonction azoture se retrouve présente partout à la surface des cellules tumorales et peut être utilisée pour cliquer divers cyclooctynes soit à des fins de détection (DBCO fluorescents par exemple) soit à des fins thérapeutiques (DBCO couplé à un toxique par exemple).

Parmi les nombreux exemples d'utilisation de la SPAAC à des fins thérapeutiques, nous pouvons citer le travail du groupe du Dr. Kim qui a évalué la vectorisation de nanoparticules *via* une approche de glycoingénierie.<sup>21</sup> Après avoir généré des cellules tumorales décorées par des fonctions azotures en suivant l'approche mentionnée ci-dessus, un liposome greffé à un DBCO a été introduit dans la culture cellulaire. Le liposome étant toxique pour la cellule tumorale, une mort cellulaire est observée après réaction SPAAC entre le liposome-DBCO et les fonctions azotures décorant les cellules tumorales (Schéma 6). Ce concept a été validé *in vitro* mais aussi *in vivo* sur un modèle de souris xénotransplantées.

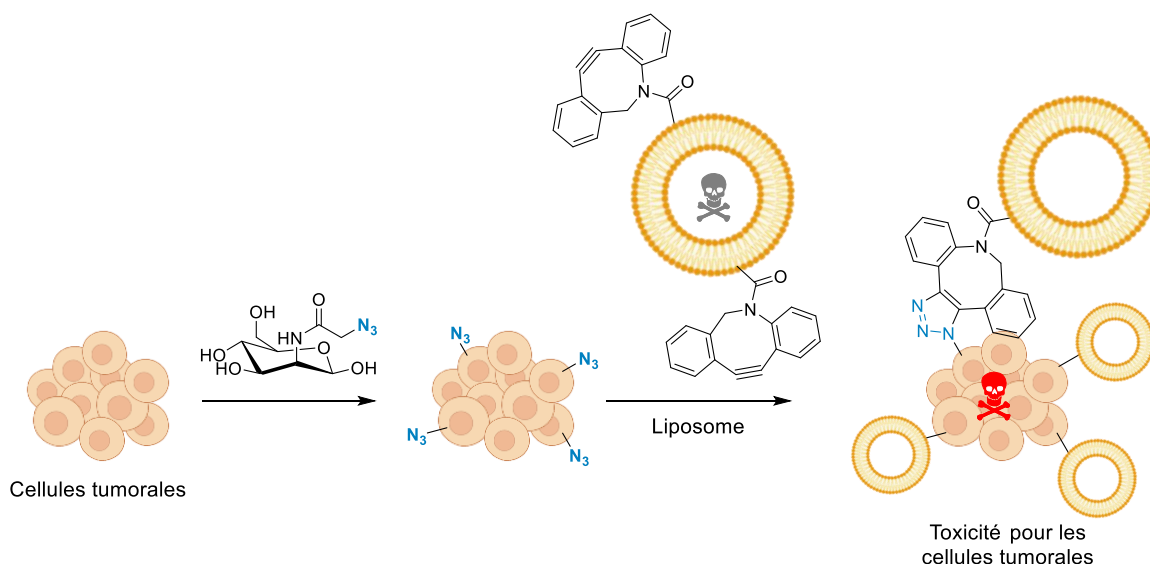


Schéma 6. Réaction de SPAAC pour une utilisation thérapeutique grâce à de la glycoingénierie

La bioorthogonalité entre le DBCO et l'azoture, et leur relative inertie vis-à-vis des fonctions du vivant donne une grande spécificité à la réaction, nécessaire pour ce type d'applications biologiques.

Pour une meilleure maîtrise de l'action des composés, un double contrôle bioorthogonal est souvent recherché. Le groupe du Dr. Brudno a marqué un tissu *in vivo* avec un azoture, puis relié celui-ci par une réaction de SPAAC à un DBCO, lui-même relié à de la doxorubicine par un linker photoclivable. La prodrogue est ainsi amenée spécifiquement dans la zone souhaitée grâce à la réaction de SPAAC. Elle est ensuite libérée uniquement sous l'action d'une longueur d'onde spécifique (Schéma 7).<sup>22</sup>

<sup>20</sup> Y. Takayama, K. Kusamori and M. Nishikawa, *Molecules*, **2019**, 24, 172–192

<sup>21</sup> H. Koo, S. Lee, J. H. Na, S. H. Kim, S. K. Hahn, K. Choi, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11836–11840

<sup>22</sup> S. Palvai, C. T. Moody, S. Pandit, and Y. Brudno, *Mol. Pharmaceutics* **2021**, 18, 10, 3920–3925

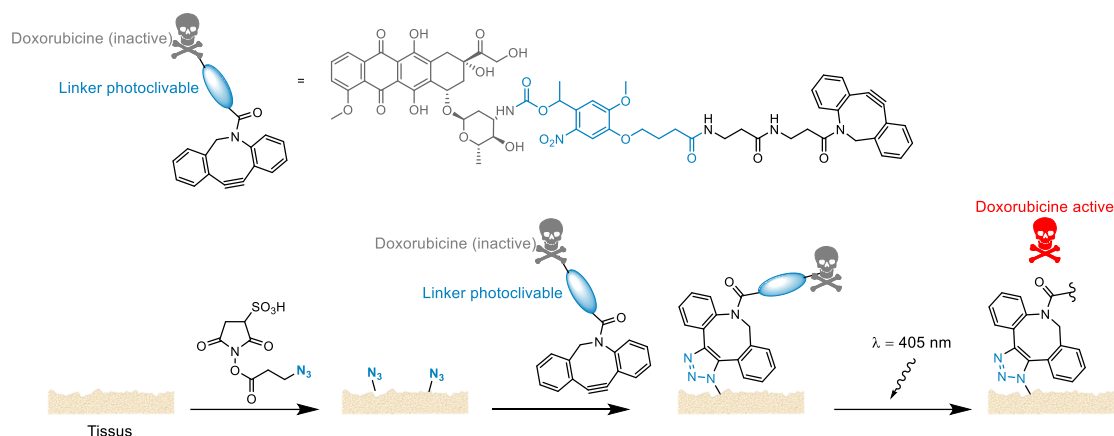


Schéma 7. Réaction de SPAAC pour la libération photocontrôlée de doxorubicine

### c) Réaction avec d'autres dipôles 1,3

D'autres dipôles ont par la suite été testés comme des oxydes de nitriles<sup>23</sup>, des diazocarbonyles<sup>24</sup> ou des nitrones<sup>25,26</sup> (Figure 6). Ces composés ont des cinétiques de cycloadditions similaires ou plus rapides que les azotures (cas des oxydes de nitriles). Cependant, les oxydes de nitriles doivent être générés *in situ* car très instables et les nitrones et composés diazo ont des stabilités modérées dans les milieux biologiques.

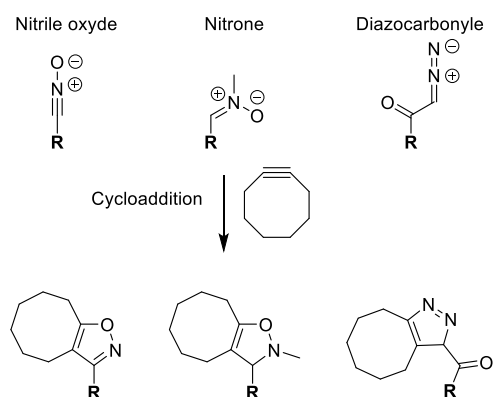


Figure 6. Autres dipôles pour cycloaddition

### d) SPSAC

Des résultats antérieurs du laboratoire ont montré qu'il était possible de réaliser des réactions de click impliquant des composés mésoioniques.<sup>27</sup> Un composé mésoionique est un dipôle hétérocyclique, dans lequel la charge positive et la charge négative sont délocalisées. Il ne peut pas être représenté par une forme mésomère neutre. Les sydnones, sydnones imines (aussi appelées iminosydnones), les münchnones et les carbènes mésoioniques sont des composés mésoioniques (Figure 7).

<sup>23</sup> B. C. Sanders, F. Friscourt., P. A. Ledin, N. E. Mbua, S. Arumugam, J. Guo, T. J. Boltje, V. V. Popik, G. J. Boons., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 949–957

<sup>24</sup> K. A. Andersen, M. R. Aronoff, N. A. McGrath, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 2412–2415

<sup>25</sup> C. S. McKay, J. Moran, J. P. Pezacki, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 931–933

<sup>26</sup> Y. Li and H. Fu, *ChemistryOpen* **2020**, 9, 835–853

<sup>27</sup> L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuyper, C. Créminon, D. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych and F. Taran, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 9376–9378

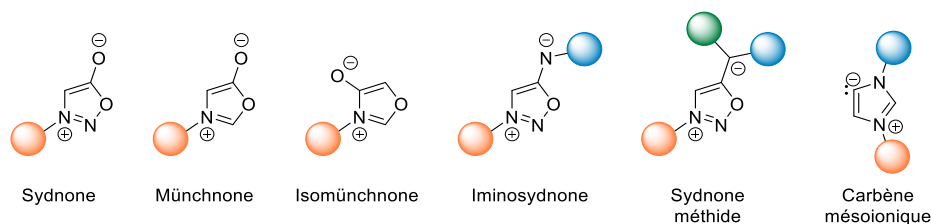


Figure 7. Exemples de différents composés mésoioniques

Les composés mésoioniques, comme les sydnones, ont une numérotation des atomes du cycle spécifique, et présentent cinq formes mésomères différentes (Figure 8).

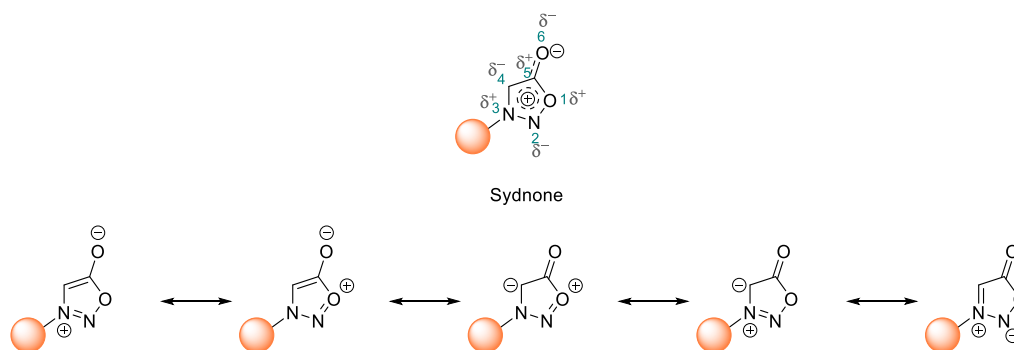


Figure 8. Différentes formes mésomères des sydnones

Les sydnones sont des composés mésoioniques intéressants pour des réactions de click avec des alcynes terminaux catalysées par du cuivre dans des réactions similaires à elles de la CuAAC.<sup>28</sup>

Cependant, les quantités de cuivre nécessaires sont trop importantes pour être réellement biocompatibles. Une version sans cuivre, utilisant des cyclooctynes a donc été développée par le groupe de Chin<sup>29</sup> et par notre groupe.<sup>27</sup> Cette réaction, appelée Strain Promoted Sydnone Alkyne Cycloaddition (SPSAC), implique des aryl-sydnones et des cyclooctynes, formant un composé cyclooctane-pyrazole *via* une cycloaddition [3+2] (Schéma 8).

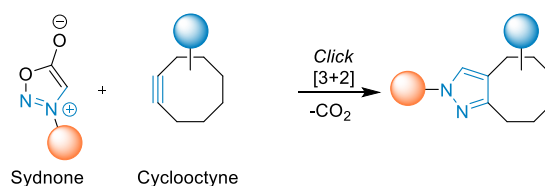


Schéma 8. Click entre une sydnone et un cyclooctyne

Des modifications sur les sydnones ont été effectuées pour améliorer la cinétique de cette réaction.<sup>27</sup> La modification en position C4 de la sydnone par des halogènes a un effet considérable, les sydnones réagissant le plus rapidement étant les fluoro-sydnones (Figure 9).<sup>30</sup>

<sup>28</sup> S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M. C. Nevers, C. Creminon, F. Taran, *Angew.Chem. Int. Ed.* **2013**, 52,12056–12060

<sup>29</sup> S. Wallace and J. W. Chin, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1742–1744

<sup>30</sup> H. Liu, D. Audisio, L. Plougastel, E. Decuyper, D. Buisson, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, M. Elhabiri, A. Krzyczmonik, S. Forsback, O. Solin, V. Gouverneur and F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 12073–12077

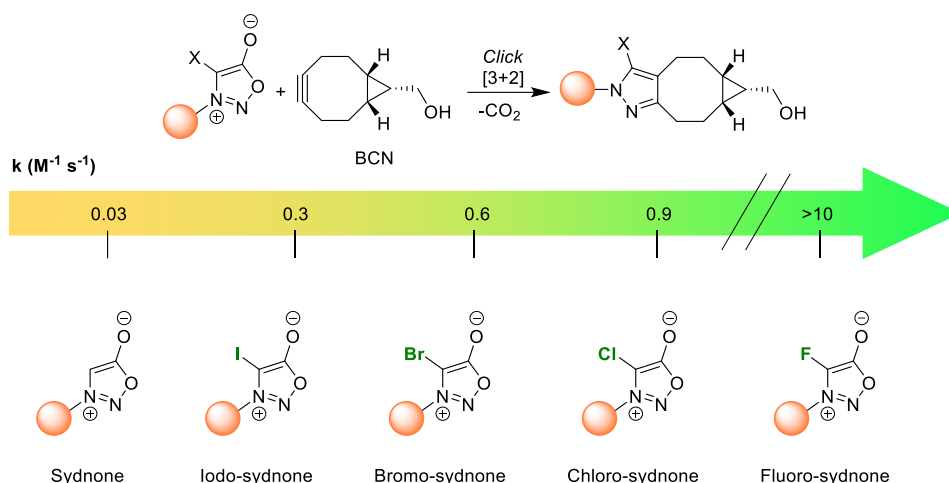


Figure 9. Réactivité des halogénosyndones dans une réaction de click avec le BCN

Les chlorosyndones représentent le meilleur compromis entre la stabilité des composés et leur réactivité. Ces syndones sont parfaitement stables et leur constante de vitesse, de l'ordre de  $1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  avec le BCN, peut être fortement améliorée en utilisant le DBCO qui permet d'obtenir une constante de vitesse de  $k = 350 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  dans le plasma à  $37^\circ\text{C}$ .

### 3. Cycloadditions [4+2]

Une réaction de click particulièrement importante est la cycloaddition entre une tétrazine (Tz) et un dérivé de *trans*-cyclooctène (TCO).<sup>31</sup> Dans cette cycloaddition [4+2], le *trans*-cyclooctène, un alcène tendu, réagit avec une tétrazine substituée *via* une réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (IEDDA), et forme une pyridazine (Schéma 9). Contrairement à la réaction de Diels-Alder classique, c'est la LUMO du diène (Tz) qui réagit avec la HOMO du diénophile (TCO).

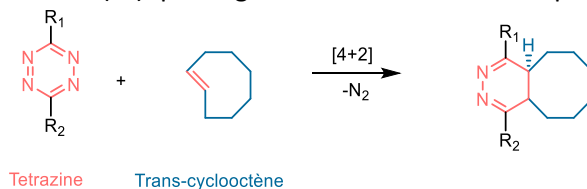


Schéma 9. Click entre une tétrazine et un *trans*-cyclooctène

Les cinétiques de cette réaction sont très élevées, les plus rapides pour cette cycloaddition atteignant jusqu'à plus de  $3\,000\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  en milieu aqueux avec des TCO modifiés pour être plus réactifs.<sup>32</sup> Cette réaction fonctionne donc à de très faibles concentrations, sans catalyseur, et dans des milieux biologiques. Cette réaction présente de nombreux avantages, cependant, le *trans*-cyclooctène peut s'isomériser *in vivo* en *cis*-cyclooctène non réactif, ce qui peut diminuer l'efficacité de la ligation. Obtenir des cinétiques de click de plus en plus rapides pour contourner ce problème est une option, mais les composés les plus réactifs sont souvent moins stables, et donnent alors lieu à une conversion incomplète.

Des variations ont été effectuées sur la structure des tétrazines pour faire évoluer leur réactivité.<sup>33</sup> Des constantes de vitesse très importantes allant jusqu'à  $30\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  avec le TCO sont ainsi obtenues, mais parfois au détriment de la stabilité des composés utilisés (Figure 10). L'un des défis de la chimie bioorthogonale est de trouver le meilleur équilibre entre la stabilité et la réactivité des composés utilisés.

<sup>31</sup> M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518–13519

<sup>32</sup> B. L. Oliveira, Z. Guo and B.J.L Bernardes, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 4895–4950

<sup>33</sup> M. R. Karver, R. Weissleder and S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 2263–2270



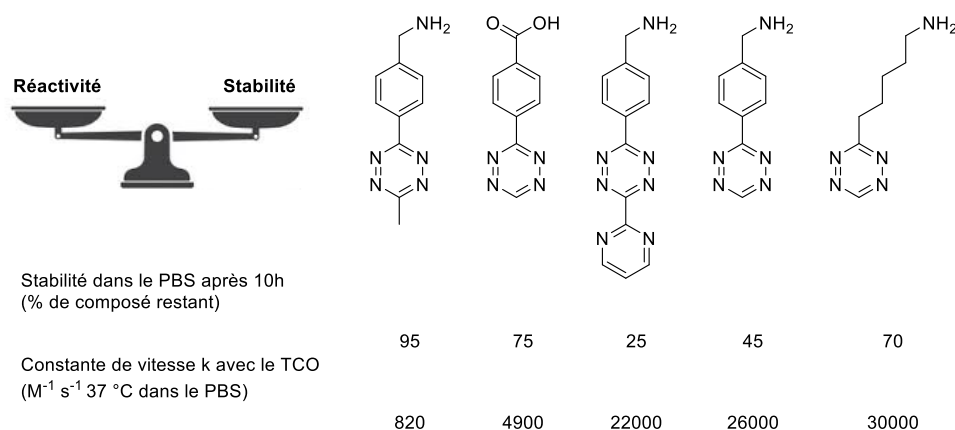


Figure 10. Stabilité et réactivité de différentes tétrazines

## C. Réactions de coupures bioorthogonales

### 1. Coupures catalysées par des métaux

Les réactions bioorthogonales se sont d'abord focalisées sur la création de liaisons entre deux molécules ne réagissant pas avec le reste de l'environnement biologique. Plus récemment, des réactions de clivages bioorthogonales ont vu le jour.<sup>34</sup> L'utilisation de couplages métallocatalysés dans les ligations bioorthogonales s'est beaucoup développée dans les dernières années.<sup>35</sup> Les couplages pallado-catalysés comme ceux de Heck, Sonogashira ou Suzuki-Miyaura ou la métathèse d'oléfines catalysée au Ruthénium sont utilisés pour modifier des biomolécules, grâce au développement de systèmes catalytiques bioorthogonaux.<sup>26</sup> Cependant, ces réactions de ligation sont encore relativement peu employées en raison de la nécessité d'utiliser des quantités importantes de catalyseur.

Depuis quelques années des résultats importants ont été obtenus dans le domaine des réactions de coupures bioorthogonales basées sur une catalyse organométallique. Le Palladium et le Ruthénium sont particulièrement impliqués dans la catalyse de réactions de coupures bioorthogonales.<sup>36</sup> Ces réactions de coupure servent principalement à déprotéger des composés d'intérêt qui sont masqués par une fonction chimique clivable. Par exemple, des fluorophores peuvent être quenchés par des groupements carbamates allyliques ou propargyliques. Un complexe métallique bioorthogonal va venir cliver cette fonction carbamate et libérer une amine fluorescente (Schéma 10).<sup>37</sup> Il en va de même pour des principes actifs dont l'activité peut être révélée par coupure d'un groupement inhibiteur.<sup>38</sup>

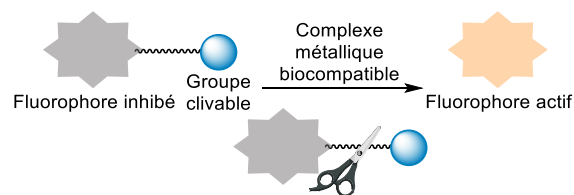
<sup>34</sup> J. Li and P. R. Chen, *Nature Chemical Biology* **2016**, 12, 129–137

<sup>35</sup> C. Zhang, E. V. Vinogradova, A. M. Spokoyny, S. L. Buchwald, B. L. Pentelute, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58, 4810–4839

<sup>36</sup> M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6511–6526

<sup>37</sup> Y. Bai, J. Chen, S. C. Zimmerman, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 1811–1821

<sup>38</sup> T. Volker, F. Dempwolff, P. L. Graumann, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10536–10540



Exemples de coupures métallo-catalysées

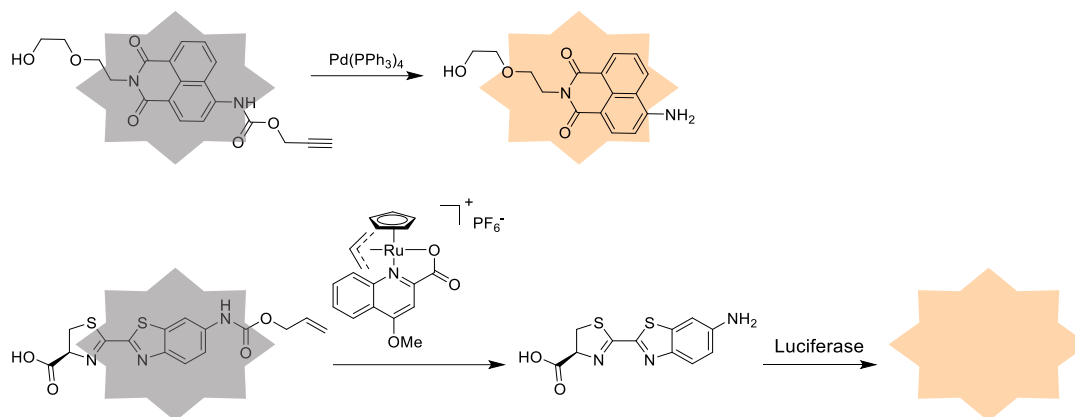


Schéma 10. Principe de libération de fluorophore par coupure métallo-catalysée

Récemment, une réaction de coupure catalysée par un complexe de cuivre a été utilisée pour libérer de la doxorubicine liée à une protéine mimétique d'anticorps en milieu cellulaire (Schéma 11).<sup>39</sup> Un espaceur clivable comportant un alcyne relie la protéine à la doxorubicine. En présence de cuivre, l'espaceur se coordonne et permet la libération de l'amine. La majorité de l'amine libre est observée après 1h. Cette réaction de coupure a montré son efficacité sur des cellules.

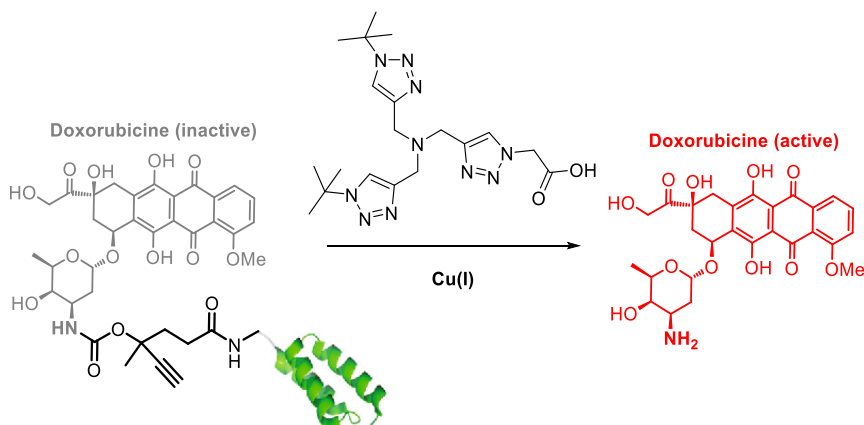


Schéma 11. Libération de doxorubicine par coupure catalysée au cuivre

Les réactions de coupures bioorthogonales peuvent être utilisées pour créer de nouveaux types de bioconjugués, notamment des bioconjugués anticorps-médicament (ADC, Antibody Drug Conjugate). Les premiers ADCs développés exploitaient principalement un mode de clivage enzymatique, dépendant des enzymes présentes dans le milieu tumoral. Avec les réactions de coupures bioorthogonales, un relargage par une réaction chimique non naturelle provoquée *in vivo* est

<sup>39</sup> X. Wang, Y. Liu, X. Fan, J. Wang, W. Shu Ching Ngai, H. Zhang, J. Li, G. Zhang, J. Lin and P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 17133–17141

envisageable. Toute une nouvelle catégorie d'ADCs compatibles avec cette approche reste à investiguer.

## 2. Réactions photoinduites

Les réactions de coupures bioorthogonales sont intéressantes pour pouvoir maîtriser la libération d'un composé d'intérêt en milieu biologique. Les réactions catalysées par des métaux sont prometteuses mais présentent des inconvénients, dont la toxicité des complexes métalliques utilisés ainsi que leur acheminement sur la cible visée. Ainsi, des réactions de coupures photoinduites ont été développées. Les réactions bioorthogonales photoinduites permettent un contrôle important du déclenchement de la réaction en jouant sur l'action de photons émis à une longueur d'onde précise. Un précurseur stable et inerte est activé par une longueur d'onde spécifique puis réagit de manière bioorthogonale dans une réaction de ligature ou de coupure.<sup>40</sup> Parmi les différents groupes photoprotecteurs, les plus communs sont les arylcarbonylméthyles, les nitroaryles, les coumarines ainsi que qu'une variété d'autres composés (Figure 11).<sup>41</sup>

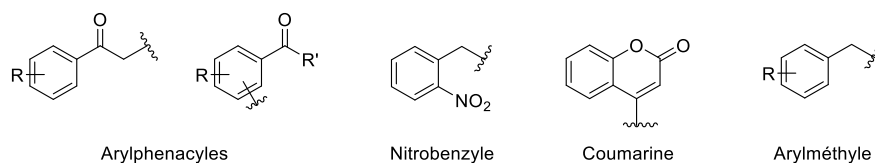


Figure 11. Exemples des groupes photoprotecteurs les plus utilisés

Comme pour d'autres réactions de coupures bioorthogonales, l'une des applications des réactions de coupures photoinduites est la libération contrôlée de composés d'intérêt. En protégeant des composés d'intérêt par des groupements photoprotecteurs, il est possible de libérer sélectivement la forme active sous irradiation à une longueur d'onde donnée. Par exemple, un composé actif comme un dérivé de pyridine peut être relargué dans le milieu par action d'un stimulus lumineux (Schéma 12).<sup>42</sup>

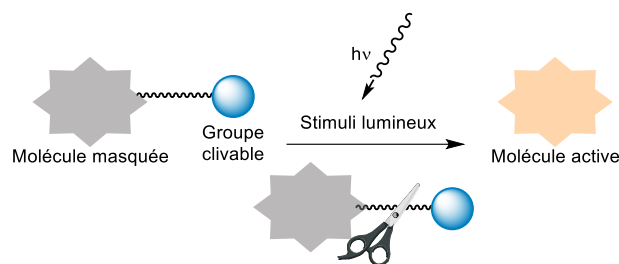
Des systèmes plus complexes sont développés pour plus de sélectivité : un photocatalyseur est activé à une longueur d'onde spécifique, et peut ainsi catalyser la déprotection d'un composé d'intérêt, ici un fluorophore (Schéma 12).<sup>43</sup> Il s'agit d'une combinaison entre les coupures métallo-catalysées et photoinduites, pour plus de spécificité.

<sup>40</sup> G. S. Kumar and Q. Lin, *Chem. Rev.* **2021**, 121, 12, 6991–7031

<sup>41</sup> P. Klan, T. Solomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov and J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 119–191

<sup>42</sup> X. Tang, Y. Wu, R. Zhao, X. Kou, Z. Dong, W. Zhou, Z. Zhan, W. Tan, X. Fang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 18386–18389

<sup>43</sup> Z. Huang, Z. Liu, X. Xie, R. Zeng, Z. Chen, L. Kong, X. Fan, and P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021** 143, 44, 18714–18720



*Exemples de coupures photoinduites*

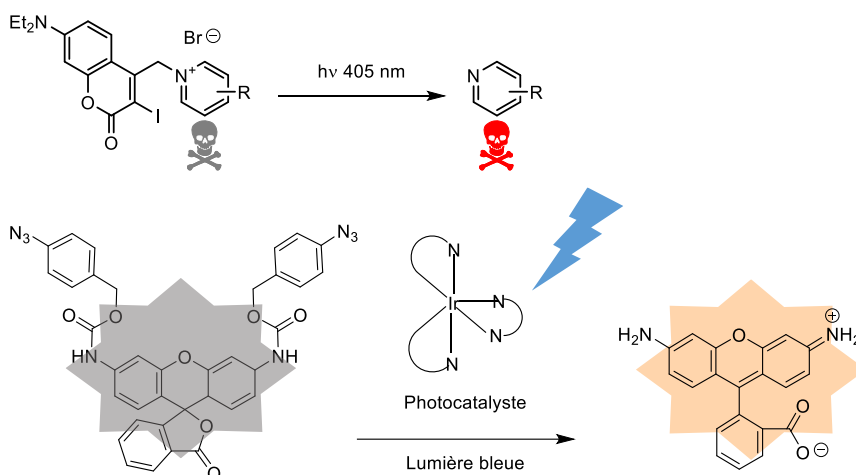


Schéma 12. Principe de libération d'une molécule d'intérêt par coupure photoinduite

Les réactions de coupures photoinduites sont intéressantes car elles ne nécessitent pas l'ajout de réactifs supplémentaires dans le milieu. Cependant, la contrainte majeure de ce type de réactions est leur utilisation *in vivo*. L'efficacité de la réaction est directement dépendante de la pénétration des photons dans les tissus. De plus, il ne faut pas que les rayonnements utilisés soient néfastes, ce qui limite la plage de longueurs d'ondes disponibles.

#### D. Réactions « click and release »

Des réactions de « bioorthogonal triggered release » ont également été développées : un relargage spécifique d'une molécule après une réaction bioorthogonale. Nous nous attarderons sur les réactions de « click and release », où une molécule est relarguée à la suite d'une réaction de click. Certaines réactions de click présentées plus tôt peuvent être utilisées pour des réactions de « click and release », aussi appelées réactions de ligation et coupure (Schéma 13).

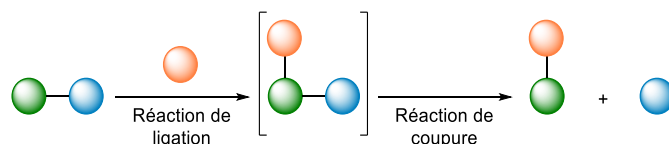


Schéma 13. Principe d'une réaction de "click and release"

Les réactions de « click and release » permettent d'envisager la libération ciblée de principes actifs contenant une fonction d'intérêt comme une fonction amine ou alcool. Ces fonctions d'intérêt sont présentes dans de nombreuses molécules actives. Les principes actifs sont sous forme de prodrogues et sont libérés de façon contrôlée uniquement lorsque les deux partenaires de click entrent en contact. Les cellules sont ainsi mieux ciblées, ce qui évite de nombreux effets secondaires. L'une des grandes

applications de ce relargage contrôlé est la libération d'actifs anticancéreux dans des cellules tumorales.

## 1. Staudinger « click and release »

En 2000, Bertozzi et Saxon ont développé une réaction de Staudinger intra-moléculaire. Cette réaction de Staudinger modifiée a ensuite été adaptée par le groupe de Florent pour effectuer une réaction de « click and release », permettant de relarguer une molécule active de manière ciblée (Schéma 14).<sup>44</sup>

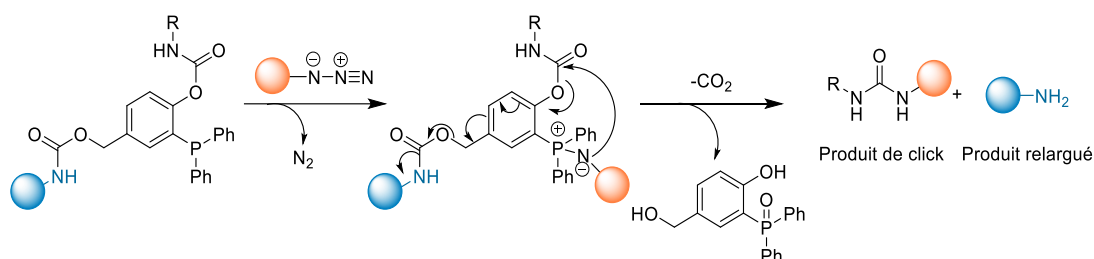


Schéma 14. « Click & release » par réaction de Staudinger

Cette approche implique un bras autoimmolable composé d'un squelette 4-(hydroxyméthyl)phénol. L'amine que l'on souhaite relarguer est liée par une fonction carbamate à l'alcool benzylique en position 4. Un carbamate sur la fonction phénol est aussi nécessaire ainsi qu'une phosphine en position 2. Lorsque la réaction de Staudinger a lieu, l'azoture est réduit par la phosphine et un réarrangement s'opère : l'aza-ylure s'additionne sur le carbamate à proximité. L'amine d'intérêt est obtenue par élimination 1,6.

Grâce à cette approche, de la doxorubicine, molécule anticancéreuse, a été libérée de manière sélective et avec un rendement satisfaisant de 90%. Cette application est l'une des premières utilisant les réactions bioorthogonales pour libérer de manière contrôlée un principe actif. Cette approche de libération de principes actifs en deux temps est très intéressante. Une grande difficulté des thérapies classiques est liée à la biodistribution du principe actif *in vivo* qui souvent induit une accumulation non spécifique ailleurs que sur la cible visée. De nombreux systèmes de vectorisation (anticorps, nanoparticules, ligands...) se développent pour limiter cette non-spécificité mais à ce jour aucun n'est parfait. La chimie bioorthogonale et plus particulièrement les réactions de « click and release » offrent un contrôle en deux temps : il est alors possible d'agir sur l'endroit et le moment où la drogue sera libérée, en choisissant les conditions d'ajout du deuxième partenaire de click.

Cette approche est prometteuse mais la réaction de Staudinger présente plusieurs inconvénients pour une utilisation *in vivo*, notamment sa cinétique de réaction. C'est pour cela que cette approche de « click and release » a été transposée aux autres réactions de click étudiées précédemment.

## 2. *Trans*-cyclooctène + tétrazine

En 2013, l'équipe de Robillard a développé une réaction de « click and release » entre un *trans*-cyclooctène et une tétrazine permettant de relarguer une molécule comportant une amine primaire (Schéma 15).<sup>45</sup>

<sup>44</sup> M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, J. C. Florent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3147–3149

<sup>45</sup> R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 14112–14116

Une fonction carbamate a été introduite en alpha de la fonction alcène du *trans*-cyclooctène. C'est par cette fonction carbamate qu'est accrochée la molécule d'intérêt à relarguer. Lorsque la réaction de click a lieu, une pyridazine est formée. Un transfert de proton intramoléculaire a lieu entraînant une élimination 1,4 libérant ainsi l'amine d'intérêt.

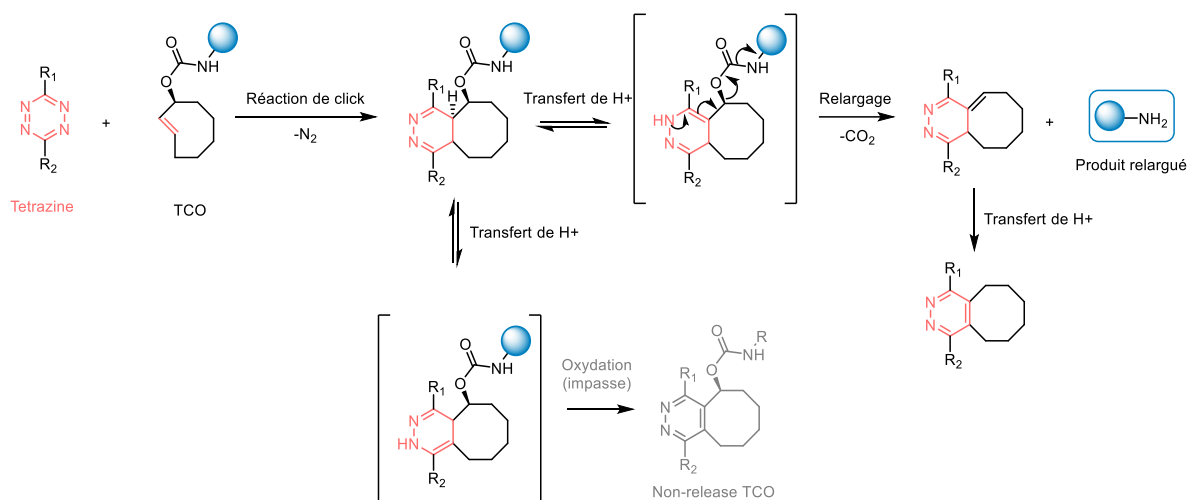


Schéma 15. « Click and Release » entre une tétrazine et un *trans*-cyclooctène

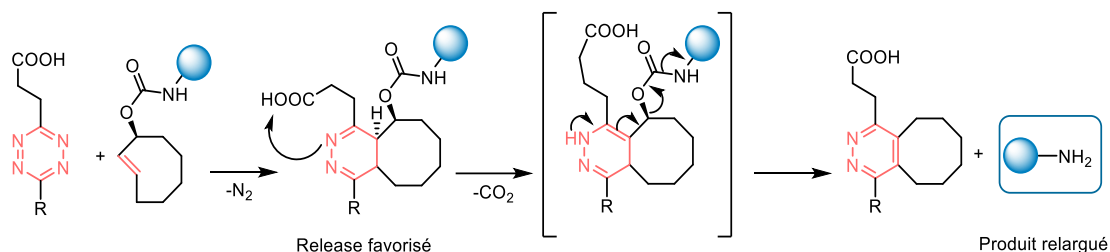
Cette réaction est prometteuse pour des applications *in vivo* de « click and release ». Ses sous-produits (N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) sont non toxiques et la réaction de click est extrêmement rapide comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent. Le TCO peut s'isomériser sous sa forme *cis* en milieu biologique, mais de nombreuses optimisations ont eu lieu pour tenter de maximiser le rapport stabilité/réactivité des composés.

Cependant, cette réaction est sujette à son environnement et au pH, et l'intermédiaire de click peut être oxydé, empêchant le relargage de la molécule d'intérêt. De plus, la cinétique de la réaction de click est rapide, mais pas celle de libération de l'amine. Cet inconvénient a été évité en utilisant des tétrazines acides.<sup>46</sup> La présence d'une fonction acide carboxylique proche du site de tautomérisation favorise la forme tautomère souhaitée et accélère la réaction de « release » (Schéma 16a).

Une autre réaction secondaire observée est l'attaque intramoléculaire du carbamate sur l'intermédiaire deshydropyridazine pour former un produit de cyclisation, empêchant le relargage de la molécule désirée. Cette cyclisation peut être évitée par l'utilisation d'une amine tertiaire (Schéma 16b).

<sup>46</sup> J. C. T. Carlson, H. Mikula and R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 3603–3612

a) *Eviter l'oxydation*



b) *Eviter la cyclisation*

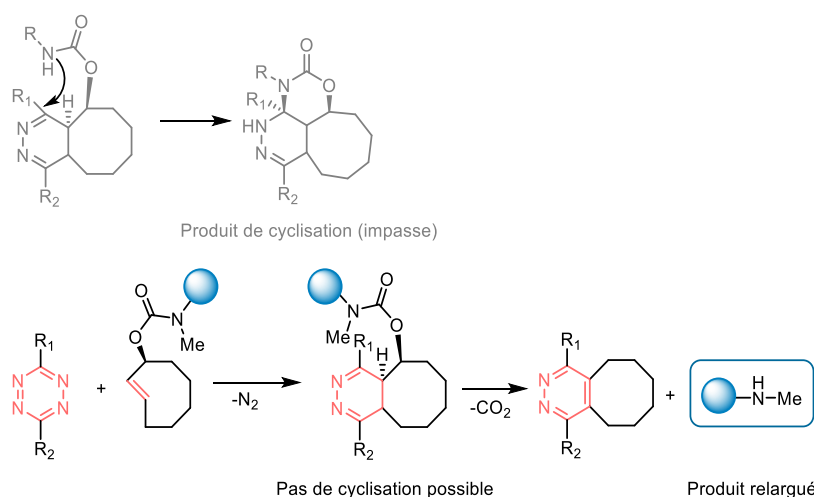


Schéma 16. Stratégie d'évitement des impasses pour la réaction de « click and release » Tz-TCO

Cette réaction de click entre un *trans*-cyclooctène et une tétrazine permet de libérer une amine. Pour libérer un alcool, une réaction de click entre un éther vinylique et une tétrazine a été développée<sup>47</sup> mais la cinétique de cette réaction est très faible (de l'ordre de  $k = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) ce qui ne permet pas d'envisager des applications *in vivo* (Schéma 17a). L'utilisation d'un acide vinylique boronique (VBA) lié à un éther vinylique permet d'accélérer cette réaction, avec une cinétique atteignant  $k = 27 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Schéma 17b).<sup>48</sup> Cette approche a été choisie pour relarguer de la doxorubicine dans des cellules, en interagissant avec des tétrazines portant un substituant pyridine coordonnant le bore (Schéma 17c).<sup>49</sup> La toxicité observée sur les cellules lors de cette expérience était similaire à celle observée pour la doxorubicine seule, montrant bien l'efficacité de cette méthode. Cette expérience montre que cette réaction est bien bioorthogonale et offre un nouveau substrat pour les réactions de Diels-Alder à demande inverse d'électrons [4+2].

<sup>47</sup> E. Jiménez-Moreno, Z. Guo, B. L. Oliveira, I. Albuquerque, A. Kitowski, A. Guerreiro, O. Boutureira, T. Rodrigues, G. Jiménez-Osés and G. J. L. Bernardes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56,243–247

<sup>48</sup> S. Eising, F. Lelieveldt and K. M. Bongers, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 12243–12247

<sup>49</sup> L. P. W. M. Lelieveldt, S. Eising, A. Wijnen and K. M. Bongers, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 8816–8821

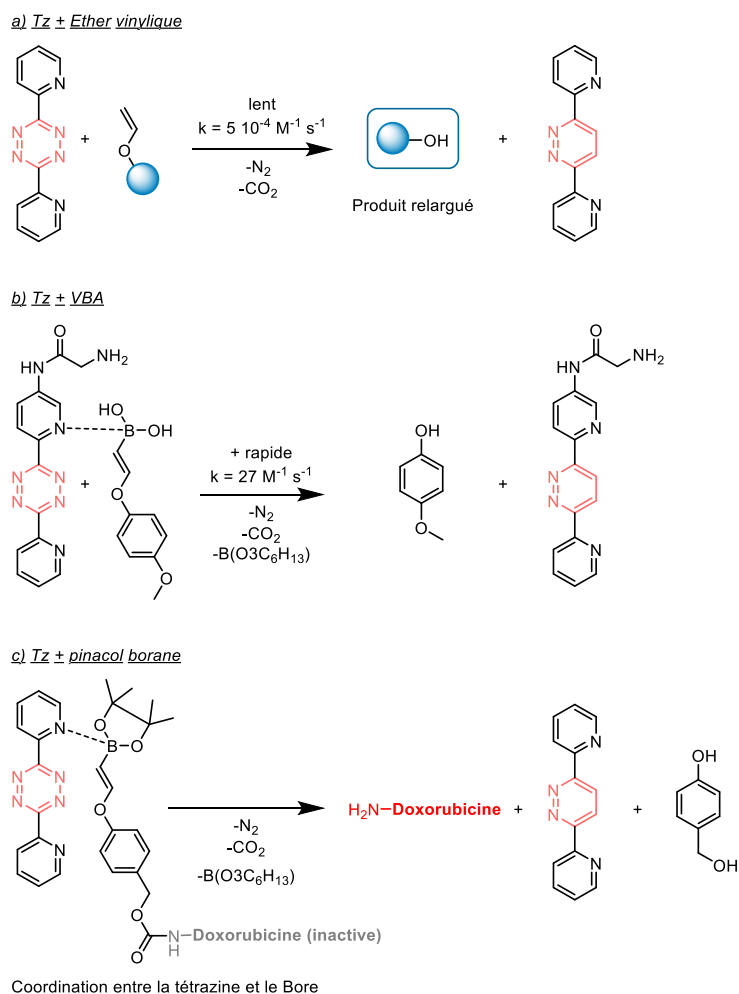


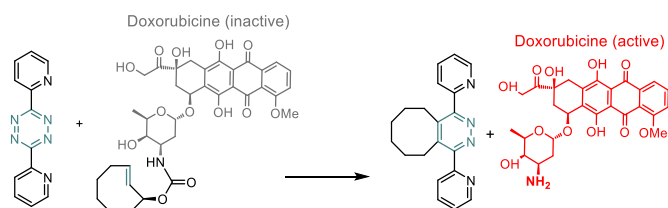
Schéma 17. « Click and release » avec a) ether vinylique b) acide boronique c) pinacol borane et relargage de doxorubicine

Le système de « click and release » tetrazine + TCO est très prometteur et des expériences ont été menées *in vitro* puis *in vivo*. Une preuve de concept montre un relargage de près de 80% de doxorubicine en quelques minutes dans du serum à des concentrations micromolaires, et une efficacité de cette réaction sur des cellules (Schéma 18a).<sup>45</sup> Par la suite, le groupe du Dr. Robillard a développé un bioconjugué anticorps-TCO-doxorubicine (ADC, Antibody Drug Conjugate)<sup>50</sup>. Un anticorps ciblant un récepteur présent sur la tumeur est greffé au *trans*-cyclooctène. L'utilisation d'ADC permet une libération contrôlée du principe actif sur sa cible (Schéma 18b). Les premiers ADCs développés exploitaient principalement un mode de clivage enzymatique, dépendant des enzymes présentes dans le milieu tumoral. La combinaison de la chimie bioorthogonale et d'un ADC permet de mieux contrôler l'étape de libération du principe actif, en choisissant le moment où est injecté le deuxième partenaire de click. De plus, une meilleure sélectivité est possible : le TCO ne réagit qu'en présence de tétrazine, et est inerte face aux autres fonctionnalités du vivant, ce qui diminue le risque de diffusion non spécifique du principe actif. La chimie bioorthogonale s'affranchit de la nécessité d'une activité enzymatique pour relarguer des composés. Les résultats de cette expérience sur des souris sont très encourageants : après 24 h, 50% de la doxorubicine a été relarguée dans les cellules tumorales.

<sup>50</sup> R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoebein, R. M. Versteegen and M. S. Robillard, *Bioconjugate Chem.*, **2016**, *27*, 1697–1706



a) Expérience *in vitro* et *in cellulo*



a) Expérience *in vivo*

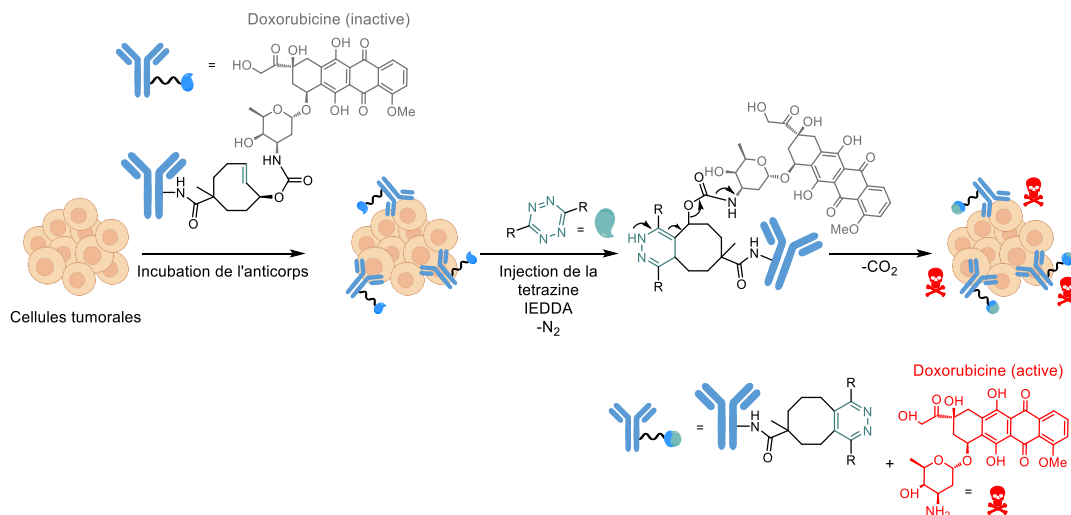


Schéma 18. Relargage de principe actif par IEDDA a) preuve de concept *in vitro* et *in cellulo* b) relargage bioorthogonal contrôlé *in vivo* par utilisation d'ADC

En utilisant la chimie bioorthogonale qui se base sur des réactions exogènes pour relarguer la molécule d'intérêt, une plus grande diversité d'anticorps est utilisable pour la formation d'ADCs, notamment des anticorps non internalisants. De nombreux mécanismes de relargage dépendaient d'enzymes intracellulaires. La chimie « click and release » s'affranchit de cette contrainte : le groupe de Robillard a libéré un principe actif, la Monométhyl-auristatin E, en utilisant un fragment d'anticorps non internalisant.<sup>51</sup> La chimie click permet donc une diversification des outils utilisés.

Enfin, cette approche de « click and release » tetrazine-TCO a été amenée jusqu'à l'essai clinique.<sup>52</sup> Un biopolymère comportant une tétrazine est injecté dans la tumeur, puis une prodrogue liée à un TCO est injectée dans le corps, s'accumule au niveau de la tumeur et libère le principe actif par réaction de « click and release » (Schéma 19). Le concept a été approuvé pour la poursuite d'essais cliniques chez l'Homme.

<sup>51</sup> R. Rossin, R. M. Versteegen, J. Wu, A. Khasanov, H. J. Wessels, E. J. Steenberg, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, A. H.A.M. van Onzen, P. J. Hudson & M. S. Robillard, *Nature Communications*, **2018**, 9, 1484

<sup>52</sup> K. Wu, N. A. Yee, S. Srinivasan, A. Mahmoodi, M. Zakharian, J. M. Mejia Oneto, M. Royzen, *Chemical Science* **2021**, 12, 1259–1271

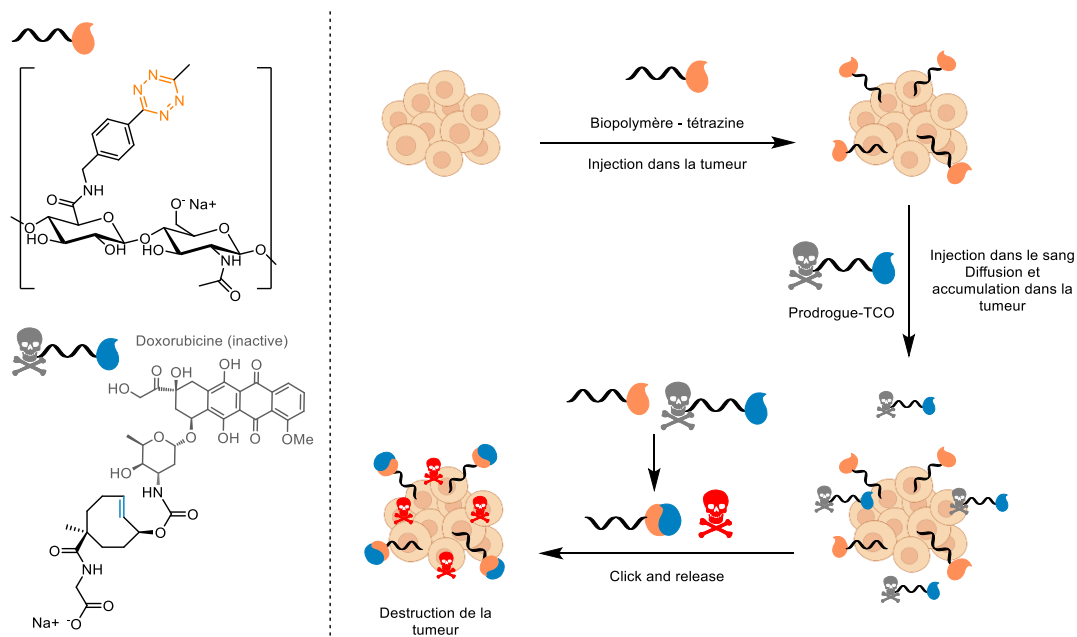


Schéma 19. Libération sélective de principe actif in vivo grâce à la « click and release », 1er essai préclinique

La doxorubicine s'accumule beaucoup moins au niveau du cœur avec cette approche qu'avec la doxorubicine-HCl utilisée actuellement sur les patients. Cette accumulation au cœur est l'une des principales limitations de l'utilisation de la doxorubicine en chimiothérapie et raison de la toxicité cardiaque fréquemment observée. L'approche de libération de principe actif contrôlée par chimie « click and release » est donc extrêmement prometteuse.

### 3. Click and release avec les iminosydones (SPICC)

Les composés mésoioniques sont étudiés dans des réactions de « click and release » par le laboratoire depuis plusieurs années.<sup>53</sup> Les travaux de recherche de notre groupe ont surtout porté sur les iminosydones. Ces composés réagissent efficacement avec les cyclooctynes par une cycloaddition [3+2], suivie d'une rétro-Diels-Alder pour former un produit de click pyrazole et un produit de release, un isocyanate. Celui-ci peut en fonction de sa structure être hydrolysé en amine plus ou moins spontanément dans le milieu. (Schéma 20).

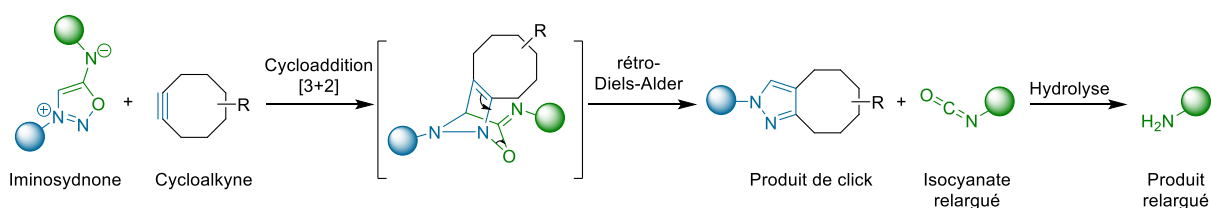


Schéma 20. « Click and release » avec les iminosydones.

Cette réaction a été appelée SPICC pour Strain Promoted Iminosydnone Cycloalkyne Cycloaddition. Les iminosydones sont intéressantes dans cette réaction, car l'amine exocyclique peut être substituée, et une amine peut être relarguée. Des études plus poussées sur la réactivité des iminosydones ainsi que sur l'influence des différents substituants ont été effectuées. Un groupe électroattracteur sur l'aromatique positionné en N3 ainsi qu'une urée sur l'azote exocyclique N6 de

<sup>53</sup> S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuyper, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. Nguyet Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 15612–15616

l'iminosydnone ont un fort impact bénéfique sur la cinétique de la réaction de « click and release » (Figure 12).<sup>54</sup>

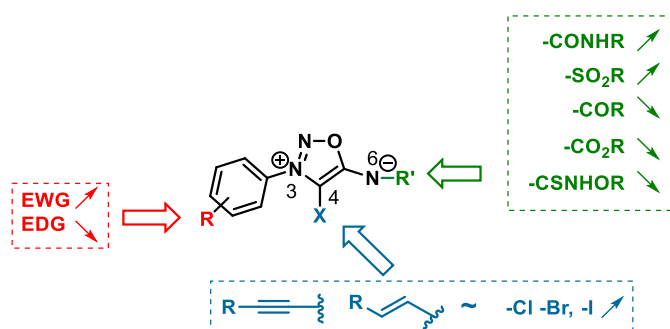


Figure 12. Influence des substituants sur la réactivité des iminosydnones. Les flèches vers le haut indiquent une augmentation de la constante de vitesse.

Ainsi, les groupements électro-attracteurs sur la position 3 du cœur iminosydnone ont un effet bénéfique significatif sur la cinétique de la réaction. La plupart des substitutions électro-attractrices sur l'azote en position 6 ont en revanche un effet néfaste, à l'exception de la fonction urée. En combinant un groupe électro-attracteur sur l'aromatique positionné en N3 et la présence d'une urée sur l'azote exocyclique N6 de l'iminosydnone, la réaction SPICC est suffisamment rapide pour envisager des applications biologiques. La constante de vitesse de la réaction entre une telle iminosydnone et le BCN atteint alors jusqu'à  $0,18 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , cinétique comparable à celle d'autres réactions telle que la SPAAC. Elle est supérieure à  $3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  avec le DBCO et atteint  $22,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  en utilisant un alcyne cyclique plus réactif tel que le TMTH (Figure 13).

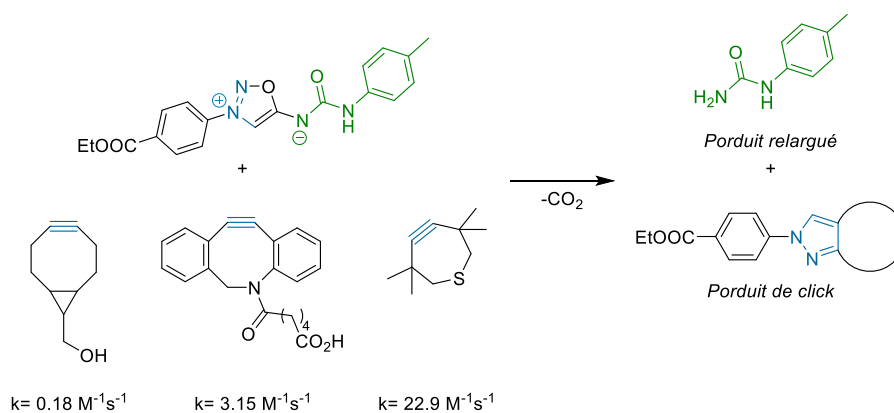


Figure 13. Cinétique de click and release entre une iminosydnone optimisée et différents alcynes cycliques

Enfin, tout comme pour les sydnones, une halogénéation de la position 4 permet aussi d'accélérer la réaction de façon très significative (Figure 14).<sup>55</sup> La bromation ou la chloration de cette position permet dans certains cas d'accélérer la réaction d'un facteur 100 voir bien plus dans le cas d'iminosydnones ayant une fonction amide en position N6. Cet effet a été mis à profit pour la libération contrôlée de l'Apixaban, un médicament anticoagulant.<sup>56</sup>

<sup>54</sup> M. Riomet, E. Decuyper, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, and F. Taran, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 535–8541

<sup>55</sup> M. Riomet, K. Porte, L. Madegard, P. Thuéry, D. Audisio, and F. Taran, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 6, 2403–2408

<sup>56</sup> M. Feng, L. Madegard, M. Riomet, M. Louis, P. A. Champagne, G. Pieters, D. Audisio and F. Taran., *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 8500–8503

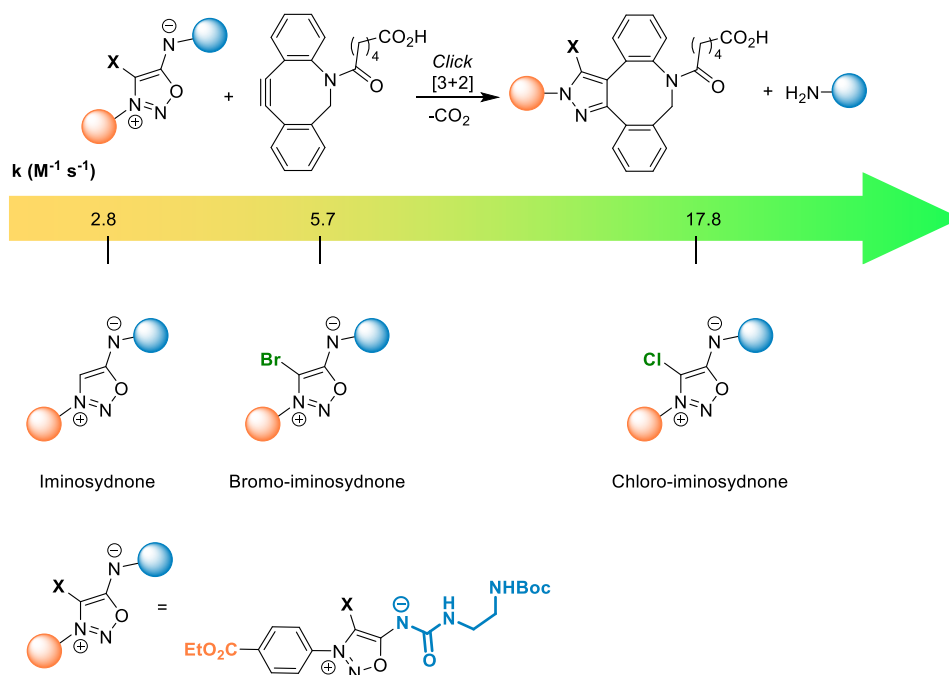


Figure 14. Réactivité des halogéno-iminosydnone dans une réaction de click avec le DBCO

Les composés mésoioniques, sur lesquels notre laboratoire travaille, ont déjà été utilisés par notre groupe dans des applications *in vivo*. Les sydnones ont été les premières à être utilisées pour des applications d'imagerie médicale dans une approche de pretargeting.<sup>57</sup> Cette approche qui consiste à détecter la cible d'intérêt en deux temps sera explorée plus en détails dans l'introduction du Chapitre 2.

Des iminosydnone ont tout d'abord été utilisées pour des réactions de « click and release » sur des protéines : un fluorophore a été relargué depuis une protéine.<sup>53</sup> Le marquage de protéines par fluorescence *via* la « click and release » est intéressant, et prometteur pour la libération future de principes actifs sur des cellules. La réaction de SPICC entre une iminosydnone et un cyclooctyne a par la suite été réalisée *in vivo*. Un fluorophore a été libéré dans des cellules tumorales grâce à des micelles clivables par chimie « click and release ».<sup>58</sup> Une iminosydnone a été fonctionnalisée avec des groupements hydrophiles et hydrophobes afin de former un amphiphile. Ce dernier peut alors s'autoassembler en une micelle, capable d'encapsuler un fluorophore hydrophobe. Un DBCO a été fonctionnalisé par un groupement le rendant hydrophile et clivable par l'action de la  $\beta$ -glucuronidase, une enzyme présente uniquement en milieu tumoral. Le DBCO libéré par cette action enzymatique devient alors hydrophobe et peut rentrer à l'intérieur de la micelle, et libère le fluorophore par « click and release » avec l'iminosydnone. La fluorescence a été observée *in vivo*, et le produit pyrazole issu de la réaction click a été isolé au niveau des tumeurs (Schéma 21).

<sup>57</sup> M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jégo, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403

<sup>58</sup> K. Porte, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, B. Eddhif, P. Poinot, E. Gravel, E. Doris, A. Wijkhuisen, D. Audisio, S. Papot, F. Taran, *Angew.Chem.Int.Ed.* **2019**, 58, 6366–6370

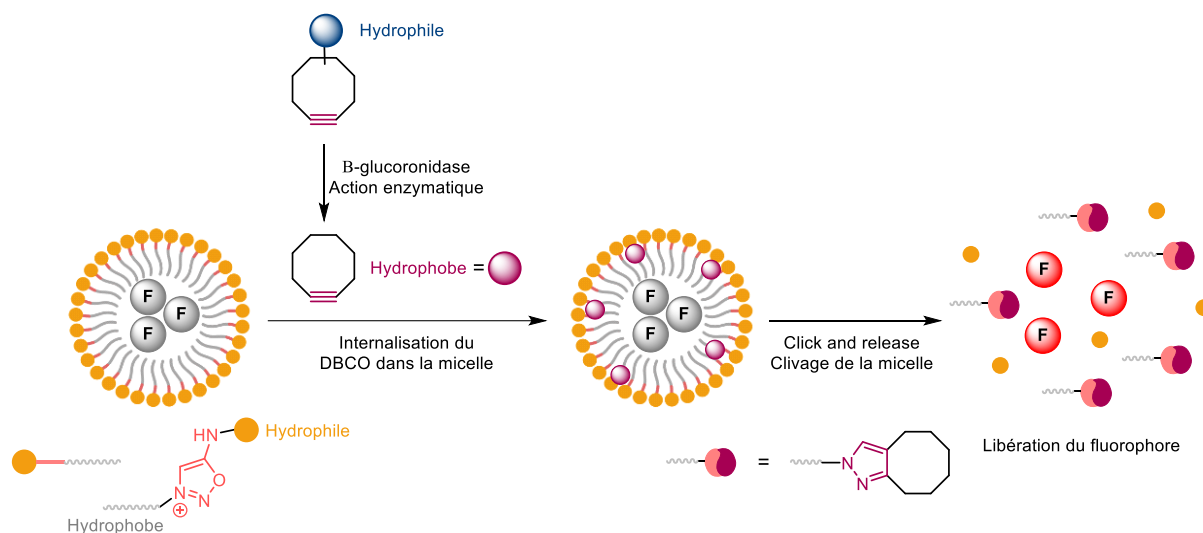


Schéma 21. Libération de fluorophore *in vivo* par SPSAC via une micelle clivable

Ces résultats sont prometteurs, et des essais sont en cours pour appliquer la réaction de SPICC entre les iminosydnonnes et les cyclooctynes pour la libération de principes actifs. La SPICC est aujourd'hui à un stade moins avancé que la IEDDA pour la libération contrôlée de principes actifs. Néanmoins, les iminosydnonnes sont des composés très intéressants pour la chimie bioorthogonale. Leur réaction avec un cyclooctyne est totale, leur possibilité de fonctionnalisation est grande et de nombreuses réactions sont en cours de développement pour obtenir des composés plus réactifs, des cinétiques plus rapides, et une plus grande diversité de fonctions relargables.

De nombreuses applications des réactions de click et de « click and release » sont en développement, avec pour but à chaque fois d'améliorer la sélectivité, la spécificité et la vitesse de la réaction. Ce sont en effet des points clés pour le développement de réactions *in vivo*. Les réactions ont lieu à faible concentration, ce qui diminue la vitesse de réaction et augmente le risque de dégradation non spécifique au fil du temps. De plus, ajouter les réactifs en excès pour accélérer la réaction présente des risques de non-spécificité et de toxicité. Il est donc important de trouver des technologies ingénieuses pour un contrôle de la spécificité et de la vitesse des réactions de « click and release ».

## II. Reconnaissance moléculaire

### A. Définition

La reconnaissance moléculaire est un processus d'interactions spécifiques entre deux molécules ou plus *via* des liaisons non covalentes (liaisons H, coordination métallique, forces de Van der Waals, effets électrostatiques, forces hydrophobes, interactions  $\pi$ - $\pi$ , etc.).

La reconnaissance moléculaire entre en jeu dans les interactions récepteur-ligand, antigène-anticorps, entre les brins d'ADN, dans les interactions entre une protéine et une autre protéine, un peptide, une petite molécule, etc. Toutes ces interactions faibles permettent la formation de structures complexes de manière très spécifique, indispensables au bon fonctionnement du vivant. Il est donc très intéressant de chercher à exploiter ces interactions de reconnaissance moléculaire pour créer des outils chémo-biologiques.

La formation de structures complexes par reconnaissance moléculaire permet également de rapprocher spatialement deux réactifs qui vont pouvoir réagir chimiquement ensemble. Certaines molécules se lient à des récepteurs cellulaires par des interactions faibles vont ensuite avoir un mécanisme d'action chimique, *via* des créations ou ruptures de liaisons covalentes. Ce concept peut être appliqué à la chimie bioorthogonale, et particulièrement à la chimie click. En rapprochant ainsi deux partenaires de click dans l'espace, la spécificité ainsi que la vitesse de la réaction peut être grandement améliorée.

Parmi les différents exemples de reconnaissance moléculaire, l'un des plus utilisés est le complexe streptavidine-biotine. Le complexe streptavidine-biotine est extrêmement utilisé dans de nombreuses biotechnologies, de par la très forte affinité entre la protéine de streptavidine et la molécule de biotine. La constante de dissociation entre la streptavidine et la biotine est l'ordre de  $10^{-14}$  mol/L, ce qui en fait l'une des liaisons non covalentes les plus fortes existante ; c'est une interaction quasi instantanée et très difficile à rompre. Le complexe streptavidine-biotine permet de lier des biomolécules entre elles, ou sur un support solide de manière efficace. Il est par conséquent utilisé dans de nombreuses biotechnologies de purification de protéines et de détection.

Le monde vivant regorge d'exemples naturels de complexes extrêmement stables avec une affinité très forte due à des liaisons hydrogène. Ces liaisons sont notamment impliquées dans l'appariement des bases de l'ADN. Cet agencement des nucléobases de l'ADN est appelé appariement de Watson-Crick (Figure 15).<sup>59</sup> La présence de trois liaisons hydrogène entre la guanine et la cytosine, contre deux entre l'adénine et la thymine, rend l'appariement Guanine-Cytosine plus fort que celui de l'Adénine-Thymine.

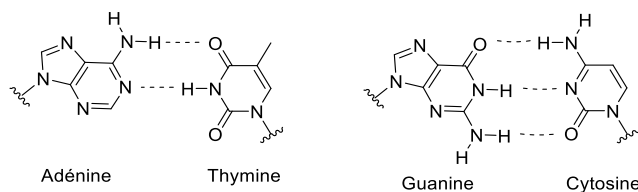


Figure 15. Appariement de Watson Crick

Les nucléobases peuvent également effectuer des liaisons hydrogène selon un autre mode d'appariement : l'appariement de Hoogsteen.<sup>60</sup> C'est une autre face de la purine qui est impliquée (Figure 16). Cet appariement se retrouve notamment dans des G-quadruplex.

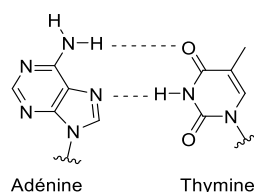


Figure 16. Appariement de Hoogsteen

En s'inspirant des différents modes d'interactions existant naturellement, des outils moléculaires synthétiques ont pu être développés afin d'exploiter le potentiel de la reconnaissance moléculaire. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes particulièrement intéressés aux acides nucléiques

<sup>59</sup> J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738

<sup>60</sup> K. Hoogsteen, *Acta Cryst.*, **1963**, 16, 907–916

peptidiques (Peptide Nucleic Acid, PNA) comme outil de reconnaissance moléculaire pour accélérer les réactions bioorthogonales. Ces composés font l'objet du paragraphe suivant.

## B. Acides Nucléiques Peptidiques (PNA)

### 1. Définition

Les acides nucléiques peptidiques (Peptide Nucleic Acid, PNA) sont des analogues artificiels des Acides DésoxyriboNucléiques (ADN) et RiboNucléiques (ARN). Ils furent découverts en 1991 par Nielsen et Buchardt.<sup>61</sup> Les PNAs sont composés de répétitions d'unités N-(2-aminoéthyl)-glycine, liées par des liaisons amides. A la différence des acides nucléiques naturels, les PNAs sont donc constitués d'un squelette entièrement peptidique, cela les rend notamment stables aux nucléases. Des nucléobases purine ou pyrimidine sont liées au squelette peptidique du PNA *via* des liaisons méthyl-carbonyl. Les mêmes nucléobases que celles des brins de l'ADN peuvent être utilisées pour construire des PNAs (Figure 17).

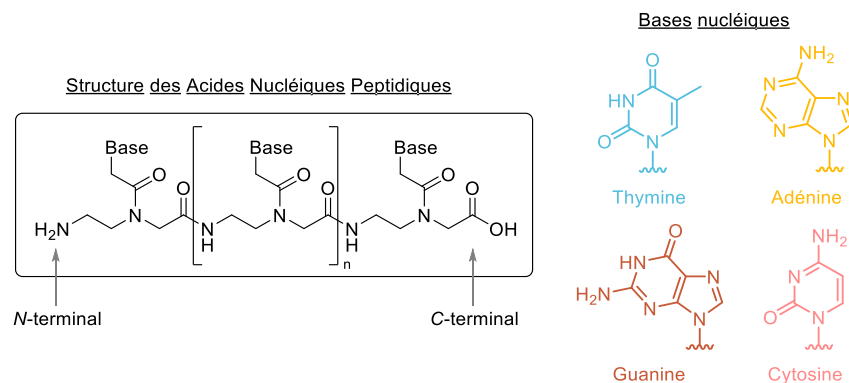


Figure 17. Structure des PNAs

### 2. Propriétés

Le squelette des PNAs contient le même nombre d'atomes que celui des brins d'ADN. Cette similarité de structure permet un appariement ADN-PNA, *via* des liaisons de Watson et Crick.<sup>62</sup> Les appariements PNA-PNA et ADN-PNA s'effectuent comme pour deux brins d'ADN, entre les bases Cytosine/Guanine, et Thymine/Adénine. Les PNAs sont neutres chimiquement, ce qui évite la répulsion électrostatique due aux phosphates qui existe entre deux brins d'ADN. Les PNAs sont stables, en conditions acides comme basiques et résistants aux protéases et nucléases. Les duplex PNA-PNA et PNA-ADN sont donc plus stables que les duplex ADN-ADN. Cependant ils sont plus sensibles que l'ADN aux erreurs d'appariement. Ils sont également très stables chimiquement.

Les PNAs ont d'abord été conçus pour former des triplex *via* des interactions de Hoogsteen avec des duplex d'ADN, mais leur potentiel d'analogues de l'ADN pouvant s'associer avec celui-ci de manière complémentaire a vite été remarqué et développé.<sup>63</sup>

<sup>61</sup> P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500.

<sup>62</sup> M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, 365, 566–568

<sup>63</sup> P. E. Nielsen, M. Egholm, *Current Issues Molec. Biol.* **1999**, 1, 2, 89–104

### 3. Synthèse et modifications des PNAs

Les PNAs sont obtenus par synthèse peptidique supportée ce qui facilite leur préparation (Schéma 22).<sup>64</sup> Les monomères de PNA sont protégés par une fonction orthogonale au groupe protecteur utilisé pour protéger l'amine lors du couplage peptidique (Figure 18).

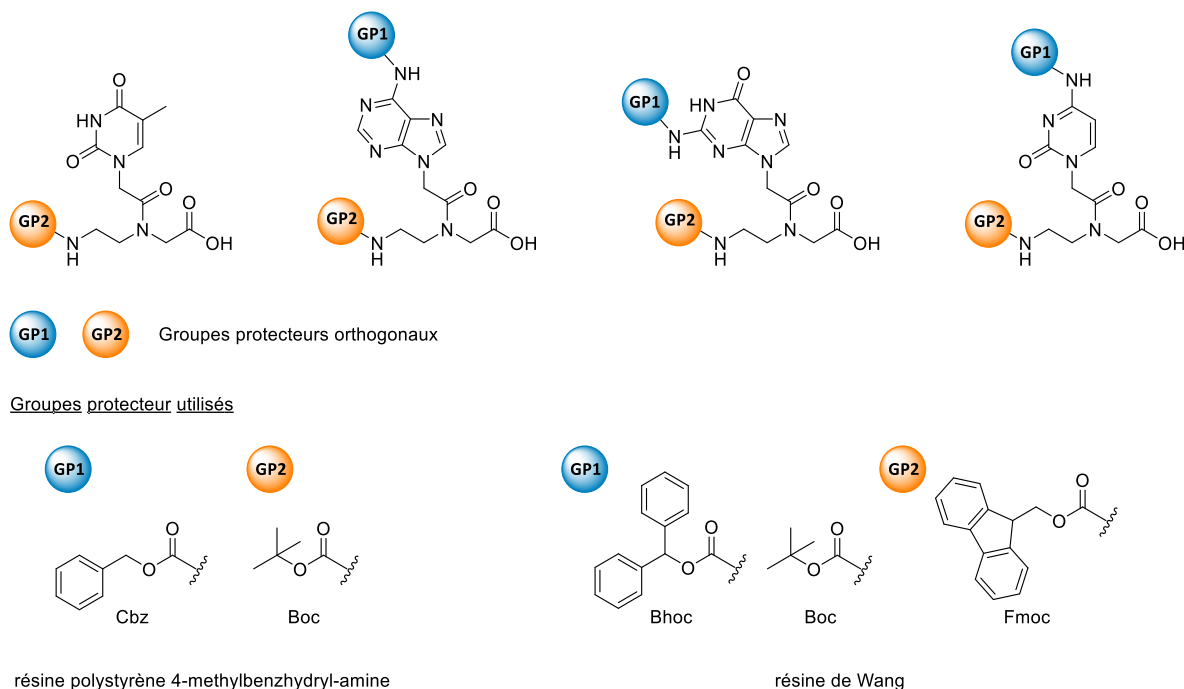


Figure 18. Synthèse de PNAs, structures des monomères PNAs utilisés pour la synthèse peptidique

Les groupes protecteurs utilisés furent d'abord des groupes Cbz pour protéger les bases A, G et C, et des groupements Boc pour protéger l'amine qui sera impliquée lors du couplage peptidique. La résine utilisée est alors une résine polystyrène 4-méthylbenzhydryl-amine. Les groupes Boc sont déprotégés par du TFA avant chaque couplage peptidique. Les groupements Cbz sont déprotégés par réduction au H<sub>2</sub>. La résine est ensuite clivée avec du HF anhydre. Ce réactif très toxique a depuis été remplacé par de l'acide trifluorométhanesulfonique (TFMSA).

D'autres groupes protecteurs sont désormais utilisés, notamment pour éviter l'utilisation de HF aqueux. C'est le cas avec une résine de Wang. Les bases A, G et C sont protégées par des groupements Boc ou Bhoc, et l'amine impliquée dans le couplage peptidique est protégée par un groupement Fmoc. De la pipéridine est utilisée pour déprotéger les Fmoc avant chaque couplage, et du TFA est utilisé pour cliver de la résine ainsi que déprotéger les bases dans le même temps.

<sup>64</sup> B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, 4, 1, 5–23



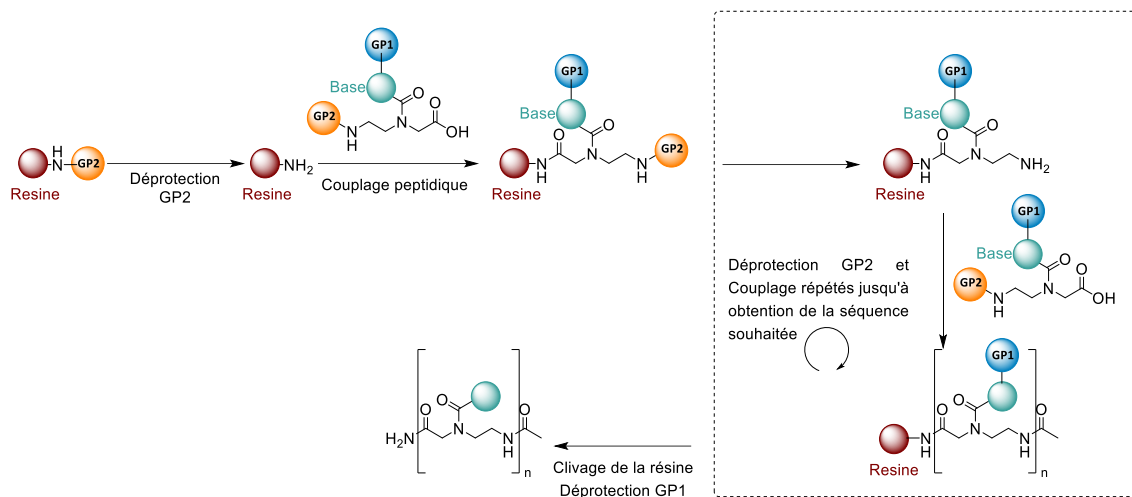
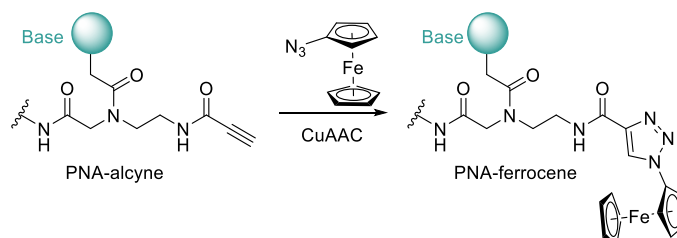


Schéma 22. Principe de la synthèse peptidique supportée sur résine

Les PNAs sont des composés extrêmement intéressants, et des modifications de leur structure ont été développées dans le but de leur apporter de nouvelles propriétés. La manière la plus simple de conférer des propriétés additionnelles aux PNAs est par l'ajout d'une fonction d'intérêt en position N-terminale, lors de la synthèse sur support solide. Le groupe du Dr. Metzler-Nolte a par exemple dérivatisé un PNA par un groupement alcyne ou azoture, permettant l'ajout de composés d'intérêt par réaction de CuAAC (Figure 19a).<sup>65</sup> Pour une fonctionnalisation plus importante du PNA, des monomères modifiés ont été synthétisés. En créant un monomère alcyne sur un squelette glycine, il est possible de fonctionnaliser le PNA ailleurs qu'en position N-terminale (Figure 19b). C'est ainsi que le même groupe a ajouté une fonction ferrocène au sein d'un PNA, fonction intéressante pour ses propriétés réversibles d'oxydoréduction.<sup>66</sup> La dérivatisation de PNAs par des composés organométalliques ouvre la voie à des applications électrochimiques et de catalyse.

a) En position terminale



b) Au sein du PNA via un monomère alcyne

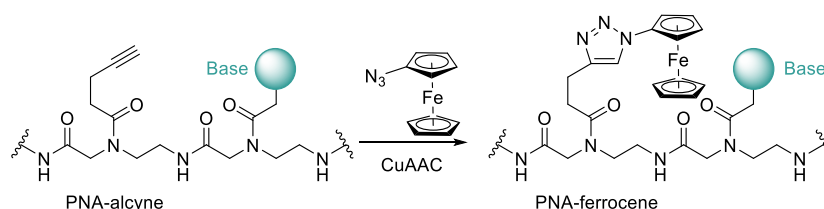


Figure 19. Ajout d'un groupement ferrocène sur un PNA par CuAAC

Il est également possible de modifier le squelette même des monomères de PNA utilisés. En changeant le squelette glycine pour un autre acide aminé, les propriétés de solubilité et de perméabilité varient : les GPNAs, PNA avec un squelette guanidine, ainsi que les PNAs dérivés par un

<sup>65</sup> N. Hüsken, G. Gasser, S. D. Köster and N. Metzler-Nolte, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 8, 1578–1586

<sup>66</sup> G. Gasser, N. Hüsken, S. D. Köster and N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.* **2008**, 3675–3677

groupe PEG ont une bien meilleure perméabilité cellulaire.<sup>67</sup> Des groupements comme une cystéine ou une lysine peuvent être ajoutés pour pouvoir conjuguer de petites molécules. Les propriétés d'appariement des PNAs sont conservées car les nucléobases et leur espacement reste inchangés. Ces modifications permettent de s'adapter au mieux au milieu (Figure 20).

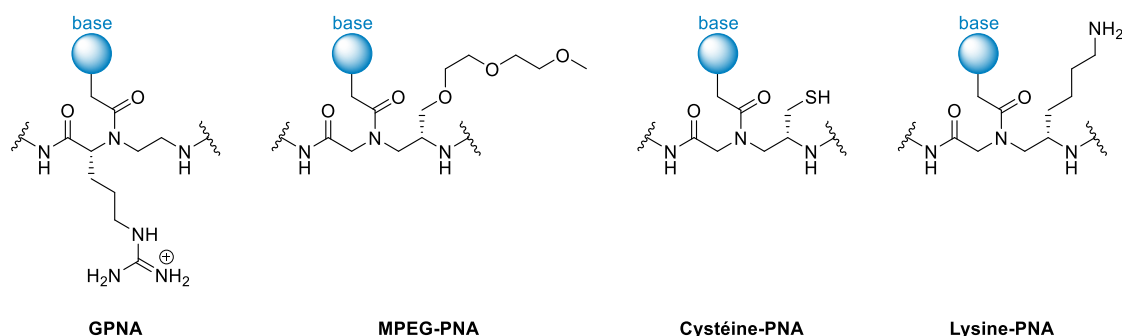


Figure 20. Exemple de PNAs au squelette modifié

## C. Utilisation des PNAs pour accélérer des réactions

### 1. Formation de complexes PNA-ADN

L'équipe du Pr. Wissinger a beaucoup travaillé sur des réactions utilisant l'ADN comme support (template), grâce à des PNAs complémentaires. Deux PNAs complémentaires de 2 régions différentes d'un oligonucléotide (ADN, ARN...) sont synthétisés. Quand ces deux PNAs sont mis en présence de l'ADN template, ils s'hybrident chacun avec une partie de cet ADN, et ainsi se rapprochent spatialement (Schéma 23). Les fonctions portées par chacun de ces brins PNA se retrouvent donc proches et susceptibles de réagir de façon quasi-intramoléculaire.

L'équipe de Wissinger a effectué une réaction de Staudinger supportée sur ADN, en faisant réagir une phosphine sur un brin PNA, et une azidocoumarine liée à un autre PNA, chacun complémentaire d'une région différente d'un même brin d'ADN.<sup>68</sup> La réaction de Staudinger engendre la formation d'une amino-coumarine fluorescente (Schéma 23). L'azido-coumarine utilisée ici est une sonde profluorescente. Le groupement azoture en position 7 quenche la fluorescence<sup>69</sup> et lorsque l'azoture est réduit en amine, la coumarine est fluorescente, ce qui permet un suivi de la réaction.

<sup>67</sup> S. Barluenga and N. Winssinger, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1319–1331

<sup>68</sup> Z. L. Pianowski and N. Wissinger, *Chem. Commun.* **2007**, 3820–3822

<sup>69</sup> D. J. Maly, F. Leonetti, B. J. Backes, D. S. Dauber, J. L. Harris, C. S. Craik, and J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3, 910–915

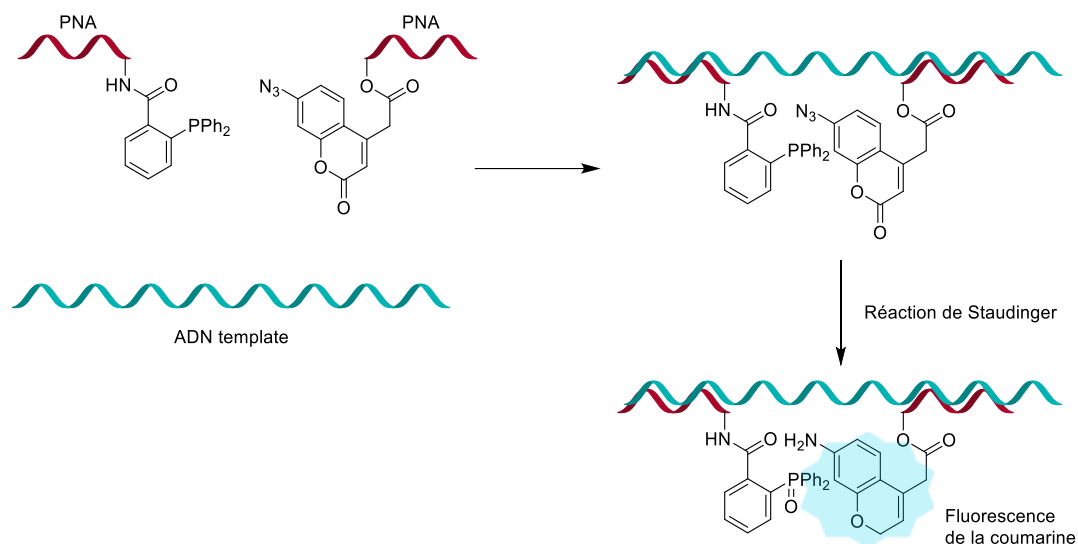


Schéma 23. Réaction de Staudinger supportée par reconnaissance de l'ADN

Dans ces conditions, jusqu'à 50% de conversion sont obtenus en moins de 10 minutes dans un mélange Formamide : PBS (1:1) selon les PNAs utilisés. Pour les mêmes PNAs utilisés, le taux de conversion après 40 min est inférieur à 5% lorsque le template ADN n'est pas complémentaire à l'un des PNAs, contre un taux de conversion supérieur à 30% dans le même temps sans mésappariement (ADN template complémentaire). La vitesse de cette réaction supportée variant de manière significative avec un mésappariement d'un seul nucléotide, elle peut être utilisée pour détecter des permutations de l'ADN.

La constante de vitesse de la réaction de Staudinger quand elle n'est pas supportée sur ADN est assez faible, de l'ordre de  $8 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>70</sup> A une concentration de 1 mM en réactifs, cette réaction prendrait plusieurs jours pour atteindre un très faible pourcentage de conversion, avec un temps de demi-vie calculé de 14 jours. Grâce à la reconnaissance moléculaire entre l'ADN et les PNAs, les vitesses de réaction sont considérablement augmentées. En moins de 10 minutes à 1 mM, plus de la moitié de la réaction a eu lieu. Tout un pan de réactions biocompatibles mais trop lentes deviennent ainsi envisageables pour des applications *in vivo*.

Sur le même principe de reconnaissance moléculaire entre les PNAs et l'ADN, l'équipe de Wissinger a réussi à relarguer des molécules fonctionnelles comme un cytotoxique (doxorubicine), un agoniste de transcription (estradiol) ou un fluorophore (rhodamine).<sup>71</sup> Ces molécules sont relarguées grâce à une réaction de Staudinger (Schéma 24). L'azoture réduit libère un bras autoimmolable qui va relarguer la molécule d'intérêt.

<sup>70</sup> M. B. Soellner, B. L. Nilsson, and R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 27, 8820–8828

<sup>71</sup> K. Gorska, A. Manicardi, S. Barluenga and N. Wissinger, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4364–4366

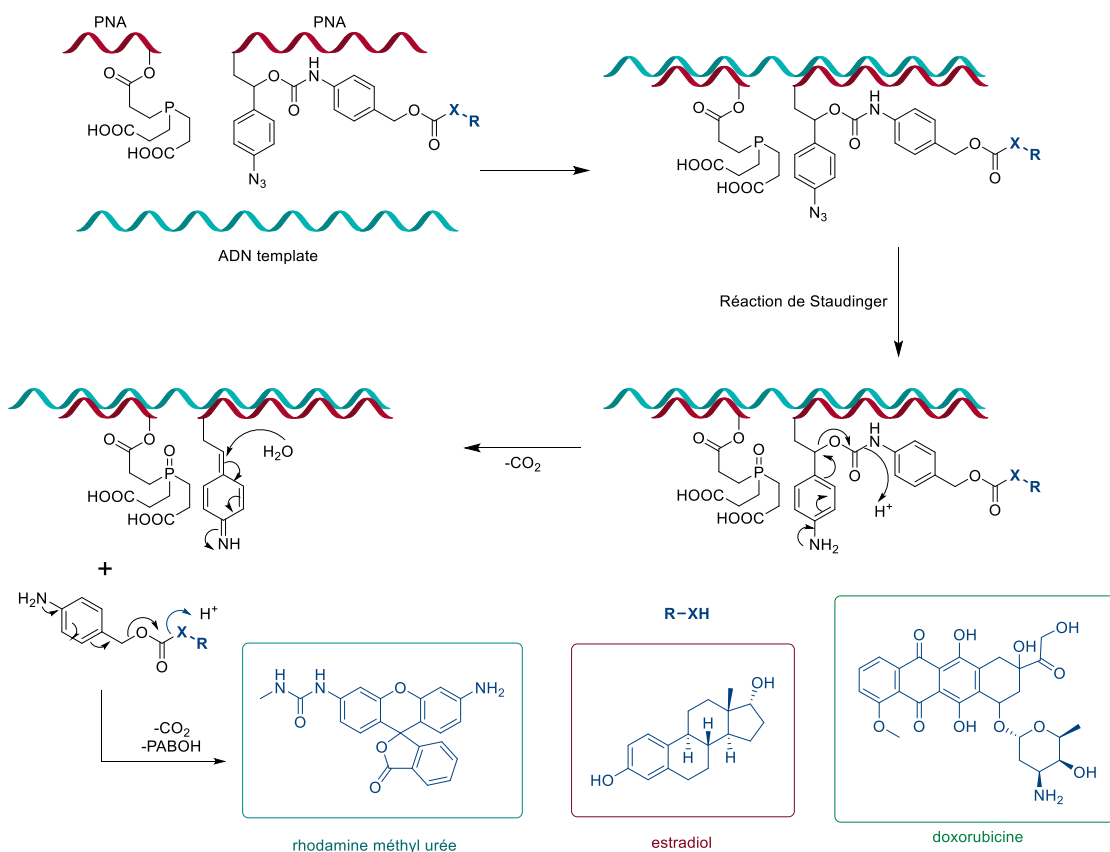


Schéma 24. Relargage de molécules actives par une réaction de Staudinger accélérée par ADN Template

L'utilisation d'ADN template permet la libération de molécules d'intérêt de manière sélective et rapide. Cela en fait un très bon outil chimobiologique pour des applications futures de détection ou de thérapie ciblée.

La chimie sur support ADN élargit le spectre des réactions bioorthogonales utilisables en augmentant suffisamment les cinétiques réactionnelles pour pouvoir utiliser des réactions bioorthogonales initialement lentes. Elle permet également une utilisation contrôlée de complexes catalytiques liés au PNA. L'équipe de Wissinger a développé un complexe de Ruthénium pouvant réduire des azotures par photoactivation catalytique.<sup>72</sup> L'ascorbate ou le NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) présents dans les cellules servent d'agent réducteur (Schéma 25). Le catalyseur au ruthénium a été greffé à un PNA qui s'apparie à l'ADN template. Un PNA greffé à un azoture s'apparie à proximité du catalyseur au ruthénium sur le template ADN. Le catalyseur est photoactivé et la réduction de l'azoture a lieu, grâce au NADPH ou à l'ascorbate présents dans le milieu. Une fois l'azoture réduit en amine, le PNA-amine peut être remplacé par un nouveau PNA-N<sub>3</sub> : le système introduit peut ainsi se régénérer. L'ADN template et son PNA complémentaire lié au catalyseur peuvent donc être introduits en proportions catalytiques.

<sup>72</sup> M. Röthlingshöfer, K. Gorska, and N. Winssinger, *Org. Lett.* **2012**, 14, 482–485

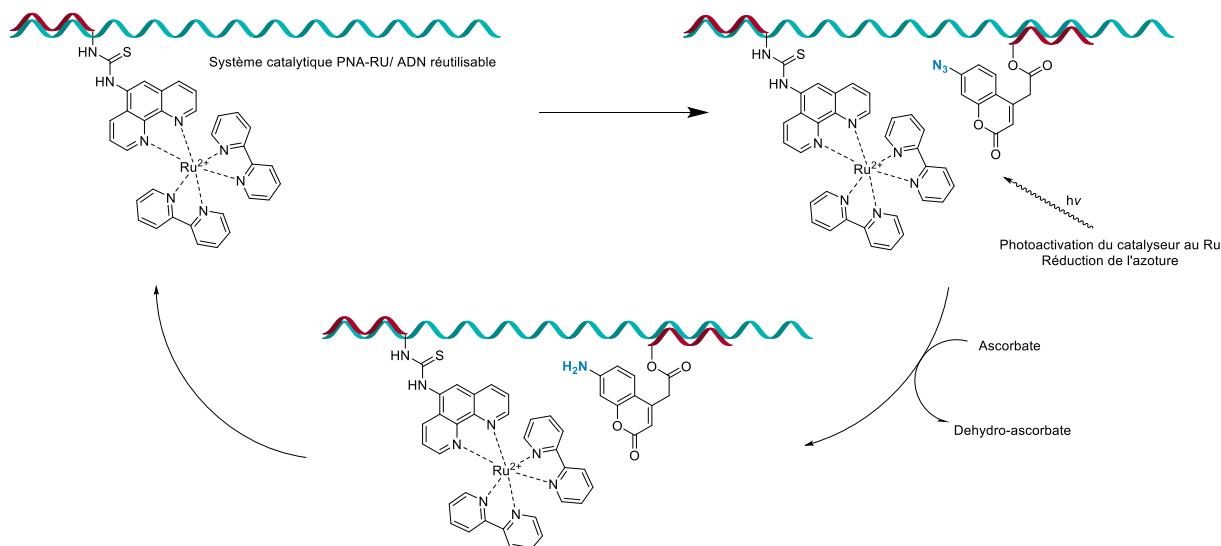


Schéma 25. Réduction photocatalytique avec un complexe de Ruthénium

Par la suite, l'équipe de Wissinger a synthétisé ce catalyseur au Ru(II) par ligation ADN-templated,<sup>73</sup> chaque brin PNA contenant une partie du catalyseur, activé par photoactivation.

Une des limitations dans l'utilisation d'ADN template pour catalyser des réactions concerne le turnover de ce template. Les réactions accélérées par ADN sont de pseudo-ordre 1, avec des constantes de vitesse apparente  $k_{app}$  de l'ordre de  $10^{-3} s^{-1}$  et cette réaction atteint un  $k_{app}$  de  $1.4 \cdot 10^{-1} s^{-1}$  en augmentant la taille des PNAs utilisés, puis s'arrête à un plateau. Des études cinétiques ont montré que la constante de dissociation entre les deux PNAs ( $k_{off}$ ) diminue quand la taille des PNAs augmente, avec des  $k_{off}$  de l'ordre de  $10^{-3} s^{-1}$  pour des PNAs de 9 bases complémentaires. Ainsi, lorsque la taille des PNAs augmente, la vitesse de réaction augmente, mais les PNAs ont tendance à rester liés au template. Le template n'est donc plus réutilisable, ce qui limite la cinétique entre des brins de PNAs longs et l'ADN (Schéma 26).<sup>74</sup>

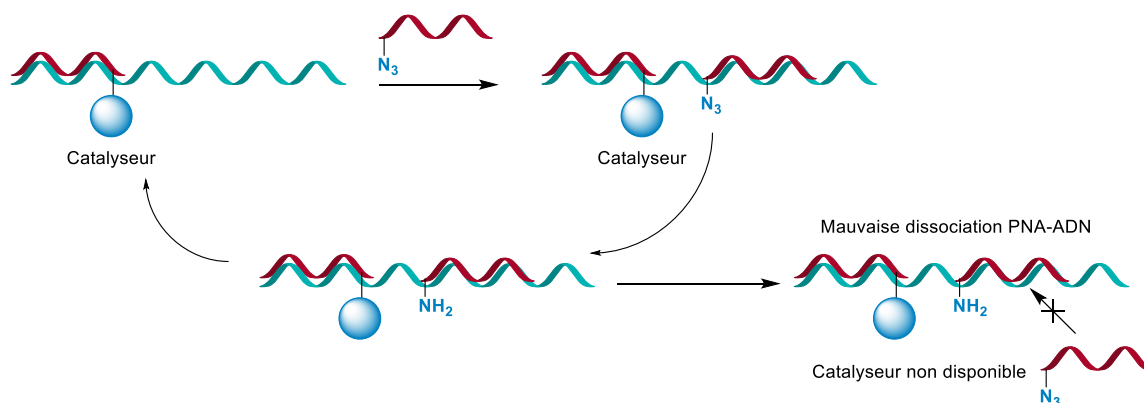


Schéma 26. Limitations de la catalyse par template ADN

Comme nous l'avons vu, les réactions catalysées par support ADN peuvent servir à libérer des principes actifs ou des fluorophores. Les brins PNA peuvent également servir de sondes vis-à-vis d'un oligonucléotide que l'on souhaite détecter. Ce concept a servi à la détection d'ARN messenger (ARNm) codant pour la O-6-méthylguanine-DNA méthyltransférase, protéine fortement exprimée dans

<sup>73</sup> M. Anzola and N. Wissinger, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 334–342

<sup>74</sup> D. Chang, E. Lindberg and N. Wissinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 1444–1447

certaines cellules en réponse à un traitement anticancéreux.<sup>75</sup> Deux PNAs complémentaires à cet ARNm ont été synthétisés, dérivatisés par une phosphine et une sonde profluorescente contenant un azoture. Les brins d'ARNm ont pu être révélés par fluorescence après réaction de Staudinger (Schéma 27).

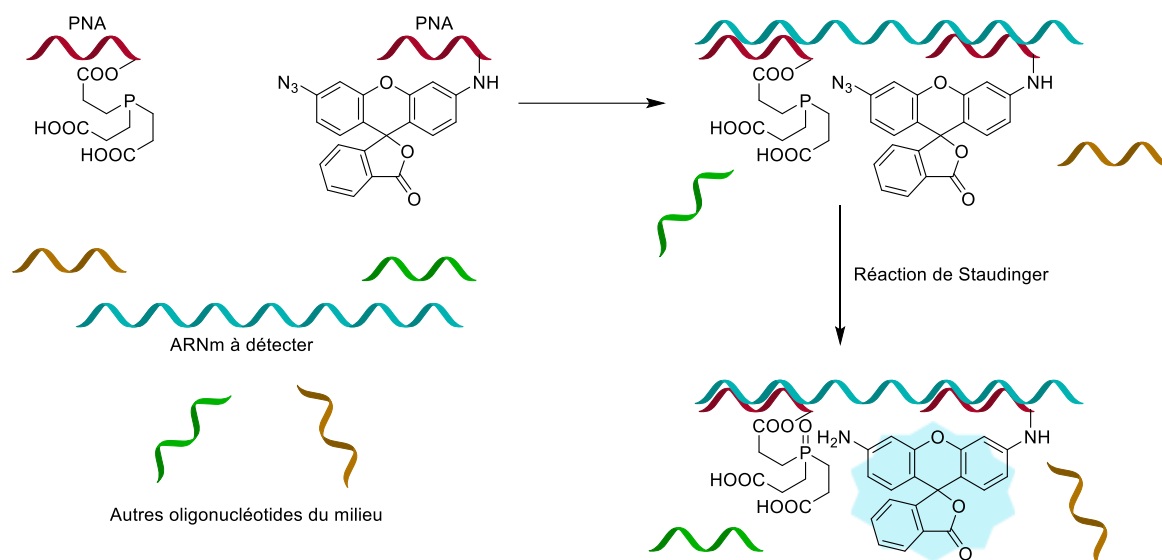


Schéma 27. Détection de l'ARNm in cellulo

Ce ciblage spécifique de l'ARN a également été effectué sur du micro-ARN (ARNmi). Les ARNsmi sont des régulateurs génétiques importants, impliqués dans la différenciation cellulaire ainsi que dans de nombreuses pathologies. Leur taille moyenne est d'une vingtaine de nucléotides. Ce ciblage spécifique de l'ARNmi a eu lieu dans des cellules<sup>76</sup>, puis des vertébrés vivants<sup>77</sup>, en utilisant cette fois la réduction photocatalytique d'un azoture par un complexe de Ruthénium décrite précédemment (Schéma 25).

L'utilisation des PNAs comme outil de détection d'oligonucléotides est très versatile, et prouve la compatibilité de ces composés avec le milieu biologique. La grande affinité des PNAs pour l'ADN et l'ARN a de nombreuses applications de détection *in vivo*, mais également *ex vivo* dans un but diagnostique. L'appariement spécifique PNA-ARN a par exemple été exploité afin de développer un test bandelette<sup>78</sup> de détection d'une séquence d'ARNmi-31, un suppresseur de tumeur. Deux PNAs sont synthétisés, complémentaires de l'oligonucléotide que l'on souhaite détecter : un PNA-séléno-cystéine marqué avec de la biotine ainsi qu'un PNA-séléno-ester marqué avec une fluorescéine thioisocyanate (FITC). Lorsque les deux brins sont à proximité, une liaison se forme entre la séléno-cystéine et le séléno-ester (Schéma 28). La séléno-cystéine utilisée étant principalement sous forme dimère, le composé PNA-séléno-cystéine est également présent sous forme de dimère. Cette forme dimère n'influe pas sur les résultats observés.

<sup>75</sup> Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten and N. Wissinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6492–6497

<sup>76</sup> K. K. Sadhu and N. Wissinger, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 8182–8189

<sup>77</sup> L. Holtzer, I. Oleinich, M. Anzola, E. Lindberg, K. K. Sadhu, M. Gonzalez-Gaitan, and N. Winssinger, *ACS Cent. Sci.* **2016**, 2, 394–400

<sup>78</sup> J. Sayers, R. J. Payne and N. Wissinger, *Chem. Sci.* **2018**, 9, 896–903

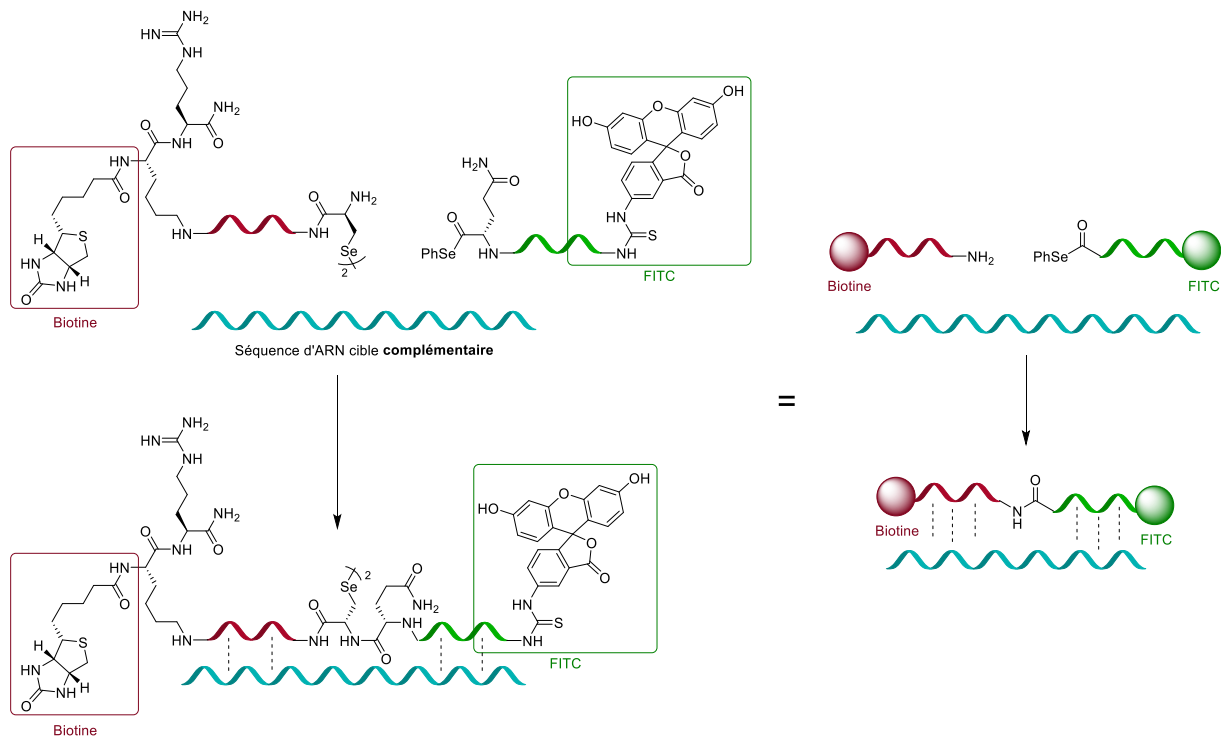


Schéma 28. Ligation entre deux PNAs sur support ARN

Le test pour savoir si l'ARNmi-31 que l'on cherche à détecter est présent s'effectue en plongeant une bandelette dans le milieu à tester. Sur cette bandelette sont présents des nanoparticules d'or recouvertes d'un anticorps anti-FITC, pour capter le FITC lié au premier PNA, ainsi que de la streptavidine, qui forme un complexe avec la biotine liée au deuxième PNA.

Les nanoparticules d'or recouvertes d'anticorps anti-FITC sont dans la zone d'absorption de la bandelette. Ces nanoparticules sont rouges. Grâce aux anticorps présents à leur surface, ces nanoparticules se lient au FITC-PNA-sénoester. Un flot latéral emporte les nanoparticules le long de la bandelette, jusqu'à la zone de test à la streptavidine. Si l'ARNmi-31 que l'on cherche à détecter est présent dans le milieu testé, il aura catalysé la réaction de ligation biotine-PNA-sénoester-PNA-FITC. Un trait rouge apparaît alors dans la zone de test avec la streptavidine, dû au complexe Streptavidine-biotine-PNA-sénoester-PNA-FITC-anticorps-nanoparticule d'or. Les nanoparticules d'or ne s'étant pas liées à un PNA-FITC sont aussi emportées par le flot latéral, créant une zone de contrôle au bout de la bandelette. Quand un trait rouge dû aux nanoparticules d'or apparaît dans la zone de test, l'ARN ciblé par les deux PNAs est détecté. Cette technologie permet donc une détection rapide et facile d'ARN sur des bandelettes (Schéma 29).

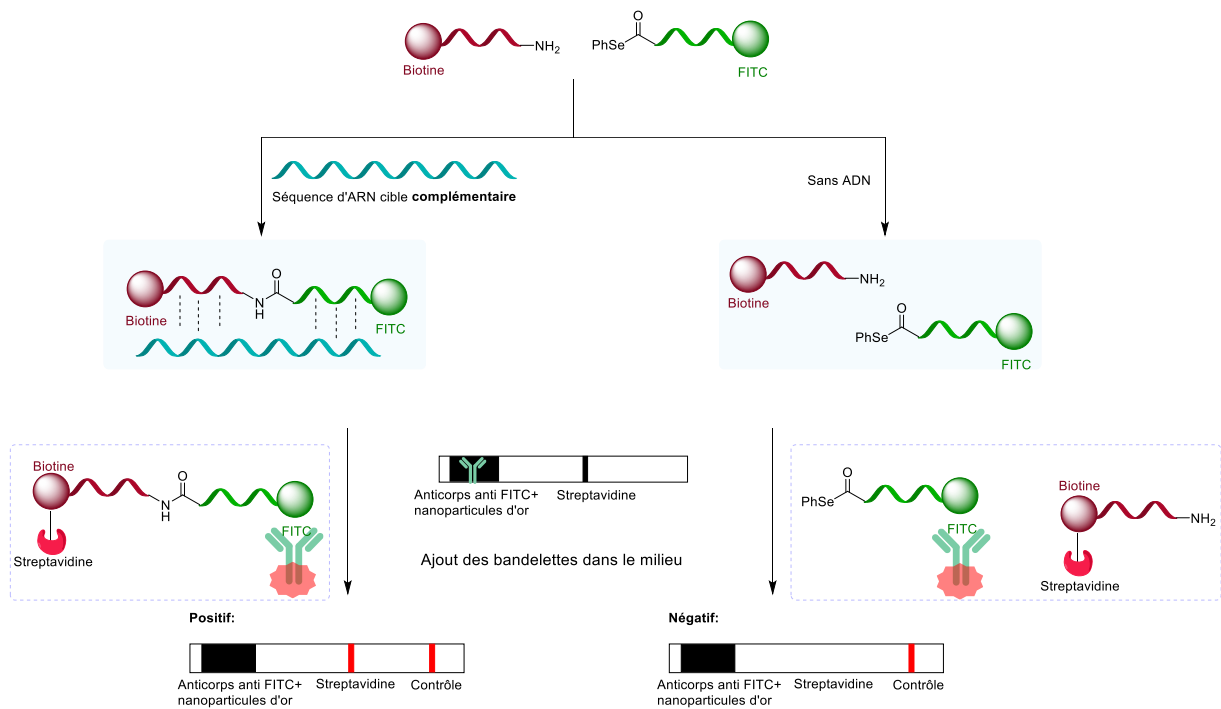


Schéma 29. Détection d'ARN par flot latéral sur bandelettes

## 2. Formation de complexes PNA-PNA

Lors de l'étude de la ligation sélénocystéine-sélénocystéine sur support ADN, l'équipe de Wissinger a également étudié cette réaction suite à la formation d'un complexe PNA-PNA. Chacun des composés est supporté par un PNA complémentaire. La reconnaissance moléculaire entre deux PNAs est plus forte que la reconnaissance moléculaire PNA-ADN. Des études cinétiques entre les deux brins PNAs complémentaires ont été effectuées et ont montré que la vitesse ne dépendait pas de la concentration. Les PNAs utilisés sont des PNAs courts, comportant 4 paires de bases. Avec la reconnaissance moléculaire des deux PNAs, la réaction devient un pseudo-ordre 1. Sans l'action des PNAs, la réaction de ligation sélénocystéine-sélénocystéine ne se produit pas en dessous de  $100 \mu\text{M}$  dans des temps raisonnables d'expérience, avec une constante de vitesse  $k = 6,5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , alors qu'avec les PNAs, la réaction a lieu rapidement à des concentrations bien plus faibles. L'hybridation des PNAs est extrêmement rapide et rapproche les deux réactifs dans l'espace, facilitant considérablement la réaction. Une constante de vitesse de  $k_{\text{app}} = 5,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  a été calculée avec un temps de demi-réaction de 13s (Schéma 30). Cette constante de vitesse s'explique car la cinétique d'hybridation des oligonucléotides courts est de l'ordre de  $k = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , le temps d'hybridation des PNAs est donc négligeable par rapport à la réaction de ligation.



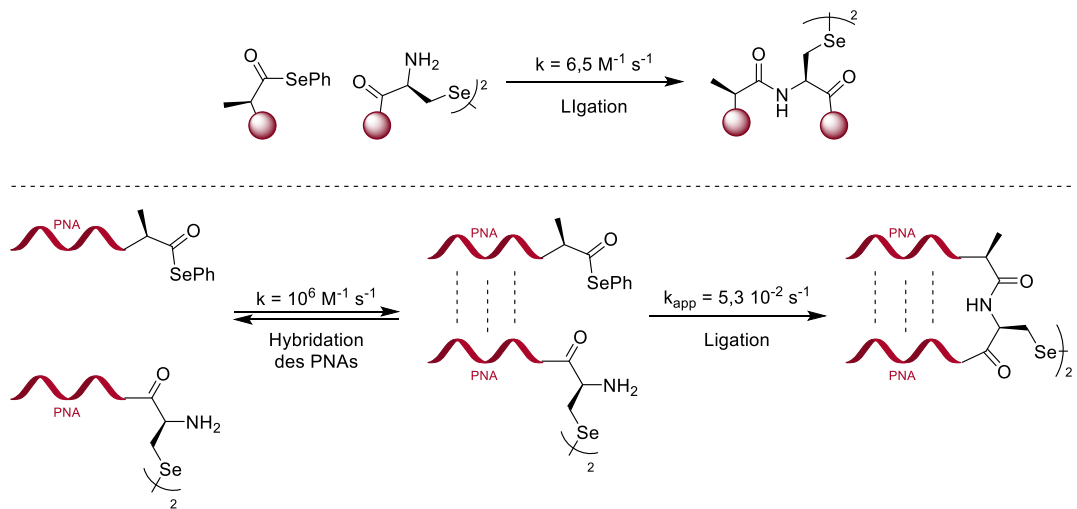


Schéma 30. Reconnaissance moléculaire entre 2 PNAs accélérant une ligation sélénocystéine-sélénocysteine

Cette accélération de la vitesse est considérable et ouvre la voie à de nombreuses possibilités pour l'accélération de réactions de couplage par association PNA-PNA. Des contrôles avec des témoins négatifs ont été effectués. Un PNA non complémentaire dérivatisé par le même groupe sélénocysteine a été ajouté dans le milieu. Seul le complexe formé entre les PNAs complémentaires a été observé, prouvant que c'est bien la reconnaissance moléculaire spécifique qui accélère la réaction (Schéma 31).

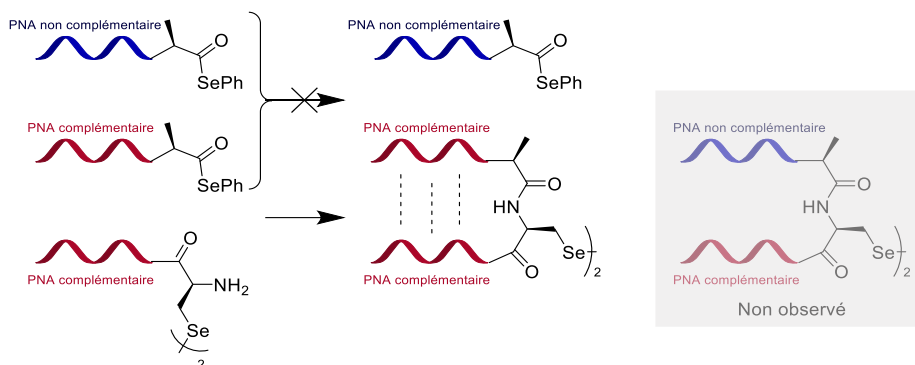


Schéma 31. Compétition entre PNA complémentaire et non complémentaire

### III. Objectifs du projet de thèse

Dans cette introduction, nous avons pu voir que la chimie bioorthogonale est un outil très important de chimobiologie, et que ses applications possibles sont multiples, notamment pour l'imagerie, le diagnostic ou la thérapie ciblée. Comme nous avons pu le voir, l'un des facteurs limitants des réactions bioorthogonales *in vivo* est leur vitesse. En effet, les concentrations *in vivo* des réactifs peuvent être très faibles, ce qui diminue leur probabilité de rencontre et donc de réaction.

Mes travaux de thèse ont pour objectif de palier ce problème en utilisant la reconnaissance moléculaire des PNAs de pair avec la chimie bioorthogonale. L'objectif principal de ma thèse est d'accélérer la réaction de « click and release » entre les iminosydnone et les cyclooctynes en utilisant cette stratégie.

En s'inspirant des travaux de Wissinger, illustrés dans les paragraphes précédents, la stratégie que nous souhaitons évaluer consistera donc à lier les deux partenaires, iminosydnone et cyclooctyne, à des brins PNAs complémentaires dans l'espoir d'accélérer suffisamment cette réaction bioorthogonale pour qu'elle puisse à terme être utilisable *in vivo*. Une fois les partenaires de la réaction liés à des brins de PNAs complémentaires, la réaction SPICC devrait devenir de pseudo-premier ordre et donc beaucoup plus rapide et efficace qu'en l'absence de PNA, en particulier à basses concentrations. L'intérêt de travailler avec une réaction d'ordre 1 ou pseudo-ordre 1 au lieu d'une réaction d'ordre 2 est clairement visible lorsque l'on observe le temps de demi-réaction en fonction de la concentration (Figure 21).

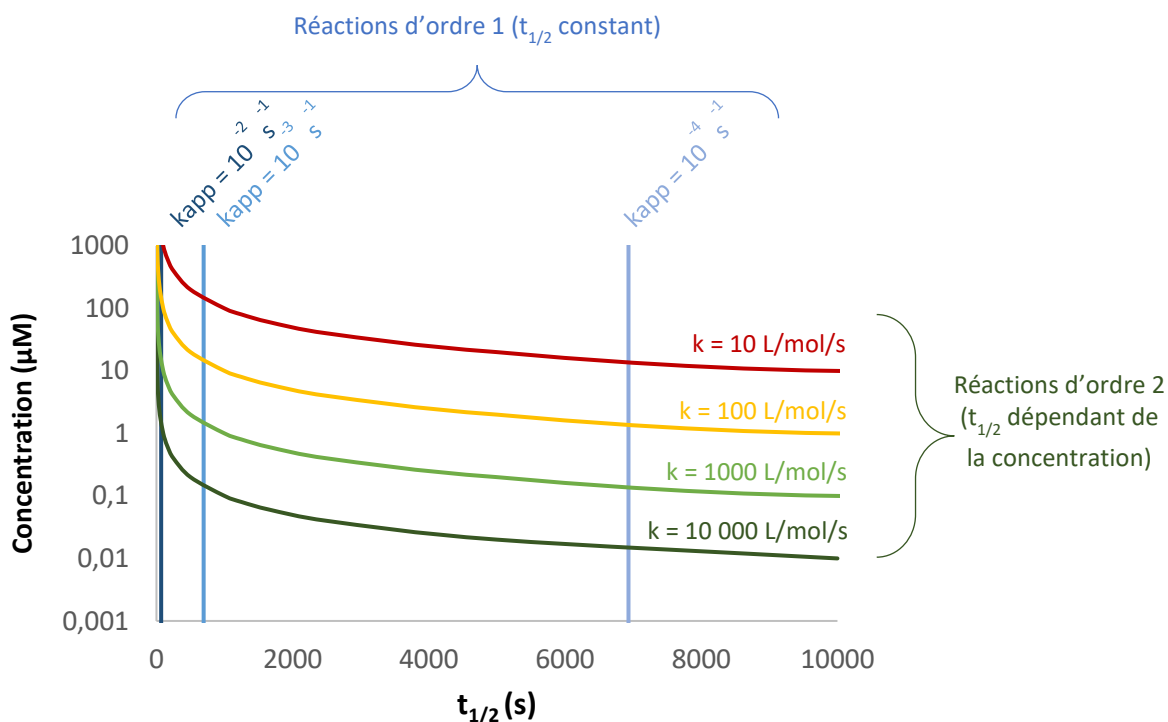
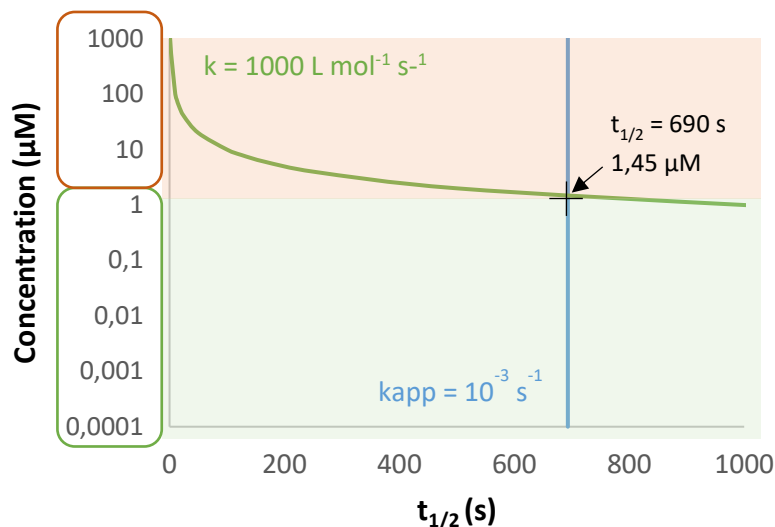


Figure 21. Temps de demi-réaction en fonction de la concentration pour différentes constantes de vitesse d'ordre 1 et 2.

Le temps de demi-réaction  $t_{1/2}$  est le temps pour lequel 50% de produit a été formé. Plus la réaction a lieu rapidement et plus ce temps est court. Pour des constantes de vitesse d'ordre 2, même lorsque la constante de vitesse est importante, des concentrations fortes sont nécessaires pour avoir un temps de demi-réaction vraiment faible. Par exemple, pour une constante de vitesse d'ordre 2 de  $k = 1000$

$M^{-1} s^{-1}$ , ordre de grandeur de réactions bioorthogonales rapides, une réaction de pseudo-ordre 1 de constante  $k = 10^{-3} s^{-1}$  devient plus rapide et avantageuse pour toute concentration inférieure à  $1,45 \mu M$  (Figure 22).



Concentrations où l'ordre 2 ( $k = 1000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) est plus rapide que l'ordre 1 ( $k = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )
  Concentrations où l'ordre 1 ( $k = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) est plus rapide que l'ordre 2 ( $k = 1000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )

Figure 22. Exemple de comparaison entre une cinétique d'ordre 2 et une cinétique d'ordre 1

Il est clair qu'à des concentrations faibles, une réaction d'ordre 1 est bien plus avantageuse qu'une réaction d'ordre 2, même pour celles possédant les constantes de vitesse les plus élevées connues. Par conséquent, développer des partenaires bioorthogonaux de pseudo-ordre 1 est très intéressant.

Dans un premier temps, des couples de PNAs complémentaires seront développés et leur impact sur la cinétique de la réaction de « click and release » évalués. Le couple de partenaire le plus rapide et adapté à des études *in vitro* puis *in vivo* sera ensuite sélectionné. Une fois le meilleur couple de partenaires PNAs déterminé, nous tenterons de l'utiliser dans plusieurs applications biologiques, telles que le relargage de principes actifs et l'imagerie par pretargeting. Nous envisageons notamment la préparation de bioconjugués avec des protéines ou anticorps d'intérêt ainsi que le marquage au fluor-18 de réactifs PNA pour des applications sur cellules et en pre-targeting *in vivo*. Enfin, la dernière partie sera consacrée à une nouvelle méthode de synthèse de composés mésoioniques d'intérêt par substitution nucléophile aromatique. Cette méthode permet d'obtenir de nouveaux composés d'intérêts plus réactifs, par une méthode de synthèse plus rapide.

# Chapitre 1. Reconnaissance moléculaire par les PNAs pour accélérer les réactions de « click and release »

## I. Introduction

### A. Objectif du projet

Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Pr. Gilles Gasser (Université PSL). Nous avons voulu utiliser la capacité d'association très forte des brins PNAs pour accélérer la réaction bioorthogonale entre une iminosydnone et un cyclooctyne (réaction SPICC). Pour cela, chacun des partenaires de la réaction SPICC devra être greffé à un brin PNA, les deux brins étant complémentaires. L'appariement des deux brins devrait rapprocher les deux réactifs dans l'espace et leur permettre de réagir plus rapidement (Figure 23).

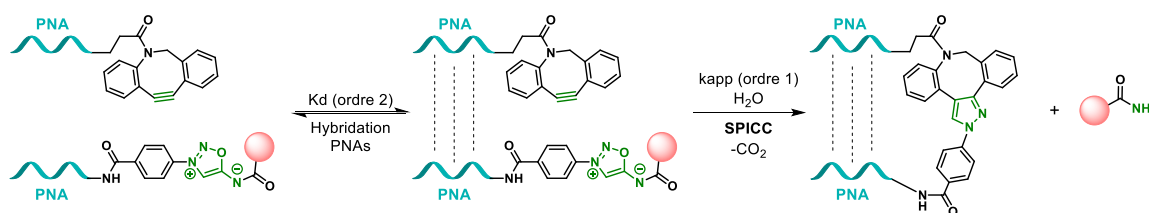


Figure 23. Principe de l'augmentation de la cinétique de SPICC par reconnaissance moléculaire entre deux PNAs

Une preuve de concept de l'efficacité de cette stratégie d'accélération de la réaction de ligation et coupure entre une iminosydnone et un cyclooctyne avait déjà été apportée par un résultat préliminaire obtenu par la Dr. Karine Porte avant mon début de thèse. L'objectif de ce projet est donc de confirmer ce résultat préliminaire et de synthétiser plusieurs couples de PNAs variant par leur taille afin d'étudier les limites de ce concept. Le but ultime de ces objets étant d'être utilisés *in vivo*, il est préférable qu'ils puissent être les plus petits possibles, tout en gardant leur forte capacité d'association. Les couples de PNAs seront synthétisés en gardant une partie de la séquence initialement utilisée par la Dr. Karine Porte. Des études cinétiques par fluorescence seront ensuite effectuées afin de sélectionner le couple de PNAs présentant le meilleur compromis taille/efficacité et rapidité de la réaction SPICC. Le couple de PNAs complémentaires choisi sera ensuite utilisé dans plusieurs applications biologiques.

## B. Résultats antérieurs du laboratoire

### 1. Conception et voies de synthèse des dérivés PNAs

Pour pouvoir suivre la réaction de « click and release » entre nos deux brins PNAs de manière rapide et ainsi faire des études cinétiques rigoureuses, nous avons décidé d'utiliser une iminosydnone fluorogénique (Figure 24). Un fluorophore est lié à l'iminosydnone ce qui induit l'inhibition de sa fluorescence (quenching). Suite à la reconnaissance moléculaire des PNAs et à la réaction SPICC, le fluorophore est libéré de l'iminosydnone et peut alors fluorescer normalement. Ainsi, il est simple de

suivre la cinétique de la réaction SPICC en mesurant l'intensité de fluorescence du fluorophore libéré au cours de la réaction.

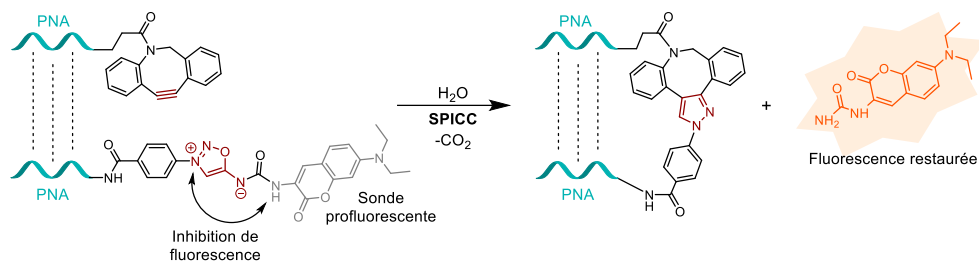


Figure 24. Principe du suivi cinétique à l'aide d'une sonde fluorogénique

Ce phénomène de « quenching » de fluorescence par une iminosydnone avait été démontré par notre laboratoire lors de travaux antérieurs.<sup>79</sup> Certaines coumarines peuvent voir leur fluorescence inhibée par effet PeT (photoinduced electron transfer) selon le groupement qui leur est lié. Il a été montré dans notre laboratoire que c'était le cas lorsque cette coumarine était liée à une iminosydnone urée. La forme urée terminale de cette coumarine, qui est la forme qui sera relarguée après réaction de « click and release », est fluorescente et son signal d'émission de fluorescence sera suivi lors des études cinétiques (Figure 24).

Diverses méthodes de synthèse des iminosydnones urées ont déjà été développées et optimisées dans notre laboratoire. Une de ces méthodes utilise une activation de l'azote exocyclique des iminosydnones à l'aide de carbonyldiimidazole (CDI) ce qui permet d'obtenir des dérivés *N*-carbonylés d'iminosydnones.<sup>80</sup> Un plus large panel de nucléophiles peut être ajouté en position *N*-exocyclique, liés par un groupement carbonyl ou thiocarbonyl (Figure 25).

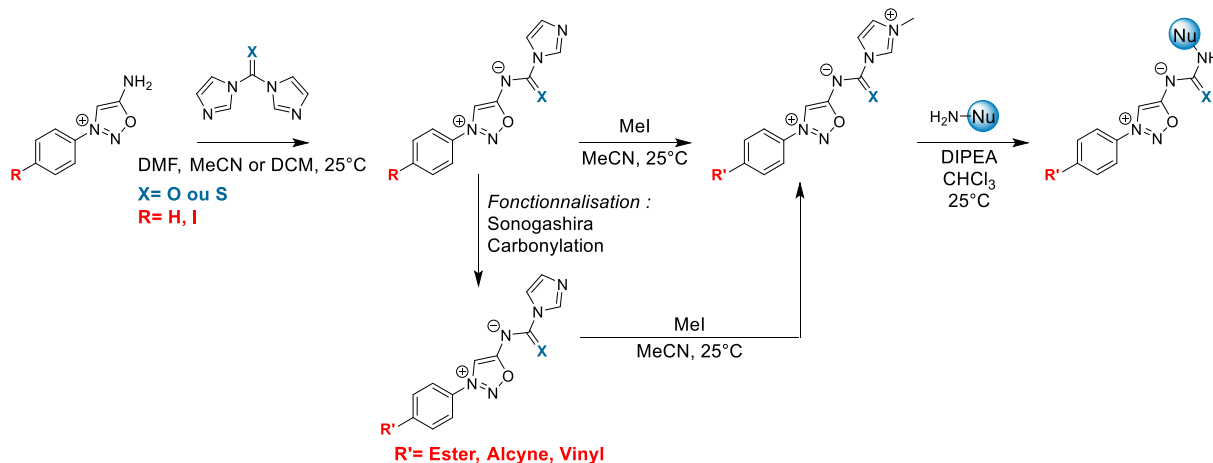


Figure 25. Synthèse de dérivés carbonylés en position N-6 d'iminosydnones

L'iminosydnone que nous avons choisi de synthétiser est liée par une fonction urée en position N6 à une coumarine. La coumarine est ajoutée en dernier sur le synthon iminosydnone, obtenu depuis la iodo-iminosydnone-amine.

L'autre partie de l'iminosydnone, liée à la position N3, a été conçue de manière à pouvoir la coupler au PNA *via* une réaction de CuAAC. Par conséquent, une fonction azoture a été greffée (Schéma 32).

<sup>79</sup> M. Riomet, K. Porte, A. Wijkhuisen, D. Audisio and F. Taran., *Chem. Commun.* **2020**, 56, 7183 – 7186

<sup>80</sup> M. Riomet, K. Porte, L. Madegard, P. Thuéry, D. Audisio, and F. Taran, *Org. Lett.* **2020**, 22, 6, 2403–2408

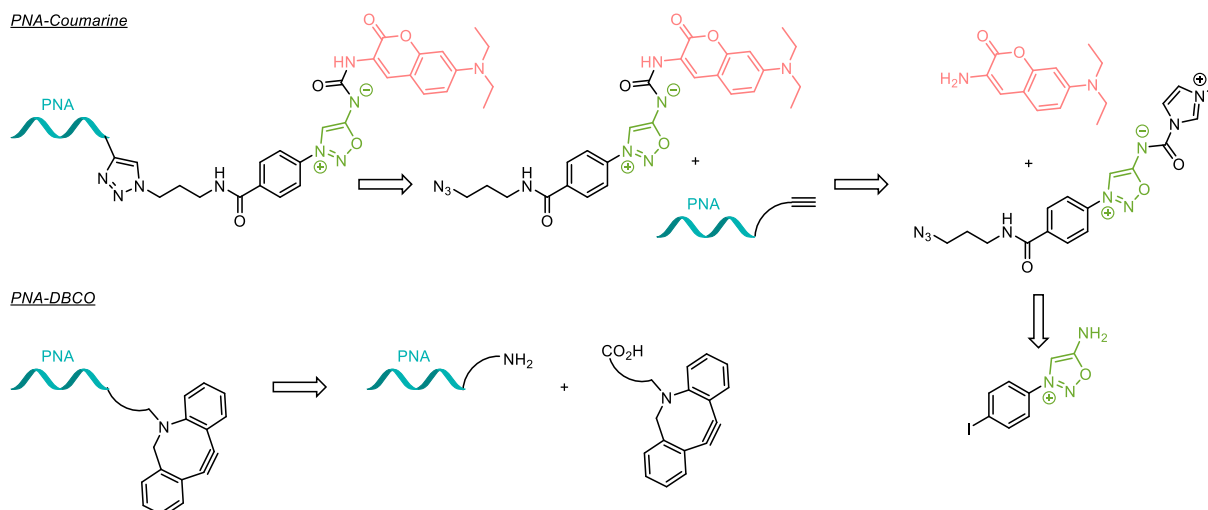


Schéma 32. Voie retrosynthétique des dérivés PNAs

Des réactions de « click and release » entre des iminosydnones urées et des cyclooctynes ont déjà été étudiées. Le DBCO est un des meilleurs compromis en termes de réactivité (meilleur que le BCN) et de stabilité. C'est donc ce cyclooctyne qui a été choisi pour être greffé sur les PNAs. Le PNA-DBCO sera obtenu par couplage peptidique entre la partie PNA et le synthon DBCO-COOH.

## 2. PNAs synthétisés et étudiés précédemment

Trois PNAs ont été synthétisés au cours de la thèse de Karine Porte : deux PNAs complémentaires, et un PNA non complémentaire, afin de pouvoir juger de l'efficacité et de la spécificité de la reconnaissance moléculaire dans l'accélération de la réaction. Les PNAs synthétisés contiennent tous huit bases, choisies d'après les travaux du Pr. Gilles Gasser (Université PSL), notre collaborateur (Figure 26).<sup>81</sup> La synthèse de ces composés sera détaillée par la suite dans la partie II. B. Synthèse des PNAs.

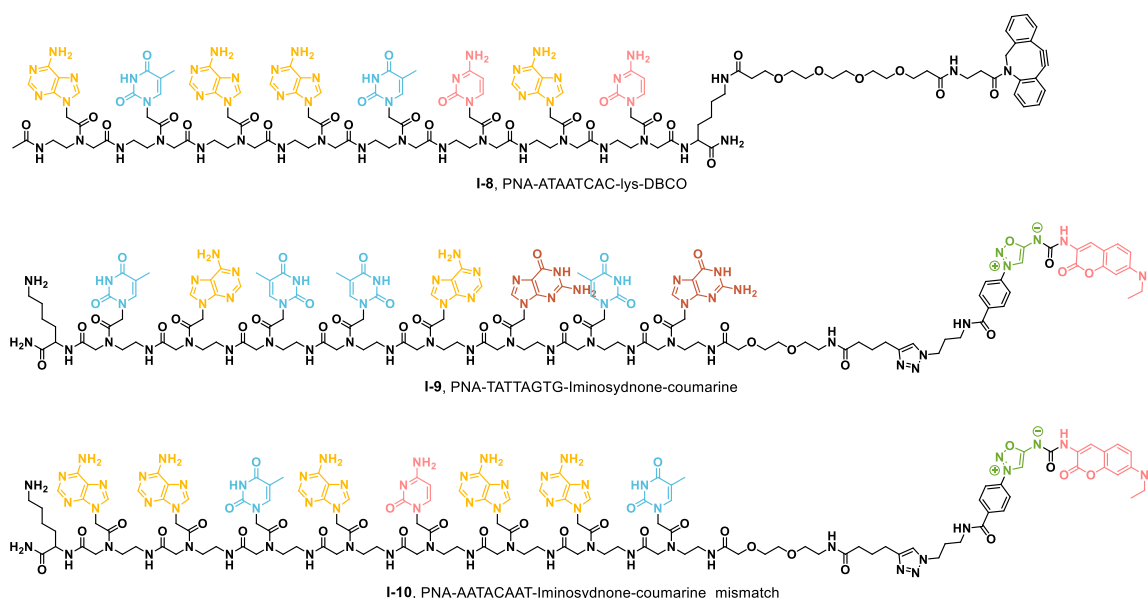


Figure 26. Structures des trois PNAs synthétisés précédemment

<sup>81</sup> A. Leonidova, C. Foerster, K. Zarschler, M. Schubert, H. Pietzsch, J. Steinbach, R. Bergmann, N. Metzler-Nolte, H. Stephan and G. Gasser, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 5601–5616

Des études cinétiques de la réaction de ligation et coupure entre le PNA **I-8** et le PNA **I-9** ont été effectuées par suivi de fluorescence de la coumarine relarguée (Figure 27). Le suivi de cette réaction de « click and release » sera plus amplement détaillé dans la partie III. Etudes cinétique. Une étude cinétique de la réaction de ligation et coupure entre les PNAs non complémentaires **I-8** et **I-10** a également été réalisée. Une analyse LC-MS montre que, tout comme lorsque les PNAs sont complémentaires, seul le produit de ligation entre les deux PNAs et la coumarine urée a été observé, mais avec une cinétique de réaction très lente d'après le suivi par fluorescence (Figure 27).

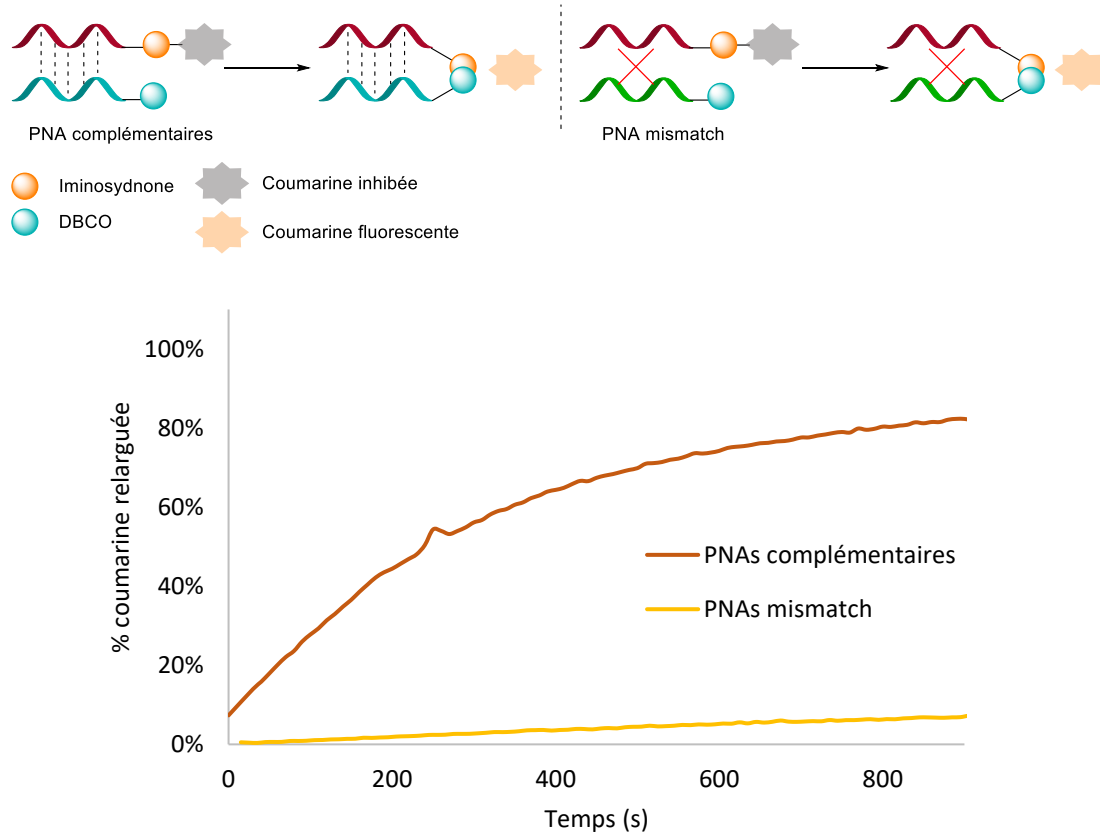


Figure 27. Comparaison des cinétiques pour les PNAs **I-8** et **I-9** et pour les PNAs **I-8** et **I-10 mismatch** à 1  $\mu\text{M}$  dans le PBS.  $\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ .

Ces résultats montrent que c'est la complémentarité des deux brins et leur forte capacité d'appariement qui augmentent considérablement la vitesse de la réaction de « click and release ». Un des objectifs de ma thèse a donc consisté à confirmer ce résultat préliminaire très encourageant. Nous avons en particulier voulu étudier l'influence de la longueur du PNA sur la vitesse de la réaction SPICC. Celle-ci a en effet un impact direct sur la constante d'association des deux brins de PNA et donc sur la vitesse globale du procédé.

Le processus de « click and release » accéléré par reconnaissance moléculaire des PNAs implique trois réactions successives : l'appariement des PNAs, la cycloaddition [3+2] entre le cyclooctyne et l'iminosynone et la réaction de rétro Diels-Alder (Schéma 33).

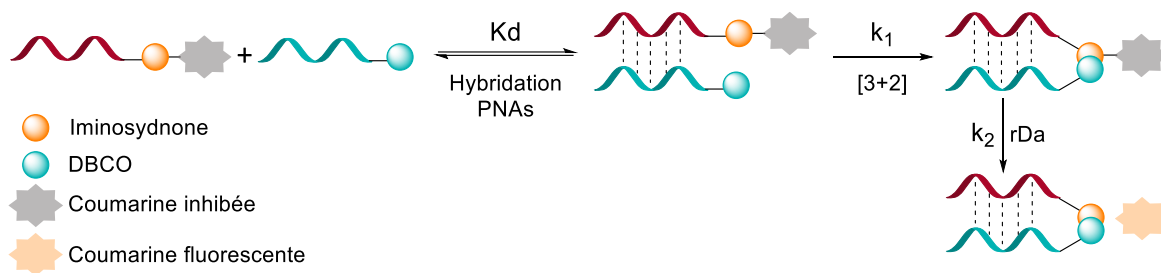


Schéma 33. Réaction de "click and release" assistée par PNAs

La réaction SPICC avec des substrats PNA dépend donc de trois constantes de vitesse. La première, relative à l'association des deux brins PNAs, est d'ordre 2. Une fois hybridés, les PNAs complémentaires sont liés par des liaisons hydrogène pour former une seule entité. Les deux partenaires de cycloaddition sont rapprochés spatialement par les PNAs : la vitesse de cycloaddition [3+2] ne dépend alors plus de la concentration des deux réactifs. Pour finir, cette ligation est immédiatement suivie d'une réaction de rétro Diels-Alder entraînant la libération du composé d'intérêt. La réaction de rétro Diels-Alder est extrêmement rapide, l'intermédiaire de cycloaddition n'étant généralement pas observé, et sa vitesse ne dépend d'aucune concentration.

La vitesse de réaction générale peut s'écrire :

$$v_1 = k_d([PNA1][PNA2]); v_2 = k'$$

$$v = v_1 + v_2 = k_d([PNA1][PNA2]) + k'$$

La constante de vitesse  $k'$  dépend de la vitesse intrinsèque de la réaction de « click and release », elle dépend donc des deux étapes du processus : la cycloaddition [3+2] et la réaction de rétro Diels-Alder. Cette dernière est considérée comme quasi-spontanée, la constante de vitesse  $k'$  est donc égale à la constante de vitesse de la cycloaddition [3+2]  $k_1$ . La réaction générale observée se comporte comme une réaction de pseudo-premier ordre si la vitesse d'hybridation des PNAs  $v_1$  est négligeable par rapport à la vitesse de la réaction de « click and release »  $v_2$ . Dans ces conditions, la vitesse de la réaction  $v$  ne dépend plus de la concentration des substrats et ne dépend plus que de la valeur de  $k_1$ .

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, la constante d'association entre PNAs complémentaires dépend du nombre de paires de bases des PNAs. D'après la littérature, la cinétique d'hybridation des oligonucléotides courts est de l'ordre de  $k = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Cette cinétique d'hybridation monte jusqu'à  $k = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  pour des PNAs plus longs, composés d'au moins 15 paires de bases.<sup>82</sup> Ces constantes de vitesse sont très rapides et la vitesse d'appariement des PNAs est donc négligeable si la concentration des substrats n'est pas trop basse. Pour une constante de vitesse d'hybridation de  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , à  $1 \mu\text{M}$ , le temps de demi-réaction d'hybridation des PNAs est de seulement une seconde.

Lors d'une réaction de « click and release » non assistée par PNAs, l'étape cinétiquement déterminante est celle de cycloaddition [3+2]. En présence de PNAs, avec une constante de vitesse d'association de  $k = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , l'étape cinétiquement déterminante reste cette même étape. Cependant, à très faibles concentrations, la vitesse d'hybridation n'est plus négligeable. Par exemple, à  $10 \text{ nM}$ , le temps de demi-réaction d'hybridation est de  $100 \text{ s}$ .

Conventionnellement, il est admis qu'une constante de vitesse de deuxième ordre supérieure à  $100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  est nécessaire pour une application *in vivo*. Pour une telle constante de vitesse, à  $10 \text{ nM}$ , seuls

<sup>82</sup> K. Jensen, H. Orum, P. E. Nielsen and B. Nordén, *Biochemistry*, 1997, 36, 16, 5072–5077



8% de conversion sont obtenus après 24 h. Il est donc crucial d'augmenter considérablement la vitesse de réaction pour des applications rapides *in vivo*. L'hybridation des PNAs augmente la probabilité de rencontre des composés et crée une concentration locale beaucoup plus élevée entre les deux partenaires de click. En comparaison, pour une réaction de pseudo-ordre 1 faisant intervenir des PNAs, les constantes de vitesse que nous avons observées sont de l'ordre de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , soit une conversion de 50% en moins de 20 minutes quelle que soit la concentration. Les premières expériences du laboratoire ont confirmé le pseudo-ordre 1 pour des concentrations descendant jusqu'à 50 nM.

L'utilisation de la reconnaissance moléculaire pour accélérer la vitesse de la réaction de SPICC est très prometteuse. Dans ce chapitre nous étudierons l'influence de la taille des PNAs utilisés sur la vitesse de la réaction, dans l'optique de sélectionner le meilleur couple pour des applications *in vivo*. Nous essaierons de déterminer le meilleur compromis entre un composé de petite taille et une accélération de la vitesse de réaction. En effet, un petit PNA est plus simple à synthétiser mais peut faire chuter le  $K_d$  de façon trop forte ce qui diminuerait l'efficacité du système à basses concentrations.

## II. Synthèse des composés

A partir des résultats obtenus précédemment au laboratoire, nous avons donc décidé de synthétiser de nouveaux conjugués PNA-DBCO et PNA-iminosydnone en faisant varier la taille des PNAs. Les PNAs dérivatisés souhaités ont été obtenus en deux principales étapes : tout d'abord la synthèse du brin PNA, obtenue par synthèse supportée sur solide, puis l'ajout du partenaire de click, iminosydnone-coumarine ou DBCO. Tout d'abord, le synthon azoture-iminosydnone-coumarine a été obtenu selon une voie de synthèse déjà développée au laboratoire.

### A. Synthèse du synthon azoture-iminosydnone-coumarine I-7.

Une voie de synthèse du composé azoture-iminosydnone-coumarine désiré a été élaborée au laboratoire (Schéma 34). Le sel d'iminosydnone **I-2** est obtenu avec de bons rendements à partir de la 4-nitro-iodoaniline, par alkylation de l'amine par le chloroacétonitrile, puis nitrosylation de l'amine secondaire obtenue et enfin cyclisation du nitroso-amino nitrile en milieu acide fort. L'iminosydnone urée **I-3** est ensuite obtenue par ajout de carbonyldiimidazole. Le groupement imidazole servira de groupe partant lors de l'ajout en dernière étape de la molécule d'intérêt. La partie phényle de la molécule est ensuite dérivatisée. L'iode réagit dans une carbonylation pallado-catalysée sous atmosphère de monoxyde de carbone dans l'EtOH pour donner l'ester éthylique **I-4** avec un rendement de 81%. Le composé est ensuite engagé dans une saponification suivie d'un couplage peptidique avec l'azidopropan-amine pour former le composé **I-6**. Enfin, l'imidazole est rendu plus nucléofuge par méthylation de l'azote, ce qui permet l'addition nucléophile de la coumarine et l'élimination de l'imidazolium. Le composé **I-7** est ainsi obtenu avec un rendement de 25%. Cette voie de synthèse permet d'obtenir plusieurs dizaines de milligrammes du produit désiré, ce qui est suffisant pour l'utilisation qui en est faite ici.

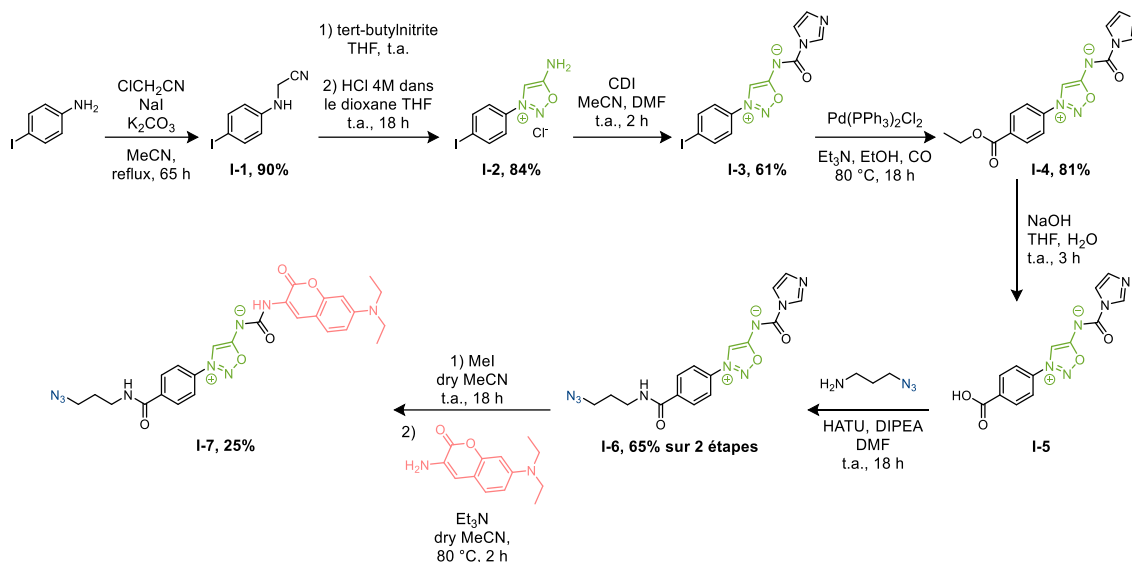


Schéma 34. Voie de synthèse du composé azoture-iminosydnone-coumarine I-7

## B. Synthèse des PNAs

Pour obtenir les PNAs, une synthèse sur support solide avec une stratégie de protection/déprotection Fmoc/Bhoc a été utilisée. Cette synthèse sur support solide a été effectuée sur des billes de résine de polystyrène TentaGel S RAM provenant de chez Rapp Polymer. Les monomères PNAs utilisés sont protégés par des groupements Fmoc sur leur amine terminale, et par des groupements Bhoc sur les amines primaires de l'adénine, la guanine et la cytosine (Figure 28).

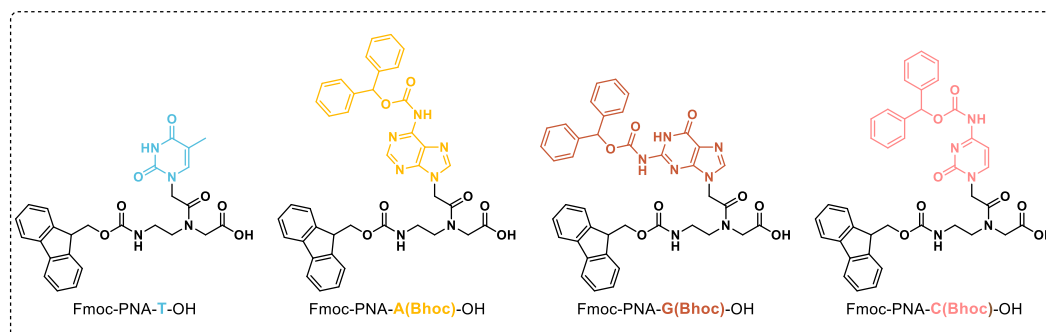


Figure 28. Structures des monomères PNAs utilisés lors de la synthèse supportée sur solide

Les différents couples de PNAs ont été conçus de manière à ce que la réaction de « click and release » soit optimale. Des espaceurs PEG ont été ajoutés entre les partenaires de click et les PNAs auxquels ils sont liés pour permettre plus de flexibilité dans la molécule. Ainsi, les partenaires de click DBCO et iminosydnone sont chacun séparés de la partie PNA par un nombre similaire d'atomes. Les deux partenaires de click peuvent alors se retrouver face à face quand les brins complémentaires des PNAs s'apparient, et ont suffisamment de flexibilité pour que l'angle nécessaire à la cycloaddition soit possible (Figure 29). En effet, l'attaque du cyclooctyne lors de la cycloaddition se fait perpendiculairement au dipôle iminosydnone.

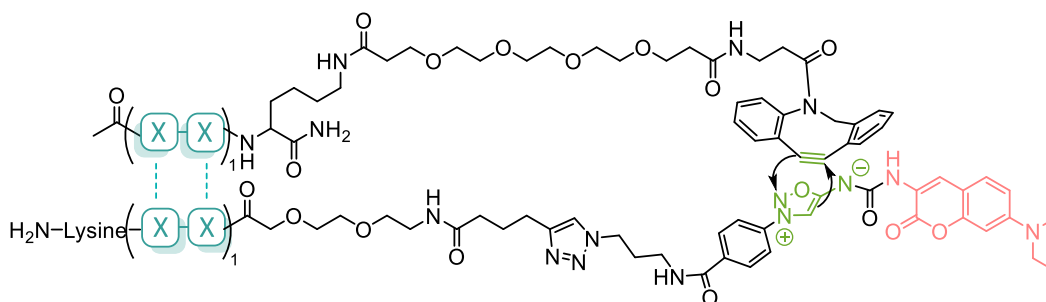


Figure 29. Structures des partenaires de click envisagés

Les PNAs choisis sont constitués de 8, 6, 4 et 2 paires de bases, avec une variation sur la composition pour les PNAs à deux paires de bases. Pour chaque nombre de paires de bases nous avons donc deux PNA complémentaires à synthétiser, un lié à l'iminosydnone-coumarine et l'autre lié au DBCO. Nous allons décrire dans un premier temps la synthèse de ces derniers.

### 1. Synthèse des PNA-DBCO

Cinq PNA-DBCO différents ont été synthétisés (Figure 30). Un espaceur PEG<sub>4</sub> a été choisi pour lier le DBCO au PNA, par l'intermédiaire d'une lysine.

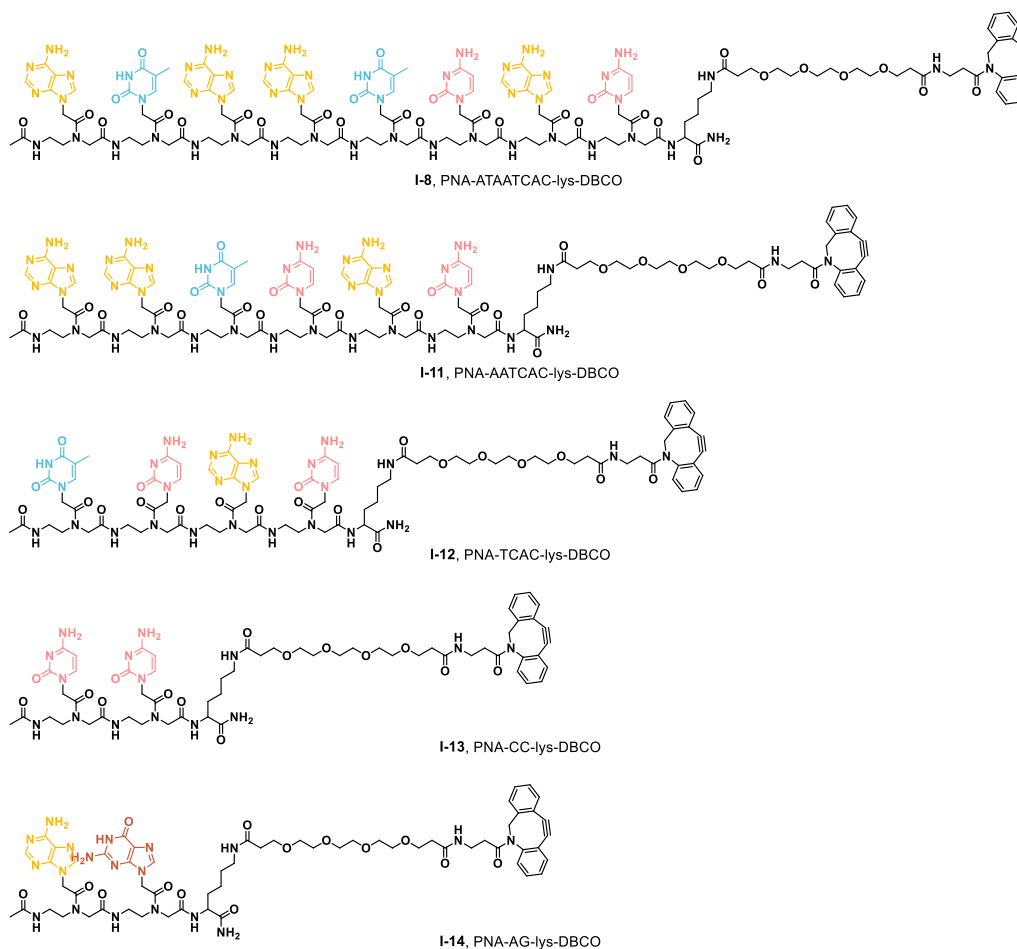


Figure 30. PNA-DBCO synthétisés

Les brins de PNAs nécessaires à la synthèse des PNA-DBCO **I-8** à **I-14** ont été dans un premier temps synthétisés par synthèse sur support solide. Puis les PNAs ont été clivés de la résine et purifiés par

HPLC semi-préparative. Le cyclooctyne a ensuite été introduit par couplage peptidique classique sur la chaîne latérale d'une lysine. Nous avons constaté qu'il était important de procéder de la sorte et non d'accrocher le DBCO sur support solide puis déprotéger et cliver l'ensemble du support, le DBCO ne supportant pas ces traitements.

Les détails de cette synthèse sont décrits ci-après.

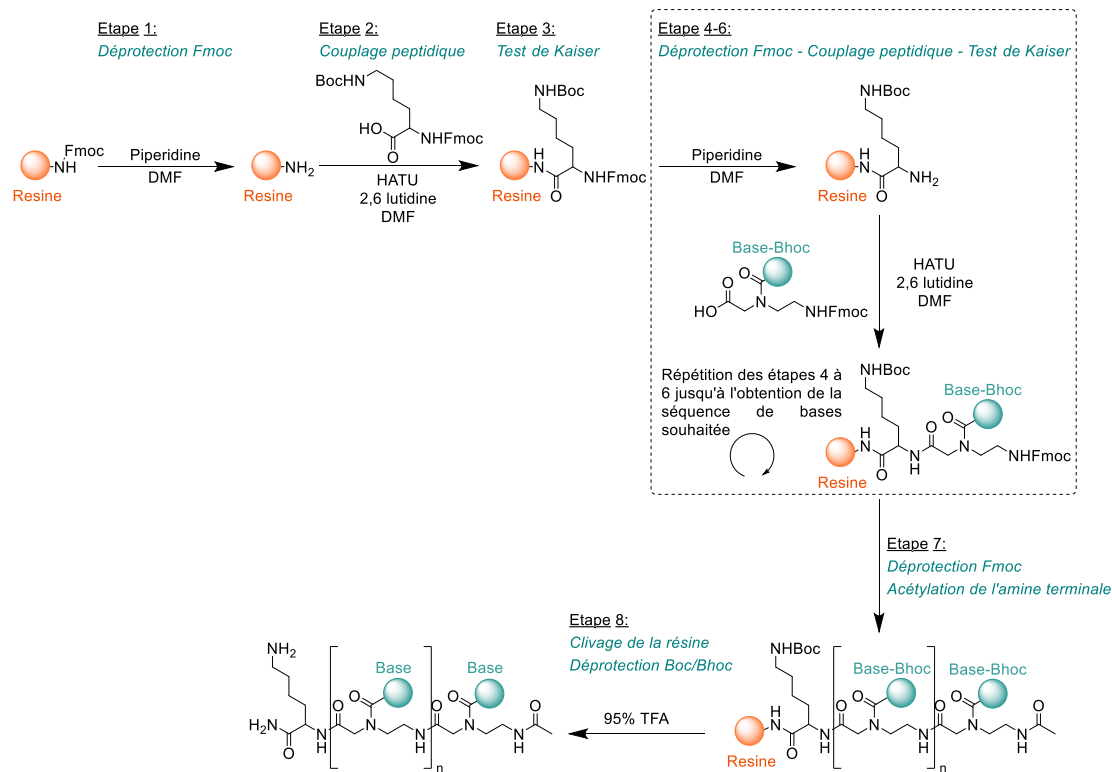


Schéma 35. Synthèse supportée sur solide de PNA

Dans un premier temps, la résine est pesée et mise à gonfler pendant 1h sous agitation dans du DMF. Une fois la résine prête à l'emploi, celle-ci, portant un groupement Fmoc, est déprotégée par de la pipéridine (Schéma 35, Etape 1). Chaque étape de déprotection comme de protection est suivie d'une étape de lavage au DMF (x 4) et DCM (x 1). Un premier couplage peptidique est ensuite effectué avec la Fmoc-Lys(Boc)-OH (Schéma 35, Etape 2). L'ajout de cette lysine à l'extrémité du PNA permettra d'effectuer par la suite un couplage peptidique avec le DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS. Pour pouvoir suivre la synthèse du PNA, des tests de Kaiser sont effectués à la fin de chaque étape de couplage sur quelques billes de résine prélevées (Schéma 35, Etape 3). Ce test colorimétrique (Schéma 36) en présence de ninhydrine permet de confirmer l'absence d'amine libre, et donc que la réaction de couplage est totale. Une amine libre en présence de ninhydrine réagit dans une réaction d'addition nucléophile, afin de former la 2-amino-1H-indène-1,3(2H)-dione. Cette amine réagit ensuite avec la ninhydrine dans une addition nucléophile, formant un chromophore bleu. La solution de ninhydrine jaune devient donc bleue en présence d'amine libre. Les étapes de déprotection et de couplage sont ensuite répétées avec les monomères de PNAs afin d'obtenir la séquence de bases désirée (Schéma 35, Etapes 4 à 6). Un dernier couplage avec de l'acide acétique est effectué (Schéma 35, Etape 7) afin de ne pas avoir d'amine libre à l'extrémité du PNA, ce qui créerait une compétition lors du couplage peptidique avec la lysine. Enfin, une fois le PNA désiré obtenu, celui-ci est clivé de la résine par une solution à 95% TFA (Schéma 35, Etape 8). Cette solution permet également de déprotéger les groupements Bhoc des bases adénine, guanine et cytosine, ainsi que le groupement Boc de la lysine. Le PNA obtenu est

complètement déprotégé. La présence du composé est vérifiée par LC-MS, et celui-ci est purifié par HPLC semi-préparative.

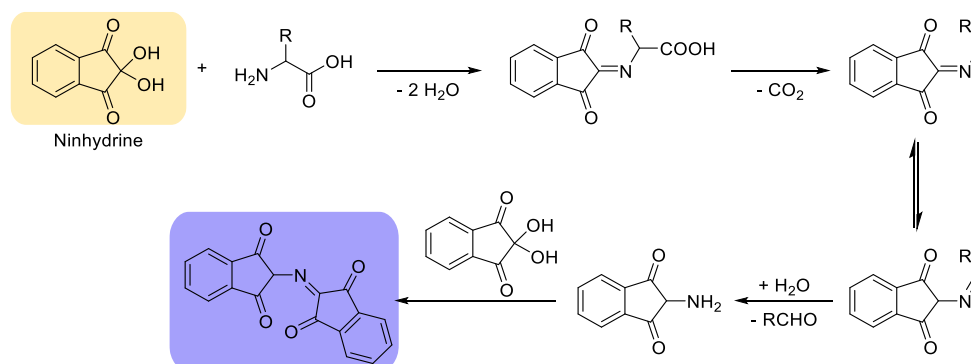


Schéma 36. Principe du test de Kaiser

Le PNA ainsi obtenu est ensuite engagé dans un couplage peptidique avec un DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS (Schéma 37). Seule l'amine de la lysine, beaucoup plus nucléophile que celles des bases nucléiques, réagit pour former le produit désiré. Le produit pur est obtenu après purification par HPLC semi-préparative.

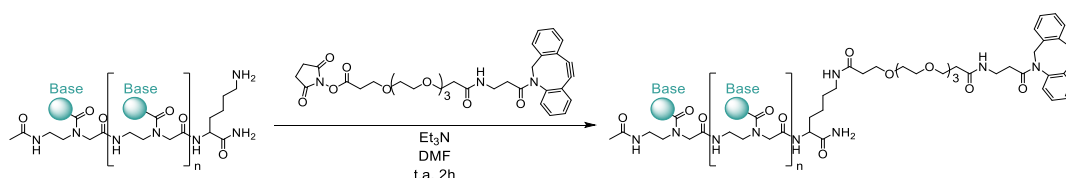


Schéma 37. Synthèse du PNA-DBCO

Les différents PNA-DBCO ont été obtenus sous forme de solide blanc, en faibles quantités de l'ordre du milligramme. Le rendement total est inférieur à 5%, en raison du nombre important d'étapes lors de la synthèse supportée et des deux étapes de purification par HPLC, mais les quantités obtenues sont suffisantes pour les applications voulues (Tableau 1).

Tableau 1. Rendements des PNA-DBCO

PNA n°	Séquence	Rendements	Quantités obtenues (mg)
I-8	ATAATCAC-DBCO	2,4%	1,5
I-11	AATCAC-DBCO	5%	2,7
I-12	TCAC-DBCO	2,5%	1
I-13	CC-DBCO	1,8%	0,5
I-14	AG-DBCO	3,5%	1

## 2. Synthèse des PNA-iminosydnone-coumarine

Cinq PNA-iminosydnone-coumarine complémentaires aux cinq PNA-DBCO ont été synthétisés (Figure 31).

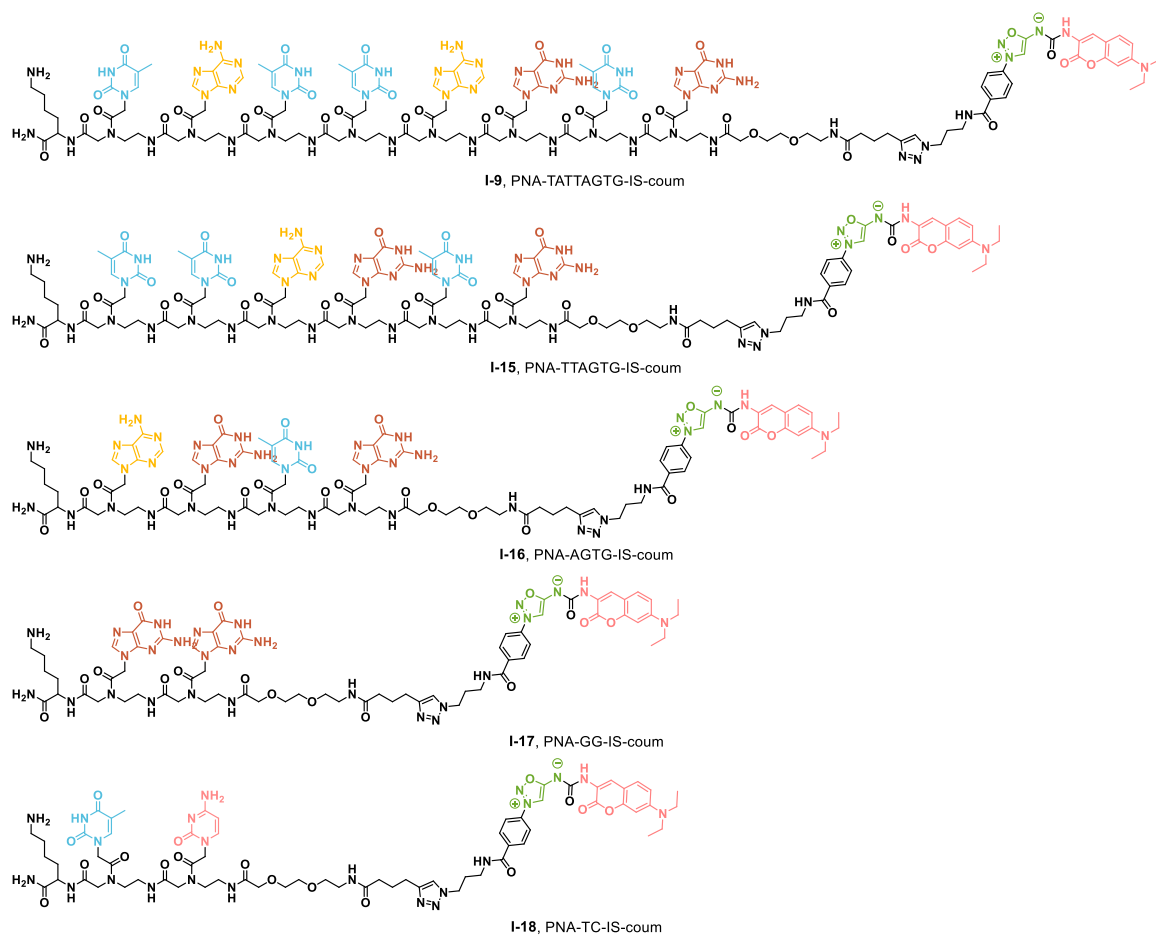


Figure 31. PNA-iminosydnone-coumarine synthétisés

Les PNA-iminosydnone-coumarine **I-9** à **I-18** ont été synthétisés avec la même stratégie de synthèse sur support solide que les PNA-DBCO (Schéma 35, Etapes 1 à 6). Le premier couplage effectué fut également avec la Fmoc-Lys(Boc)-OH. Cette lysine permettra par la suite d'effectuer des réactions de bioconjugaison. Une fois la séquence de bases désirée obtenue, le PNA n'est pas clivé de la résine, contrairement à l'intermédiaire du PNA-DBCO. Un espaceur PEG<sub>2</sub> est ajouté, suivi d'un alcyne terminal (Schéma 38, Etape 8'). Cet alcyne terminal va réagir dans une réaction de CuAAC sur support solide avec le composé azoture-iminosydnone-coumarine **I-7** préalablement synthétisé (Schéma 38, Etape 9). Après cette réaction, un lavage supplémentaire à l'EDTA est effectué pour éliminer les résidus de cuivre, en plus des lavages au DMF et au DCM. Le PNA est alors clivé de la résine et les bases Bhoc déprotégées par une solution de TFA à 95% (Schéma 38, Etape 10). Les PNA-iminosydnone-coumarine sont ainsi obtenus sous forme de solide orange après purification par HPLC semi-préparative.

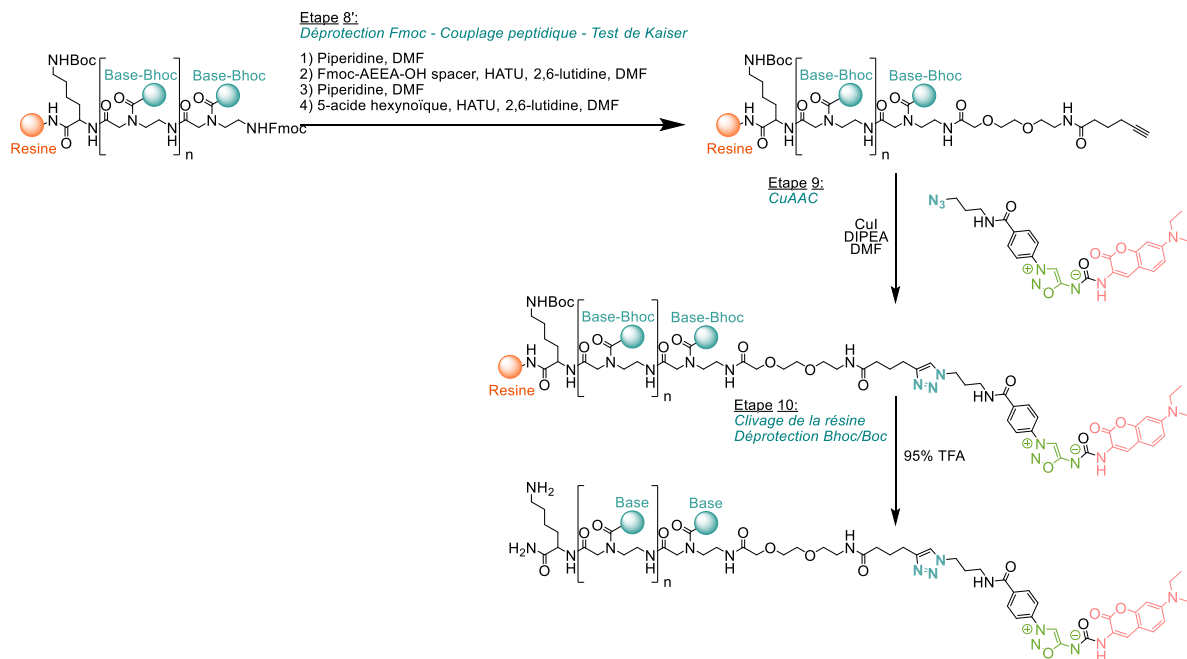


Schéma 38. Synthèse du PNA-Iminosydnone-coumarine

Les différents PNA-Iminosydnone-coumarine sont obtenus en faible quantité, mais avec des rendements plus élevés que les PNA-DBCO et en quantités suffisantes pour les applications voulues (Tableau 2).

Tableau 2. Rendements des PNA-Iminosydnone-coumarine

PNA n°	Séquence	Rendements	Quantité obtenue (mg)
I-9	TATTAGTG-IS-coum	3,8%	2,7
I-15	TTAGTG-IS-coum	27%	16
I-16	AGTG-IS-coum	32%	15
I-17	GG-IS-coum	61%	7,6
I-18	TC-IS-coum	30%	9,8

### III. Etudes cinétiques

L'accélération de la vitesse de la réaction SPICC grâce à la présence de PNAs a déjà été démontrée dans notre laboratoire par la Dr. Karine Porte. Les deux PNAs utilisés étaient les PNAs complémentaires à 8 bases **I-8** et **I-9**. Des études de suivi de fluorescence et par LC-MS ont montré que la réaction de ligation et de coupure était totale, et l'on observe uniquement le produit de ligation entre les deux PNAs **I-19** et la coumarine urée **I-20** qui est le produit de relargage fluorescent (Schéma 39). Des suivis cinétiques de cette réaction par fluorescence ont été effectués à différentes concentrations (1  $\mu\text{M}$ , 500 nM et 50 nM) dans du PBS. La constante de vitesse apparente calculée pour ces différentes concentrations reste la même à chaque fois, de l'ordre de  $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , ce qui confirme que cette réaction est de pseudo-ordre 1 et donc que la vitesse ne dépend pas de la concentration (dans les conditions utilisées). Le temps de demi-réaction, autour de 430 s, n'augmente pas quand la concentration diminue, ce qui est habituellement le cas avec la réaction de ligation et coupure classique, ainsi que toutes les autres réactions d'ordre 2. Cette caractéristique est extrêmement importante pour des applications *in vivo*, où la concentration des composés peut être très faible, et où il est impératif d'avoir un temps de réaction rapide, pour éviter d'éventuels effets secondaires dus à la présence accumulée de composés dans des organes, ou pour éviter une élimination par le corps avant que la réaction n'ait eu lieu.

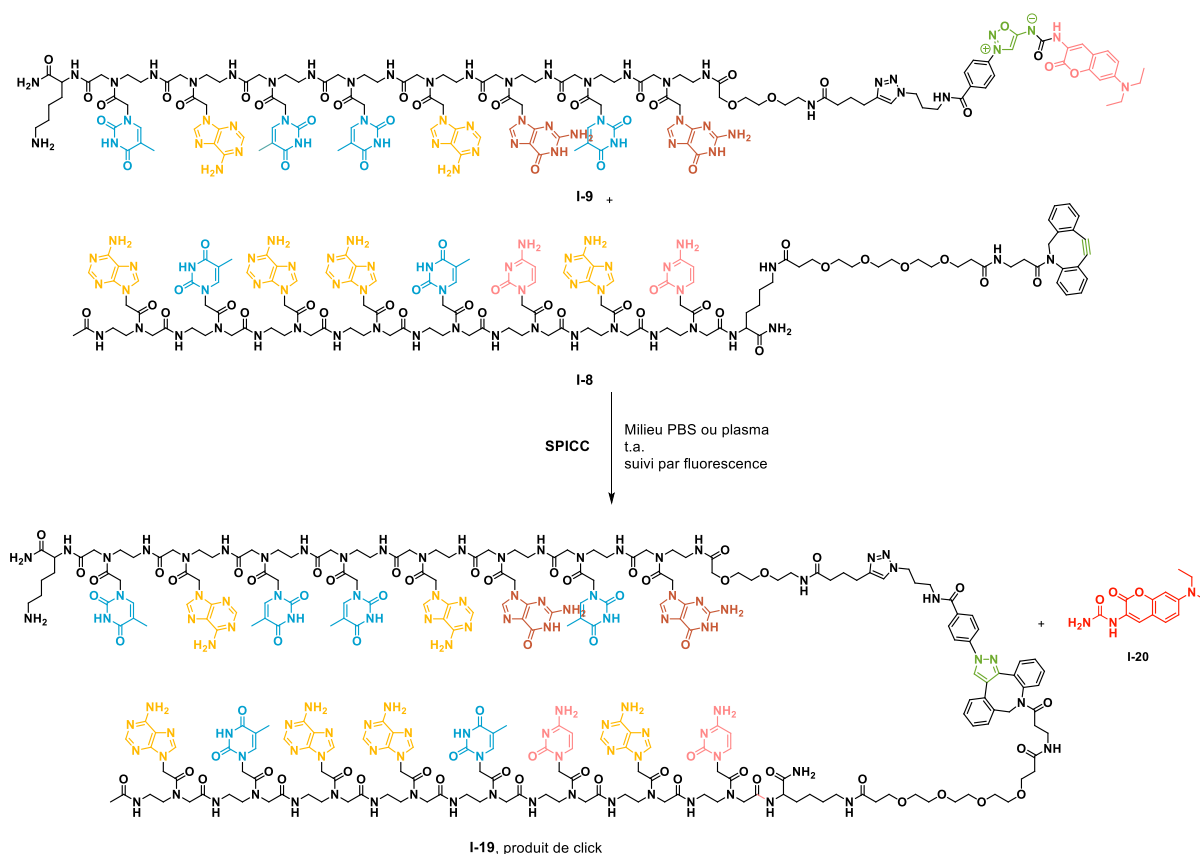


Schéma 39. Réaction de SPICC entre les PNA complémentaires à 8 bases, relargage de la coumarine

Le but de cette étude cinétique est d'observer si l'accélération de la réaction de ligation et coupure est toujours aussi efficace avec des couples de PNAs complémentaires plus petits, et si la réaction est toujours de pseudo-ordre 1. L'utilisation de PNAs plus petits que ceux déjà testés aurait plusieurs avantages, notamment une synthèse plus facile et rapide, ainsi qu'une meilleure compatibilité *in vivo*.



## A. Influence de la taille des PNAs sur la cinétique de la réaction SPICC

### 1. Etude cinétique des couples de PNAs complémentaires

Les cinétiques entre les PNAs complémentaires ont été suivies par fluorescence, avec une excitation à 387 nm et une émission à 500 nm correspondant respectivement au maximum d'absorbance et d'émission de fluorescence de la coumarine urée libérée lors de la réaction. Les cinétiques entre chaque couple de PNAs ont d'abord été effectuées dans le PBS, à température ambiante et à 1  $\mu\text{M}$  en réactifs. Grâce à un étalonnage de la coumarine libérée, il est possible d'obtenir une courbe du pourcentage de coumarine relarguée au cours du temps, et ainsi confirmer que la réaction est totale (Figure 32).

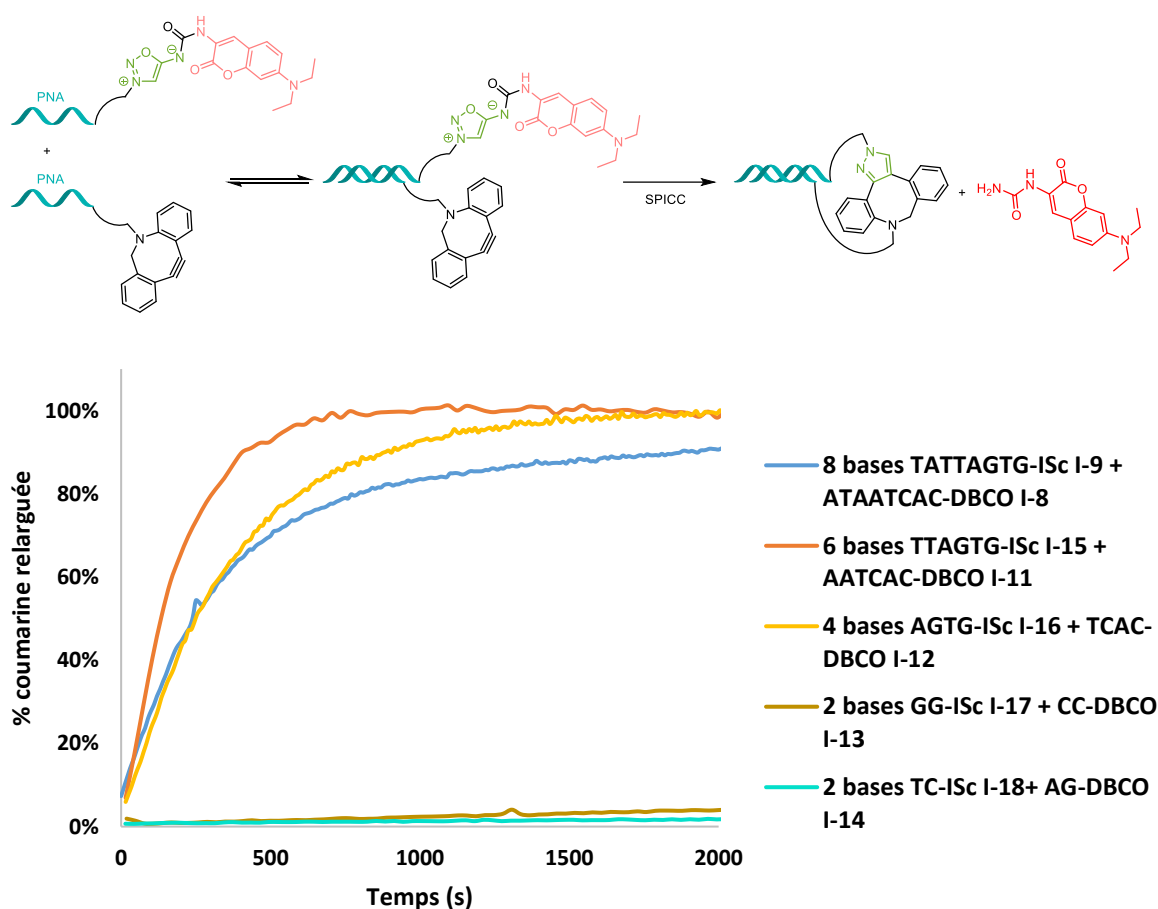


Figure 32. Cinétique de ligation et relargage de la coumarine entre les différents couples de PNAs à 1  $\mu\text{M}$  dans le PBS.  
 $\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ .

Les cinétiques sont rapides pour les couples de PNAs à 8, 6 et 4 bases (PNAs **I-8** et **I-9**, **I-11** et **I-15**, **I-12** et **I-16**), montrant ainsi l'effet hautement bénéfique de la reconnaissance moléculaire. En revanche, pour les couples de PNAs **I-13/I-17** et **I-14/I-18** ne contenant que deux paires de bases, la cinétique de relargage est extrêmement lente (Figure 33). Les constantes de vitesse apparentes sont plus de cent fois inférieures à celles des couples aux séquences plus longues (Tableau 3).

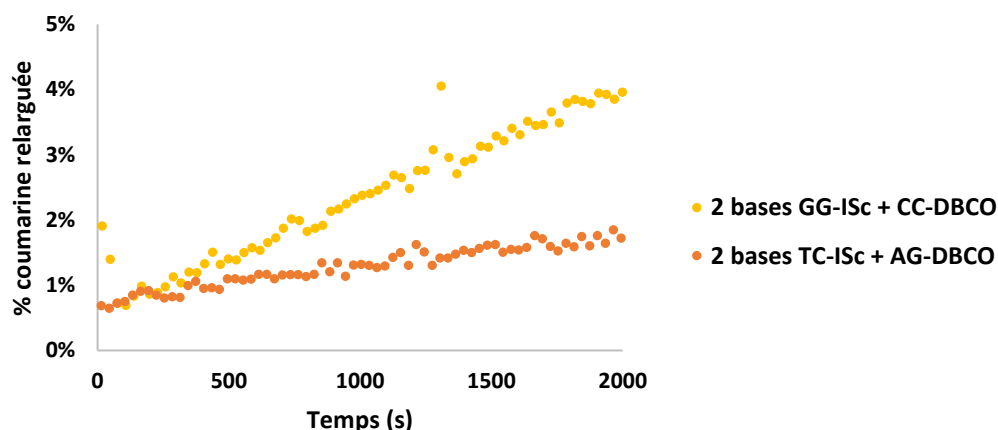


Figure 33. Cinétique de ligation et relargage de la coumarine entre les couples de PNAs à 2 paires de bases à 1  $\mu\text{M}$  dans le PBS.  $\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ .

Cela signifie que l'appariement entre les PNAs n'est pas assez fort sur une séquence aussi courte, et la reconnaissance moléculaire n'a pas lieu avec une affinité suffisante pour permettre une accélération significative de la réaction SPICC aux concentrations testées. Une différence entre le couple de PNAs CC/GG et le couple AG/TC est malgré tout constatable. Les bases adénine et thymine ne formant que deux liaisons hydrogène, contre trois pour les bases cytosine et guanine, l'appariement est moins fort entre les bases A et T. Cela explique en partie la constante encore plus faible pour le couple de PNA AG-TC. Pour le couple de PNA CC-GG, il aurait été possible d'avoir un appariement dans les deux sens, avec la partie DBCO et la partie iminosydnone-coumarine à deux extrémités différentes, car la séquence de PNA est symétrique. Cependant, l'appariement et le mésappariement sont dynamiques, et cette symétrie dans la séquence ne semble pas avoir d'influence sur la vitesse de la réaction.

Les autres suivis cinétiques à des concentrations plus faibles et en changeant le milieu seront effectués uniquement sur les couples de PNAs à 8, 6 et 4 paires de bases.

Tableau 3. Cinétiques des différents couples de PNAs à 1  $\mu\text{M}$  dans le PBS

PBS 1 $\mu\text{M}$	8 bases	6 bases	4 bases	2 bases CC / GG	2 bases AG / TC
Constante de vitesse $k_{\text{app}} (10^{-3} \text{ s}^{-1})$	1,6	4,63	2,7	0,02*	0,006*
$t_{1/2} \text{ (s)}$	433	155	250	50000	166666

\* valeurs calculées en supposant une réaction de pseudo-ordre 1 ce qui n'est probablement pas le cas pour ces PNAs

Des mesures ont également été effectuées à 1  $\mu\text{M}$  dans le plasma (Tableau 4). Les constantes de vitesses et les temps de demi-réaction observés sont similaires à ceux observés dans le PBS. La réaction est donc tout aussi efficace dans le plasma, et les composés développés pourront être donc testés dans des milieux biologiques complexes. Le couple de PNA le plus rapide est celui à 6 paires de bases, avec un temps de demi-réaction inférieur à 3 minutes à 1  $\mu\text{M}$ , et une constante de vitesse apparente  $k_{\text{app}} = 4,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , soit presque trois fois plus que pour le couple de PNAs à 8 paires de bases. L'augmentation de la constante de vitesse avec l'augmentation de la taille des PNAs s'explique par la force d'appariement qui augmente avec la longueur de la séquence et accélère la réaction. Une possible explication pour la constante de vitesse plus faible pour le couple de PNAs à huit paires de bases est le plus grand ratio AT / CG, ce qui peut avoir une influence sur la force d'appariement.

Des suivis cinétiques ont ensuite été effectués à 500, 100 et 50 nM à température ambiante (Tableau 4). Lors de cette étude à concentrations plus faibles, nous avons pu observer pour le couple de PNAs à quatre paires de bases que le temps de demi-réaction augmentait, et que la constante de vitesse apparente diminuait. Cela signifie que la réaction n'est plus de pseudo-ordre 1 dans cette zone de concentrations. Elle n'est pas non plus totalement d'ordre 2 sur l'étape de réaction SPICC, car elle serait alors beaucoup plus lente. L'appariement entre les bases complémentaires des PNAs joue toujours un rôle dans l'accélération de la vitesse de la réaction, mais n'est pas suffisant pour empêcher l'impact de la baisse de la concentration. Cela signifie que la vitesse d'association des deux brins n'est plus négligeable par rapport à celle de la réaction SPICC, lorsque la concentration des partenaires est inférieure à 1  $\mu\text{M}$ . La constante de vitesse d'association des brins PNAs a donc une influence sur la constante de vitesse apparente observée. Ce phénomène est également observable dans le cas des PNAs à 6 paires de bases mais dans une moindre mesure.

Tableau 4. Cinétiques de ligation et coupure entre les couples de PNAs

		8 bases PNAs		6 bases PNAs		4 bases PNAs		2 bases PNAs CC / GG		2 bases PNAs AG / TC	
Media	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	$t_{1/2}$ (s)	$k_{app}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)	$k_{app}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)	$k_{app}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)	$k_{app}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)	$k_{app}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )
PBS	1	433	1,6	155	4,63	250	2,7	50000	0,02	2E+05	0,006
	0,5	433	1,6	123	4,15	350	1,99				
	0,1			210	3,7	1138	0,63				
	0,05	396	1,8	280	2,8	1850	0,352				
	0,03	423	1,7								
Plasma	1	301	2,3	210	3,4	385	1,8				

Des études de la littérature<sup>82</sup> estiment aux alentours de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  la constante de vitesse d'hybridation entre deux PNAs complémentaires, avec des séquences longues d'au moins 15 paires de bases. Le temps de demi-réaction d'hybridation pour de tels PNAs est de 0,1 s à une concentration de 1  $\mu\text{M}$ . Ce temps est négligeable par rapport aux temps de demi-réaction observés dans cette étude. Cependant, une constante de vitesse d'hybridation plus faible, de l'ordre de  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , à une concentration plus faible de 10 nM donne un temps de demi-réaction d'hybridation de 100 s. Nous voyons ainsi les limites du comportement réactionnel de pseudo-ordre 1. Néanmoins, dans la fenêtre de concentration que nous avons étudiée, le pseudo-ordre 1 est bien présent, et l'accélération de la réaction est indéniable, même quand l'ordre de la réaction n'est plus totalement de pseudo-ordre 1. L'évolution du temps de demi-réaction en fonction de la concentration permet de déterminer le couple de PNAs le plus petit qui ait un comportement de pseudo-ordre 1 c'est-à-dire le moins sensible aux variations de concentration. Ce couple de PNAs pourra alors être utilisé à basse concentration et garder ses propriétés d'appariement rapide (Figure 34). Les PNAs à 6 et 8 paires de bases ont clairement un comportement de pseudo-ordre 1 jusqu'à 50 nM au moins, vu que leur temps de demi-réaction reste sensiblement le même. En revanche, il est visible que ce n'est pas le cas pour le couple de PNAs à quatre paires de bases.

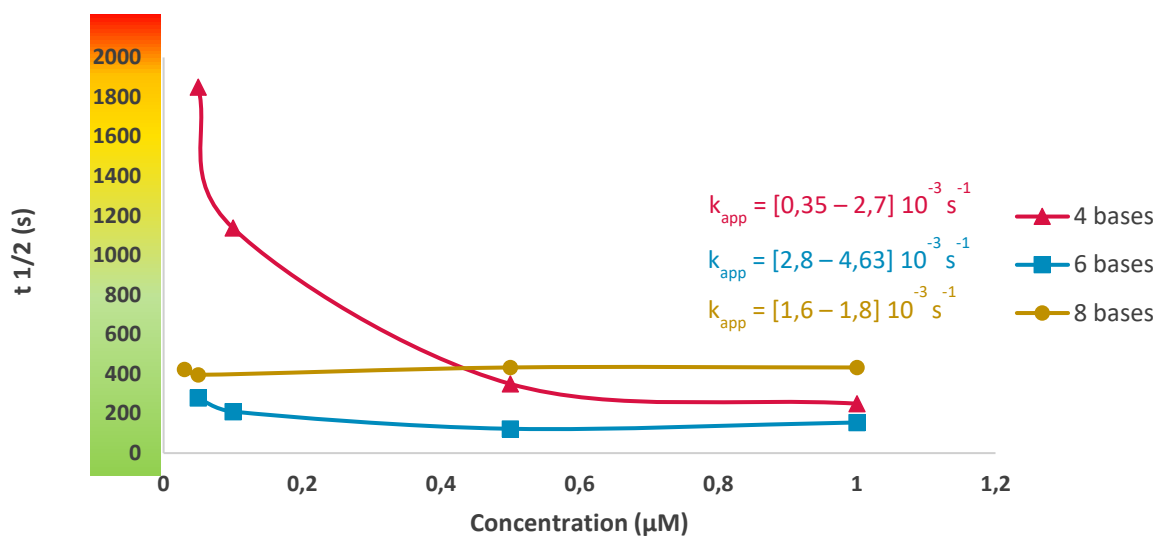
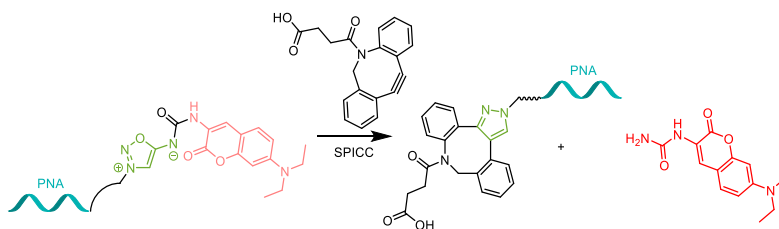


Figure 34. Evolution du temps de demi-réaction en fonction de la concentration pour les couples de PNAs à 8, 6 et 4 paires de bases

Par conséquent, c'est le couple de PNAs à six paires de bases qui a été choisi pour poursuivre les études et tenter d'utiliser ce système dans des applications biologiques. En effet, c'est le couple de PNAs complémentaires le plus rapide de tous ceux qui possèdent des propriétés de pseudo-ordre 1. De plus, sa séquence légèrement plus courte le rend plus facile à synthétiser que son homologue à huit paires de bases.

## 2. Témoin négatif

Il a déjà été montré dans notre laboratoire que l'utilisation de deux brins de PNAs non complémentaires ne permettait pas d'accélérer la réaction de ligation et coupure. Un autre témoin négatif a été développé ici, en faisant réagir le PNA-iminosydnone-coumarine I-9 à huit paires de bases avec du DBCO acide en excès (Figure 35). La cinétique de réaction observée est d'ordre 2 et de vitesse similaire à celle entre l'iminosydnone-coumarine seule et le DBCO acide. Cela confirme que les deux brins PNAs complémentaires sont nécessaires pour que l'accélération de la réaction ait lieu. Cela confirme également l'orthogonalité du PNA vis à vis de la réaction de ligation et coupure, car aucune dégradation ou influence négative sur la cinétique n'a été observé. La constante de vitesse moyenne calculée est  $k = 24 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



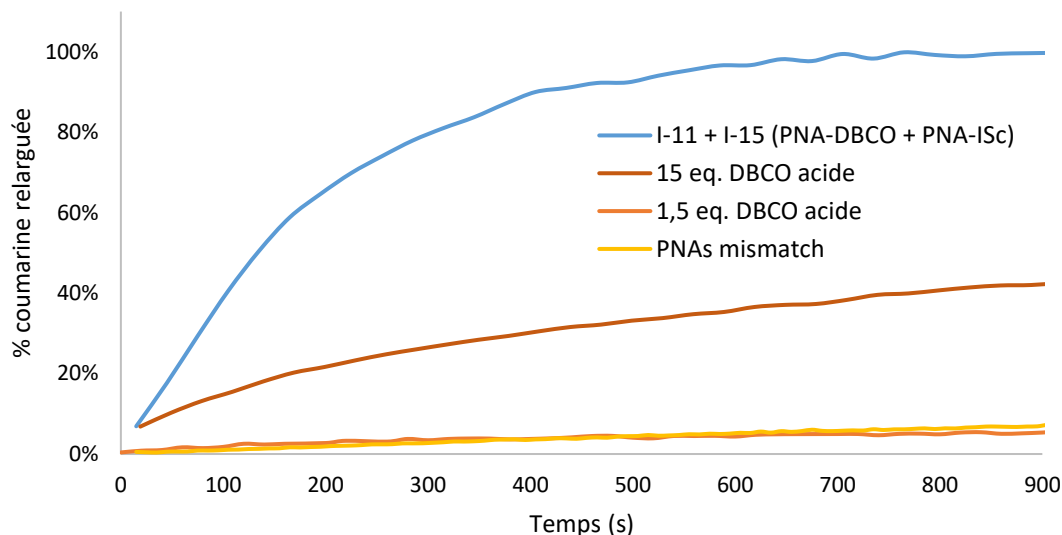
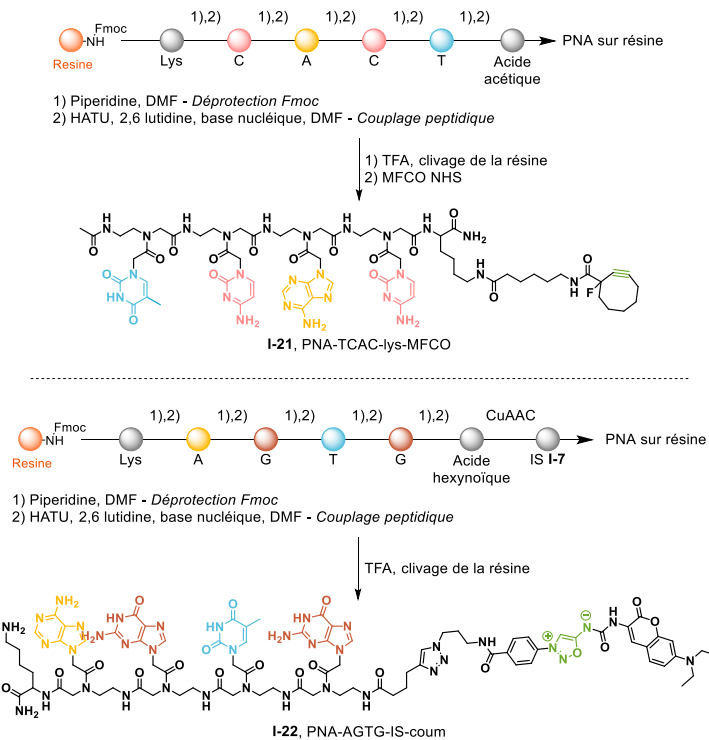


Figure 35. Cinétique entre le PNA-Iminosydnone-coumarine I-9 et du DBCO acide dans le PBS.  $[IS] = 1 \mu M$ .  $\lambda_{ex} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ . Comparaison avec les PNAs mismatches et les PNAs complémentaires.

## B. Etudes cinétiques complémentaires

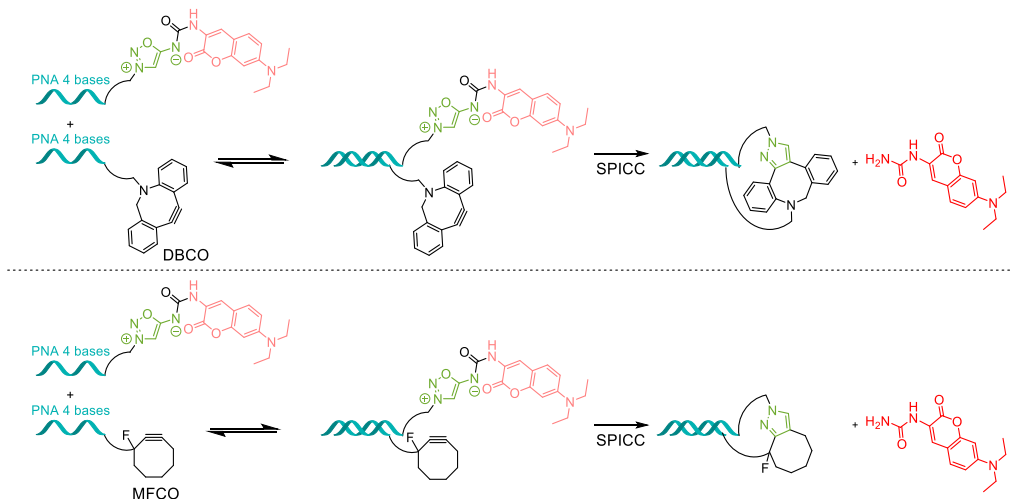
### 1. Variation de la structure des partenaires de « click and release »

Les brins PNAs ont été conçus pour qu'il y ait une grande flexibilité possible entre la partie PNA et la partie partenaire de click (DBCO ou iminosydnone). Cette flexibilité est possible grâce à des espaceurs PEG, qui permettent également une meilleure solubilité des réactifs. La flexibilité de ces espaceurs PEG permet au DBCO de se positionner de façon perpendiculaire à l'iminosydnone, ce qui est nécessaire pour que la cycloaddition ait lieu. Cependant, cette grande liberté de mouvement laisse aussi place à de nombreuses conformations moins favorables. Nous avons alors souhaité voir s'il n'était pas envisageable de réduire la liberté de mouvement du cyclooctyne en modifiant notamment son point d'attache au PNA. Ainsi, un autre PNA-cyclooctyne a été synthétisé et testé. Celui-ci comprend le cyclooctyne MFCO lié au brin PNA via une chaîne alkyle située en alpha de la triple liaison. Ce composé a été obtenu avec un rendement de 15% (4,9 mg, 3,3  $\mu\text{mol}$ ). L'espaceur est moins long que dans le cas des PNA-DBCO synthétisés précédemment et l'ancrage en alpha de la triple liaison devrait positionner l'alcyne plus favorablement pour la cycloaddition. Le PNA iminosydnone-coumarine complémentaire a été également synthétisé avec un rendement de 23% (10 mg, 5,2  $\mu\text{mol}$ ), celui-ci comprend un espaceur de taille similaire au PNA-MFCO complémentaire. Pour des facilités de synthèse, ces PNAs ont été synthétisés avec quatre paires de bases, les mêmes qu'utilisées précédemment (TCAC et AGTG) (Schéma 40).



*Schéma 40. Nouveaux PNAs synthétisés*

La réaction de ligation et coupure entre ces deux composés a été suivie par fluorescence à 1  $\mu\text{M}$ . Le cyclooctyne utilisé, le MFCO, est un alcyne moins tendu que le DBCO, de par l'absence des deux cycles aromatiques. Il est donc moins réactif et moins rapide lors d'une réaction d'ordre 2 avec l'iminosydnone-coumarine que le DBCO seul. La réaction SPICC entre les PNA **I-21** et **I-22**,  $k = 9,7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , bien que plus rapide que sans les brins PNAs ( $k = 10^{-7} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), n'est pas aussi rapide que la réaction entre les PNA-lminosydnone coumarine **I-16** et PNA-DBCO **I-12** (Figure 36).



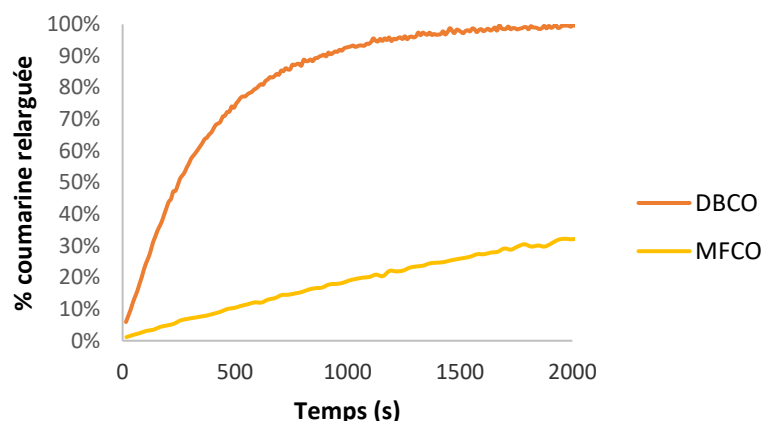


Figure 36. Comparaison des cinétiques entre les PNAs DBCO et MFCO et leurs PNAs complémentaires dans le PBS. Réactions effectuées à  $1 \mu\text{M}$  à  $25^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ .

Ces résultats montrent les limites de la reconnaissance moléculaire sur la réaction SPICC. Celle-ci accélère fortement les réactions d'ordre 2, au point d'en faire des réactions de pseudo-ordre 1, en rapprochant fortement dans l'espace les réactifs, et ce de manière quasi instantanée. Cependant, si la réaction de « click and release » initiale est lente, comme celle entre une iminosydnone urée et un cyclooctyne peu activé comme le MFCO, la réaction sera accélérée, mais cela peut ne pas être suffisant pour les applications visées (Tableau 5). L'efficacité de ces systèmes dépend donc à la fois de la force des interactions permettant la reconnaissance moléculaire mais aussi la vitesse intrinsèque de la réaction bioorthogonale.

Tableau 5 Comparaison des temps de demi-réaction à  $1 \mu\text{M}$  en fonction du cyclooctyne utilisé et de la présence de PNAs

Cyclooctyne	$t_{1/2}$ sans PNA ( $1 \mu\text{M}$ )	$t_{1/2}$ avec PNA ( $1 \mu\text{M}$ )
<b>DBCO</b>	11,6 h	250 s
<b>MFCO</b>	pas de conversion à $1 \mu\text{M}$	6500 s

Une conséquence positive de cela est qu'en utilisant les PNAs en combinaison avec des composés ayant des constantes de vitesse bien plus rapides que les iminosydnones-urées et le DBCO, la vitesse de réaction sera encore plus rapide, et presque instantanée. Notre laboratoire développant actuellement des sydnones et iminosydnones bien plus réactives que les iminosydnones-urées, c'est une perspective intéressante pour l'utilisation de la reconnaissance moléculaire des PNAs comme accélératrice de réaction.

## IV. Applications biologiques

### A. Tentatives de couplage protéines-protéines

L'un des intérêts de la chimie bioorthogonale est la modification de biomolécules, notamment des protéines. Nous avons voulu dans cette partie attacher les PNAs préalablement synthétisés à des protéines. Il est en effet intéressant pour de futures applications de pouvoir effectuer une réaction rapide de click ou de « click and release » sur une protéine. Nous avons d'abord tenté de conjuguer un PNA à une protéine, puis à un anticorps. Les résultats cinétiques précédents nous ont montré que des PNAs de six paires de bases étaient suffisants pour accélérer la réaction de « click and release » de façon remarquable. Nous avons voulu voir si cette réaction pouvait alors être utile pour réaliser l'une des bioconjugaisons les plus difficiles : le couplage de 2 protéines entre elles. Pour pouvoir tenter ce type de bioconjugaison il convient dans un premier temps de préparer les conjugués protéine-PNA.

#### 1. Préparation de conjugués protéine-PNA

L'une des méthodes les plus accessibles pour modifier une protéine est de fonctionnaliser les acides aminés présents dans sa séquence.<sup>83</sup> Cette méthode est relativement simple mais rend dépendant des fonctionnalités présentes sur les acides aminés. La spécificité de la réaction dépendra du groupement fonctionnel utilisé. Si l'acide aminé que l'on cherche à modifier est peu abondant, comme une cystéine, il se peut qu'il ne soit pas assez accessible et que la fonctionnalisation soit compliquée. Cela permet toutefois une certaine sélectivité. En revanche, si l'acide aminé que l'on souhaite modifier est beaucoup plus abondant, comme une lysine, il sera plus compliqué de contrôler le nombre d'entités couplées à la protéine. Le mélange obtenu contient des protéines dérivatisées par un nombre différent de molécules, et possiblement sur des zones différentes. Il peut également y avoir une compétition entre les différents acides aminés qui réagissent. Cette méthode n'est pas spécialement spécifique, et voit donc le risque d'une altération des propriétés de la protéine étudiée.

Dans cette première application, nous avons tout d'abord souhaité fonctionnaliser une protéine simple de référence avec nos PNAs, sans nous intéresser dans un premier temps à l'impact de la conjugaison sur son activité biologique. Nous n'avions donc pas besoin d'une réaction spécifique pour marquer cette protéine.

##### a) Bioconjugué BSA-PNA-iminosydnone

###### 1) Couplage Lysine – acide activé

Nous avons choisi, comme première approche, de greffer un PNA sur l'albumine bovine (BSA). Cette protéine est très souvent utilisée en biologie, notamment pour la greffer sur un support, comme les puits d'un test ELISA. C'est une protéine modèle facile d'accès et peu onéreuse, c'est pourquoi nous avons fait nos premiers essais dessus.

Notre première approche a été d'effectuer un couplage entre l'amine libre des lysines de la BSA et un acide activé qui serait présent sur notre PNA. En effet, la BSA comporte plus de cinquante lysines, et plusieurs d'entre elles sont accessibles. Pour partir sur cette stratégie de couplage, nous avons dû modifier les PNAs déjà synthétisés. Le PNA **I-15**, TTAGTG-IS-coum a été choisi pour être modifié. En faisant réagir sa lysine terminale avec de l'anhydride glutarique, le composé **I-23**, PNA avec une

---

<sup>83</sup> C. Spicer, B. Davis, *Nat Commun.* **2014**, 5, 4740



extrémité acide carboxylique, est obtenu sans purification et de manière quantitative (17 mg, quantitatif) (Schéma 41).

L'acide carboxylique du PNA **I-23** est ensuite activé en ester de NHS en présence de N,N,N',N'-Tetraméthyl-O-(N-succinimidy)uronium tétrafluoroborate (TSTU) et de triéthylamine. Il est ensuite ajouté directement sur la protéine en solution à 1 mg/mL en milieu basique (pH = 8.3, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> dans de l'eau milliQ) pour le couplage avec la protéine, et mis à agiter pendant 4 h (Schéma 41). Le milieu basique permet de passer les amines des lysines sous forme NH<sub>2</sub>. Le PNA **I-24** est mis en excès par rapport à la protéine, avec un rapport 20 pour 1. Il est important de mettre la molécule que l'on greffe en excès par rapport à la protéine pour une meilleure fonctionnalisation de celle-ci. Ainsi, les probabilités de rencontre entre les lysines libres et la molécule sont plus grandes, sachant qu'une partie de l'ester activé est hydrolysé dans les conditions basiques utilisées. De plus, nous ne cherchons pas ici à contrôler ni l'emplacement des fonctionnalisations, ni leur nombre. Il est par ailleurs intéressant pour certaines applications d'avoir une protéine multi-dérivée. La solution contenant la protéine dérivatisée est ensuite conservée à 4 °C jusqu'à l'étape de purification.

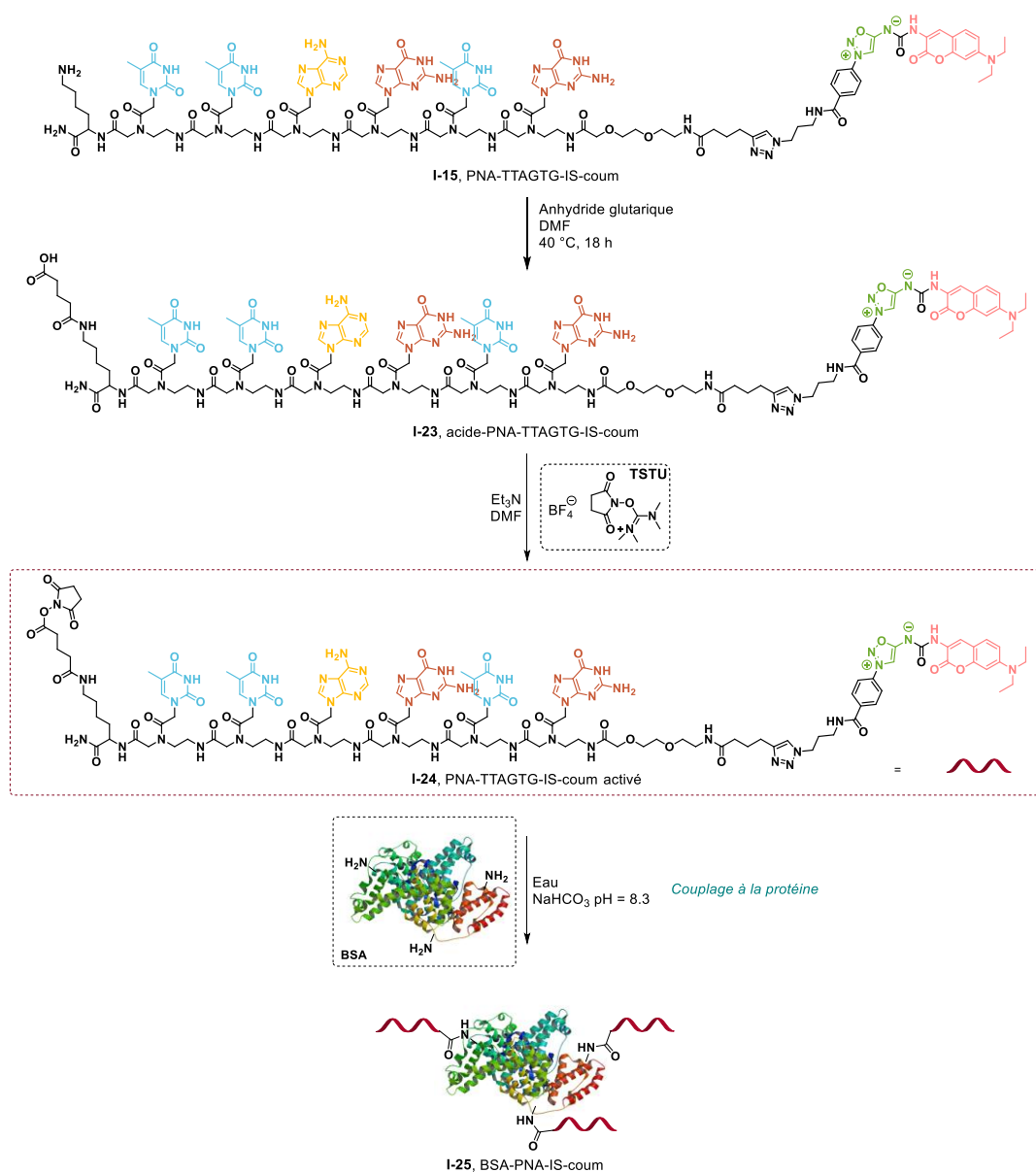


Schéma 41. Synthèse d'un PNA acide et couplage acide activé-lysine entre PNAs et la BSA

La protéine dérivatisée ainsi obtenue est ensuite purifiée et analysée par MALDI-TOF et UV pour déterminer le nombre de PNAs greffés.

## 2) Purification et caractérisation des bioconjugués

Pour purifier de grosses biomolécules comme la BSA, de poids moléculaire aux alentours de 66 kDa, la meilleure solution reste de discriminer les petites molécules des grosses par exclusion stérique (Figure 37). Les colonnes d'exclusion stérique sont des colonnes conçues pour retenir les molécules avec une masse moléculaire inférieure à une masse « cut-off », et laisser passer les autres. Cette purification par colonne d'exclusion stérique a pour objectif d'éliminer le PNA qui n'a pas réagi sur la BSA. Pour vérifier la présence ou l'absence de PNA libre après la purification, l'échantillon est analysé en LC-MS. Les premières colonnes d'exclusion stérique que nous avons testées avaient un « cut-off » de 5 kDa mais n'ont pas permis d'éliminer le PNA n'ayant pas réagi sur la protéine. Il est possible que les PNAs s'agglomèrent entre eux ou s'adsorbent sur la protéine ce qui expliquerait leur passage à travers la colonne. Des colonnes Vivaspin avec un « cut-off » de 30 kDa ont ensuite été choisies. L'exclusion stérique a cette fois lieu avec une membrane ne laissant passer que les petites molécules, les protéines étant récupérées dans le surnageant. Malheureusement, la purification ne s'est pas avérée totale : il reste toujours du PNA libre, et une partie de notre protéine reste accrochée à la membrane. Une cassette de dialyse avec un « cut-off » de 40 kDa a alors été utilisée dans un volume de 1 L de tampon NaCl 0,9 M. Malheureusement, une nouvelle fois l'analyse LCMS a montré qu'il restait toujours un peu de PNA libre après cette purification. Il est possible que les PNAs fassent des agrégats autour de la protéine. Pour éviter cet effet, une colonne d'exclusion stérique par centrifugation au « cut-off » de 40 kDa a été utilisée, en utilisant comme solvant d'élution un tampon à 0,15 M NaCl, 50 mM phosphate et 0,1% tween. Le tween est un détergent qui aura pour effet de détacher les PNAs agrégés sur la biomolécule. Après cette dernière purification, la solution ne contient plus de PNA libre.

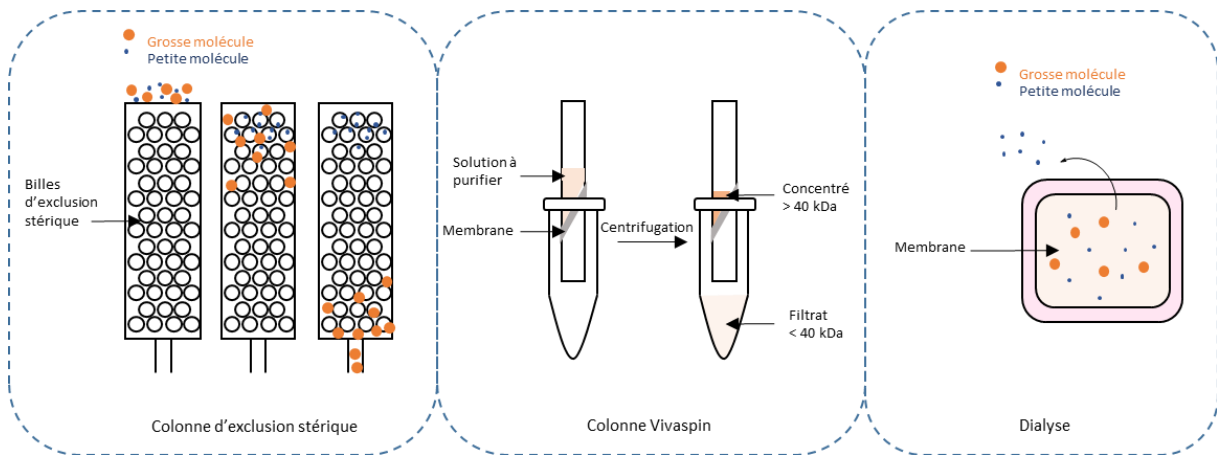


Figure 37. Méthodes de purification des protéines par exclusion stérique

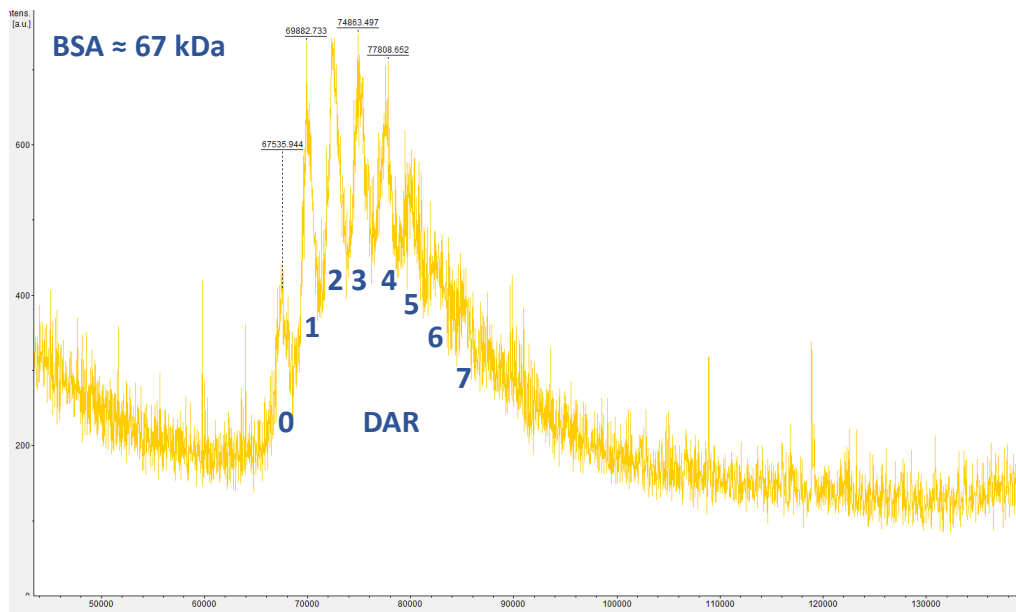


Figure 38. Spectre MALDI-TOF du composé BSA-PNA-ImSyd-Coum I-25

Une fois purifiée, la BSA couplée au PNA peut être analysée par MALDI-TOF (Figure 38). Cette analyse montre que la BSA dérivatisée est présente sous un mélange de composés, allant de la BSA seule à la BSA couplée à 7 PNAs. Le nombre moyen de PNAs accrochés (DAR) est de 3. Des analyses UV et de fluorescence de cet échantillon ont été effectuées pour déterminer la concentration de cet échantillon BSA-PNA-IS-coum I-25. Une concentration de 0,28 mg/mL en BSA a été déterminée.

#### b) Bioconjugué BSA-PNA-DBCO

Nous souhaitons avoir à notre disposition une deuxième BSA dérivatisée avec cette fois le PNA-DBCO. Pour cela nous avons synthétisé un nouveau PNA. La lysine du PNA I-11 est déjà utilisée lors du couplage peptidique pour l'ajout de la partie DBCO (Schéma 37). La stratégie utilisée pour obtenir le PNA I-23 ne peut donc pas être reproduite. Nous avons donc décidé de synthétiser un nouveau PNA-DBCO avec une extrémité maléimide. Ce maléimide pourra réagir dans une réaction de Michael avec les thiols libres des cystéines. L'un des soucis de cette technique est que les cystéines peuvent être moins nombreuses. Leur nombre peut être augmenté en réduisant les ponts disulfures, mais cela peut avoir un impact sur la fonctionnalité de la protéine.

La BSA ne possède qu'un seul thiol libre. Nous avons choisi de ne pas dénaturer la protéine et d'essayer le couplage. Nous savons cependant que la protéine ne pourra porter au maximum qu'un seul PNA, et qu'il n'y aura pas de composé multi-dérivé. Le nouveau PNA-maléimide a été synthétisé par stratégie de synthèse sur support solide (Schéma 35), en ajoutant le composé maléimide à la fin de la synthèse, par utilisation d'un composé maléimide-ester de NHS (Schéma 42).

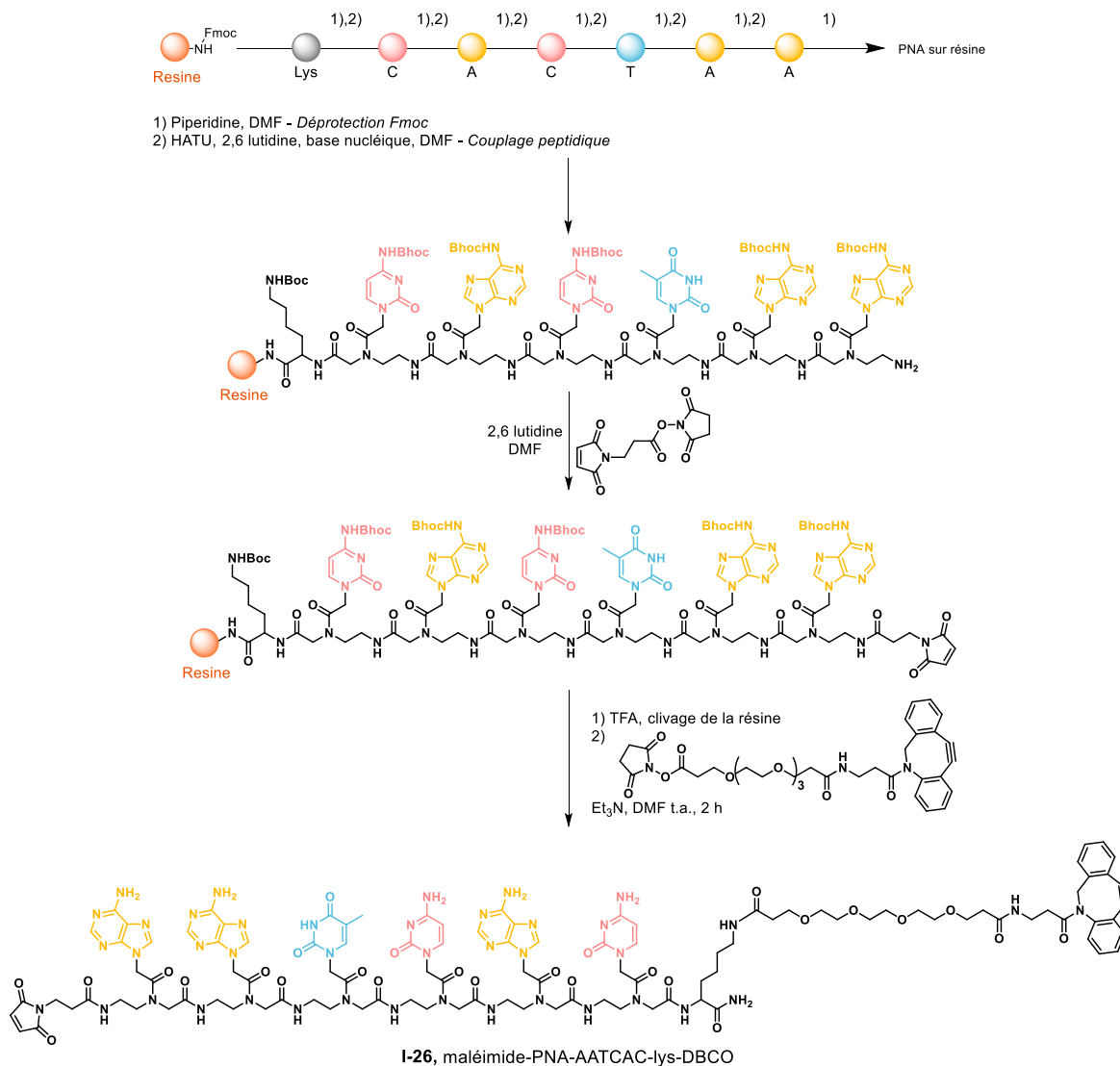


Schéma 42. Ajout du maléimide sur le PNA

Le DBCO est ensuite ajouté sur la lysine du PNA hors résine comme précédemment et purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir le composé **I-26** (7.3 mg, 3.0  $\mu$ mol, 13%). Le composé est alors ajouté en excès (28 équivalents) à une solution de BSA à 1 mg/mL, dans un tampon aqueux NaCl 0,9%. La solution est ensuite purifiée par colonne de centrifugation stérique de 40 kDa utilisant comme solvant d'éluion un tampon à 0,15 M NaCl, 50 mM phosphate et 0,1% tween afin d'obtenir le composé BSA-PNA-DBCO **I-27** (Schéma 43).

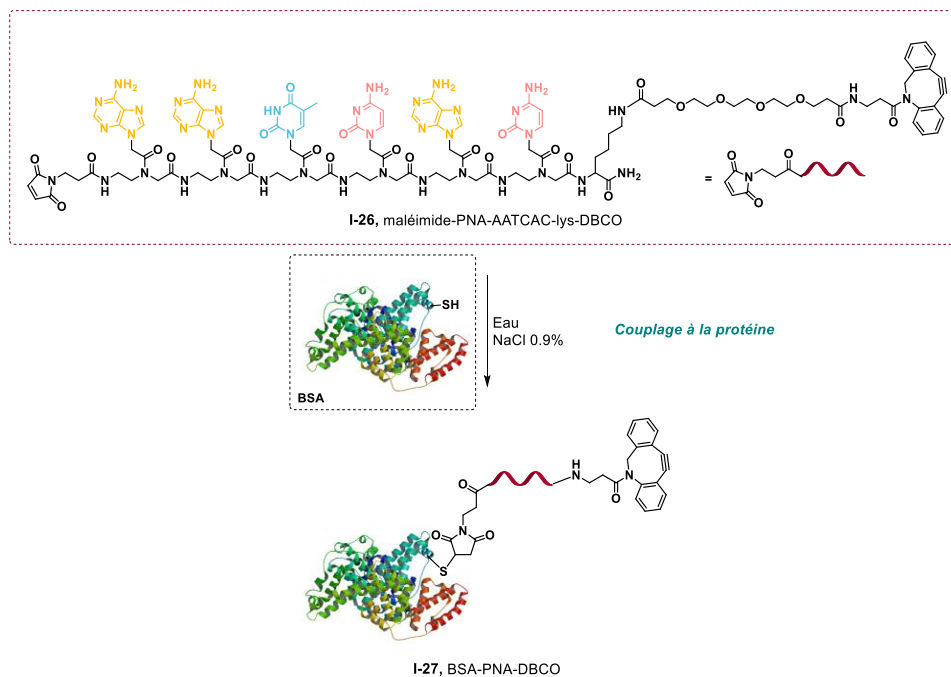


Schéma 43. Couplage maléimide thiol entre le PNA I-26 (28 equiv.) et la BSA

Les analyses MALDI-TOF ont montré qu'un peu moins de la moitié de la BSA de l'échantillon a été dérivatisée (Figure 39). La concentration en BSA de l'échantillon est de 1 mg/mL.

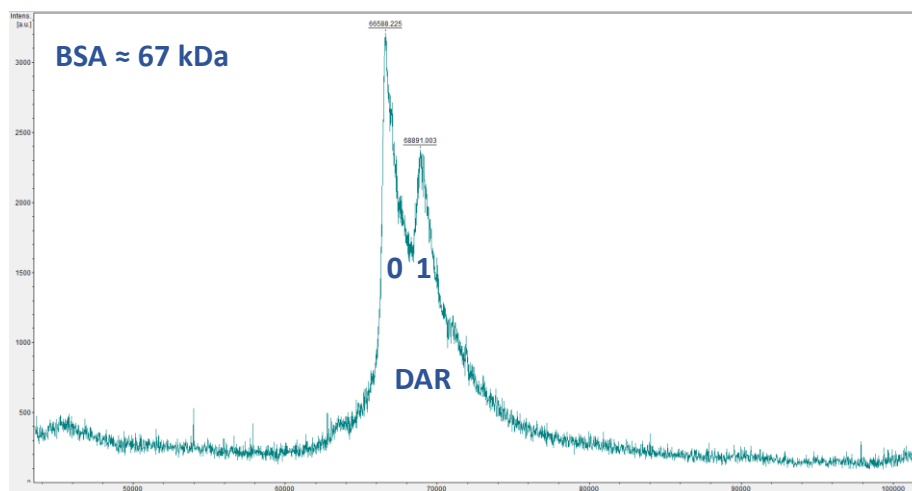


Figure 39. Analyse MALDI-TOF du composé BSA-PNA-DBCO I-27

### c) Réaction de « click and release » avec les conjugués BSA-PNA

#### 1) Avec la BSA-PNA-Iminosydnone-coumarine

Une fois nos protéines dérivatisées par des PNAs obtenues, nous avons voulu effectuer une réaction de « click and release » sur celles-ci. Dans un premier temps, nous avons voulu réaliser une cinétique entre le composé BSA-PNA-IS-coum I-25 et le PNA-DBCO I-11. Nous souhaitons par cette expérience nous assurer que la présence d'une macromolécule comme la BSA ne perturbait pas le système de reconnaissance moléculaire suivi de la réaction SPICC et que celui-ci fonctionnait toujours. Comme précédemment, la cinétique a été suivie en observant la fluorescence de la coumarine relarguée (Figure 40). Le calcul du pourcentage de coumarine relarguée a été effectué en tenant compte de la valeur du DAR qui est de 3. Ainsi, 3 équivalents de PNA-DBCO I-11 sont additionnés sur la BSA libérant donc potentiellement 3 molécules de coumarine par BSA. La Figure 40 montre que c'est bien le cas.

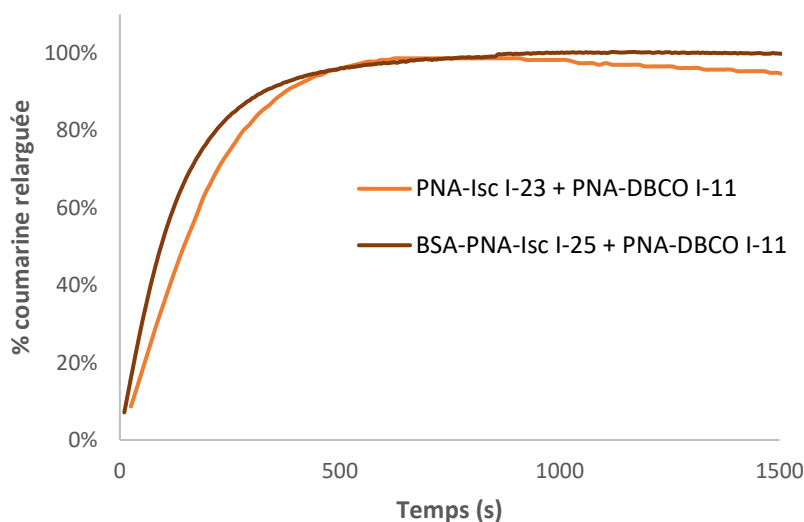
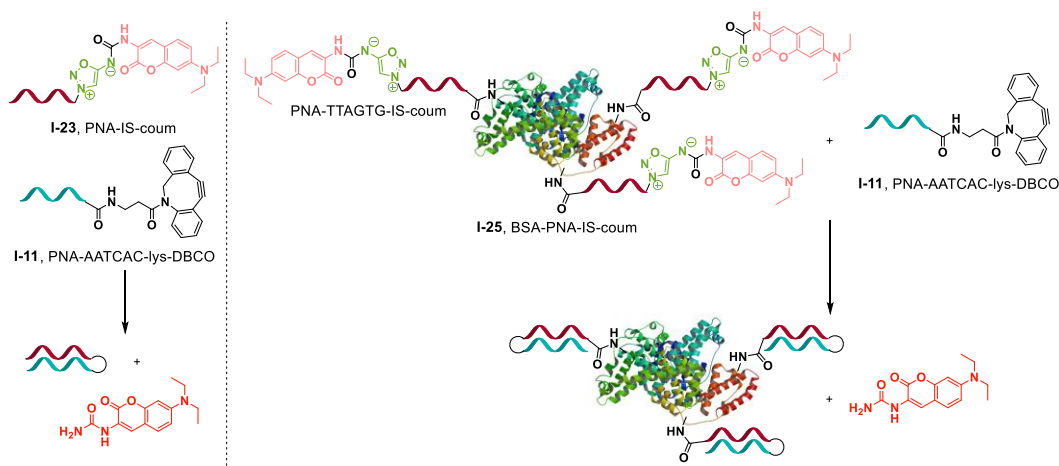


Figure 40. Cinétique de "click and release" entre les composés BSA-PNA-IS-coum **I-25** et PNA-DBCO **I-11** (3 eq.),  $[I-25] = 0,28$  mg/mL,  $9 \mu\text{M}$  en PNA-Isc,  $[I-11] = 30 \mu\text{M}$  dans le PBS. Cinétique de « click and release » entre les PNA **I-23** et **I-11**,  $1 \mu\text{M}$  dans le PBS.  
 $\lambda_{ex} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ .

Cette cinétique est comparable à celle obtenue avec les deux PNAs libres. La constante de vitesse calculée est de  $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  et le temps de demi-réaction de 95 s. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles observées avec les deux PNAs non liés à la BSA. Ce résultat montre que le concept de reconnaissance moléculaire entre deux PNAs pour accélérer une réaction peut fonctionner aussi quand le PNA est lié à une biomolécule, ce qui est très intéressant et prometteur.

## 2) Avec le bioconjugué BSA-PNA-DBCO

Cette fois, une réaction de couplage entre la BSA-PNA-DBCO **I-27** et un PNA-Iminosydnone-coumarine **I-15** a été testée. Cette réaction a également été suivie par fluorescence de la coumarine relarguée. Cependant, la cinétique observée n'est pas du tout comparable à celle des PNAs seuls, et seule une légère augmentation de fluorescence est observée dans ce cas. La cinétique est un peu plus rapide lorsque l'on ajoute un excès de PNA-Iminosydnone-coumarine mais elle reste toujours très lente et la quantité de coumarine libérée très inférieure à ce que l'on peut attendre (Figure 41). Après 1 h, seulement 14% de conversion sont atteints.

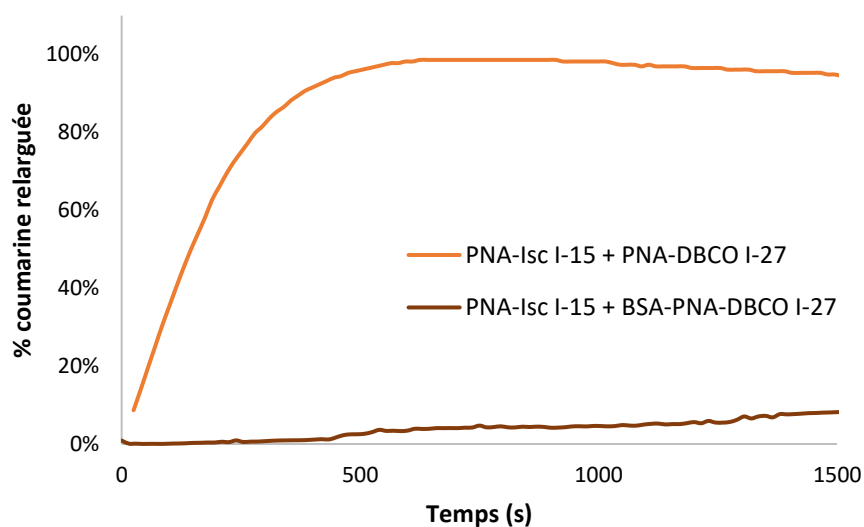
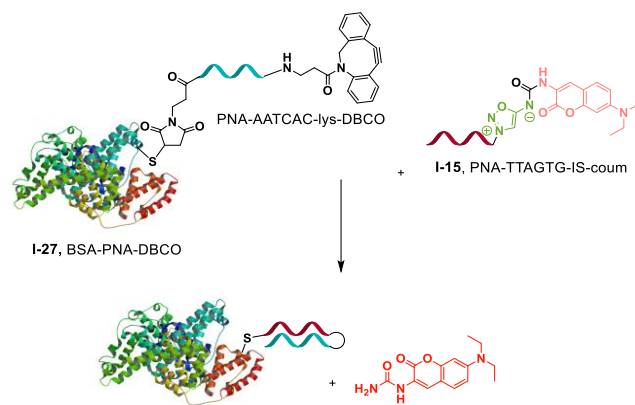


Figure 41. Cinétique de "click and release" entre les composés BSA-PNA-DBCO I-27 et PNA-Isc I-15, [I-27] = 0,13 mg/mL, [PNA-DBCO] = 0,1  $\mu$ M, [I-15] = 1  $\mu$ M dans PBS. Cinétique de « click and release » entre les PNA I-15 et I-27, 1  $\mu$ M dans le PBS.  $\lambda_{ex}$  = 387 nm,  $\lambda_{em}$  = 500 nm.

La réaction SPICC assistée par les PNAs n'a pas fonctionné aussi bien que désiré lorsque le PNA-DBCO est lié à la BSA. Ce résultat est surprenant et difficile à expliquer, compte tenu du résultat positif obtenu précédemment avec un bioconjugué similaire. Il est possible que le PNA lié au seul thiol libre de la BSA ne soit pas vraiment accessible, et par conséquent ne puisse pas réagir correctement. Une solution pour remédier à ce problème pourrait être de changer de technique de couplage. Enfin, il est possible que le cyclooctyne lié au PNA se soit dégradé et ne puisse par conséquent plus entrer en jeu dans des réactions de cycloadditions.

#### d) Tentative de couplage BSA-BSA

En parallèle des essais de couplage de la BSA-PNA-DBCO avec un PNA-iminosydnone-coumarine, nous avons tenté un couplage entre deux protéines dérivatisées par des PNAs complémentaires. Comme pouvait le laisser présager les résultats de cinétiques entre la BSA-PNA-DBCO et le PNA-Iminosydnone-coumarine, les résultats ne furent pas très concluants.

Une cinétique entre les deux composés I-25 et I-27 montre une évolution de la fluorescence sur un temps long. Une conversion de 13% semble être atteinte après 1h (Figure 42). La réaction a lieu sans la reconnaissance moléculaire. Après 16h, la fluorescence a encore un peu augmenté, mais semble avoir atteint un plateau, pour une conversion de 20%.

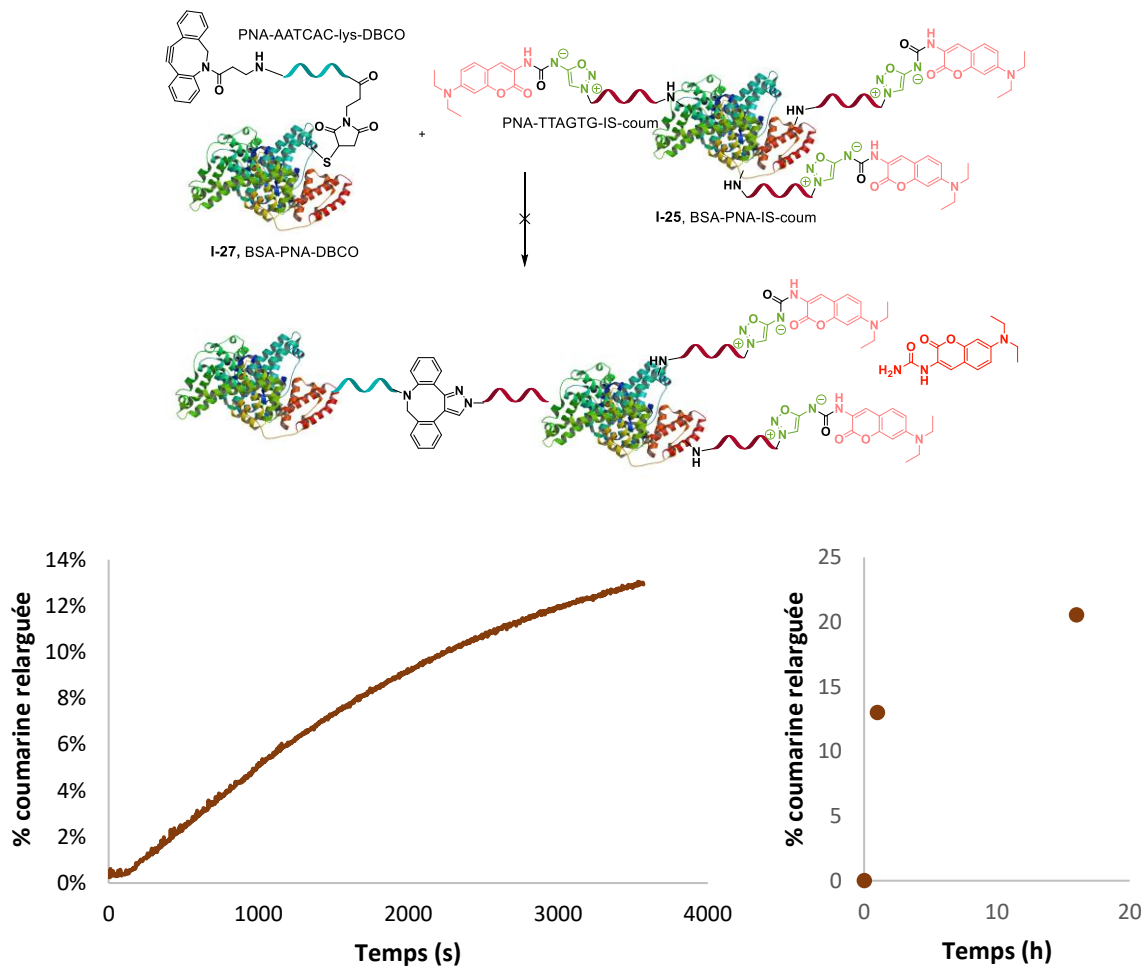


Figure 42. Cinétique de "click and release" entre les composés BSA-PNA-DBCO I-27 et BSA-PNA-ISC I-25 à 1  $\mu$ M dans le PBS.  $\lambda_{ex} = 387$  nm,  $\lambda_{em} = 500$  nm.

Nous avons voulu nous assurer que le couplage entre les deux BSA avait bien eu lieu et pour cela nous avons souhaité réaliser un gel d'électrophorèse de l'échantillon avec une série de témoins BSA et de marqueurs moléculaires (Figure 43). Des tâches sont observées pour chaque cas aux alentours de 66 kDa, mais aucune aux alentours de 120 kDa qui correspondrait au résultat attendu pour le couplage de deux BSA. Si jamais il y a bien eu couplage entre les deux protéines, c'est en proportions trop faibles pour être détectées par un gel d'électrophorèse.



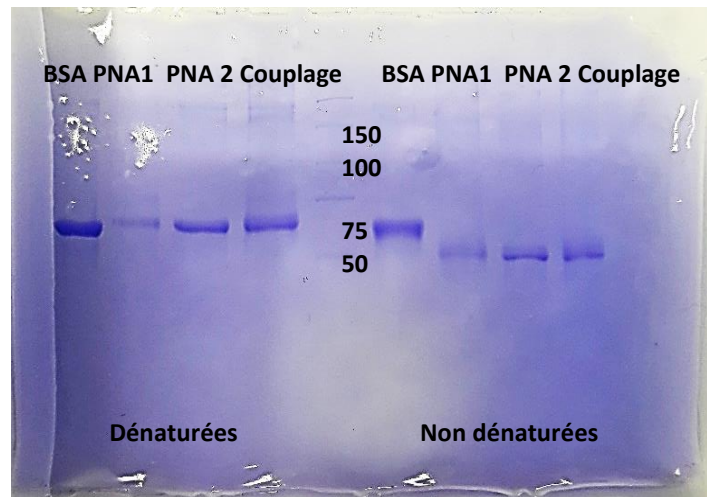


Figure 43. Gel d'électrophorèse de la tentative de couplage protéine-protéine

D'après les résultats des expériences contrôles, les difficultés de couplage BSA-BSA semblent provenir du composé BSA-PNA-DBCO qui ne réagit pas aussi bien qu'espéré. Les résultats obtenus entre la BSA-PNA-Iminosydnone-coumarine **I-25** et le PNA-DBCO **I-11** sont encourageants et nous ont incité à concevoir un nouveau bioconjugué BSA-PNA-DBCO. Il se peut en effet que la voie d'accroche entre le PNA et la BSA ne soit pas idéale : le PNA est lié au seul thiol libre de la BSA, et n'est peut-être pas suffisamment accessible. De plus, la voie d'accroche des deux bioconjugués envisagée initialement n'était pas optimale et peut engendrer beaucoup de gêne stérique car les deux protéines BSA se retrouvent du même côté lors du couplage. De plus, l'espacement entre les deux protéines et les PNA n'est probablement pas assez grand pour éviter les interactions stériques entre les deux partenaires BSA. Pour remédier à ce problème, nous avons décidé de synthétiser un nouveau PNA-DBCO, qui devrait permettre de limiter cette gêne stérique.

## 2. Nouvelle stratégie de couplage

Dans cette partie, de nouveaux PNAs ont été synthétisés afin de remédier au problème de mauvaise réactivité du bioconjugué BSA-PNA-DBCO mis en lumière précédemment et du possible problème de gêne stérique dans le cadre du couplage protéine-protéine.

La nouvelle stratégie que nous souhaitons explorer est basée sur un nouveau PNA-DBCO qui permettrait de positionner le DBCO et la protéine du même côté. Ainsi, lors du couplage protéine-protéine, celles-ci se trouveraient de part et d'autre des brins PNA ce qui limiterait la gêne stérique entre les deux protéines (Figure 44).

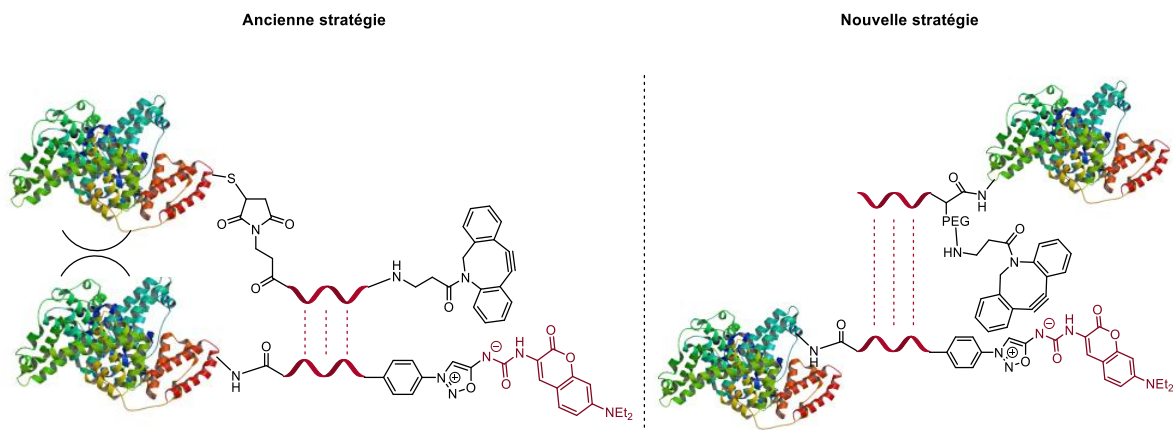


Figure 44. Nouvelle stratégie de couplage protéine-protéine

Le composé BSA-PNA-Iminosydnone-coumarine **I-25** précédemment décrit présente une très bonne réactivité et permet de relarguer la coumarine avec une très bonne cinétique suite à l'addition du PNA-DBCO complémentaire. Il ne nécessite donc pas de changement important. Cependant, pour mettre toutes nos chances de notre côté et dans l'optique d'éviter les problèmes de gêne stérique et d'accessibilité du PNA dans le cadre du couplage protéine-protéine, un nouveau PNA-Iminosydnone-coumarine a été synthétisé avec un espaceur plus long situé entre sa lysine terminale et la première nucléobase. Le composé **I-28** a été obtenu par synthèse peptidique sur support (22 mg, 7.65  $\mu\text{mol}$ , 34%). Celui-ci a ensuite été activé par le TSTU, agent de couplage peptidique, puis couplé à la BSA dans les mêmes conditions que précédemment, pour donner le composé **I-29** (Schéma 44).

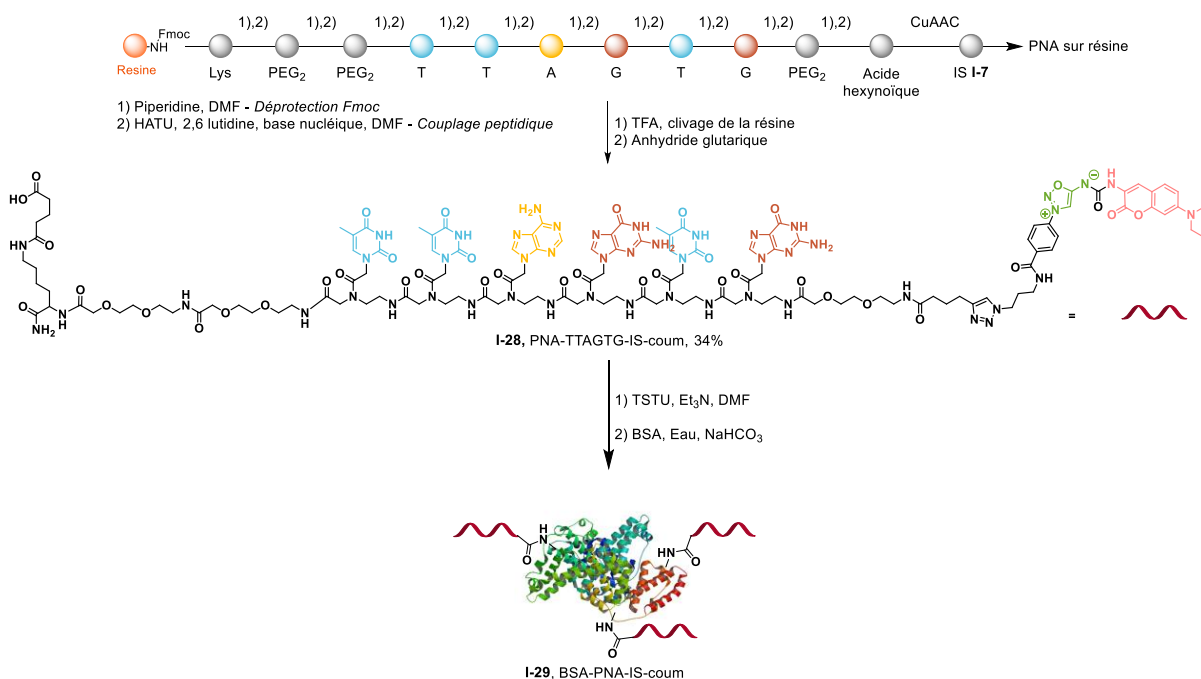


Schéma 44. Couplage lysine-acide entre le PNA **I-28** (20 equiv.) et la BSA. Nouveau composé BSA-PNA-Iminosydnone-coumarine **I-29**

Le composé **I-29** a été purifié comme décrit précédemment et analysé par MALDI-TOF (Figure 45). Le nombre moyen de PNAs par BSA est de 2. La concentration de cet échantillon est de 0,3 mg/mL.

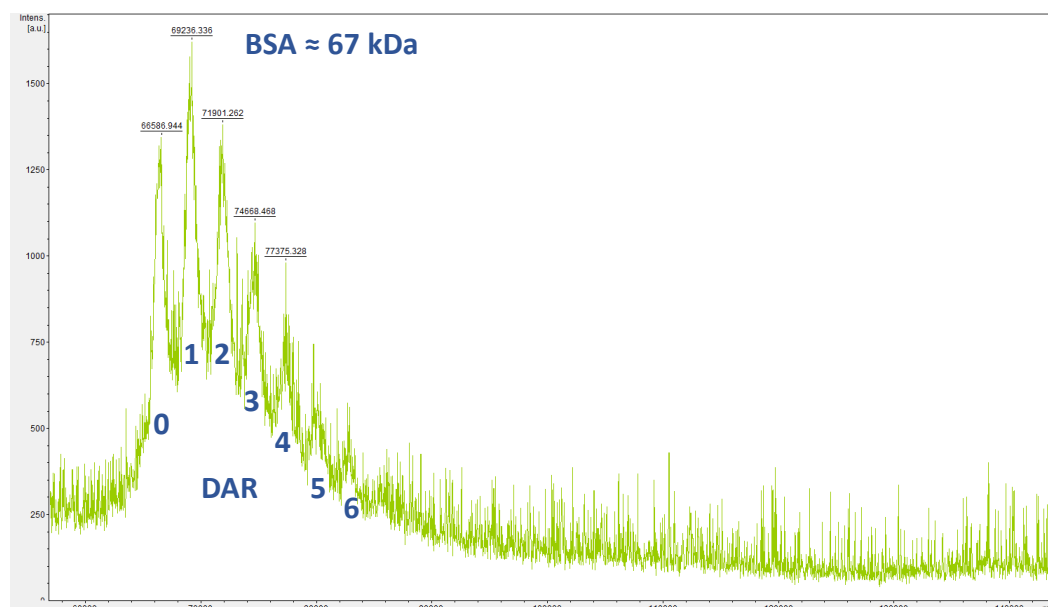


Figure 45. Analyse MALDI-TOF du composé BSA-PNA-ImSyd-Coum **I-29**

Le composé BSA-PNA-DBCO est celui qui nécessite le plus de modifications, notamment dans sa conception. Le PNA-DBCO précédent **I-26** était fonctionnalisé par le DBCO sur une lysine en position C-terminale, et pouvait être rattaché à la protéine par un maléimide en position N-terminale. Pour ce nouveau PNA, un acide a été ajouté en position C-terminale, suivi d'un espaceur puis de la lysine permettant d'accrocher le DBCO au PNA, et ensuite seulement les nucléobases. Le DBCO et l'acide servant à lier le PNA à la protéine se trouvent du même côté des bases nucléiques (Figure 46). Le squelette du PNA **I-30** Asp-PEG<sub>2</sub>-PEG<sub>2</sub>-Lys-C-A-C-T-A-A-acétyl a été obtenu par synthèse peptidique sur support, puis le DBCO a été ajouté sur la lysine hors de la résine (13.25 mg, 4.87 μmol, 22%).

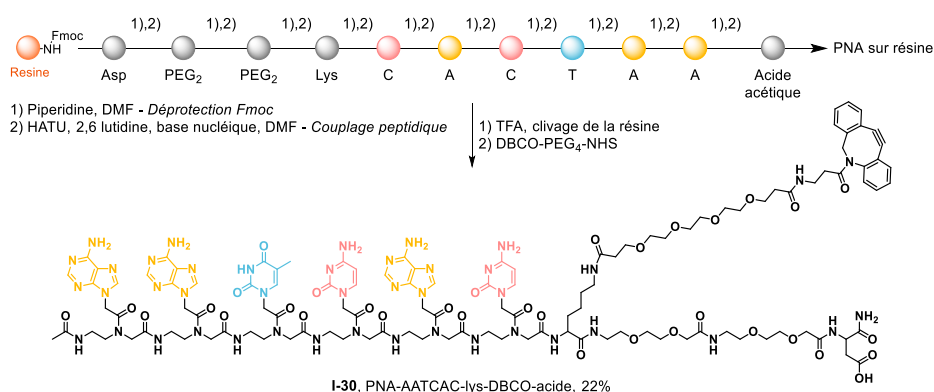


Figure 46. Nouveau PNA-DBCO acide **I-30**

Une cinétique entre le PNA-IS-coum **I-28** et le nouveau PNA-DBCO **I-30** a été réalisée, afin de vérifier que cette nouvelle configuration n'interfère pas avec la réaction de « click and release ». La cinétique obtenue est similaire à celle obtenue entre les composés **I-11** et **I-15** (Figure 47) lors de la preuve de concept. Le temps de demi-réaction est de 120 s. La position des partenaires de click sur le PNA n'a donc pas d'influence, tant que la reconnaissance moléculaire est possible et permet leur rencontre.

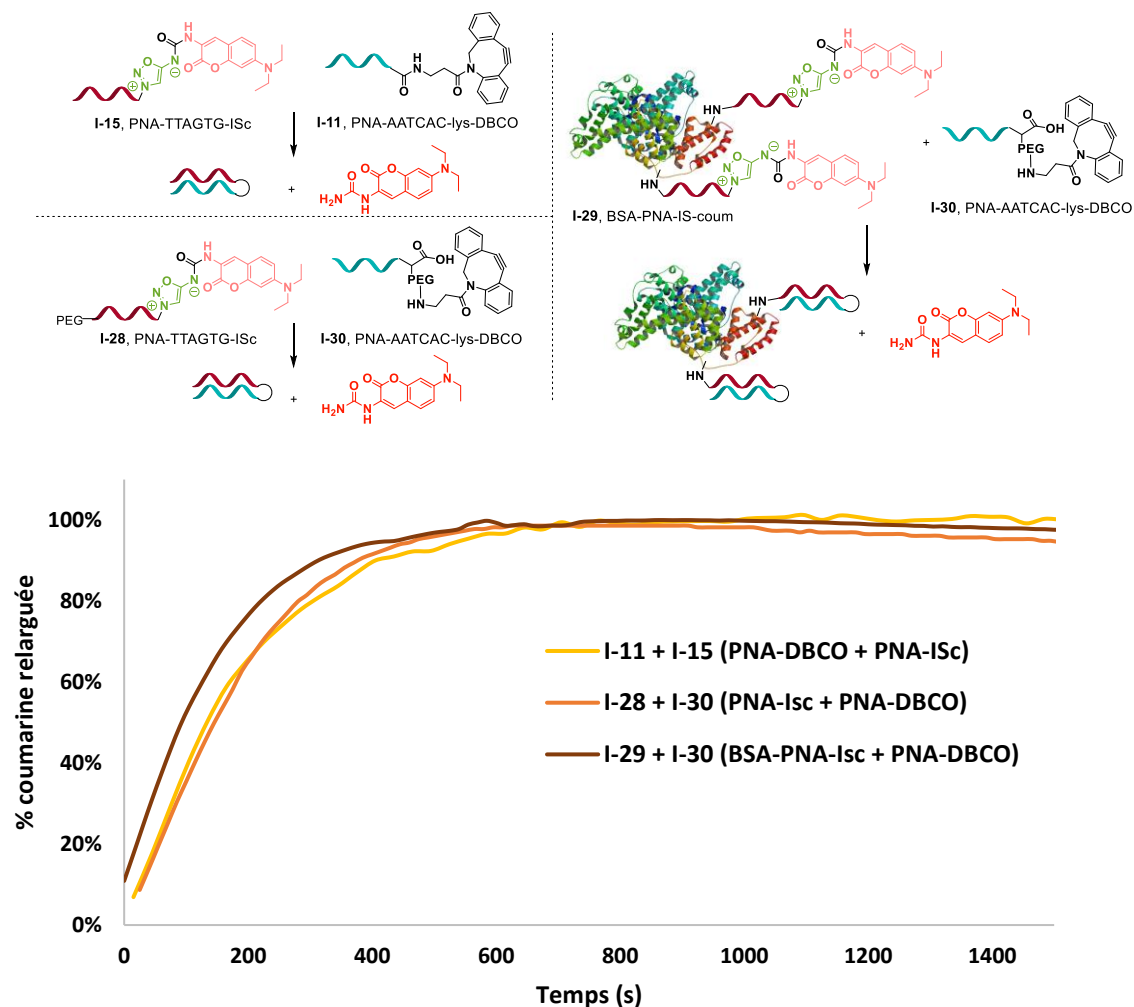


Figure 47. Cinétiques de "click and release" entre les PNAs à 6 paires de bases I-11 et I-15 ainsi que I-28 et I-30. [PNA] = 1  $\mu$ M dans le PBS. Cinétique entre la BSA-PNA-ISC I-29 et le PNA-DBCO I-30, [PNA] = 300 nM dans le PBS.

La réaction entre le composé BSA-PNA-ISC-coum I-29 et le PNA-DBCO I-30 donne des cinétiques similaires à celles des PNAs complémentaires seuls. Cela confirme que la présence de la BSA n'empêche pas la réaction de s'effectuer avec rapidité et efficacité. Ce résultat nous a donc encouragé à poursuivre les études et à tenter un nouveau couplage BSA-BSA. Avant cela il est nécessaire de préparer le nouveau bioconjugué BSA-PNA-DBCO.

Pour être ensuite greffé sur la BSA, l'acide de ce nouveau PNA I-30 a été mis à réagir avec du TSTU et de la triéthylamine afin de l'activer. L'ester activé n'est pas isolé avant d'être ajouté à la BSA en solution (Schéma 45).

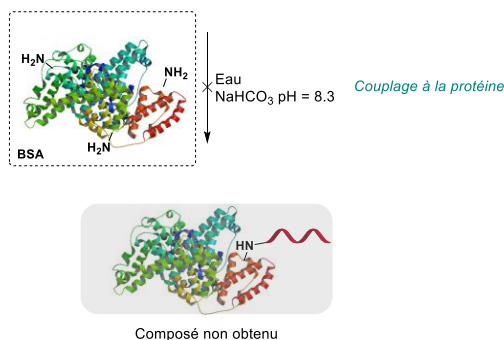
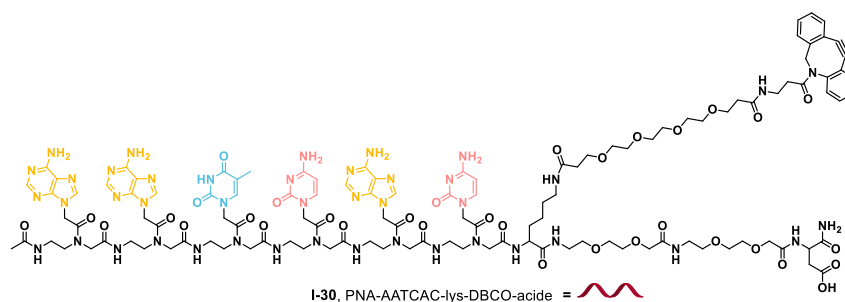


Schéma 45. Tentative de couplage du PNA-DBCO I-30 à la BSA

Cependant, toutes les analyses effectuées ont montré que le couplage n'avait pas eu lieu. Des analyses en LC-MS ont par la suite montré que le problème se situait au niveau de l'activation de la fonction acide carboxylique du composé I-30. Nous avons donc par la suite testé plusieurs autres agents activateurs dont le HATU, l'anhydride succinique et le N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC), mais sans succès. Il est possible que la fonction amide terminale proche de l'acide carboxylique pose problème lors de l'activation. Après de nombreux essais tous infructueux nous avons donc dû nous résigner à abandonner l'utilisation de ce nouveau PNA-DBCO I-30.

### 3. Deuxième génération de PNA-DBCO

L'activation de l'acide du PNA-DBCO I-30 n'ayant pas fonctionné, un nouveau PNA-DBCO a été synthétisé. La différence principale avec le PNA I-30 est le remplacement de la partie acide carboxylique par un maléimide (Figure 48). Le squelette du PNA I-31 Gly-A-A-T-C-A-C-Lys-PEG<sub>2</sub>-PEG<sub>2</sub>-maléimide a été obtenu par synthèse peptidique sur support, puis le DBCO a été ajouté sur la lysine hors de la résine (7.63 mg, 2.75 µmol, 12%).

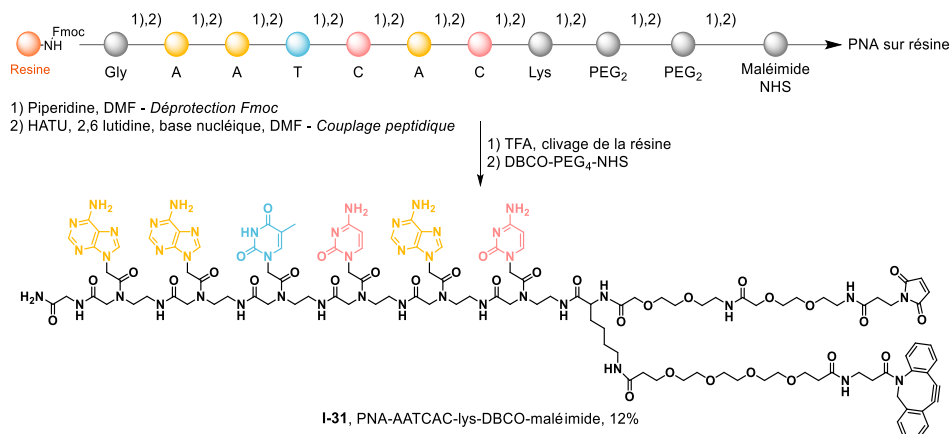


Figure 48. Nouveau PNA-DBCO maléimide I-31

Une cinétique entre ce nouveau PNA **I-31** et le PNA-IS-coum **I-28** a été effectuée, cohérente avec celle de la preuve de concept, avec un temps de demi-réaction de 205 s et une constante de vitesse  $k_{app} = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  (Figure 49).

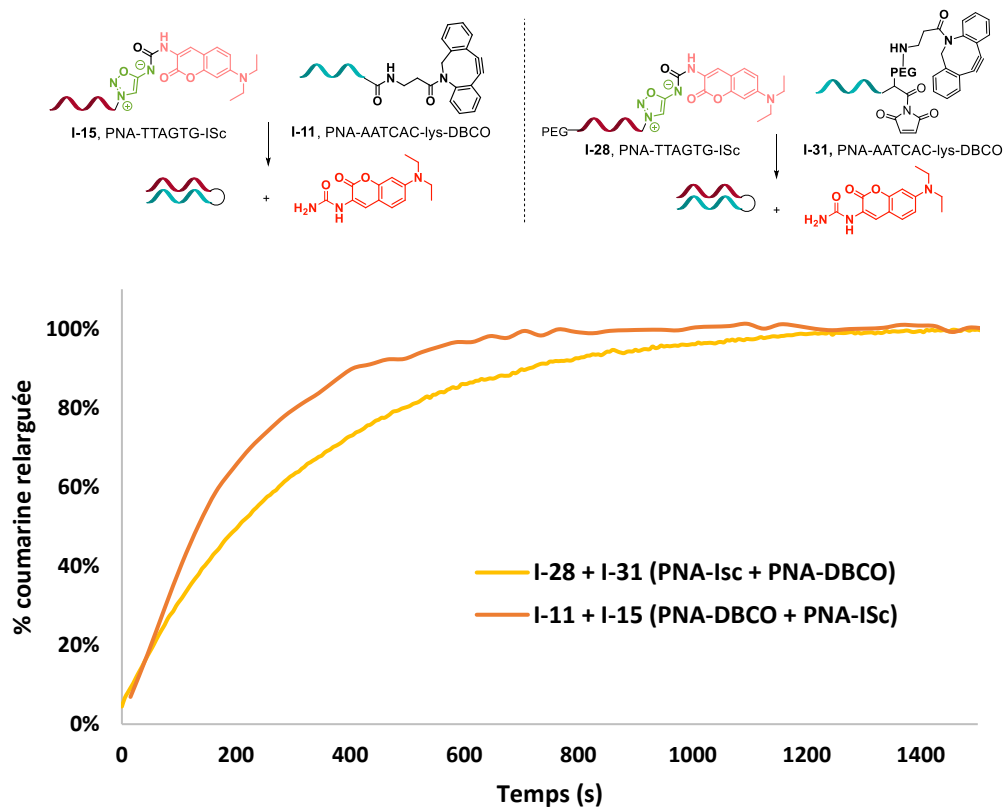


Figure 49. Cinétiques de "click and release" entre les PNAs à 6 paires de bases **I-11** et **I-15** ainsi que **I-28** et **I-31**.  
[PNA] = 1  $\mu\text{M}$  dans le PBS.  $\lambda_{exc} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ .

Ce nouveau PNA-DBCO-maléimide **I-31** a donc été utilisé dans un couplage avec la BSA. Les analyses MALDI-TOF (Figure 50) ont montré que la BSA avait bien été dérivatisée afin d'obtenir le composé **I-32**, avec un seul PNA présent sur la protéine, DAR = 1 (Schéma 46).

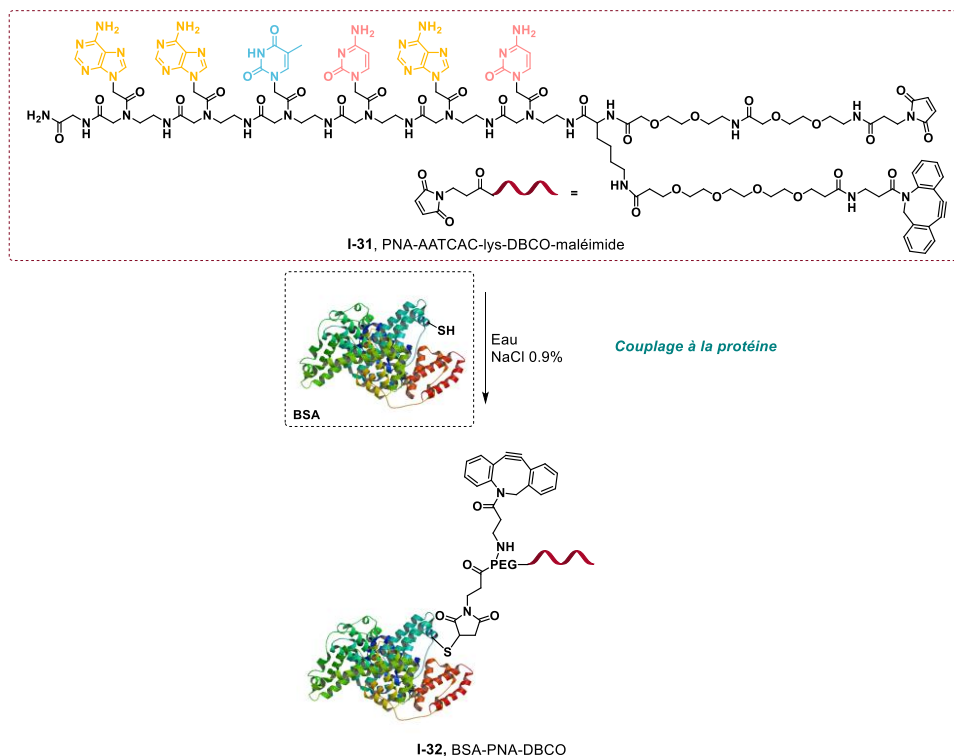


Schéma 46. Nouveau composé BSA-PNA-DBCO-maléimide I-32

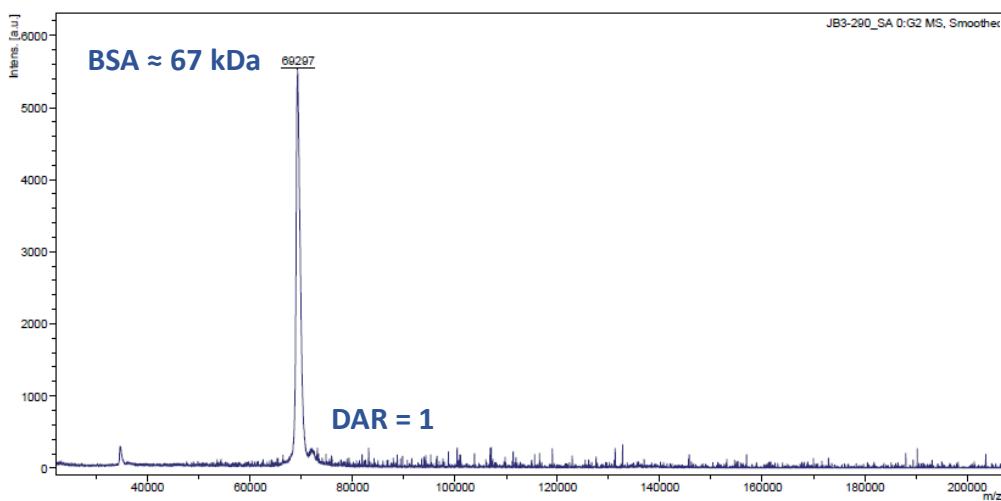


Figure 50. Analyse MALDI-TOF du composé BSA-PNA-DBCO I-32

Nous avons alors réalisé la réaction test de « click and release » entre ce composé et le PNA-IS-coum I-28 mais malheureusement celle-ci n'a pas été concluante, aucune fluorescence n'a été observée. Un problème s'est peut-être produit lors du couplage entre le PNA et la BSA, une hypothèse serait une destruction de la triple liaison du DBCO qui est relativement sensible aux conditions. Nous avons plusieurs fois changé la façon de greffer le PNA à la BSA sans succès, nous avons donc voulu changer la protéine.

En effet, la BSA possède des régions hydrophobes qui pourraient être à l'origine d'interactions non spécifiques avec le DBCO, ce qui pourrait expliquer son manque de réactivité. Nous avons donc décidé de coupler le PNA-DBCO I-31 à un anticorps. Les anticorps présentent de plus l'avantage de pouvoir

être purifiés par des techniques relativement douces, peut-être plus compatibles avec la structure fragile du DBCO. L'anticorps utilisé sera l'anticorps anti-KPC-416. Cet anticorps est produit par le Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI) de l'Institut des Sciences du vivant Frédéric Joliot-CEA, avec qui nous collaborons. Les manipulations avec l'anticorps anti-KPC-416 ont été effectuées en collaboration avec la Dr. Célestine Mairaville du SPI.

Cet anticorps anti-KPC-416 est dirigé contre les *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC). Les carbapénémases sont des enzymes pouvant hydrolyser les carbapénèmes, agents antibactériens parmi les plus efficaces. Les carbapénémases confèrent donc une résistance à ces antibiotiques. L'objectif en utilisant cet anticorps est de pouvoir par la suite l'utiliser dans des applications plus poussées, notamment des applications de détection.

Pour pouvoir dériver au mieux l'anticorps anti-KPC-416 par le PNA-DBCO maléimide **I-31**, des thiols ont été ajoutés à la surface de l'anticorps. Pour cela, l'anticorps a été mis en réaction avec 20 équivalents de N-succinimidyl S-acetylthioacetate (SATA), un agent de couplage hétérobifonctionnel permettant d'introduire des groupements thiols protégés sous forme d'acétate, dans 10% de tampon borate à pH = 9,5. Les lysines libres de l'anticorps réagissent sur l'ester de NHS. Après 1h d'incubation, la solution est purifiée par colonne d'exclusion stérique 40 kDa puis stockée dans du tampon phosphate 50 mM à pH = 7,4. La concentration de cette solution d'anticorps dérivatisés **I-33** est dosée par UV et donne une concentration de 2,33 mg/mL.

Juste avant le couplage avec le PNA-DBCO maléimide **I-31**, les groupements thiols acétylés incorporés dans la structure de l'anticorps anti-KPC-416 sont déprotégés par traitement avec une solution à 0,1 M en hydroxylamine pendant 30 min pour donner les thiols libres (Schéma 47).

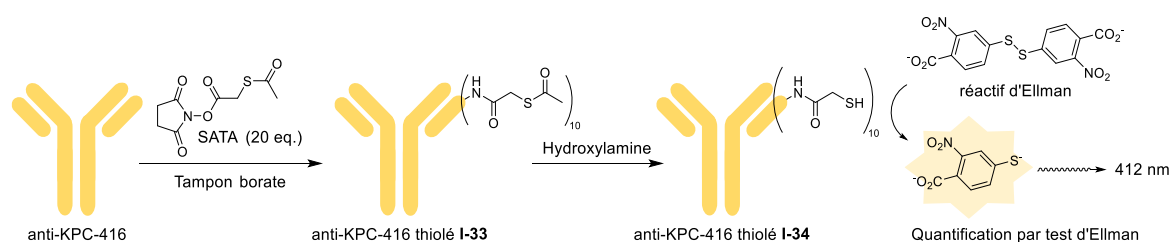


Schéma 47. Thiolation de l'anticorps anti-KPC-416

Le nombre de thiols ajouté a ensuite pu être déterminé par test d'Ellman. Le DTNB, aussi appelé réactif d'Ellman, réagit avec les thiols libres pour former un produit chromophore. En observant l'absorbance à 412 nm, il est possible de connaître la concentration en thiols libres. Une concentration en thiol de 164 nmol/mL a ainsi été obtenue. La concentration en anticorps ayant été déterminée à 15,5 nmol/mL, nous avons donc une solution avec une moyenne de 10 thiols par anticorps.

La solution d'anticorps anti-KPC-416 thiolés **I-34** est ensuite mise en réaction avec 5 fois plus de PNA-DBCO **I-31** que de thiols, soit 50 équivalents par rapport à l'anticorps. La solution est incubée 1 h. Le composé anti-KPC-416-PNA-DBCO est ensuite purifié sur colonne de résine de protéine A (Schéma 48). La protéine A est une protéine de poids moléculaire entre 35 et 50 kDa. Elle présente une très grande spécificité pour la région Fc des molécules d'immunoglobulines G (IgG) chez de nombreuses espèces de mammifères. L'immunoglobuline G est la principale des 5 classes d'immunoglobulines. L'anticorps anti-KPC-416 étant un anticorps IgG1, cette technique peut être utilisée pour le purifier. La résine de protéine A permet de purifier les anticorps spécifiquement. Ceux-ci se lient à la protéine A tandis que toutes les autres impuretés sont éluées. Quand il ne reste plus que les anticorps voulus sur la résine, un éluant glycine 0,1 M au pH acide = 2,58 permet de casser cette affinité et de récupérer l'anticorps en solution. Une dialyse est ensuite effectuée sur la solution pour neutraliser le pH et



conserver l'anticorps dans un tampon salin 0,9 M NaCl. Cette technique permet en particulier d'éliminer le PNA non accroché à l'anticorps. Le composé anti-KPC-416 PNA-DBCO **I-35** est ainsi obtenu en solution à 433 µg/mL (Schéma 48).

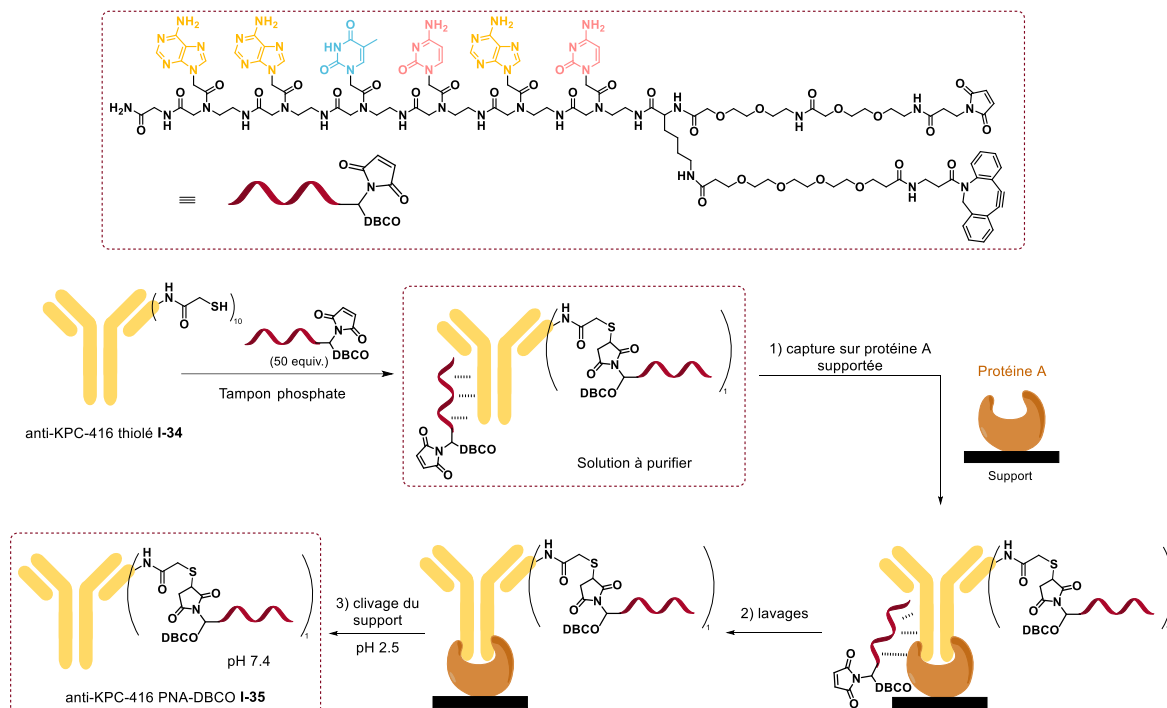


Schéma 48. Synthèse et purification de l'anticorps dérivatisé anti-KPC-416 PNA-DBCO **I-35**

Une fois le composé anti-KPC-416 PNA-DBCO **I-35** obtenu, des analyses MALDI-TOF de celui-ci ont été effectuées. Le signal obtenu est très faible, il semble y avoir du produit autour de la masse de l'anticorps mais il est impossible de confirmer si la dérivatisation par les PNAs a bien été effective. En comparaison, l'analyse MALDI-TOF du composé anti-KPC-416 thiolé **I-33** est très claire et ce composé a bien été obtenu. Des cinétiques entre l'anticorps dérivatisé et le PNA-Iminosydnone-coumarine complémentaire **I-28** ont tout de même été effectuées. Une très légère augmentation de fluorescence est observée, mais elle n'est pas significative. Il se peut qu'il y ait eu un problème, notamment de solubilité, lors du couplage des PNAs à l'anticorps. Sans surprise, les résultats de la cinétique entre l'anticorps PNA-DBCO et la BSA-PNA-ISc **I-29** sont similaires. Le produit de couplage entre la BSA et l'anticorps n'a pas pu être observé.

Ces résultats négatifs semblent montrer que le problème de ce couplage protéine-protéine ne provient probablement pas de la nature de la protéine puisque les résultats sont similaires que l'on utilise de la BSA ou un anticorps. Nous avons donc poursuivi nos travaux en nous focalisant sur la structure du PNA-DBCO qui semble être le réactif responsable des problèmes rencontrés.

#### 4. Troisième génération de PNA-DBCO

Les différentes stratégies essayées jusqu'alors pour coupler deux protéines entre elles en utilisant la chimie click assistée par la reconnaissance moléculaire n'ont pas fonctionné. Le principal problème se trouve au niveau du PNA-DBCO. Le couplage à une protéine ou un anticorps semble plus complexe avec ce PNA, et quand le couplage est bien observé, c'est la réaction de « click and release » sur ce composé qui pose problème. Les cinétiques de couplage très rapides obtenues entre les bioconjugués

BSA-PNA-Iminosydnone-coumarine (**I-25** et **I-29**) et leurs PNA-DBCO complémentaires montrent que le concept fonctionne, et le souci vient sûrement des bioconjugués obtenus avec ce type de PNA.

Ce projet a été poursuivi par la Dr. Emilie Lesur qui a synthétisé de nouveaux composés dans le cadre de son contrat post-doctoral. Un nouveau PNA-DBCO **I-36** acide a été synthétisé, avec un espaceur PEG beaucoup plus grand dans l'espoir de limiter d'éventuels problèmes d'accessibilité (Schéma 49). Le squelette du PNA **I-36** Gly-A-A-T-C-A-C-Lys-PEG<sub>5</sub>-PEG<sub>5</sub>-acide a été obtenu par synthèse peptidique sur support, puis le DBCO a été ajouté sur la lysine hors de la résine (7,5 mg, 2,4 μmol, 10%).

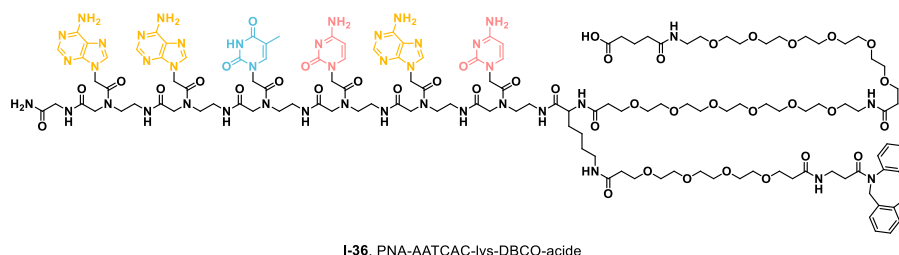


Figure 51. Nouveau PNA-DBCO-acide **I-36**

Ce PNA a été greffé par couplage lysine – acide activé sur l'anticorps anti-KPC-416 et sur l'anticorps Cetuximab (Ctx), un anticorps monoclonal chimérique IgG1, dirigé spécifiquement contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Schéma 49).

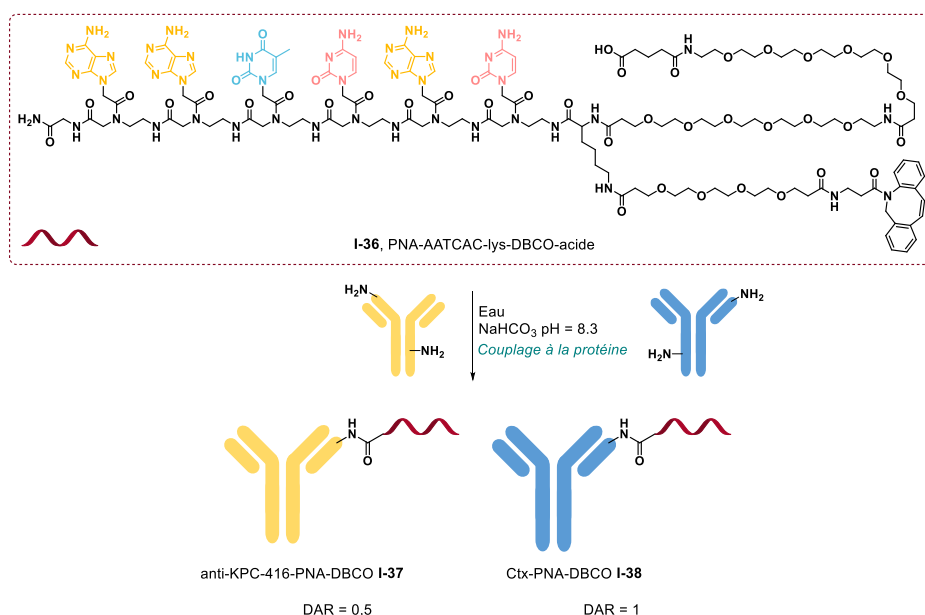


Schéma 49. Nouveau PNA-DBCO-acide **I-36** et nouveaux anticorps dérivatisés **I-37** et **I-38**

De nouvelles études cinétiques ont été effectuées avec ces nouvelles protéines. Les études cinétiques par fluorescence ont donc porté sur les deux nouveaux anticorps dérivatisés **I-37** et **I-38**. La dérivatisation des anticorps a mieux fonctionné que précédemment mais avec un plus faible nombre de PNAs greffés, avec un DAR de 0,5 pour l'anti-KPC-416, et de 1 pour le Cetuximab (Figure 52).

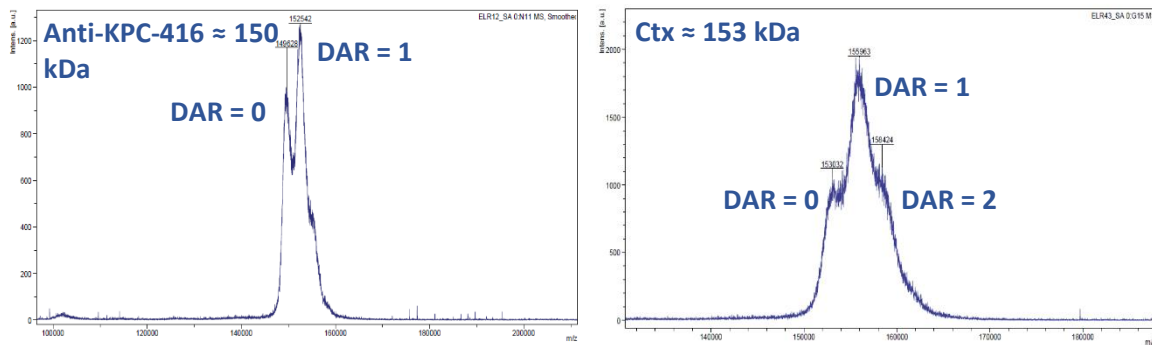


Figure 52. Analyse MALDI-TOF du composé anti-KPC-416-PNA-DBCO I-37 et du composé Ctx-PNA-DBCO I-38

Les anticorps dérivatisés semblent réagir dans des réactions de « click and release » avec le PNA-IsC I-28 mais toujours avec des cinétiques très lentes. Seule une faible augmentation de fluorescence est observée (Figure 53).

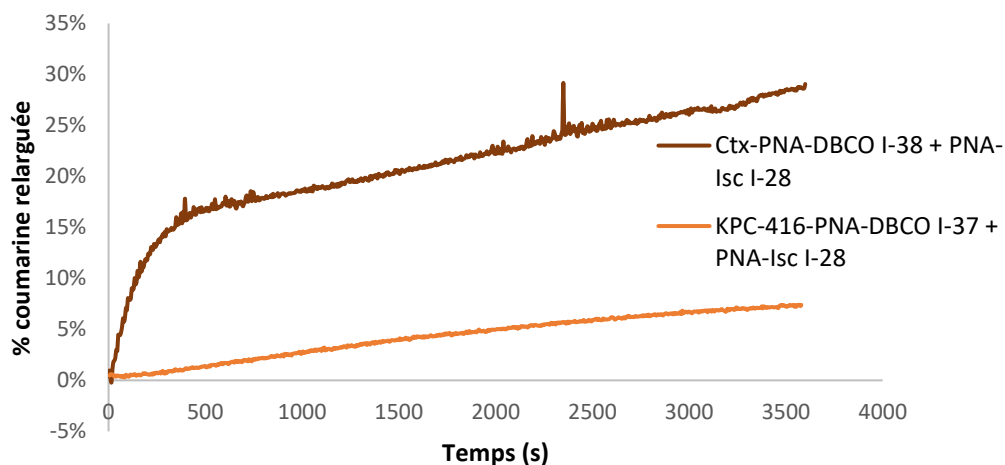
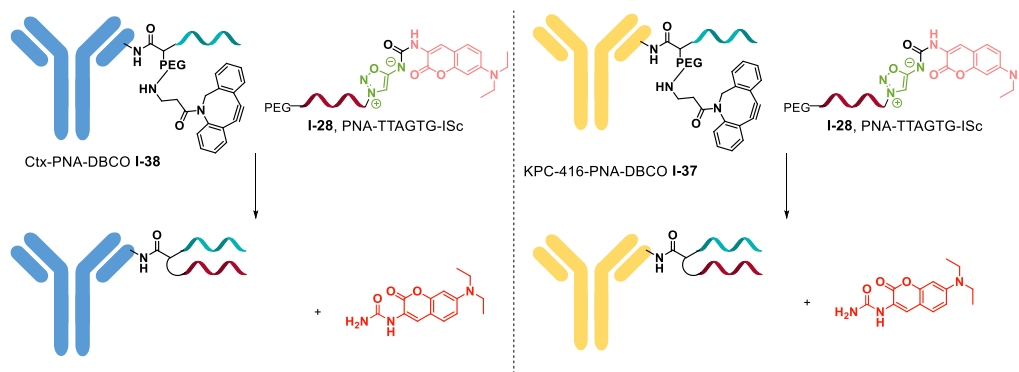


Figure 53. Cinétiques de "click and release" entre le PNA-IsC I-28 les anticorps dérivatisés I-37 et I-38, [PNA] = 100 nM dans le PBS.  $\lambda_{ex} = 387 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ .

Le meilleur résultat est obtenu avec le bioconjugué dérivé du Cetuximab qui semble réagir relativement rapidement dans un premier temps puis plus lentement pour une raison inexpliquée. Cependant, il est clair que la reconnaissance moléculaire ne semble pas avoir lieu de façon optimale, ce qui tend à confirmer une certaine incompatibilité entre le PNA-DBCO et le couplage aux protéines. En effet, le concept fonctionne lorsque la BSA est dérivatisée par un PNA-IS-coum (I-29) et réagit avec

un PNA-DBCO complémentaire **I-30**. Le problème ne vient donc pas du concept mais du PNA-DBCO et de sa structure, ou de l'anticorps en lui-même.

Plusieurs observations nous font penser que les différents PNA-DBCO que nous avons synthétisés font des interactions non spécifiques avec les protéines. Ceci pourrait en partie expliquer les mauvais résultats obtenus avec ces dérivés. Ces résultats nécessitent encore beaucoup d'optimisations, peut-être en changeant la séquence et la longueur des PNAs ou en changeant la structure du squelette des PNAs pour les rendre plus solubles. Ces pistes sont en cours d'explorations par la Dr. Emilie Lesur et nos collaborateurs du SPI.

En conclusion de cette partie, de nombreux essais ont été réalisés pour appliquer le concept de reconnaissance moléculaire combinée à la réaction bioorthogonale SPICC au couplage protéine-protéine mais sans beaucoup de succès. Ce concept fonctionne très bien *in vitro* mais se complique lorsque l'on souhaite l'utiliser en bioconjugaison sur des protéines. Nous avons eu une multitude d'échecs sur les couplages protéine-protéine mais aussi sur des réactions de couplage n'impliquant qu'une seule protéine dérivatisée par un PNA-DBCO. Nous n'avons pas à ce stade d'explication solide expliquant ce mauvais résultat mais nous soupçonnons des interactions non spécifiques du PNA-DBCO avec la protéine sur laquelle il est lié. Ces interactions non spécifiques pourraient empêcher la reconnaissance moléculaire par le PNA complémentaire. Toutefois, nous avons pu montrer que le concept fonctionnait en revanche lorsque le PNA-iminosydnone-coumarine était lié à une protéine. Dans ce cas, la présence de la protéine ne semble pas gêner la réaction. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur une application possible de ce type d'objet : la libération contrôlée de principes actifs. En effet, si l'on remplace la coumarine, qui nous a servie pour faire les études cinétiques décrites plus haut, par une molécule bioactive, nous pourrions la libérer de façon rapide et très efficace d'un vecteur tel qu'un anticorps. Nous pourrions ainsi développer de nouveaux espaceurs pour des ADCs (Antibody Drug Conjugates).

## B. Libération contrôlée de principes actifs

### 1. Introduction

Nous avons montré dans la première partie de ce chapitre que les PNAs pouvaient être utilisés pour accélérer la réaction bioorthogonale de SPICC. Nous avons ici voulu appliquer ce concept au relargage de principes actifs de manière contrôlée. La bioorthogonalité de la réaction SPICC permettrait de relarguer le composé d'intérêt de manière spécifique, et les PNAs rendraient cette réaction extrêmement rapide même à de très faibles concentrations.

L'application évidente de ce concept se situe dans le domaine du développement des ADCs, bioconjugués entre un anticorps et un médicament, généralement un cytotoxique. Les ADCs sont de plus en plus développés pour acheminer un principe actif sur une cible.<sup>84</sup> Plutôt que d'injecter le principe actif directement dans le corps de manière non spécifique, celui-ci est lié sous une forme non active à un anticorps. Cet anticorps est injecté et s'accumule progressivement sur sa cible. Il existe ensuite différents mécanismes d'action pour libérer le principe actif au niveau de la cible. L'un des plus utilisés est l'action enzymatique : une enzyme présente spécifiquement au niveau de la cible détruit le lien entre l'anticorps et la drogue qui est alors libérée et active.

Nous voulons ici développer un ADC clivable par chimie bioorthogonale : une iminosydnone liée à l'anticorps et à un cytotoxique inactivé, réagirait avec un DBCO afin de libérer le principe actif. Nous

---

<sup>84</sup> P. Khongorzul, C. Jia Ling; F. Ullah Khan; Awais Ullah Ihsan; Juan Zhang, *Mol Cancer Res.*, 2020, 18, 1, 3–19

souhaitons par ailleurs accélérer cette réaction de libération de la drogue grâce aux PNAs développés précédemment (Schéma 50). L'association des PNAs avec une iminosydnone pourrait constituer une nouvelle stratégie de linker clivable pour le développement de nouveaux ADCs.

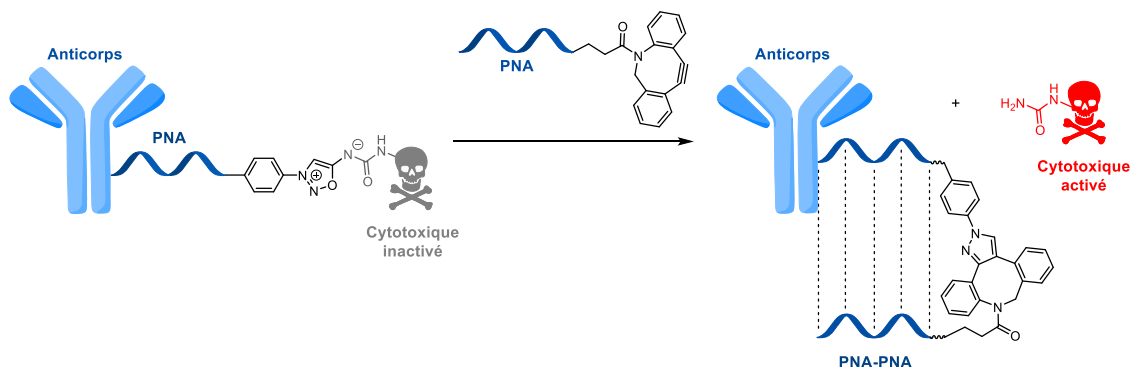


Schéma 50. Libération d'un principe actif accroché à un ADC par chimie bioorthogonale accélérée par reconnaissance moléculaire

#### a) Choix du principe actif : la doxorubicine

Pour les raisons mentionnées plus haut, nous avons choisi de libérer un principe actif cytotoxique. La technologie que nous cherchons à développer pourrait en effet être utile dans le cas de la libération contrôlée d'une drogue sur des cellules tumorales. Notre choix s'est porté sur la doxorubicine (Figure 54), qui est l'un des composés les plus utilisés en thérapie ciblée.

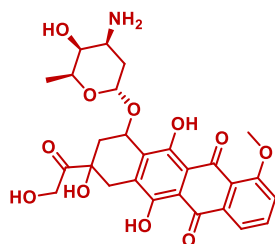


Figure 54. Doxorubicine

La doxorubicine appartient à la famille des anthracyclines. Elle est obtenue à partir de la daunorubicine, qui est issue de la fermentation de souches *Streptomyces*. Comme toutes les anthracyclines, elle comporte un noyau anthraquinone aromatique plan. Cette partie aromatique chromophore peut s'insérer entre deux paires de bases de l'ADN, et empêcher ainsi sa réplication dans les cellules tumorales. L'amine libre du sucre de la doxorubicine a une grande importance dans l'activité de celle-ci car elle interagit avec les bases de l'ADN *via* une liaison hydrogène. C'est également un inhibiteur des enzymes ADN topoisomérases II, impliquées dans la réplication de l'ADN. La doxorubicine est approuvée par la FDA depuis 1974, et est dans la liste de l'OMS des médicaments essentiels. Ses propriétés colorimétriques (solide rouge) et fluorescentes la rendent utile pour le suivi de réaction et le suivi de composés *in cellulo* et *in vivo*.

#### b) Utilisation de l'espaceur Valine-Citruline

Nous avons souhaité utiliser un espaceur pour relier notre iminosydnone à la doxorubicine, notamment car la réaction de « click and release » libère une urée et non une amine primaire comme celle de la doxorubicine. Nous avons choisi l'espaceur valine-citrulline-p-aminocarbamate, un bras

clivable par action enzymatique. Il est clivé par la Cathepsine B, une protéase lysosomale.<sup>85</sup> Cette protéase est présente en milieu intracellulaire, dans les lysosomes des cellules saines, mais est surexprimée par les cellules cancéreuses, y compris dans le milieu extracellulaire. La cathepsine B péricellulaire est impliquée dans des processus de dégradation liés à la prolifération des tumeurs. Le dipeptide valine-citrulline présente donc une grande stabilité *in vivo* en milieu sain mais est clivé dans le microenvironnement tumoral.

L'urée terminale du bras valine-citrulline est indispensable pour que la cathepsine B puisse avoir une action enzymatique.<sup>86</sup> La molécule d'intérêt est liée *via* une amine à l'espaceur valine-citrulline par un lien para-aminobenzyl carbamate (PABC). Lors du clivage de l'espaceur, la liaison amide aromatique est coupée suite à l'action de la cathepsine B et l'amine d'intérêt est libérée par élimination 1,6 du PABC (Schéma 51).

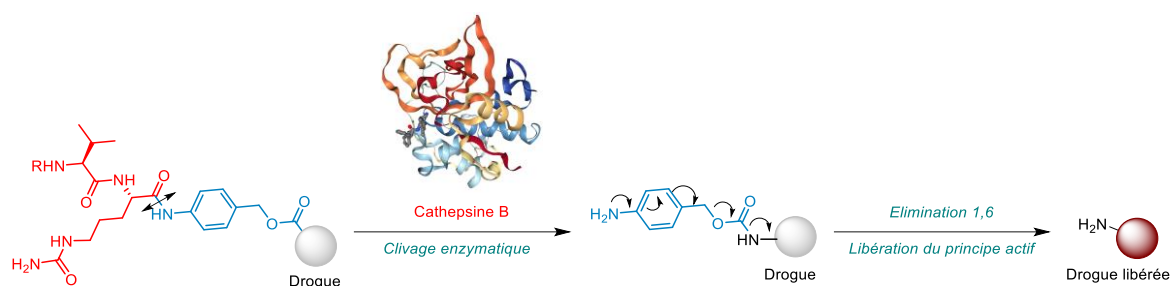


Schéma 51. Clivage enzymatique de l'espaceur valine-citrulline

L'utilisation de l'espaceur Valine-Citrulline permet donc un relargage de médicaments uniquement en présence de cette enzyme surexprimée dans les cellules cancéreuses.

De nombreux ADCs ont été développés en utilisant l'espaceur valine-citrulline. Parmi eux, un bioconjugué, l'ADCETRIS® (brentuximab vedotin, Figure 55), a été mis sur le marché en 2018,<sup>87</sup> et de nombreux autres ADCs contenant des espaceurs peptidiques, dont valine-citrulline, sont en phase clinique.<sup>88</sup>

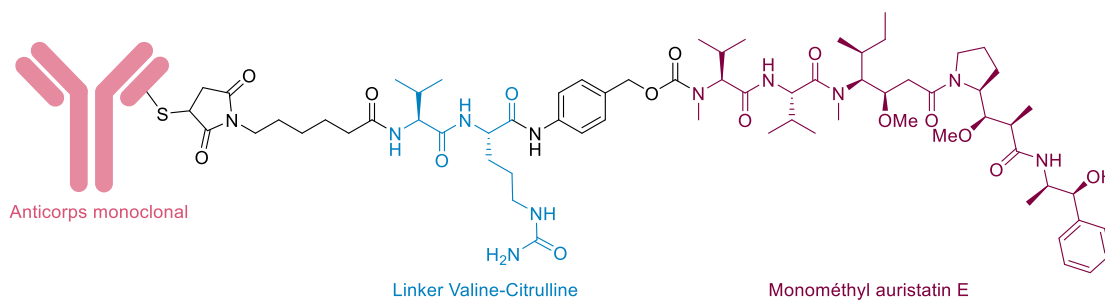


Figure 55. ADCETRIS®

<sup>85</sup> G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch and P. A. Trail, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 855–869

<sup>86</sup> B. Wei, J. Gunzner-Toste, H. Yao, T. Wang, J. Wang, Z. Xu, J. Chen, J. Wai, J. Nonomiya, S. P. Tsai, J. Chuh, K. R. Kozak, Y. Liu, S-F Yu, J. Lau, G. Li, G. D. Phillips, D. Leipold, A. Kamath, D. Su, K. Xu, C. Eigenbrot, S. Steinbacher, R. Ohri, H. Raab, L. R. Staben, G. Zhao, J. A. Flygare, T. H. Pillow, V. Verma, L. A. Masterson, P. W. Howard, B. Safina, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 989–1000.

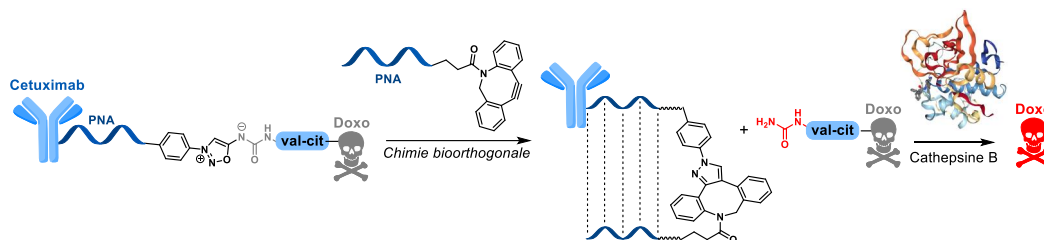
<sup>87</sup> P. D. Senter & E. L. Sievers, *Nature Biotechnology*, **2012**, 30, 631–637

<sup>88</sup> N. Jain, S. W. Smith, S. Ghone & Bruce Tomczuk, *Pharm Res*, **2015**, 32, 3526–3540

### c) Objectifs

Le but ultime de ce travail consiste à concevoir un nouveau type d'ADC qui serait formé d'un espaceur doublement activable : par chimie bioorthogonale et par activation enzymatique. Cet ADC serait constitué d'un PNA lié à une iminosydnone elle-même liée à la doxorubicine via un espaceur valine-citrulline (Schéma 52).

Principe général de libération de doxorubicine via un ADC-PNA-Valine-Citrulline-Doxorubicine



Libération du principe actif de manière doublement bioorthogonale

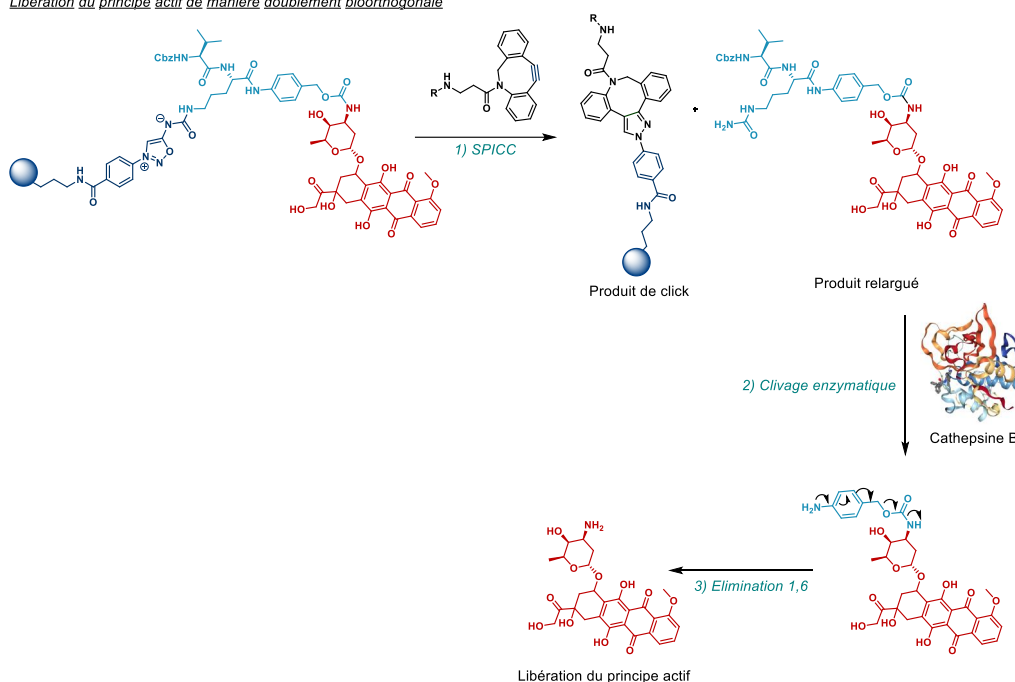


Schéma 52. Principe de double activation pour une libération contrôlée de la doxorubicine.

Le concept que nous souhaitons développer est tel que suit. Dans un premier temps, l'ADC est injecté et circule dans l'organisme. L'anticorps s'accumule au niveau de sa cible, surexprimée au niveau de cellules cancéreuses. L'anticorps que nous envisageons d'utiliser est le Cetuximab, l'ADC est composé du Cetuximab lié à un PNA, lui-même lié à une iminosydnone avec le composé valine-citrulline-doxorubicine en position N6. Après plusieurs jours d'accumulation, le PNA-DBCO complémentaire est injecté dans l'organisme. Celui-ci est sensé être non toxique, et lorsqu'il se trouve en présence de l'ADC, la reconnaissance moléculaire entre les PNAs complémentaires a lieu et accélère la réaction de SPICC entre l'iminosydnone et le cyclooctyne. Le composé valine-citrulline-doxorubicine est alors relargué. Le dipeptide valine-citrulline est ensuite clivé par action enzymatique de la cathepsine B qui est surexprimée en milieu tumoral. Finalement, la doxorubicine active est libérée.

Nous avons choisi de synthétiser un composé azoture-iminosydnone-valine-citrulline-doxorubicine car ce composé présente une double bioorthogonalité : tout d'abord la partie iminosydnone qui réagira de manière spécifique avec un cyclooctyne pour libérer la seconde partie du composé, puis l'espaceur valine-citrulline, qui pourra être clivé en présence de cathepsine B, et libérer ainsi la

doxorubicine, composé cytotoxique. Si seul un de ces deux paramètres est présent, la libération du principe actif n'aura pas lieu. En effet, en présence du seul cyclooctyne, le composé Valine-Citrulline-Doxorubicine serait relargué mais serait inactif, l'amine de la doxorubicine devant être libre pour que le composé soit actif. Le principe actif reste donc ainsi inhibé. En présence uniquement de Cathepsine B, sans action d'un cyclooctyne au préalable, le lien valine-citrulline ne pourrait pas être reconnu, car sa fonction urée serait indisponible, et c'est celle-ci qui est reconnue par l'enzyme. Ainsi, notre système est plus robuste et les possibilités de libérer le principe actif de manière non spécifique sont limitées (Schéma 52).

Cet objectif est très ambitieux car l'ADC visé est très complexe et sera difficile à obtenir. Le schéma rétrosynthétique ci-dessous montre la stratégie que nous envisageons de suivre pour former un tel objet moléculaire (Schéma 53).

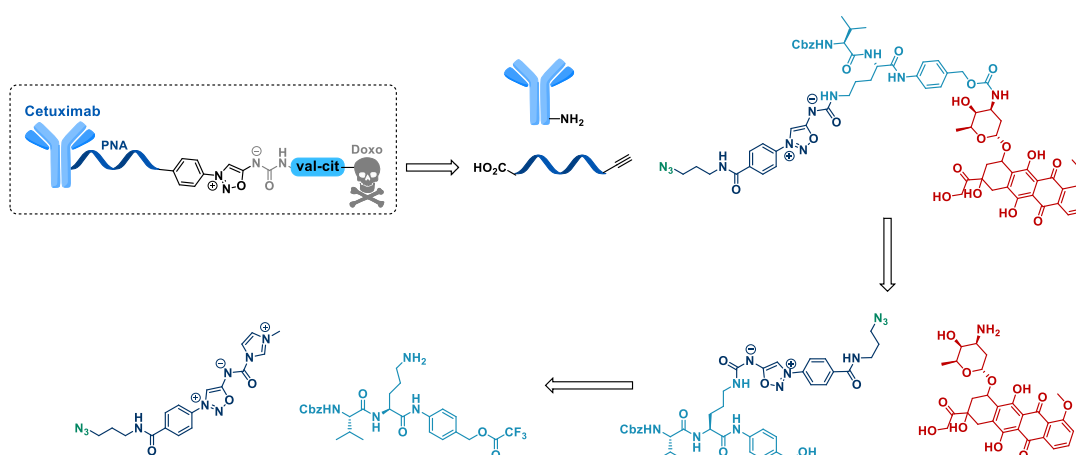


Schéma 53. Schéma rétrosynthétique envisagé

Le bioconjugué sera obtenu en dernière étape. Il sera obtenu par combinaison de l'anticorps, de la partie PNA et de la partie Iminosydnone-valine-citrulline-doxorubicine. La doxorubicine sera ajoutée en dernier et les synthons iminosydnone et valine-citrulline seront synthétisés séparément puis assemblés.

## 2. Synthèse du composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine

La synthèse du composé Azoture-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine peut être divisée en trois parties : la synthèse de l'iminosydnone, le dipeptide valine-citrulline et la doxorubicine.

Nos efforts ont d'abord porté sur la formation du synthon valine-citrulline. Nous avons voulu reproduire une voie de synthèse déjà développée dans notre laboratoire (Schéma 54). La première étape de cette voie de synthèse consiste en un couplage peptidique entre l'alcool para-aminobenzyle (PABOH) et une ornithine protégée par un groupement Fmoc, et un groupement Boc sur son amine latérale. Le groupement Fmoc de l'ornithine est ensuite déprotégé par de la pipéridine pour être couplé au composé Val(Cbz)-OH. Le groupement Boc est ensuite déprotégé par du TFA pour obtenir l'amine correspondante pouvant alors être fonctionnalisée.



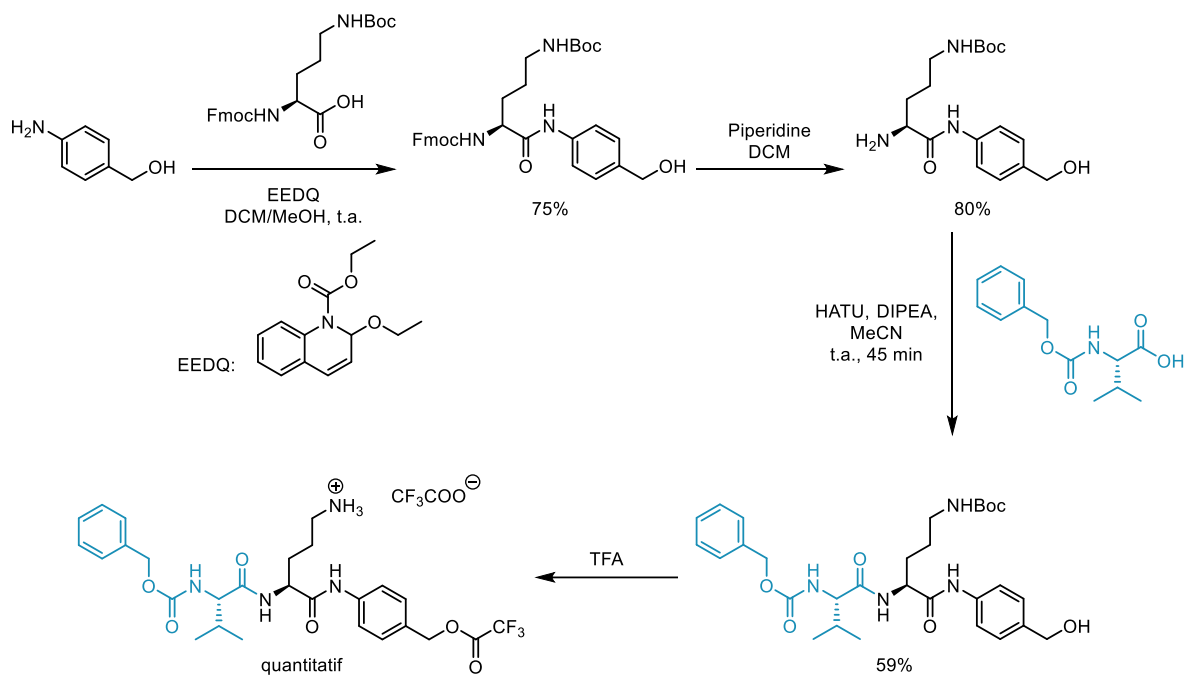


Schéma 54. Synthèse du dipeptide valine-citrulline développée par notre laboratoire

Cependant, lors de la réalisation de cette voie de synthèse, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats que ceux obtenus précédemment dans le laboratoire. Le premier couplage peptidique et la déprotection à la piperidine donnent les produits attendus, mais lors de la troisième étape, un produit d'estérification sur l'alcool benzylique **I-41** est observé (Schéma 55), malgré l'utilisation en défaut du composé Val(Cbz)-OH.

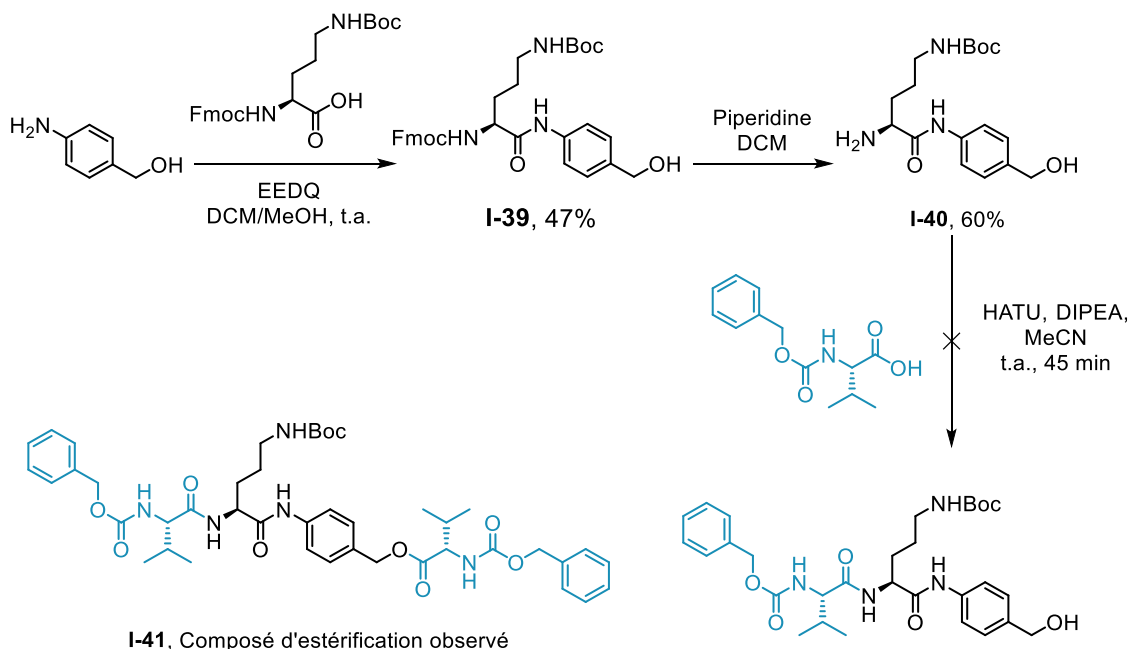


Schéma 55. Première tentative de synthèse du composé Valine-Citrulline

Une autre voie de synthèse a alors été envisagée, basée sur la protection de l'alcool benzylique. L'alcool benzylique du para-nitrobenzyl alcool est protégé par un groupement tetrahydropyrane (THP). La fonction nitro est alors réduite en amine, l'aniline correspondante est ainsi obtenue en deux étapes quantitatives (Schéma 56).

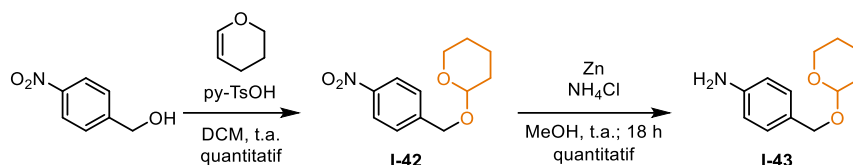


Schéma 56. Protection de l'alcool benzylique par un groupement THP

L'alcool benzylique protégé **I-43** est par la suite engagé dans les étapes de synthèses prévues initialement (Schéma 57). Le composé intermédiaire **I-46** Valine-Citrulline protégé par les groupements Boc et THP est solubilisé dans du TFA pour une double déprotection. Le composé souhaité **I-47** est obtenu en 4 étapes de synthèse (rendement global de 28%).

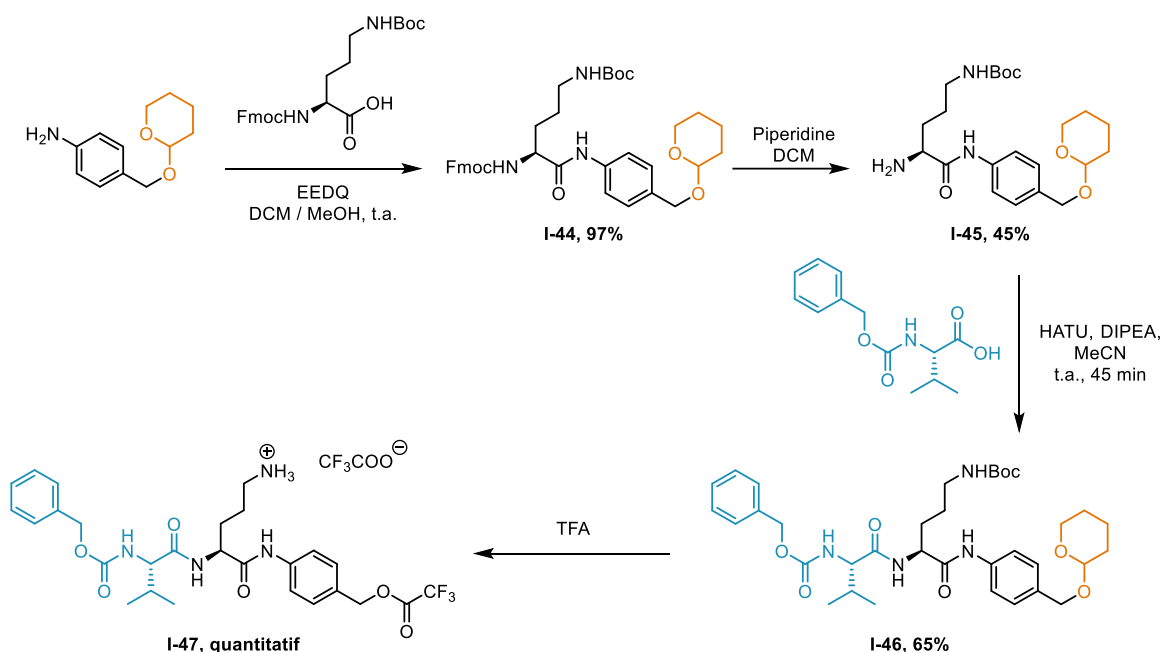


Schéma 57. Nouvelle voie de synthèse du dipeptide valine-citrulline

L'amine libre de l'espaceur valine-citrulline **I-47**, réagit avec l'iminosydnone **I-6-int** dont la synthèse a été décrite précédemment (voir Schéma 34) pour obtenir le composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH **I-48** (Schéma 58). L'ester trifluoroacétate est déprotégé au cours de la réaction.

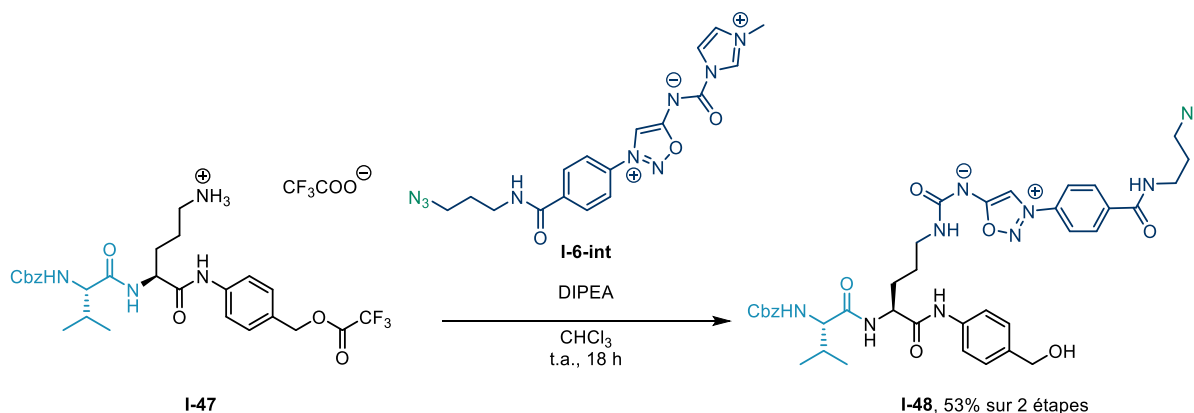


Schéma 58. Formation du composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH

La dernière étape de synthèse de notre composé d'intérêt est le greffage de la doxorubicine sur l'intermédiaire Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH. Un lien carbamate a été choisi pour lier la doxorubicine à l'espaceur valine-citrulline, ce lien ayant déjà été utilisé dans d'autres travaux. L'alcool benzylique a été activé par un groupement para-nitrophényl (PNP), puis la doxorubicine a été ajoutée par addition élimination pour former le carbamate **I-49** (Schéma 59). Une dizaine de milligrammes du composé pur **I-49** ont été obtenus après purification par HPLC semi-préparative.

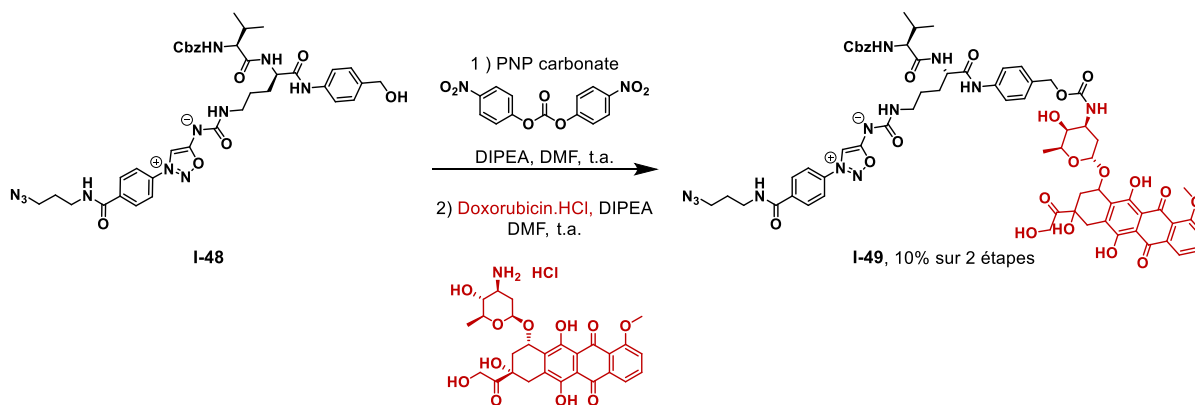


Schéma 59. Obtention du composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine

### 3. Synthèse du PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine

Une fois le composé Azoture-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine **I-49** obtenu, nous avons souhaité le greffer à un PNA. Le couple de PNAs à six paires de bases ayant été déterminé comme le meilleur pour nos objectifs, c'est sur celui-ci qu'ont été effectués les essais.

#### a) CuAAC

Pour accrocher le composé Azoture-Iminosydnone-Coumarine **I-7** à un PNA, nous avons effectué une CuAAC sur support solide. Une CuAAC dans les mêmes conditions a donc été envisagée pour le composé **I-49** (Schéma 60).

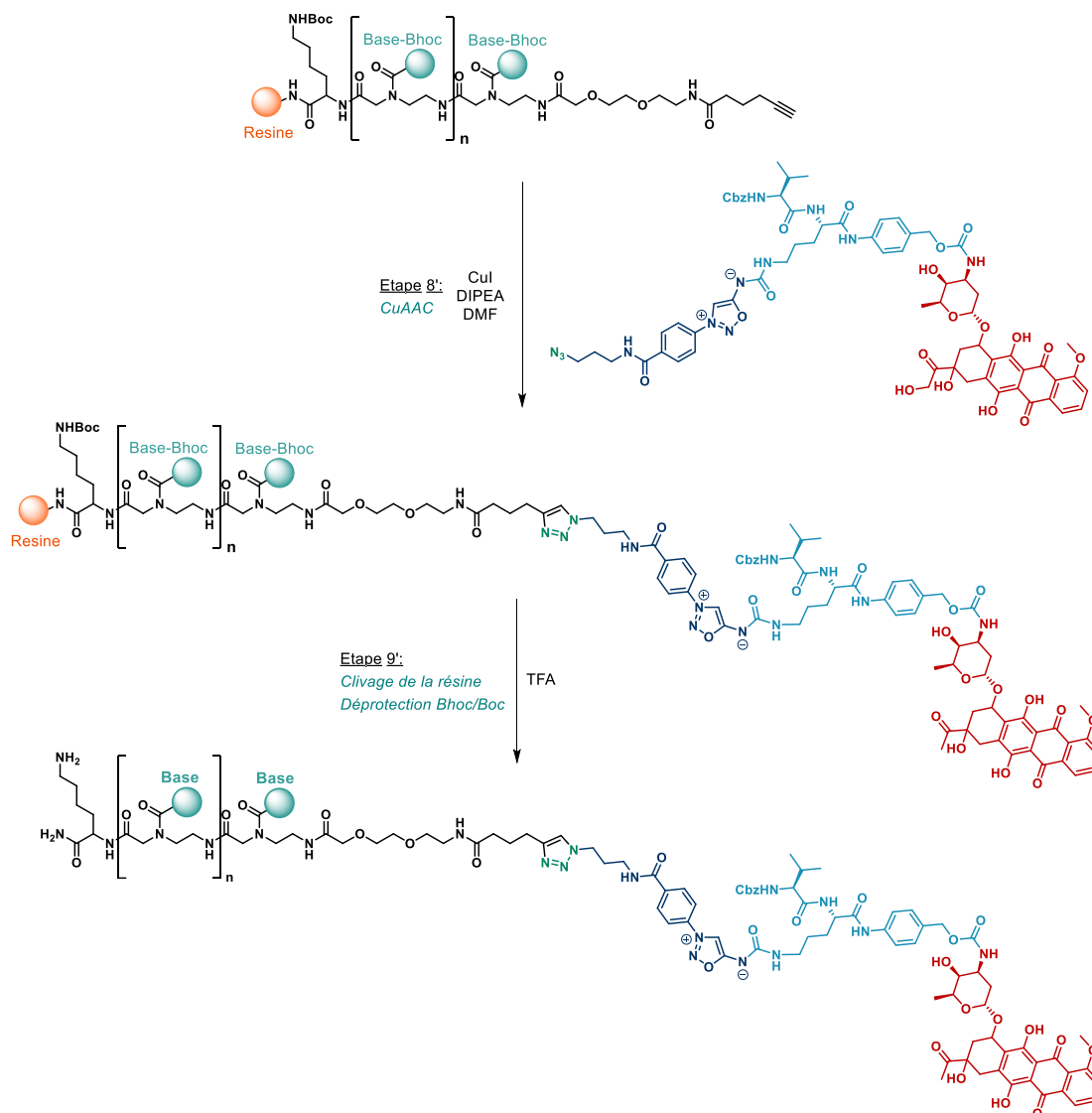
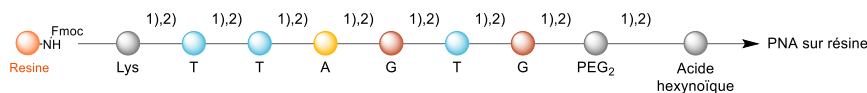


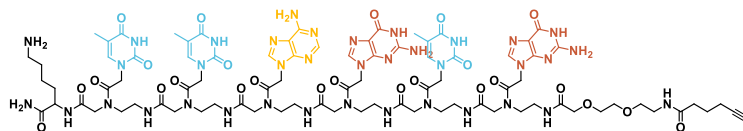
Schéma 60. Voie de synthèse envisagée pour le PNA-Iminosynnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine

Malheureusement, le produit n'a pas pu être observé, mais seulement de la dégradation. Il n'est pas possible de savoir si la CuAAC sur support n'a pas fonctionné ou si le composé n'a pas supporté les conditions de clivage. L'idée d'effectuer la réaction de CuAAC sur support a été abandonnée suite à ces mauvais résultats. Nous avons alors décidé de tester la réaction de CuAAC en solution, après clivage du PNA de la résine. Pour cela un PNA modèle **I-50** Lys-T-T-A-G-T-G-PEG<sub>2</sub>-acide hexynoïque a été synthétisé par synthèse sur support solide (14 mg, 6,86 μmol, 30%) (Schéma 61).



1) Piperidine, DMF - Déprotection Fmoc  
 2) HATU, 2,6 lutidine, base nucléique, DMF - Couplage peptidique

TFA, clivage de la résine



I-50, PNA TTAGTG-alkyne

Schéma 61. PNA alcyne intermédiaire

Comme de nombreuses étapes sont nécessaires pour synthétiser le composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine, que celui-ci n'a été obtenu qu'en de faibles quantités et qu'il nécessite des précautions d'emploi particulières dues à la cytotoxicité de la doxorubicine, l'optimisation a été effectuée dans un premier temps sur l'intermédiaire de synthèse Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH I-50 (Schéma 62).

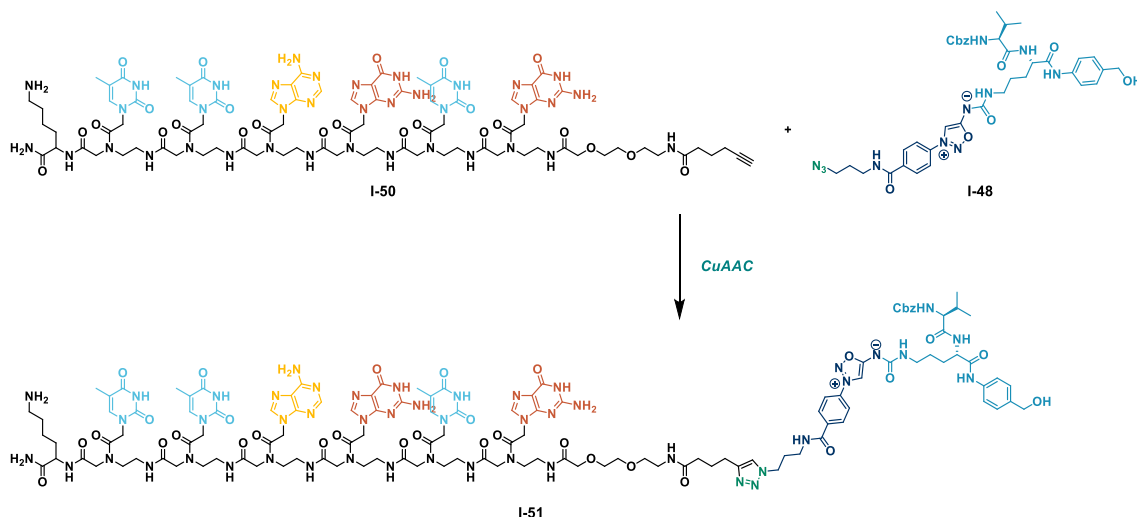


Schéma 62. Réaction de CuAAC utilisée pour les études d'optimisation

Cette optimisation a été faite à l'échelle du milligramme dans un premier temps, en faisant un suivi LC-MS rapide de la réaction pour voir si du produit se formait.

Tableau 6. Optimisation de la CuAAC avec Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH

Entrée	I-48 (eq.)	PNA-alkyne (eq.)	CuI (eq.)	CuSO <sub>4</sub> (eq.)	DIPEA (eq.)	THPTA (eq.)	NaAsc (eq.)	Aminoguanidine HCl (eq.)	H <sub>2</sub> O/DMF	Temps	Résultat
1	1,7	1	20	-	20	-	-	-	0/100	18 h	Dégradation
2	1	1	-	5	-	10	10	-	50/50	18 h	Dégradation
3	1	1	-	5	-	10	10	-	50/50	2 h	Observé puis dégradation
4	1	1	-	1	-	2	2	-	50/50	1 h 30	Observé, conversion faible
5	2	1	-	0,2	-	2	2	5	50/50	3 h	Observé
6	1	1	-	1	-	2	2	5	50/50	40 min	Produit purifié : 1 mg

Les premières conditions qui ont été testées sont celles de la CuAAC sur support solide, avec du CuI en excès comme source de cuivre, de la DIPEA dans le DMF (Tableau 6, entrée 1). Seule de la dégradation a été observée. Les conditions ont alors été changées pour des conditions de CuAAC plus classiques : du sulfate de cuivre comme source de cuivre, de l'ascorbate de sodium et un ligand THPTA, dans un mélange eau/DMF (Tableau 6, entrées 2 à 6). L'ascorbate de sodium est un réducteur doux par lequel le cuivre (II) est réduit en cuivre (I). Ce réactif est mis en excès par rapport au cuivre (II) afin que celui-ci puisse toujours être réduit en cuivre (I). Une partie du cuivre (I) formée *in situ* est directement oxydée en présence d'air, ce qui explique la nécessité d'avoir de l'ascorbate de sodium en excès.<sup>89</sup> Le ligand THPTA est également introduit en excès par rapport au sulfate de cuivre. Le cuivre (I) formé *in situ* contribue à la formation d'espèces actives de l'oxygène (ROS). Le THPTA comporte plusieurs hétérocycles azotés capables de complexer le cuivre (I) et réduit la formation de ROS.

Avec les réactifs de la CuAAC en excès (CuSO<sub>4</sub> 5 eq., NaAsc 10 eq., THPTA 10 eq.), le produit désiré est observé en LC-MS, mais se dégrade rapidement. Après plusieurs heures, il n'y a plus que du produit de dégradation (Tableau 6, entrée 2). La réaction est relancée dans les mêmes conditions, mais arrêtée beaucoup plus rapidement. Après 2h, le produit est observé en LC-MS et le milieu réactionnel est filtré sur célite pour éliminer le cuivre, puis évaporé à l'évaporateur rotatif, dans un bain chauffant à 40 °C. Cependant, une LC-MS après ce traitement montre la dégradation totale du produit (Tableau 6, entrée 3). Avec les quantités sur lesquelles nous travaillons, il est difficile d'expliquer la cause précise de cette dégradation. Il est possible que le PNA agisse comme une sorte de ligand, ou que le linker PABOH soit sensible aux conditions oxydantes de la CuAAC. Les quantités de réactifs ont été divisées par cinq pour voir si la dégradation était moindre, tout en gardant un excès d'ascorbate de sodium par rapport au sulfate de cuivre. Le produit est observé, avec un faible taux de conversion en LC-MS, mais moins de dégradation (Tableau 6, entrée 4). La réaction est relancée en ajoutant un sel d'aminoguanidine en excès, un inhibiteur de radicaux libres<sup>90</sup> (Tableau 6, entrée 5). La réaction est relancée dans le but d'isoler le produit formé (Tableau 6, entrée 6). Celui-ci est observé, et la réaction est filtrée sur célite après 40 min pour éviter la formation de produit de dégradation. Le filtrat est directement purifié par HPLC semi-préparative et un milligramme du produit désiré **I-51** est finalement obtenu sous la forme de solide blanc.

Les conditions (Tableau 6, entrée 6) ayant permis d'isoler le produit PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH ont été choisies pour tenter de former le composé PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine (Schéma 63).

---

<sup>89</sup> V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 14, 2596–2599

<sup>90</sup> C. Courderot-Masuyer, F. Dalloz, V. Maupoil, L. Rochette, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **1999**, 13, 535–540

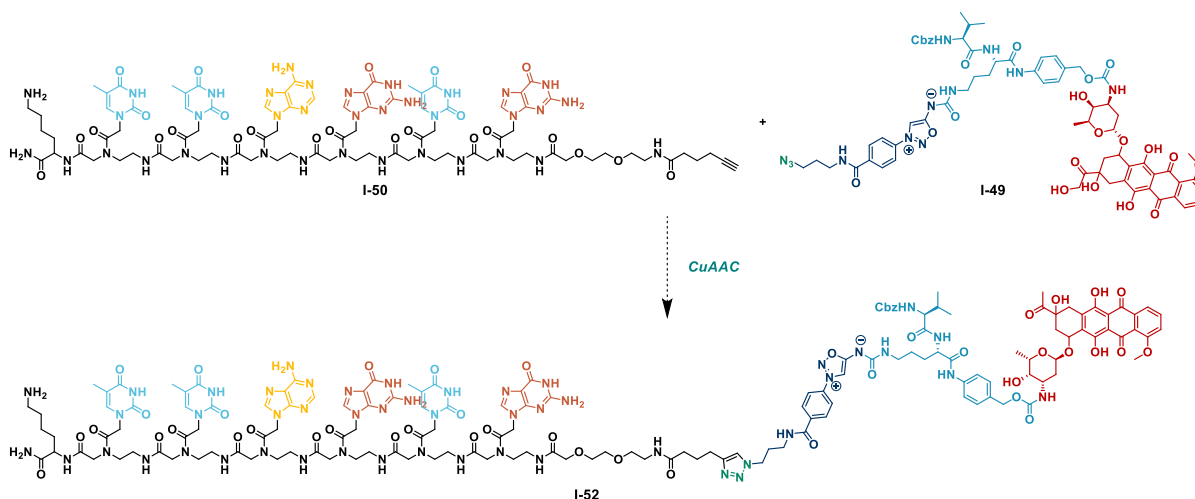


Schéma 63. CuAAC envisagée pour obtenir le composé PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine

Les réactions pour former ce produit ont été également réalisées à l'échelle du milligramme, comme pour l'optimisation précédente. En utilisant les mêmes conditions que pour obtenir le composé **I-51**, le produit désiré est observé par LC-MS mais avec une conversion très faible (Tableau 7, Entrée 1). Les quantités de réactifs sont augmentées pour revenir à celles qui avaient permis d'observer le produit PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH, mais avec de la dégradation (conditions du Tableau 6, Entrée 3). Le produit voulu est observé mais le brut s'est dégradé au congélateur (Tableau 7, Entrée 2). Ces conditions ont été testées une dernière fois, mais le produit observé semble peu soluble, y compris dans le DMSO, et le produit est perdu après filtration sur célite (Tableau 7, Entrée 3).

Tableau 7. Optimisation de la CuAAC avec Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine

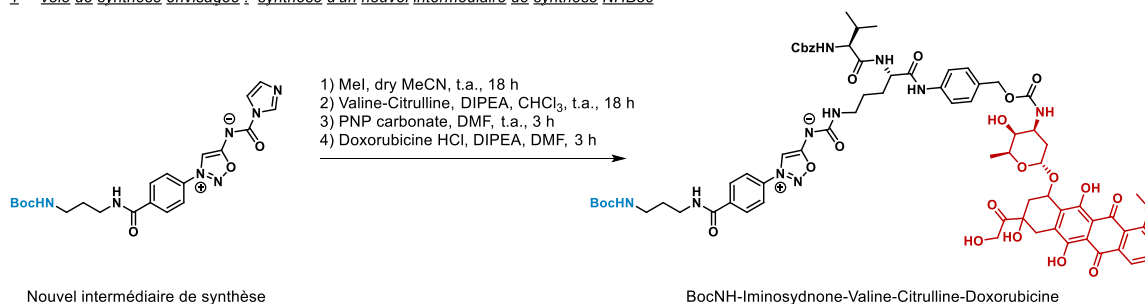
Entrée	N <sub>3</sub> -ImSyd-Valcit	PNA-alcyne	CuSO <sub>4</sub>	THPTA	NaAsc	Aminoguanidine HCl	H <sub>2</sub> O/DMF	Temps	Résultat
1	1	1	1	2	2	5	50/50	3 h	Observé, conversion très faible
2	1	1	5	10	10	-	50/50	45 min	Observé, dégradation du brut au congélateur
3	1	1	5	10	10	-	50/50	40 min	Observé, problèmes de solubilité, perdu par filtration sur célite

Le produit semble être compliqué à obtenir par la voie CuAAC. Cette approche a donc été abandonnée pour tenter d'obtenir le produit PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine d'une autre manière.

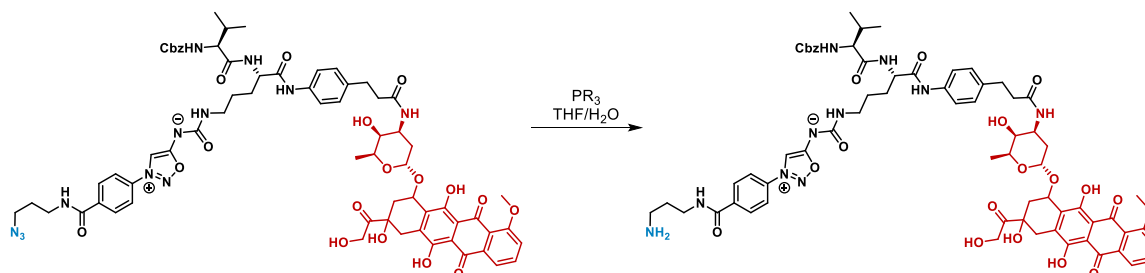
#### b) Accroche par couplage peptidique

Pour éviter la réaction de CuAAC, il a été envisagé de greffer le PNA au composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine par un couplage peptidique. Pour obtenir le composé NH<sub>2</sub>-Iminosydnone-Valine-Citrulline, deux voies de synthèses ont été explorées (Schéma 64). La première consiste à resynthétiser un nouvel intermédiaire comportant une amine protégée par un groupement Boc à la place de l'azoture. La deuxième voie consiste à partir du composé **I-49** afin d'obtenir une amine par réaction de Staudinger.

1<sup>ère</sup> voie de synthèse envisagée : synthèse d'un nouvel intermédiaire de synthèse NHBoc



2<sup>ème</sup> voie de synthèse envisagée : réaction de Staudinger



Dans un premier temps, nous avons synthétisé le composé Amine-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine. La voie de synthèse est la même que précédemment, avec une modification au moment d'obtenir l'intermédiaire iminosydnone. En utilisant un bras N-Boc-1,3-propanediamine au lieu d'un bras 3-azidopropan-1-amine, le composé intermédiaire Boc-NH-Iminosydnone-Imidazole **I-53** est obtenu (Schéma 65). Le composé Boc-NH-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine **I-55** est ensuite obtenu selon la même voie de synthèse que précédemment.

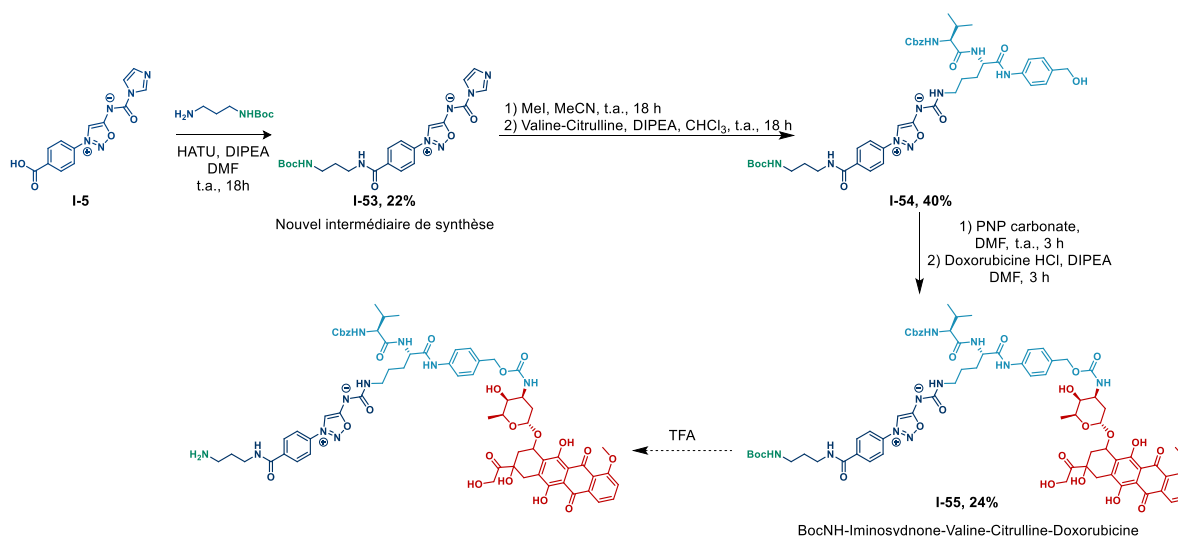


Schéma 65. Nouvel intermédiaire Iminosydnone et nouveau composé BocNH-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine

Le composé Boc-NH-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine **I-55** est ensuite mis à réagir en présence de TFA dans du DCM à température ambiante pendant 1 h. La réaction est suivie par LC-MS mais le composé déprotégé avec une amine libre n'est pas observé. Le réactif Boc-NH-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine **I-55** n'est plus visible et des produits secondaires de dégradation sont observés. Nous avons alors choisi d'effectuer une réaction de Staudinger sur le composé Azoture-



Iminosydnone-Valine-citrulline **I-49** afin d'obtenir une amine libre. Les conditions ont à nouveau été testées dans un premier temps sur l'intermédiaire de synthèse Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH. L'objectif est de déterminer les meilleures conditions de réaction sur ce substrat, sans chercher à l'isoler. Les meilleures conditions seront ensuite appliquées au substrat **I-49** comportant la doxorubicine.

La réaction est d'abord testée avec la triphénylphosphine, et pour éviter une étape de purification, la triphénylphosphine est supportée sur résine (Tableau 8, Entrée 1). La réaction est effectuée en présence de deux équivalents de phosphine dans un mélange THF/eau. Après agitation pendant 24 h, les billes de résine sont filtrées et le produit est récupéré. Du produit et du réactif sont récupérés, même après plusieurs jours de réaction et aucune évolution n'est observée après un certain temps, malgré une conversion partielle de seulement 50%. La réaction étant trop lente et incomplète, il a été décidé d'utiliser la triphénylphosphine de façon homogène et de la comparer à d'autres phosphines. En utilisant la triméthylphosphine, le produit n'est pas obtenu. La diméthylphénylphosphine permet d'obtenir le produit, mais la meilleure conversion est obtenue avec la triphénylphosphine sans résine (Tableau 8, Entrées 2 à 4). Ces conditions ont été choisies pour effectuer la réaction de Staudinger sur le composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine (Tableau 8, Entrée 5). Le composé désiré a été obtenu majoritairement avec une pureté LC-MS de 70% et utilisé directement sans purification.

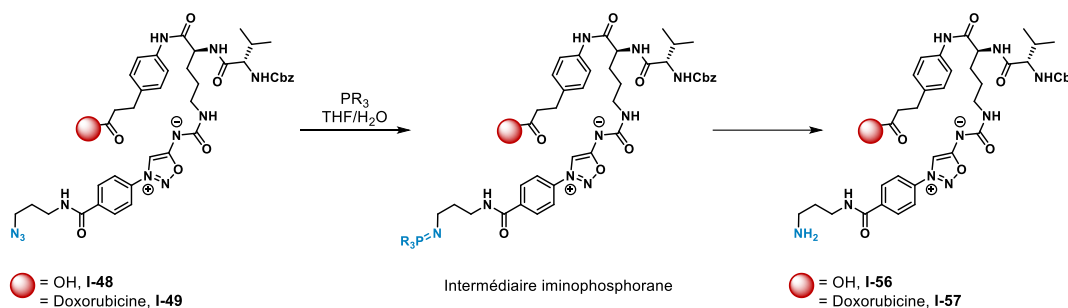


Tableau 8. Conditions testées pour la réaction de Staudinger

Entrée	Substrat (1 eq.)	Phosphine (2 eq.)	Solvant	Conversion
1	<b>I-48</b> - PABOH	PPh <sub>3</sub> sur résine	THF/Eau	50%
2	<b>I-48</b> - PABOH	PMe <sub>3</sub>	THF/Eau	0%
3	<b>I-48</b> - PABOH	PPhMe <sub>2</sub>	THF/Eau	50%
4	<b>I-48</b> - PABOH	PPh <sub>3</sub>	THF/Eau	80%
5	<b>I-49</b> - Doxorubicine	PPh <sub>3</sub>	THF/Eau	70% + 20% intermédiaire

Pour effectuer le couplage peptidique avec le PNA, un nouveau brin PNA **I-58** Lys-GT-T-G-A-T-T-PEG<sub>2</sub>-PEG<sub>2</sub>-maléimide NHS a été synthétisé par synthèse peptidique sur support solide (26,8 mg, 11,06 μmol, 49%) (Schéma 66). La suite de bases est la même que dans le PNA alcyne **I-50** utilisé précédemment. Un espaceur PEG terminé par un groupement maléimide a été ajouté à l'extrémité pour avoir la possibilité d'accrocher le PNA dérivatisé sur un anticorps. Pour pouvoir effectuer le couplage, un acide carboxylique a été ajouté à l'extrémité du PNA que l'on souhaite coupler. Pour cela, de l'anhydride glutarique réagit avec la lysine terminale.

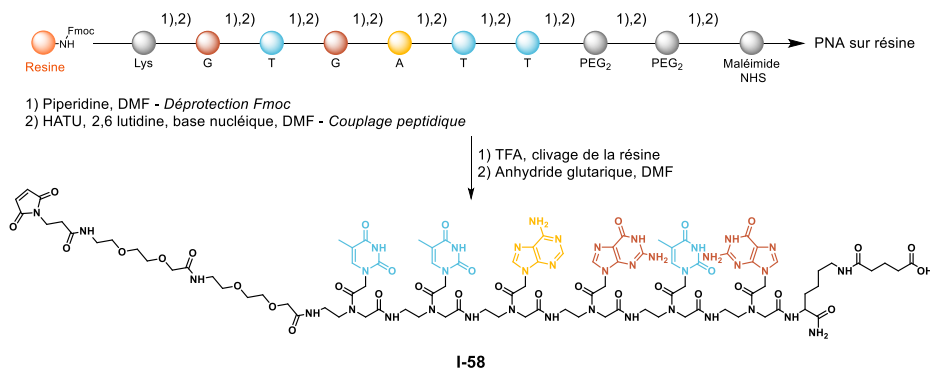


Schéma 66. PNA synthétisé pour couplage peptidique

L'acide du PNA a été activé pendant 2 h par du TSTU, en solution dans du DMF, puis le composé I-57 Amine-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine a été ajouté. Plusieurs sous-produits de masses importantes sont observés, mais pas le produit désiré (Schéma 67). Un précipité peu soluble, y compris dans le DMSO, est observé. Il est difficile d'évaluer ce qui s'est passé lors de la réaction, et si les sous-produits de la réaction précédente ont pu avoir un impact.

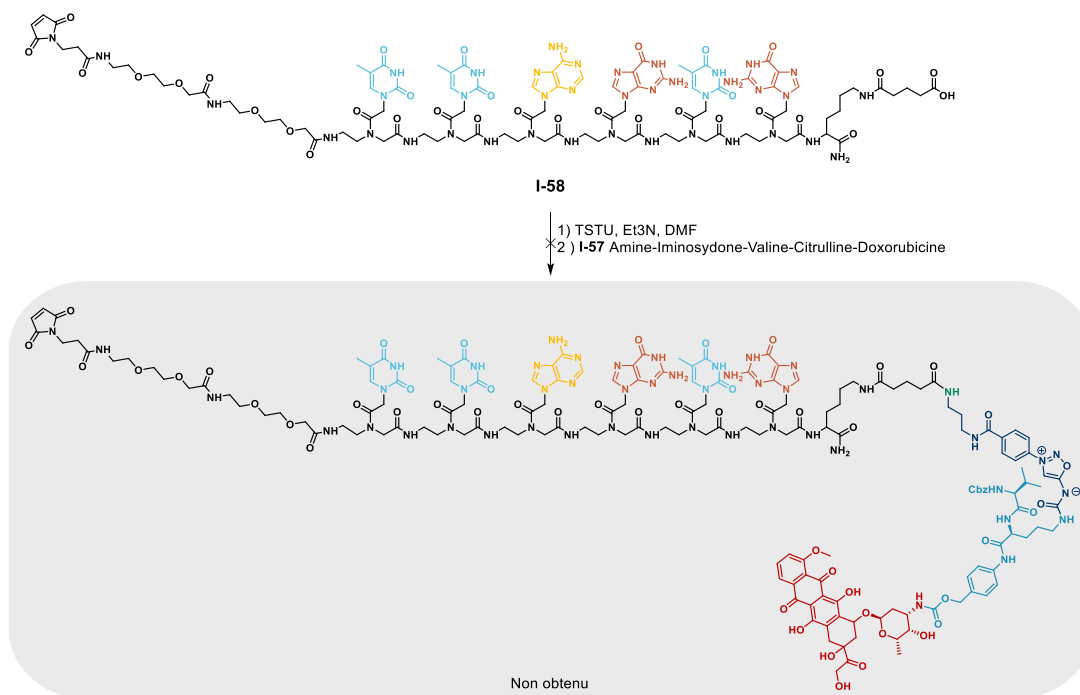


Schéma 67. Tentative d'accroche de l'iminosydnone-valine-citrulline-doxorubicine au PNA par couplage peptidique

Malgré tous nos efforts, les différents couplages au PNA n'ayant pas fonctionné, l'obtention du produit PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline semble compromise.

#### 4. Conclusion

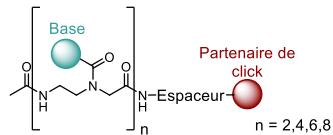
Dans cette partie, nous avons tenté d'obtenir un composé PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine, afin d'effectuer un relargage de Doxorubicine de façon contrôlée, en utilisant la reconnaissance moléculaire entre PNAs pour accélérer la réaction. La voie de synthèse pour obtenir un composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine a été améliorée et sa répétabilité est assurée. Différentes méthodes pour brancher un composé Iminosydnone-Valine-Citrulline-Doxorubicine à un PNA ont été utilisées. Malheureusement, aucune de ces méthodes n'a permis

l'obtention du produit désiré. La taille et la complexité chimique du produit désiré le rendent sensible à de nombreuses formes de dégradation, ainsi qu'extrêmement difficile à solubiliser lorsque le produit est observé. Ce projet nécessite d'obtenir des molécules très complexes et reste inachevé. Il faudrait encore un grand travail d'optimisation pour espérer obtenir le PNA voulu afin de libérer un principe actif dans des applications biologiques. En effet l'objectif, si ce composé était synthétisé, serait ensuite de faire réagir le PNA-Iminosydnone-ValCit-Doxo avec un PNA-DBCO complémentaire dans des cellules tumorales surexprimant la Cathepsine B. La libération de la drogue par réaction de « click and release » puis par clivage enzymatique de l'espaceur valine-citrulline pourraient alors être étudiés.

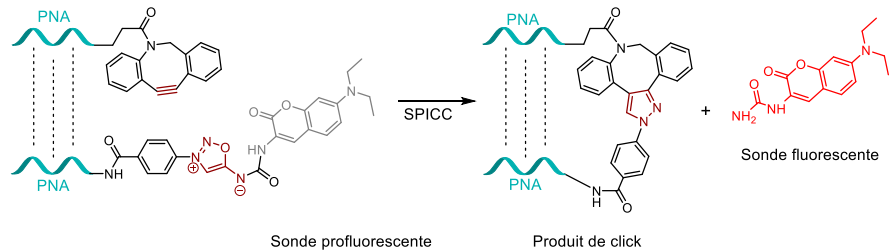
## V. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons montré que la reconnaissance moléculaire entre deux brins complémentaires de PNAs accélérât considérablement la réaction de SPICC entre une iminosydnone et un cyclooctyne. Plusieurs séquences de différentes tailles ont été synthétisées afin de déterminer le couple de PNAs le plus efficace, tout en ayant des objets moléculaires les plus petits possibles, afin d'en faciliter la synthèse (Figure 56). Les études cinétiques effectuées sur les différents couples de PNAs complémentaires synthétisés ont permis de déterminer la longueur de séquence minimale nécessaire pour que la cinétique reste de pseudo-ordre 1 à des concentrations inférieures à 0,1  $\mu\text{M}$ . Les PNAs avec des séquences de six et huit paires de bases semblent être le meilleur compromis. La cinétique de pseudo-ordre 1, très avantageuse pour des applications biologiques à faibles concentrations est l'un des atouts majeurs de la combinaison entre chimie click et reconnaissance moléculaire. Les cinétiques obtenues sont très rapides, et compétitives avec les meilleurs systèmes bioorthogonaux connus à ce jour. Les valeurs de constantes de vitesse obtenues avec ces systèmes sont de l'ordre de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ce qui permet de réaliser des réactions de ligation-coupeure en quelques minutes même à des concentrations aussi faibles que 50 nM. De ce point de vue, ces systèmes sont supérieurs en efficacité aux meilleures réactions de deuxième ordre, y compris la réaction impliquant des tétrazines et des dérivés de trans-cyclooctènes.

### Variation de la longueur des PNAs



### Etudes cinétiques par fluorescence



### Détermination du meilleur couple de PNAs

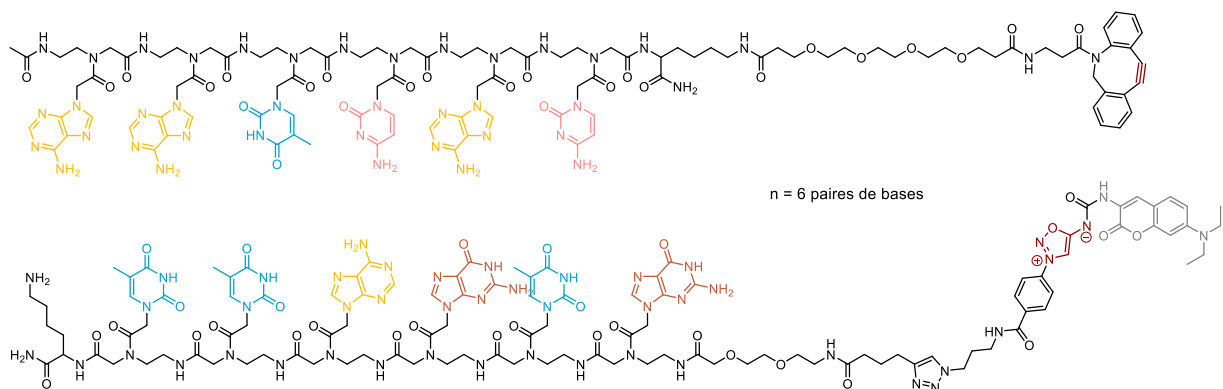
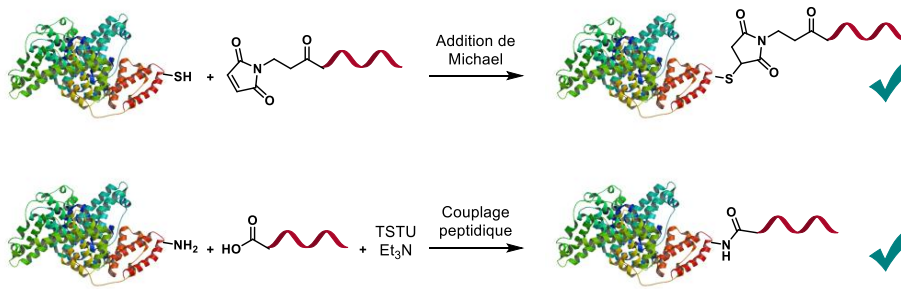


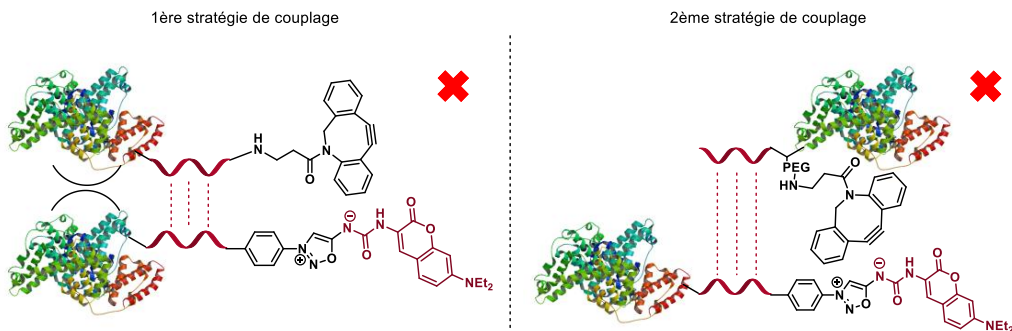
Figure 56. Détermination du meilleur couple de PNAs

Le couple de PNAs à six paires de bases a été identifié comme le meilleur choix pour des applications biologiques. Des protéines et des anticorps conjugués à des PNAs ont pu être obtenus et engagés dans des réactions de ligation et coupure. Des résultats prometteurs de libération d'une coumarine liée à une protéine, accélérée par la reconnaissance moléculaire, ont été obtenus. Malheureusement, les différents essais de couplage entre deux protéines *via* la reconnaissance moléculaire associée à la chimie click n'ont pas donné de résultats probants (Figure 57). De nombreux défis restent à résoudre sur ce projet et font l'objet d'études au laboratoire. Le développement d'une technique de couplage efficace et rapide entre deux protéines grâce à deux PNAs complémentaires et une réaction de chimie click permettrait de développer des applications de détection ultra-rapide de protéines et d'anticorps.

Variation de l'accorche protéine-PNA



Variation de la stratégie de de couplage



Application fonctionnelle : Libération de la coumarine sur une BSA dérivatisée

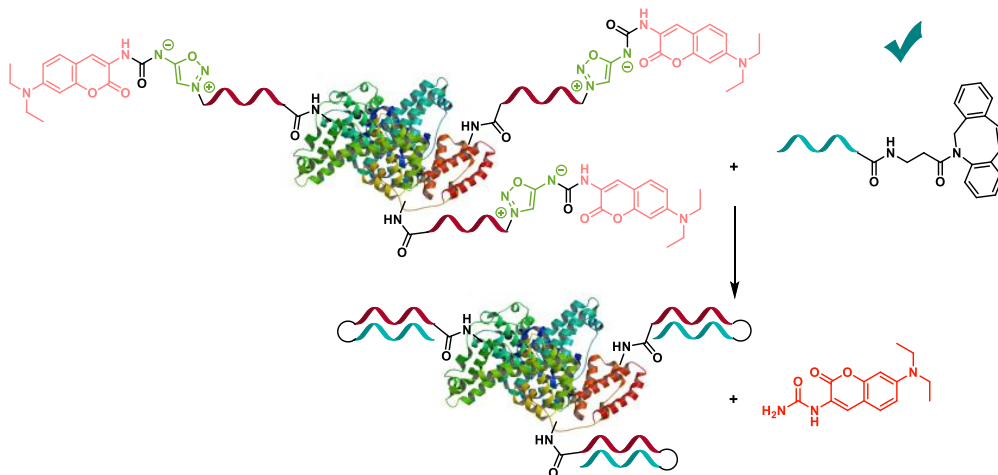
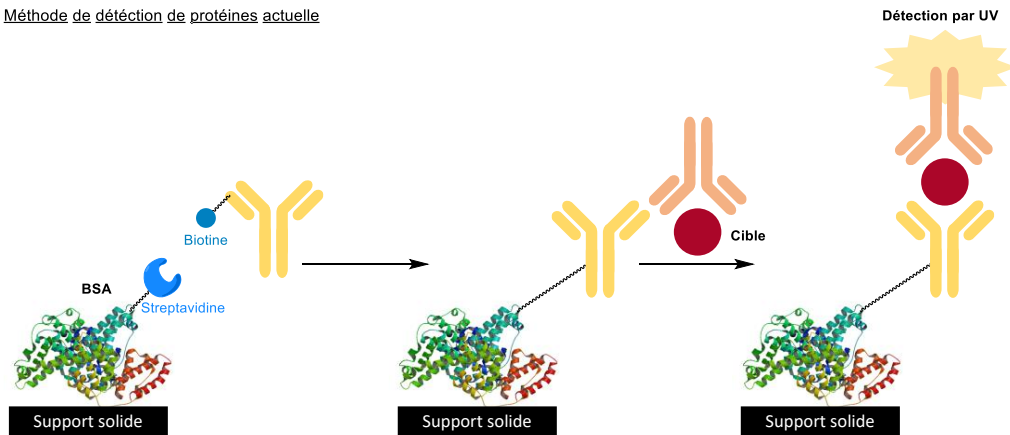


Figure 57. Récapitulatif des différentes approches testées pour le couplage de protéines assisté par PNA et chimie click

Si le couplage protéine-protéine assisté par PNA arrivait à être fonctionnel, le couplage rapide entre deux protéines assisté par la reconnaissance moléculaire des PNAs pourrait être utilisé pour des applications de détection. Les applications de détection de protéines usuelles se basent sur l'affinité streptavidine-biotine très élevée. Une amélioration de la technique de couplage entre deux protéines dérivatisées par des PNAs complémentaires serait très intéressante pour développer des tests ELISA plus rapides. La possibilité d'avoir plusieurs couples de PNAs complémentaires permettrait également d'avoir des applications de détection simultanée de plusieurs cibles (Figure 58).

Méthode de détection de protéines actuelle



Méthode de détection de protéines envisagée

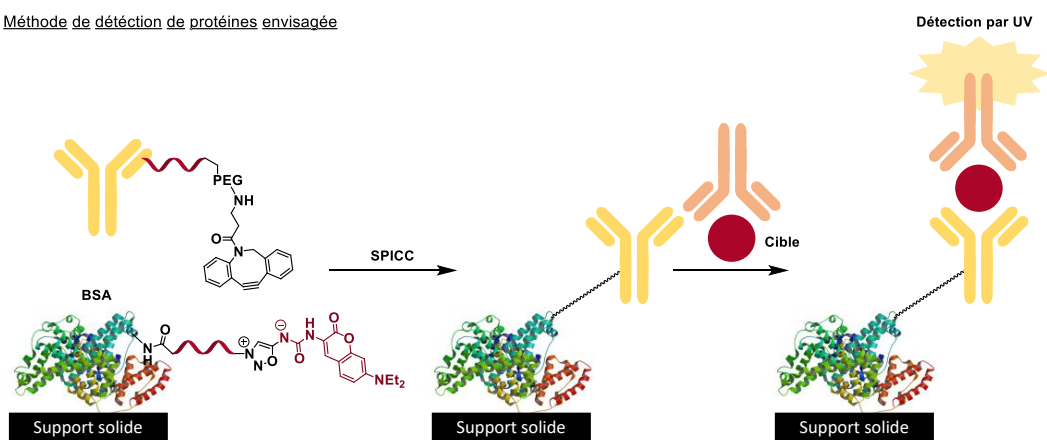
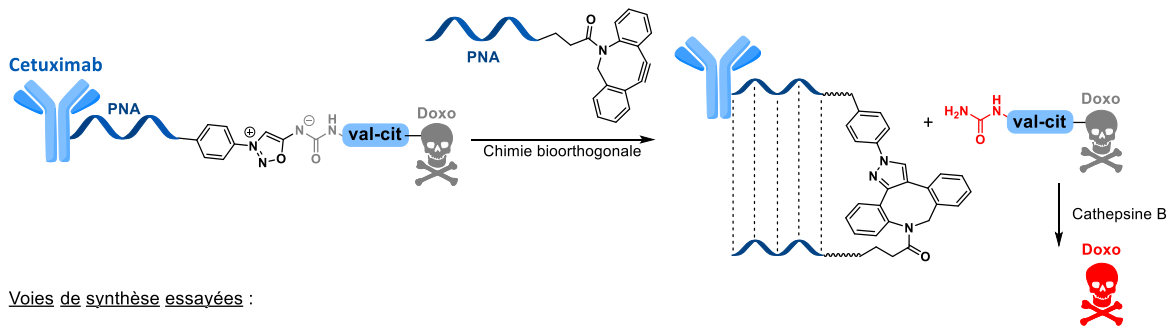


Figure 58. Application de détection de protéines envisagée

Les applications de détection actuelles se basent sur l'affinité entre la biotine et la streptavidine. De la BSA dérivée par de la streptavidine est liée à un support solide, puis un anticorps lié à de la biotine se greffe. Celui-ci va alors pouvoir se lier à sa cible que l'on cherche à détecter. Un deuxième anticorps est incubé dans ce milieu, dérivatisé par un composé que l'on pourra doser par UV. Cette méthode de détection est efficace, et nous aurions voulu la reproduire en utilisant les PNAs. Cette application envisagée montre tout le potentiel d'un couplage protéine-protéine assisté par PNA.

Enfin, de nombreux essais pour la libération rapide d'un principe actif en combinant un relargage par chimie click et un clivage enzymatique n'ont pas été concluants (Figure 59). De nombreuses difficultés de synthèse se sont présentées, et le composé désiré PNA-Iminosydnone-valine-citrulline-doxorubicine n'a pas pu être obtenu. Ce projet est très prometteur mais de gros efforts restent à faire pour contourner les obstacles de synthèse et obtenir les produits voulus.

Objectif :



Voies de synthèse essayées :

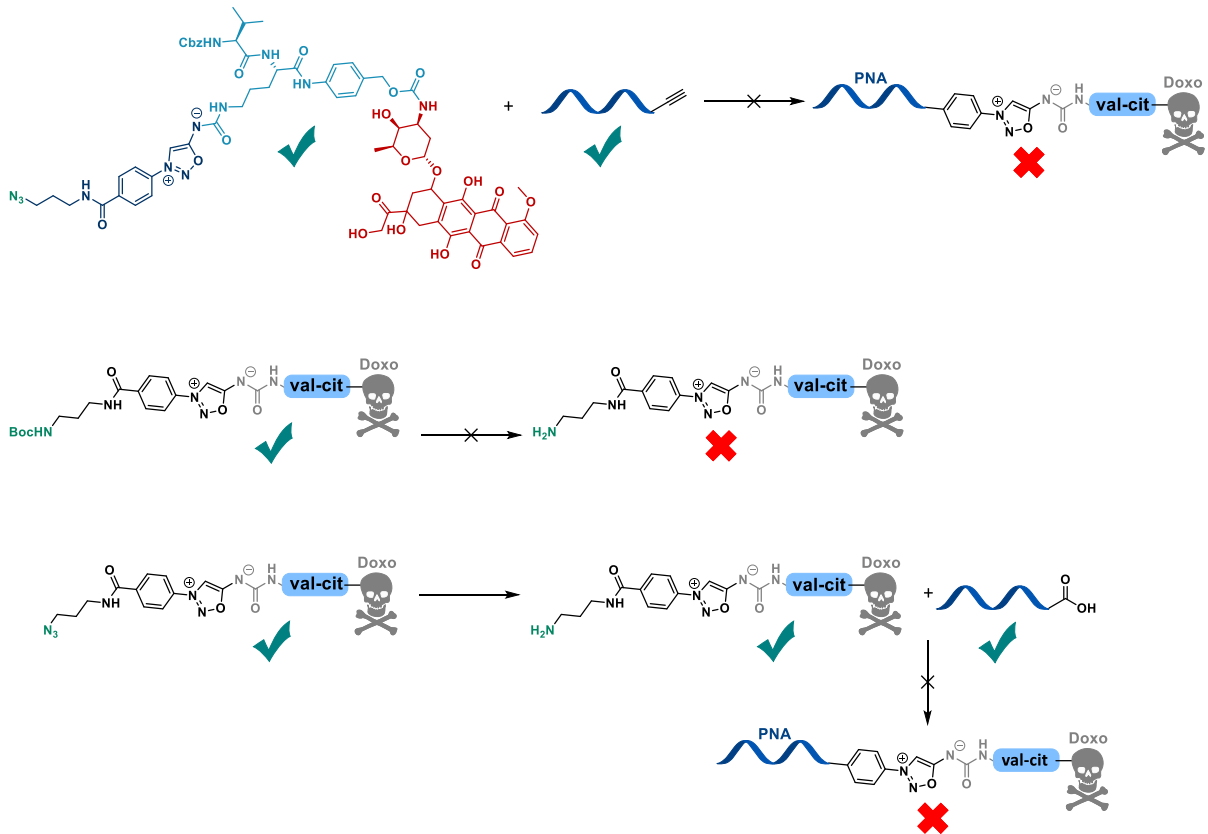


Figure 59. Bilan des différents essais pour l'obtention d'un PNA-imosydnone-valine-citrulline-doxorubicine

---

# Chapitre 2. Utilisation des PNAs pour le préciblage au fluor-18

---

## I. Introduction

### A. L'imagerie médicale radioactive

#### 1. Principe de l'imagerie médicale en médecine nucléaire

L'imagerie médicale regroupe les différentes techniques qui permettent d'obtenir des images du corps humain à des fins de diagnostic ou d'accompagnement thérapeutique. Acquérir des images de la structure interne du corps humain ou de ses fonctionnalités, de manière non destructive est un enjeu majeur pour mieux diagnostiquer et mieux soigner. Parmi les nombreuses techniques existantes, celles impliquant l'utilisation d'isotopes radioactifs sont particulièrement intéressantes pour étudier des mécanismes du corps humain. Ce type d'imagerie médicale permet l'obtention d'images de façon non invasive grâce à la radioactivité émanant des atomes radioactifs utilisés et qui agissent comme traceurs. La radio-imagerie est une imagerie d'émission fonctionnelle : les rayonnements proviennent directement du patient, à qui un composé radioactif a été injecté. Les rayonnements émis lors de la désintégration du radio-isotope sont ensuite détectés et analysés pour reconstituer l'image. C'est une imagerie dynamique et fonctionnelle permettant de détecter un phénomène biologique spécifique sur le principe de la scintigraphie : un traceur aux propriétés biologiques connues est injecté dans le corps du patient et s'accumule sur sa cible biologique. Les rayonnements émis par le traceur sont alors détectés et localisés, ce qui permet de connaître la position de la cible biologique. Le traceur biologique peut être un composé qui va être métabolisé (sucre, etc.), qui va s'accumuler dans une zone spécifique ou qui va avoir une affinité particulière pour la cible visée (anticorps, etc.).

Il existe plusieurs types d'imageries médicales en médecine nucléaire, dont les deux plus communes sont la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP). La médecine nucléaire inclue également la radiothérapie ciblée. Les isotopes utilisés dans ce cas émettent des rayonnements qui servent à détruire les cellules, et non à les imager.

L'imagerie TEMP utilise des radio-isotopes émettant des rayons  $\gamma$ , les photons émis ayant une énergie entre 70 et 300 keV. Les émetteurs de photons  $\gamma$  les plus couramment utilisés en imagerie médicale sont le Technétium 99m, l'Iode 123, l'Indium 111, le Thallium 201 et le Gallium 67 avec des temps de demi-vie respectifs de 6, 13, 67, 73 et 78 h. Les différents radioéléments utilisés en imagerie TEMP ont un temps de demi-vie de l'ordre de plusieurs heures à plusieurs dizaines d'heures. Il est nécessaire d'avoir un temps de demi-vie suffisamment long pour avoir le temps d'effectuer le marquage du traceur biologique, de l'injecter au patient, et que le marqueur puisse atteindre sa cible dans le corps afin de suivre le processus d'intérêt. Cependant, il ne faut pas que le temps de demi-vie utilisé soit trop long pour éviter une exposition inutile aux rayonnements  $\gamma$ .

L'imagerie TEP est une technique d'imagerie médicale fonctionnelle quantitative et dynamique utilisant des radio-isotopes au rayonnement  $\beta^+$ .<sup>91</sup> La désintégration de l'isotope radioactif produit un

---

<sup>91</sup> D. Vodovar, J. Aboab, S. Silva, N. Tournier, *Méd. Intensive Réa.*, 2019, 28, 4, 347–352



positon. Lorsqu'un positon rencontre un électron, deux photons  $\gamma$  ayant une énergie de 511 keV sont émis à 180° l'un par rapport à l'autre : c'est le rayonnement de ces photons qui est capté par les caméras et qui permet de reconstituer une image (Figure 60).

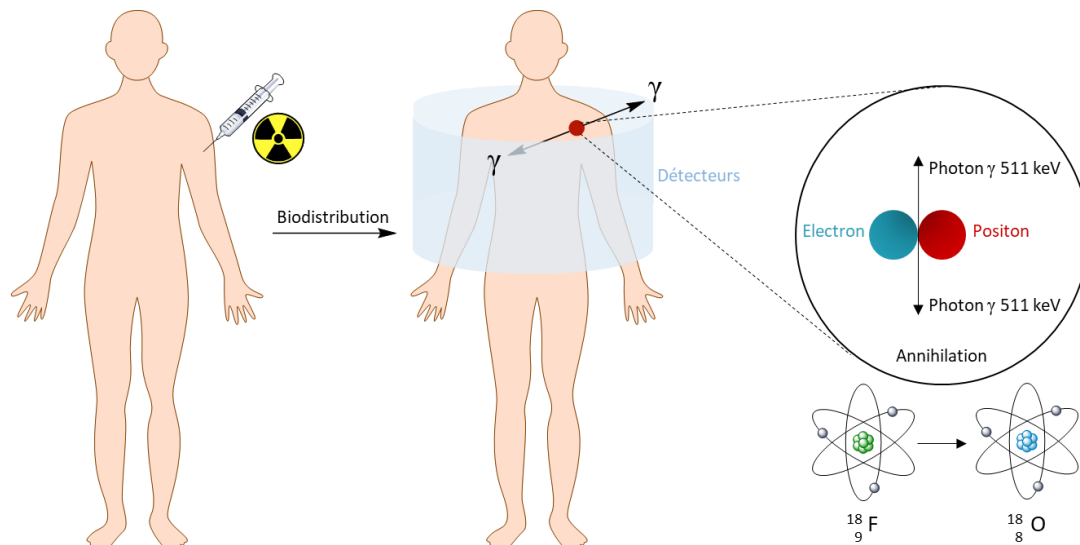


Figure 60. Principe de l'imagerie TEP au fluor-18

Les radio-isotopes à rayonnement  $\beta^+$  les plus utilisés sont le Fluor 18, le Carbone 11, le Brome 76 et l'Azote 13, avec des temps de demi-vie respectifs de 110, 20, 972 et 10 minutes. Parmi eux, le fluor-18 est de loin l'isotope le plus utilisé en imagerie TEP dans les centres hospitaliers.

L'imagerie TEP est un outil diagnostique qui occupe une place de plus en plus grande dans la médecine moderne. Les temps de demi-vie de ces radio-isotopes sont courts ce qui permet de limiter le temps d'exposition du patient aux rayonnements radioactifs, mais peut limiter les applications en particulier dans le cas de composés ayant des pharmacocinétiques très lentes, comme c'est le cas avec les anticorps. L'approche de préciblage, que nous détaillerons dans la deuxième partie de cette introduction, peut en principe correspondre à une solution à ces temps de demi-vie plus courts et pourrait permettre d'étendre l'utilisation de l'imagerie TEP aux radiotraceurs à base d'anticorps.

## 2. L'imagerie au fluor-18

L'isotope le plus utilisé en imagerie TEP est le fluor-18. Cet atome est facilement intégrable à des structures organiques sans pour autant changer fondamentalement leur structure et donc sans modifier leur mode d'action.

Le fluor-18 est produit en cyclotron, de préférence à proximité du lieu où il sera utilisé. La manière principale d'obtenir du fluor-18 implique un bombardement protonique d' $\text{H}_2^{18}\text{O}$  ce qui génère l'ion fluorure-18 qui peut alors être utilisé par exemple dans des réactions de substitution nucléophile.

Le  $^{18}\text{F}$  se désintègre en  $^{18}\text{O}$  en émettant un positon. Le  $^{18}\text{F}$ fluoro-2-desoxy-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ FDG) est le traceur biologique marqué au fluor-18 le plus utilisé en imagerie TEP.<sup>92</sup> Le  $^{18}\text{F}$ FDG est synthétisé *via* une substitution nucléophile du triflate en position C2 du mannose polyacétylé par l'ion fluorure-18. La molécule marquée désirée est ensuite obtenue en hydrolysant les fonctions acétylé (Schéma 68).

<sup>92</sup> J. S. Fowler, T. Ido, *Seminars in Nuclear Medicine*, **2002**, 32, 1, 6–12

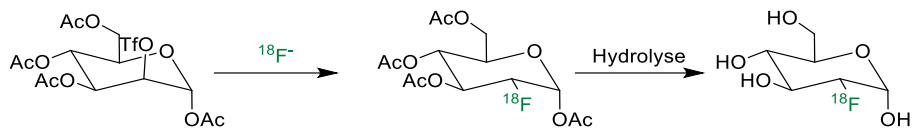


Schéma 68. Synthèse du  $^{18}\text{F}$ FDG

La molécule de  $^{18}\text{F}$ FDG est utilisée pour localiser des cellules cancéreuses. Ces cellules cancéreuses ont en effet une consommation anormalement élevée de sucre, entraînant une accumulation du  $^{18}\text{F}$ FDG dans celles-ci. Une fois dans la cellule, le  $^{18}\text{F}$ FDG est phosphorylé en fluorodésoxyglucose-6-phosphate par une hexokinase. Ce composé n'est pas métabolisé et reste coincé dans les cellules cancéreuses, permettant de le visualiser par imagerie TEP, et ainsi de détecter la tumeur. Cependant, le  $^{18}\text{F}$ FDG est également très fortement absorbé dans le foie et dans le cerveau. Le  $^{18}\text{F}$ FDG est couramment utilisé pour le diagnostic de plusieurs types de cancers, mais a de nombreuses limitations. Pour des patients diabétiques avec des taux de sucre trop élevés, cette technique n'est pas envisageable. De plus, il y a une compétition entre les différents organes pour la métabolisation du sucre, ce qui peut créer des artefacts ou rendre l'imagerie de certaines zones, comme le cerveau, plus complexes voire impossible.

Par ailleurs, le temps de demi-vie assez court du fluor-18 rend l'utilisation de composés marqués par cet isotope compliquée lorsque ceux-ci ont une pharmacocinétique lente. En effet, il faut qu'une fois le traceur administré au patient, celui-ci atteigne sa cible de manière spécifique relativement rapidement. Les anticorps sont très utilisés pour cibler les cellules cancéreuses, mais le temps qu'ils mettent à se lier à leur cible, ainsi que le temps d'élimination des anticorps circulants, appelée clairance, sont une contrainte importante pour l'utilisation du fluor-18 dans le cadre de l'imagerie à base d'anticorps. La possibilité de marquer un anticorps *in vivo*, après que celui-ci se soit lié à sa cible, semble une solution très prometteuse pour étendre le champ des possibles : c'est la stratégie de préciblage.

## B. Le préciblage *in vivo*

### 1. Principe du préciblage

Le préciblage, ou pretargeting, est une approche d'imagerie en deux étapes. Dans un premier temps, un traceur biologique d'intérêt (anticorps par exemple) est injecté et s'accumule sur la tumeur pendant plusieurs jours. Dans un deuxième temps, une sonde radio-marquée est injectée et circule rapidement dans le corps. Une partie va venir se lier rapidement au traceur biologique préalablement accumulé sur la tumeur. La clairance de cette sonde radio-marquée est beaucoup plus rapide que celle du traceur biologique et, en théorie, seul le signal émanant de la sonde liée au traceur biologique sera détectable si l'excrétion de la sonde est totale. Le traceur biologique est ainsi radiomarké et donc détectable par imagerie TEP. Le préciblage est une approche très intéressante pour l'imagerie à l'aide d'anticorps, aussi appelée immunoPET. En effet, les anticorps mettent plusieurs jours à s'accumuler sur leur cible, pendant lesquels ils circulent librement dans l'organisme. L'utilisation d'anticorps marqués par des radio-isotopes aux temps de demi-vie courts, comme le fluor-18, n'est donc pas possible. L'approche actuelle consiste donc à marquer les anticorps avec des radio-isotopes aux temps de demi-vie plus longs, tel que le Zirconium-89 ( $t_{1/2} = 3.2$  jours). Cependant, les anticorps ayant une élimination corporelle très lente, de l'ordre d'une vingtaine de jours, cette approche implique donc une irradiation interne d'environ 20 jours chez le patient. L'approche de préciblage permet de s'affranchir de ce problème de dosimétrie interne et ouvre la possibilité d'une imagerie plus précise (Figure 61). En effet, l'approche de marquage en deux temps permet de s'affranchir de la

pharmacocinétique lente des anticorps. L'utilisation d'une petite molécule marquée permet d'utiliser le fluor-18 et si cette molécule est rapidement excrétée, une meilleure imagerie devrait être possible en raison d'un bruit de fond plus faible.

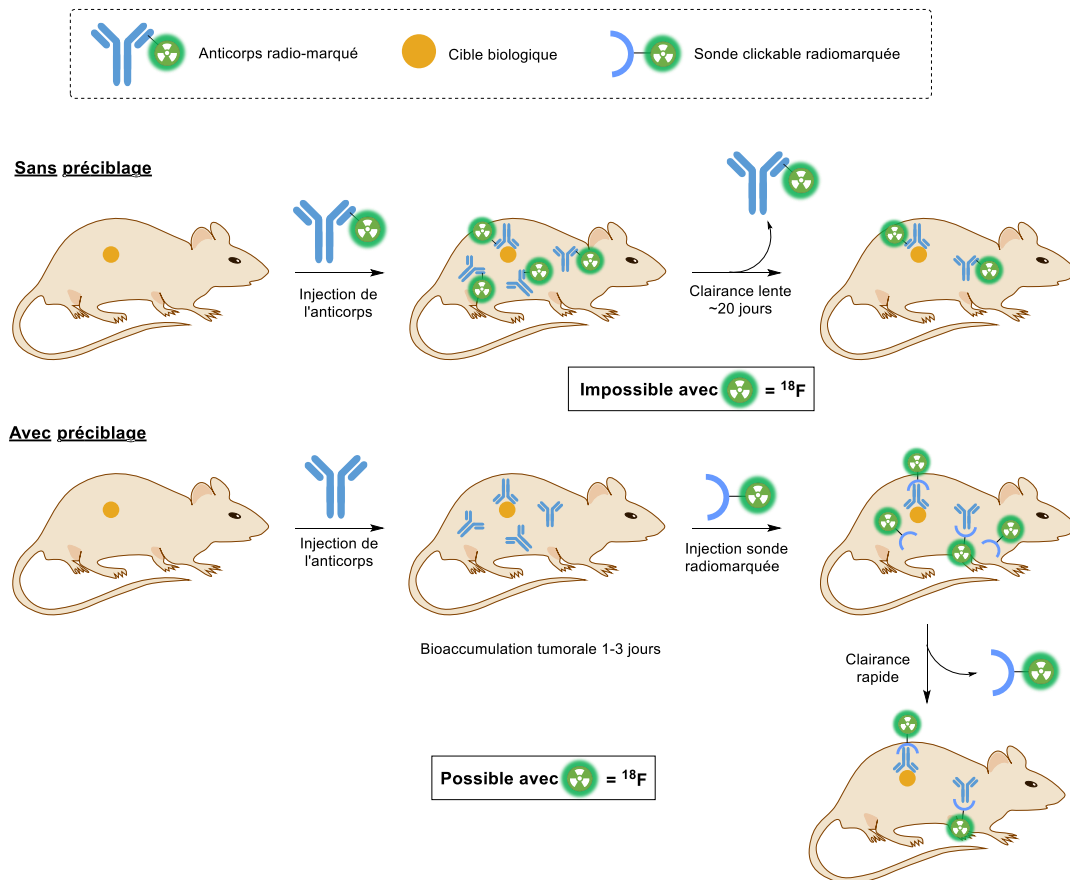


Figure 61. Principe du préciblage en ImmunoPET

## 2. Exemples de préciblage

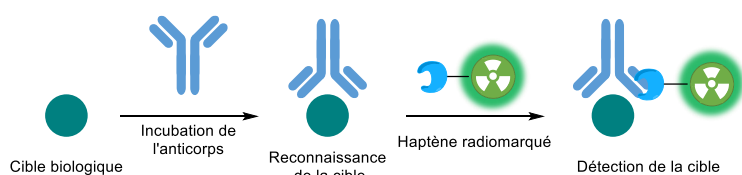
Différentes techniques ont été développées au fil des années afin de marquer des anticorps par une approche de préciblage.<sup>93</sup> Les premières approches de préciblage ont impliqué des systèmes de reconnaissance moléculaire. Des anticorps bispécifiques ont par exemple été utilisés. Quelques jours après l'injection de ces anticorps, un haptène radiomarqué que ces anticorps reconnaissent spécifiquement a été injecté (Schéma 69a).<sup>94</sup> Afin de diversifier l'approche de préciblage, des anticorps fonctionnalisés par un groupement d'intérêt (tag) ont été synthétisés ainsi que des sondes capables de reconnaître spécifiquement ce tag. Ce tag ajouté sur l'anticorps ne change pas son affinité avec la cible. La biotinylation d'anticorps a été par exemple très utilisée pour faire des complexes avec la streptavidine qui peut à nouveau reconnaître une biotine radio-marquée (Schéma 69b).<sup>95</sup> Cette approche a l'inconvénient de nécessiter l'injection successive de 3 composés différents.

<sup>93</sup> M. Patra, K. Zarschler, H-J. Pietzsch, H. Stephanb and G. Gasser, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 6415–6431

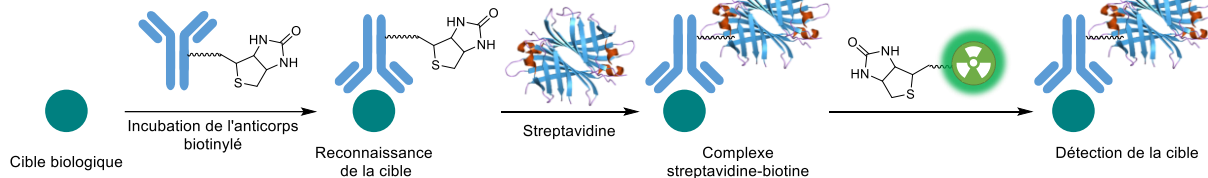
<sup>94</sup> E. J. L. Stéen, P. E. Edem, K. Nørregaard, J. T. Jørgensen, V. Shalgunova, A. Kjaer, M. Herthab, *Biomaterials*, **2018**, 179, 209–245

<sup>95</sup> H. Kobayashi, H. Sakahara, M. Hosono, Z-S. Yao, S. Toyama, K. Endo, J. Konishi, *Journal of Nuclear Medicine*, **1994**, 35, 10, 1677 – 1684

a) Utilisation d'anticorps bispécifiques



b) Utilisation d'anticorps tagués



c) Utilisation de PNAs

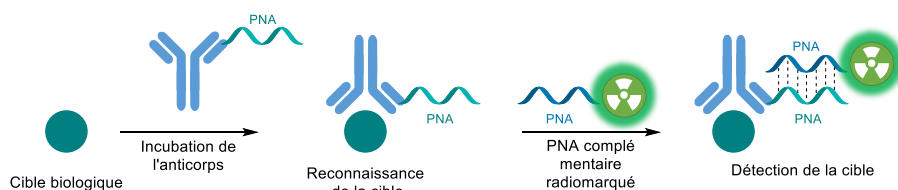


Schéma 69. Premières stratégies de préciblage

Les PNAs ont également été utilisés dans les stratégies de préciblage. Leur stabilité *in vivo*, leur haute affinité et spécificité pour un PNA complémentaire en font de bons candidats pour l'approche préciblage (Schéma 69c). L'équipe du Pr. Gilles Gasser a obtenu de bons résultats en synthétisant un bioconjugué Cetuximab-PNA de douze paires de bases et son PNA complémentaire marqué au  $^{99m}\text{Tc}$ .<sup>96</sup> Le bioconjugué Anticorps-PNA a été injecté à des souris, s'est accumulé sur sa cible pendant 24 h, puis un PNA radiomarqué au  $^{99m}\text{Tc}$  a été injecté et s'est lié à son PNA complémentaire sur l'anticorps. Au bout d'une heure, les PNAs radiomarqués ne s'étant pas liés à l'anticorps sont éliminés et il est possible de détecter la tumeur par imagerie TEMP (Figure 62).

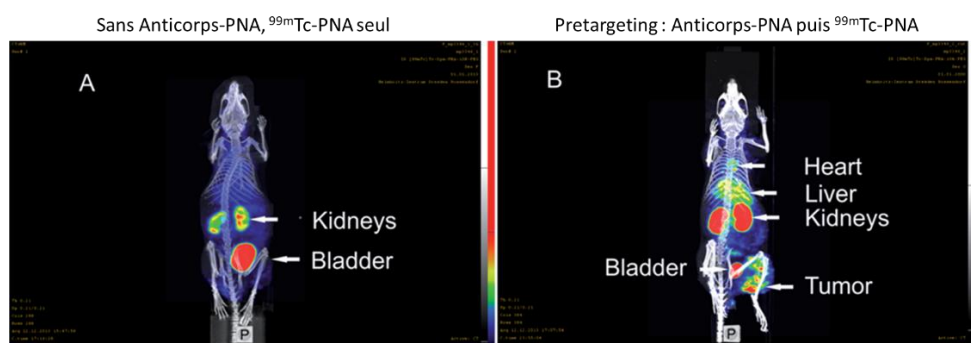


Figure 62. Marquage d'une tumeur par approche de préciblage avec des PNAs.

Des PNAs ont également été radiomarqués au fluor-18, rendant possibles les futures applications en imagerie TEP.<sup>97</sup> Récemment, une approche de préciblage entre un bioconjugué anticorps-PNA et

<sup>96</sup> Anna Leonidova, Christian Foerster, Kristof Zarschler, M. Schubert, H-J. Pietzsch, J. Steinbach, R. Bergmann, N. Metzler-Nolte, H. Stephan and G. Gasser, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 5601–5616

<sup>97</sup> B. Kuhnast, F. Dolle et B. Tavitian, *J. Labelled Cpd. Radipharm.*, **2002**, 45, 1–11

un PNA radiomarqué au fluor-18 a été développée par le groupe de Dr. Yuxia Liu.<sup>98,99</sup> Dans un premier temps, un anticorps a été dérivatisé avec un PNA à 18 paires de bases, puis un dendrimère poly(amidoamine) a été dérivatisé par plusieurs PNAs complémentaires. Enfin, le PNA initial a été radiomarqué au fluor-18. Cette approche permet une amplification du signal radioactif, avec plusieurs PNAs radiomarqués pour un seul anticorps (Schéma 70).

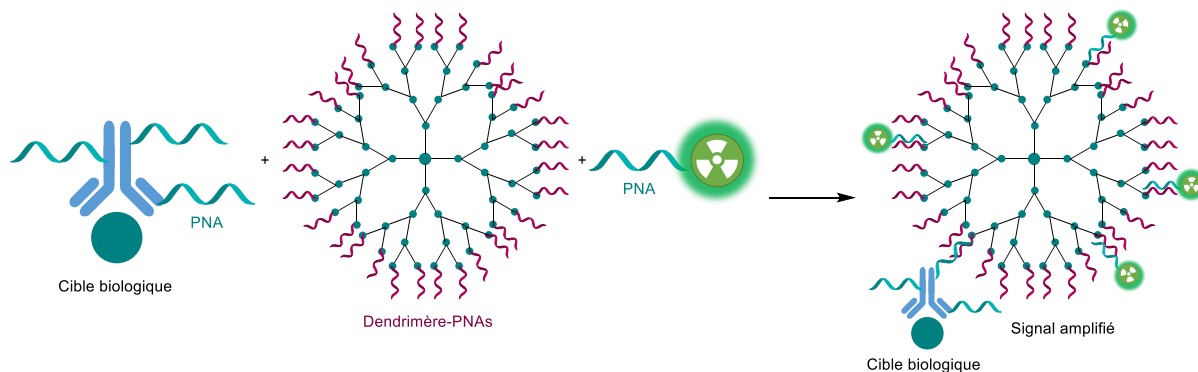


Schéma 70. Stratégie de préciblage utilisant des PNAs avec amplification du signal du fluor-18

L'utilisation des PNAs sur un dendrimère permet l'amplification du signal, un meilleur rapport signal/bruit et une reconnaissance spécifique importante entre les composés greffés.

La chimie bioorthogonale, et plus particulièrement les réactions de click sont des outils très intéressants pour l'approche préciblage et ont été rapidement utilisées dans ce sens.<sup>100</sup> L'une des propriétés principales des réactifs bioorthogonaux est leur inertie vis-à-vis du vivant, minimisant ainsi les risques d'interactions non spécifiques. De plus, ces réactions sont développées pour être le plus rapides possibles, ce qui est en accord avec les contraintes de la radio-imagerie et l'utilisation de radio-isotopes aux temps de demi-vie courts. Le premier essai de préciblage s'appuyant sur la chimie bioorthogonale impliquait la ligation de Staudinger.<sup>101</sup> Cependant, la cinétique de la réaction était trop lente et les résultats n'étaient pas satisfaisants. C'est pour cela que les recherches se sont rapidement tournées vers les réactions de click, plus rapides, notamment la cycloaddition tétrazine/transcyclooctène. En 2010, le groupe du Dr. Robillard a pré-ciblé une tumeur *via* un conjugué anticorps-transcyclooctène, puis marqué cette tumeur par un dérivé tétrazine-DOTA-<sup>111</sup>In (Schéma 71a).<sup>102</sup> La réaction de IEDDA entre une tétrazine et un TCO est extrêmement rapide, et a prouvé son efficacité à de très faibles concentrations pour l'imagerie TEMP. Par la suite, cette réaction a été utilisée dans de nombreuses approches de préciblage, y compris avec d'autres isotopes comme le fluor-18 pour l'imagerie TEP.<sup>103</sup> Par ailleurs, cette approche de préciblage par réaction IEDDA a

<sup>98</sup> L. Cai, S. He, X. Zheng, J. Li, H. Wang, Y. Liu, L. Zhang, *J Label Compd Radiopharm.*, **2021**, 64, 428–439

<sup>99</sup> L. Cai, H. Wang, S. He, X. Zheng, Y. Liu and L. Zhang, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2022**, 331, 2895–2902

<sup>100</sup> K. Porte, M. Ribéraud, R. Châtre, D. Audisio, S. Papatand F. Taran, *ChemBioChem* **2021**, 22, 100–113

<sup>101</sup> D. J. Vugts, A. Vervoort, M. Stigter-van Walsum, G. W. M. Visser, M. S. Robillard, R. M. Versteegen, R. C. M. Vulders, J. D. M. Herscheid, and G. A. M. S. van Dongen, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 10, 2072–2081

<sup>102</sup> R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, and Marc S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 3375–3378

<sup>103</sup> J. Meyer, J. L. Houghton, P. Kozlowski, D. Abdel-Atti, T. s Reiner, N. Pillarsetty, W. W. Scholz, B. M. Zeglis and J. n S. Lewis, *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 298–301

également été utilisée en thérapie ciblée, en utilisant des isotopes émettant des radiations détruisant les cellules tumorales.<sup>104,105</sup>

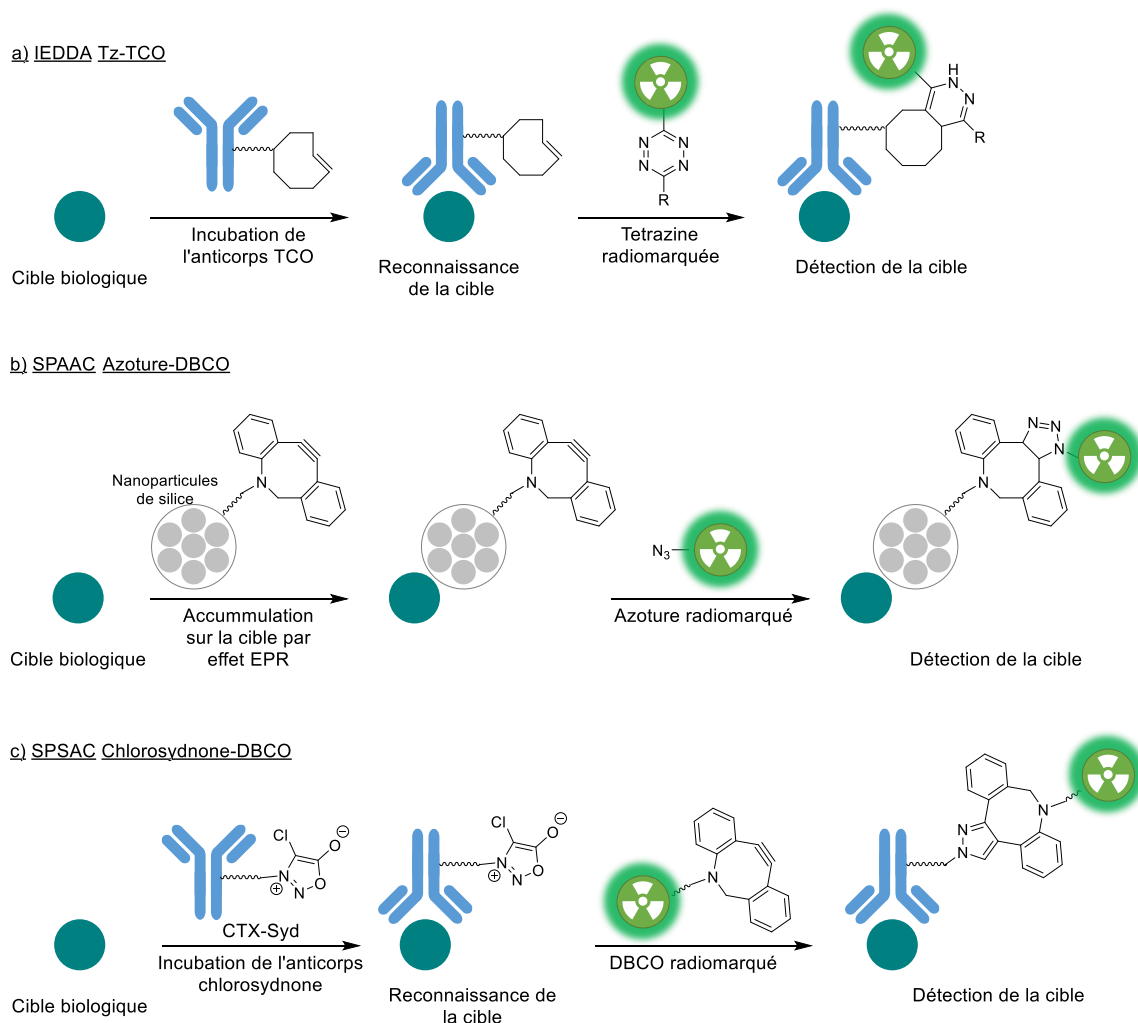


Schéma 71. Préciblage grâce à la chimie bioorthogonale

En parallèle, le groupe du Pr. Dong Wook Kim a montré que la SPAAC, réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne tendu, était compatible avec le préciblage de tumeurs, même si sa vitesse de réaction est beaucoup plus lente que celle de la réaction IEDDA.<sup>106</sup> Dans cette expérience, le groupe a fonctionnalisé non pas un anticorps, mais des nanoparticules de silice mésoporeuse par des groupements DBCO. Les nanoparticules s'accumulent ensuite à la tumeur par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Après 24h, les nanoparticules ont pu s'accumuler au niveau des cellules tumorales, et un azoture marqué au fluor-18 est injecté dans un second temps (Schéma 71b). Après 1 h, la tumeur a pu être observée par imagerie TEP.

Notre groupe a également développé une réaction de click pour l'imagerie TEP.<sup>107</sup> Une chlorosydnone a été ajoutée sur un anticorps Cetuximab, et un DBCO a été radio-marqué au fluor-18.

<sup>104</sup> J. L. Houghton, R. Membreno, D. Abdel-Atti, K. M. Cunanan, S. Carlin, W. W. Scholz, P. B. Zanzonico, J. S. Lewis and B. M. Zeglis, *Mol. Cancer Ther.*, **2017**, 16, 124–133

<sup>105</sup> M. A. Shah, X. Zhang, R. Rossin, M. S. Robillard, D. R. Fisher, T. Bueltmann, F. J. M. Hoeben, and T. P. Quinn, *Bioconjugate Chem.* **2017**, 28, 3007–3015

<sup>106</sup> S. B. Lee, H. L. Kim, H.-J. Jeong, S. T. Lim, M.-H. Sohn, and D. W. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 10549–10552

<sup>107</sup> M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jégo, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403

Ces deux composés réagissent rapidement dans une réaction de SPSAC (Schéma 71c), avec une constante de vitesse de l'ordre de  $k = 300 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la présence d'un chlore en position C4 de la sydnone accélère significativement la réaction de SPSAC, les constantes de vitesse étant 30 fois supérieures à une sydnone non substituée en C4. L'image obtenue après imagerie TEP n'est pas optimale, dû à la mauvaise élimination du DBCO (Figure 63). Cependant, ces résultats sont encourageants pour de futures applications de par la détection spécifique du site tumoral mais ils nécessitent une optimisation des réactifs et de leur biodistribution.

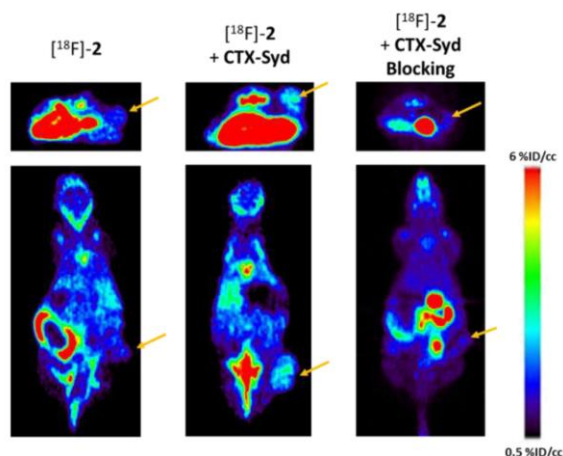


Figure 63. Expérience de marquage d'une tumeur par chimie click entre un anticorps-chlorosydnone (CTX-Syd) et un  $[^{18}\text{F}]$ DBCO ( $[^{18}\text{F}]$ -2).

L'utilisation de la chimie bioorthogonale pour une approche de préciblage ouvre un grand champ de possibilités. La rapidité de ces réactions les rend compatibles avec l'imagerie TEP au fluor-18. La spécificité des réactifs de click pour leurs partenaires est grande, et peut être utilisée dans de nombreuses applications. De plus, la chimie bioorthogonale est compatible avec d'autres approches de préciblage décrites précédemment.

### C. Objectifs du projet

L'objectif de ce projet est d'effectuer de l'imagerie TEP au fluor-18 avec une approche de préciblage, en utilisant des PNAs complémentaires et de la chimie click. Lors de la preuve de concept évoquée lors du Chapitre 1, nous avons montré que l'utilisation de la reconnaissance moléculaire entre PNAs accélérerait considérablement la vitesse de réaction de « click and release » entre une iminosydnone et un cyclooctyne. Cette accélération de réaction, y compris à faible concentration, est également valable pour la réaction de SPSAC, entre une chlorosydnone (ClSyd) et un cyclooctyne. La combinaison de la reconnaissance moléculaire par des brins de PNAs complémentaires avec la rapidité intrinsèque de la réaction SPSAC devrait aboutir à un système de click ultra-rapide ce qui est un critère important pour les approches de préciblage *in vivo*.

Dans cette partie, nous avons repris le couple de PNAs complémentaire à six paires de bases, désigné précédemment comme le plus efficace pour accélérer la réaction de SPICC, pour l'utiliser dans une approche de préciblage. Le PNA-chlorosydnone sera greffé sur un anticorps, et son PNA-DBCO complémentaire sera marqué au fluor-18. L'objectif est d'injecter l'anticorps-PNA-ClSyd à une souris possédant des cellules tumorales surexprimant le récepteur contre lequel l'anticorps est spécifique, d'attendre que l'anticorps se fixe à sa cible, puis d'injecter le  $[^{18}\text{F}]$ PNA-DBCO afin de localiser la tumeur par imagerie TEP (Figure 64).

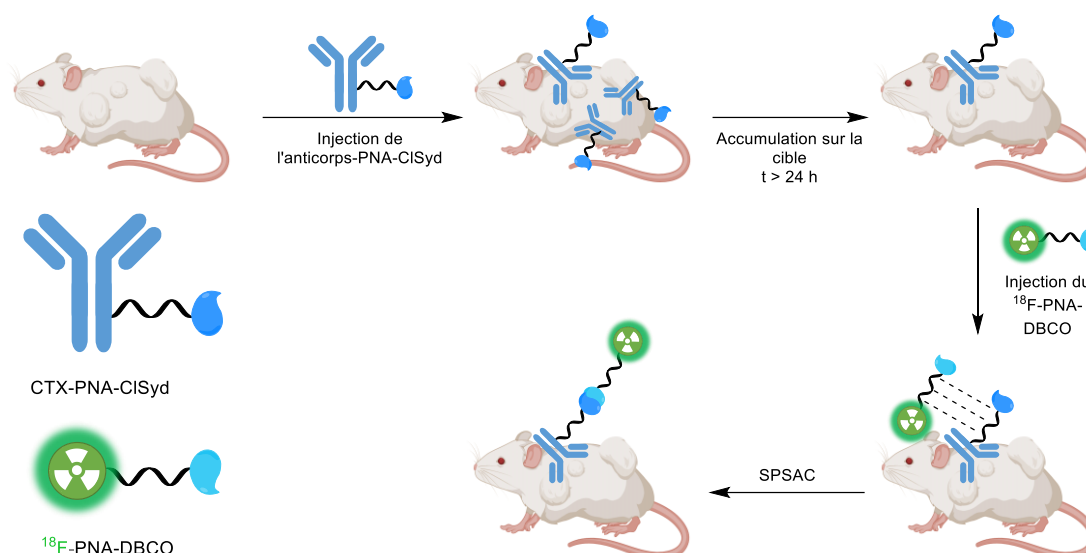


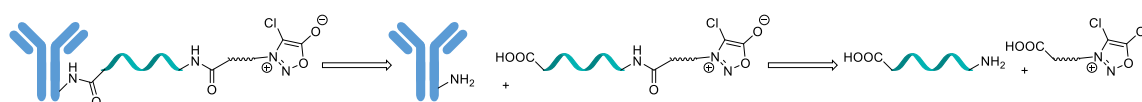
Figure 64. Principe du préciblage pour l'imagerie TEP avec la chimie click accélérée par PNAs

La conception de ce projet repose beaucoup sur les résultats décrits dans le Chapitre 1. Ainsi, nous avons vu précédemment que toutes les tentatives de bioconjugaison à partir de conjugués protéine-DBCO avaient été infructueuses mais qu'en revanche les conjugués protéine-iminosydnone étaient fonctionnels pour une réaction de « click and release » avec un PNA-DBCO complémentaire. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'accrocher la chlorosydnone à l'anticorps et non le DBCO.

Pour ce projet, nous avons collaboré avec le Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ). Le marquage au fluor-18 du PNA a été effectué par le Dr. Simon Specklin, et les tests biologiques *in cellulo* et *in vivo* par la Dr. Estelle Porret et le Dr. Charles Truillet.

L'approche que nous proposons ici, combinant reconnaissance moléculaire par de courts brins de PNAs couplée à une réaction de chimie click n'a jamais encore été explorée dans un contexte d'imagerie par préciblage. Il sera donc intéressant de comparer cette approche avec celles déjà décrites dans la littérature (Figure 65).

Bioconjugué Anticorps-PNA-chlorosydnone



$^{18}\text{F}$ -PNA-DBCO

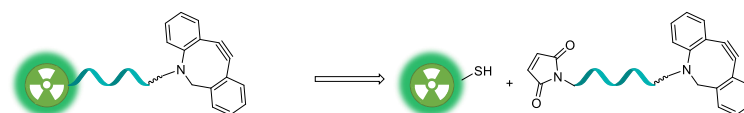


Figure 65. Voies rétrosynthétiques des composés choisis pour l'approche de préciblage combinant PNAs et chimie click

Nous avons choisi de synthétiser un composé Cetuximab-PNA-chlorosydnone et de marquer le PNA-DBCO complémentaire au fluor-18. Les PNAs seront synthétisés sur support solide comme dans le chapitre précédent, et le PNA-chlorosydnone sera greffé à l'anticorps par couplage peptidique. Le PNA-DBCO sera radiomarké par addition de Michael d'un thiol radioactif sur un malimide. Cette partie sera effectuée par nos collaborateurs au SHFJ. Ces composés seront ensuite impliqués dans des essais biologiques.



## II. Résultats

### A. Synthèse des réactifs

#### 1. Synthèse des PNAs

Pour ce projet, il a été choisi d'effectuer de la chimie click *in vivo*, et non de la « click and release ». Par conséquent, nous avons décidé de changer l'iminosydnone précédemment utilisée par une chlorosydnone. En effet, les chlorosydnone sont plus réactives et ont des constantes de vitesse plus élevées que les iminosydnone-urées ainsi que les sydnones non chlorées. La chlorosydnone **II-5** a été synthétisée par Maxime Ribéraud, doctorant du laboratoire, selon la voie de synthèse décrite dans la littérature (Schéma 72).<sup>108,109</sup> Le composé **II-1** a été obtenu par alkylation de l'amine par de l'acide chloroacétique, qui a ensuite été nitrosylé et cyclisé pour donner la sydnone **II-2**. Cette sydnone a ensuite été chlorée en position C4 par de l'hypochlorite de sodium afin d'obtenir la chlorosydnone **II-3**. L'acide de celle-ci a ensuite été activé pour former un ester de NHS, puis le bras PEG-acide a été ajouté par couplage peptidique, donnant la Chlorosydnone-PEG-acide **II-5**.

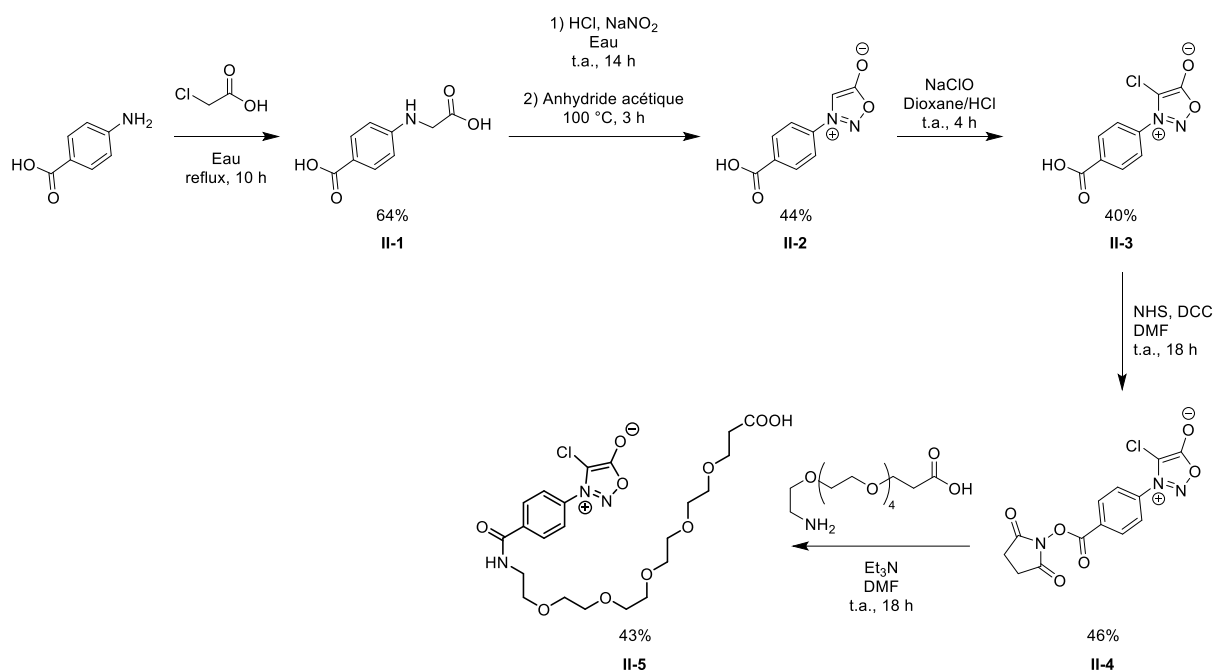


Schéma 72. Synthèse de la chlorosydnone **II-5**.

La constante de vitesse pour la cycloaddition entre la chlorosydnone acide **II-3** et le DBCO a été déterminée précédemment dans notre laboratoire et est de  $k = 292 \pm 4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>109</sup>

Un composé PNA-chlorosydnone a ensuite été synthétisé par synthèse sur support solide (Figure 66). Un groupement lysine suivi de trois espaceurs PEG<sub>2</sub> ont d'abord été ajoutés, dans l'optique de lier le PNA à un anticorps tout en ayant de la flexibilité : nous avons en effet vu dans le Chapitre 1 qu'il était préférable d'ajouter un espaceur entre notre PNA et la protéine à laquelle il sera greffé. Puis la séquence de bases TAAGTG choisie a été ajoutée sur le support solide, et enfin, la chlorosydnone-PEG-

<sup>108</sup> L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuypere, C. Créminon, D. A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Chem. Commun.* **2014**, 50 (66), 9376-9378

<sup>109</sup> M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jégo, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400-10403

acide **II-5** a été ajoutée par couplage peptidique sur support solide. Le PNA désiré a ensuite été clivé de la résine et les bases Bhoc déprotégées par une solution de TFA à 95%. Le PNA-chlorosydnone **II-6** a ainsi été obtenu sous forme d'huile jaune après purification par HPLC semi-préparative (19.7 mg, 7.17  $\mu\text{mol}$ , 32%).

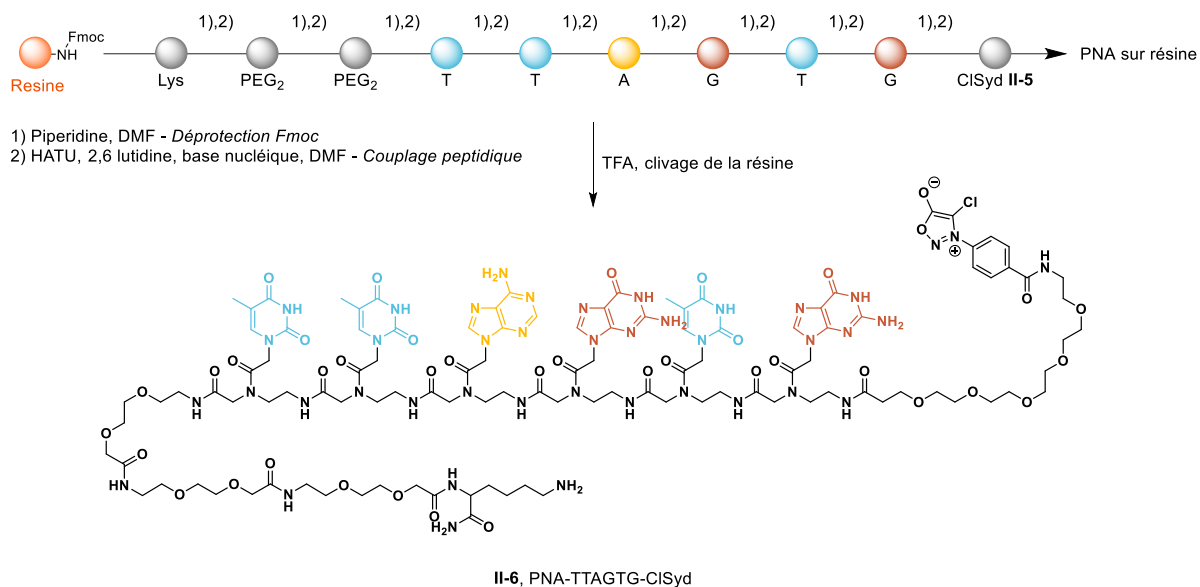


Figure 66. PNA-chlorosydnone **II-6**

Le PNA-DBCO complémentaire **II-7** choisi pour être marqué au fluor-18 a été synthétisé au préalable dans le Chapitre 1 (Figure 67). Ce PNA a été choisi en raison de la présence de la fonction maléimide qui pourra par la suite être utilisée pour un marquage au fluor-18.

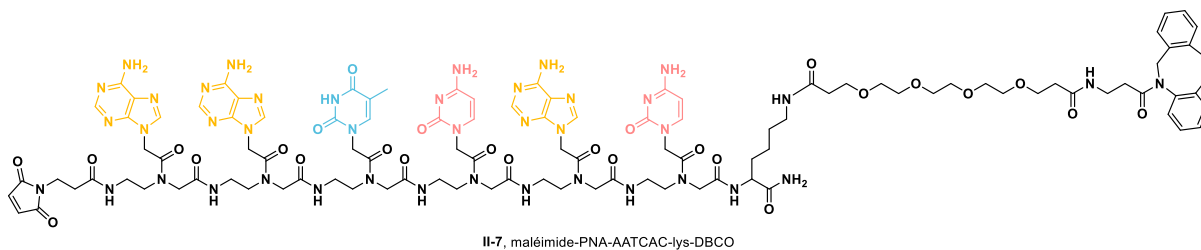


Figure 67. PNA-DBCO **II-7**

Dans un premier temps, nous avons voulu contrôler le bon fonctionnement de la réaction de SPSAC entre les deux partenaires ainsi que l'accélération de cette réaction par l'effet de reconnaissance moléculaire des brins PNAs. La réaction de click entre les deux nouveaux partenaires **II-6** et **II-7** a été suivie par LC-MS pour attester de la formation du produit de click (Schéma 73). Celui-ci est bien observé tout comme la disparition des deux réactifs. Comme attendu, aucun autre sous-produit n'est observé.

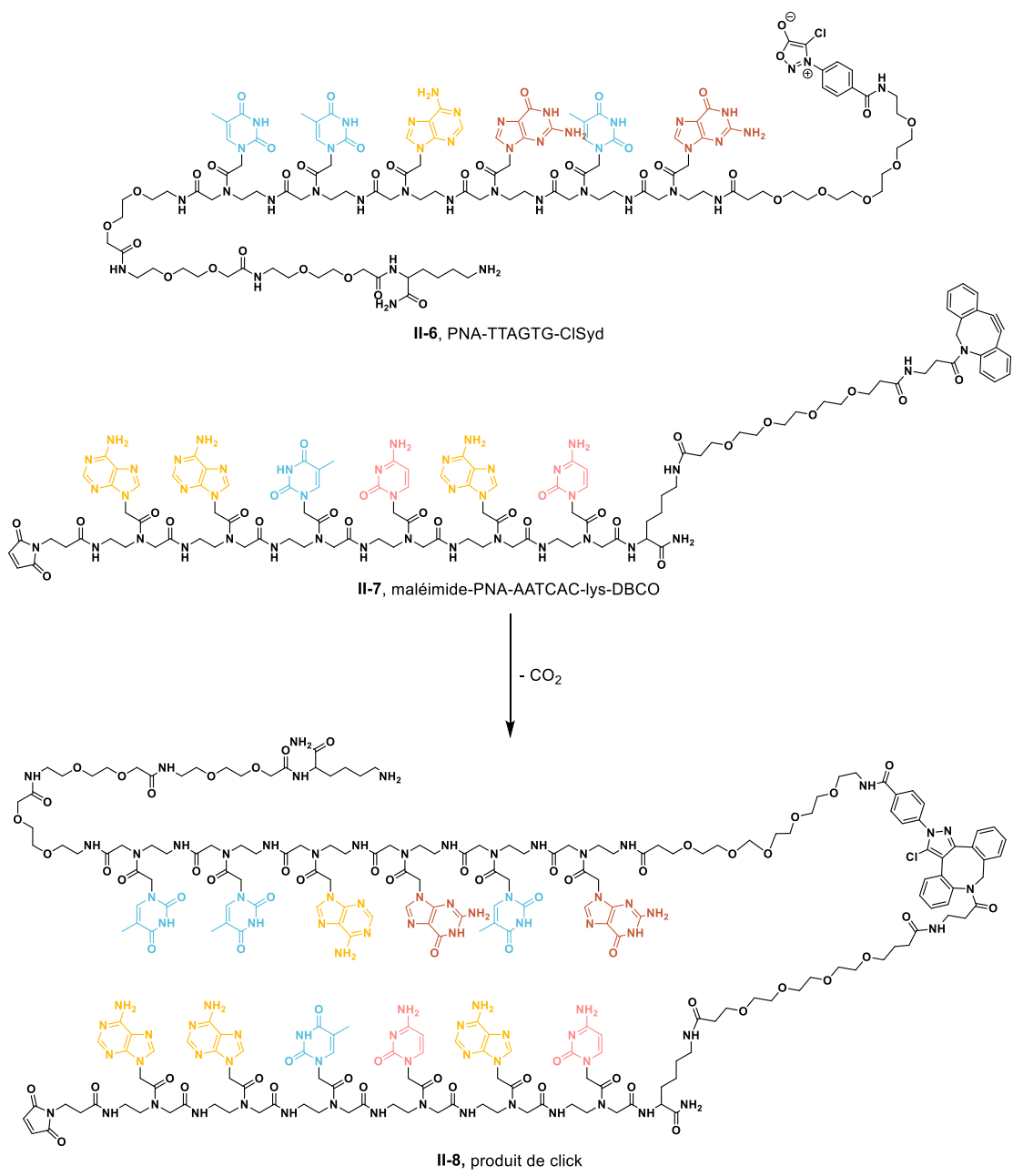


Schéma 73. Réaction de SPSAC entre les PNAs complémentaires II-6 et II-7

Une étude cinétique a par la suite été effectuée entre ces deux partenaires de click. La réaction a été suivie par spectroscopie UV-visible. La chlorosydnone a une absorbance spécifique en UV à 310 nm. C'est la disparition de cette absorbance spécifique qui est observée lors de l'étude cinétique (Figure 68).

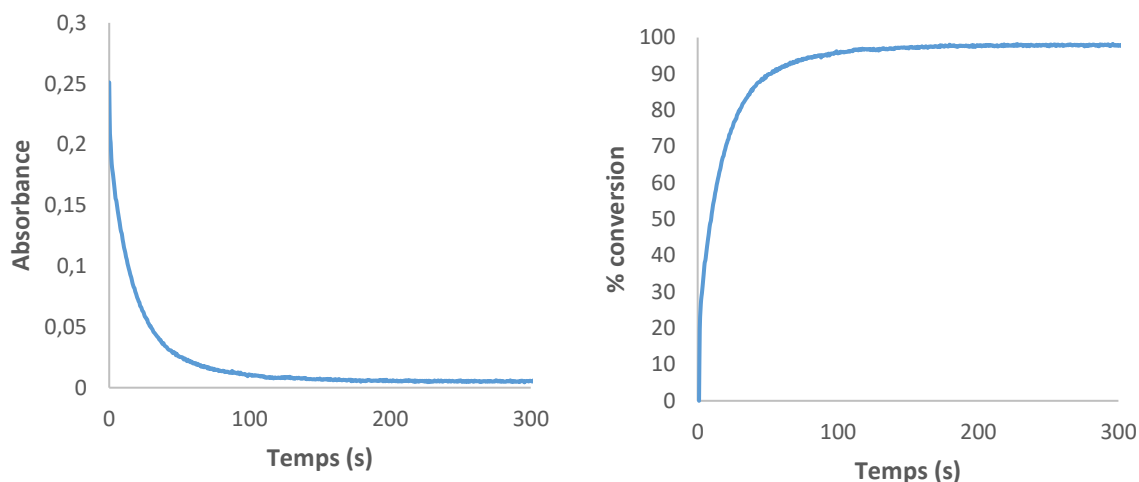


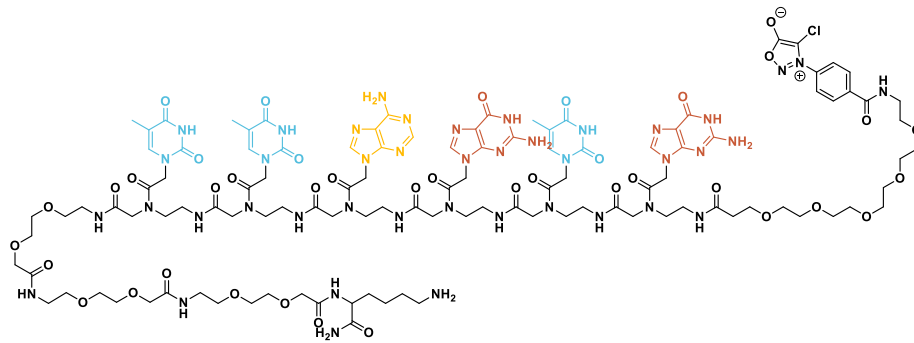
Figure 68. Cinétique déterminée par spectroscopie UV-visible entre le PNA-ClSyd II-6 et le PNA-DBCO II-7,  $\lambda_{obs} = 310 \text{ nm}$ ,  $[II-6] = [II-7] = 100 \mu\text{M}$  dans PBS à  $37^\circ\text{C}$

La cinétique de click entre les deux PNAs est très rapide. Le temps de demi-réaction  $t_{1/2}$  est de 10 s et la constante de vitesse apparente,  $k_{app} = 53 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Cette constante de vitesse est dix fois plus rapide que celle de la réaction entre le PNA-IS-coum et le PNA-DBCO possédant les mêmes séquences ( $k_{app} = 4,63 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). La réaction n'a pas pu être effectuée aux mêmes concentrations, la sensibilité du spectromètre UV-visible étant moindre que celle du fluorimètre. Cependant, cette réaction est un pseudo-ordre 1 et il est possible de comparer les cinétiques de ces deux réactions. Les résultats de cette étude cinétique sont logiques : la constante de vitesse de la réaction de click entre la chlorosydnone et le DBCO ( $292 \pm 4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) est également dix fois plus importante que celle de la réaction entre l'iminosydnone-urée-coumarine et le DBCO ( $k = 24 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). L'effet de reconnaissance moléculaire est donc toujours bien présent pour le nouveau couple de PNAs.

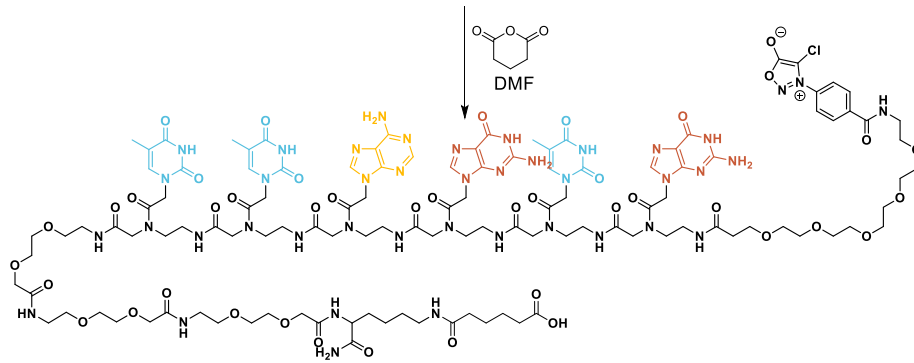
## 2. Synthèse du bioconjugué Anticorps-PNA

Ayant validé le choix de notre couple de PNAs, nous avons commencé la synthèse du bioconjugué anticorps-PNA. Le Cetuximab, anticorps monoclonal chimérique IgG1, dirigé spécifiquement contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), a été choisi. Des mutations de la protéine EGFR mènent à sa surexpression, qui déclenche une division cellulaire incontrôlée, résultant en un cancer. Le Cetuximab est donc d'un grand intérêt pour diagnostiquer des cellules tumorales, et est très souvent utilisé dans les approches de préciblage.

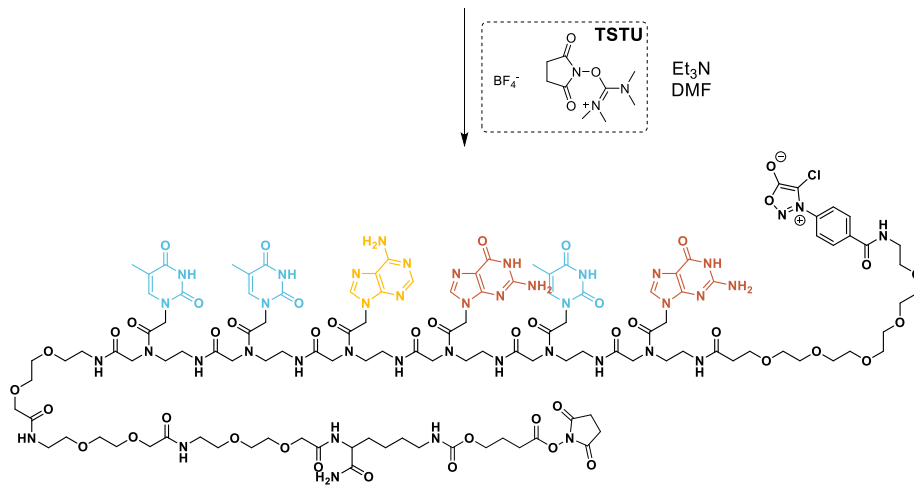
Le PNA-ClSyd a été greffé sur le Cetuximab par couplage Lysine-acide activé. Pour cela, une fonction acide carboxylique a été ajoutée sur la lysine du PNA-ClSyd en faisant réagir le PNA II-6 avec de l'anhydride glutarique. Cet acide a été mis à réagir avec du TSTU et de la triéthylamine pour former un ester de NHS II-10 prêt pour le couplage avec l'anticorps (Schéma 74). Le PNA activé ainsi préparé a ensuite été mis directement en solution avec le Cetuximab à 2 mg/mL, dans un tampon  $\text{NaHCO}_3$  pH = 8,3 et incubé pendant 4 h. 100 équivalents de PNA ont été ajoutés pour un équivalent de Cetuximab. Le bioconjugué Ctx-PNA-ClSyd II-11 a ensuite été purifié par protéine A.



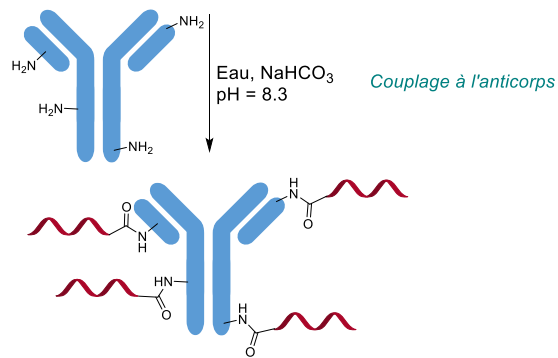
II-6, PNA-TTAGTG-CISyd



II-9, acide-PNA-TTAGTG-CISyd



II-10 NHS-PNA-TTAGTG-CISyd



II-11, Ctx-PNA-CISyd

Schéma 74. Synthèse du bioconjugué Ctx-PNA-CISyd II-11

Une analyse MALDI-TOF du bioconjugué **II-11** a montré un nombre moyen de quatre PNAs par Cetuximab (Figure 69). La concentration de l'échantillon obtenu a été déterminée par test BCA (Acide Bicinchoninique). Le test BCA est un test colorimétrique permettant de déterminer la concentration en protéines d'une solution. Les protéines réduisent les ions cuivre (II) en cuivre (I) en milieu alcalin et l'acide bicinchoninique forme un complexe pourpre absorbant à 562 nm avec les ions cuivre (I). La concentration est directement proportionnelle à l'absorbance. La concentration de l'échantillon est de 0,34 mg/mL.

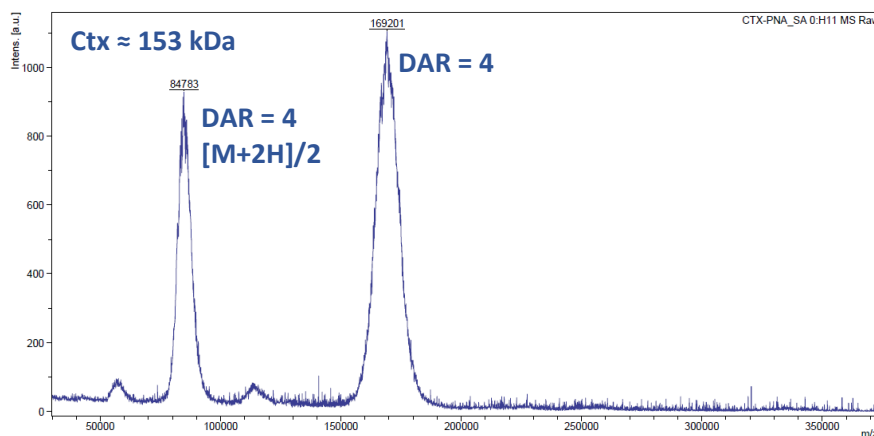


Figure 69. Analyse MALDI-TOF du composé Ctx-PNA-ClSyd **II-11**

### 3. Radio-marquage au fluor-18 du PNA-DBCO

Le radio-marquage du PNA-DBCO avec du fluor-18 a été mis au point par le Dr. Simon Specklin et Maxime Ribéraud au SHFJ.

La radiosynthèse utilisant le fluor-18 est effectuée en cellule automatisée. Le PNA-maléimide **II-7** a été marqué au fluor-18 par réaction avec le [<sup>18</sup>F]Fluoropyridine-thiol ([<sup>18</sup>F]FPySH) **II-14**. Ce composé marqué a été obtenu en partant de l'iodure de Triméthylammonium-pyridine-thiol-trityle **II-12** qui a été marqué par substitution nucléophile aromatique du groupement amonium par le K[<sup>18</sup>F]F·K<sub>222</sub> dans le DMSO à 160 °C pendant 5 min.<sup>110</sup> Le K<sub>222</sub> est un cryptand puissant des ions K<sup>+</sup> ce qui permet d'augmenter la réactivité des ions fluorures. Le composé **II-13** a été ainsi obtenu après purification sur une cartouche de C18 (silice modifiée octadécyl). Le thiol a ensuite été déprotégé de son groupement trityle en étant mis en réaction avec du TFA et du triisopropyl silane dans le DCM à 60 °C pendant 5 min. Le composé **II-14** a été obtenu après purification sur HPLC semi-préparative (Schéma 75).

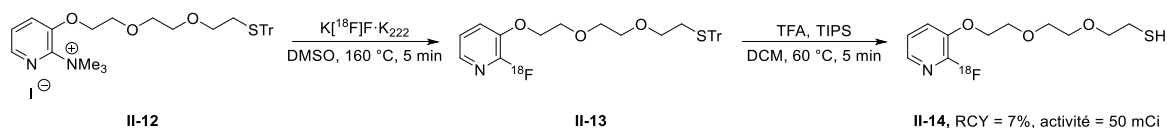


Schéma 75. Synthèse du [<sup>18</sup>F]Fluoropyridine-thiol

Le rendement radiochimique de cette synthèse (radiochemical yield, RCY) est de 7% après 70 min, et l'activité est de 50 mCi pour 600 µL. En synthèse radioactive, le rendement radiochimique c'est-à-dire le rendement basé sur le fluor-18, est la donnée la plus importante. Celui-ci est souvent très faible en raison des conditions particulières des radiosynthèses (concentrations très faibles de fluor-18) mais suffisent en général pour réaliser les expériences biologiques souhaitées.

<sup>110</sup> M. Richard, F. Hinnen and B. Kuhnast, *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, **2022**, *7*, 7

Une première tentative de marquage du PNA à partir du composé  $[^{18}\text{F}]\text{II-14}$  dans le DMSO à 37 °C pendant 15 min n'a pas été concluante. En effet, seuls les réactifs de départ ont été identifiés en masse après décroissance. Le composé  $[^{18}\text{F}]\text{II-14}$  semble instable après un certain temps dans le DMSO, et un composé présentant un pont disulfure semble se former (Schéma 76).

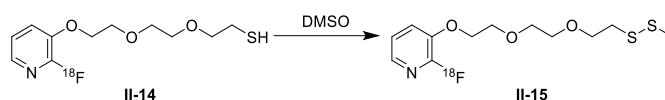


Schéma 76. Dégradation du composé  $[^{18}\text{F}]\text{II-14}$

Il a alors été décidé d'effectuer des expériences contrôles sur un maléimide (Schéma 77). De la tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) a été utilisée lors de l'optimisation de la réaction pour tenter d'éviter la formation de pont disulfure. La réaction dans le DMSO ne donnant pas de résultat concluant, la réaction a été optimisée dans l'acétonitrile. Dans ce solvant, c'est finalement sans TCEP à 40 °C pendant 10 min que la conversion obtenue est optimale, avec une concentration en maléimide de 10 mM (Tableau 9).

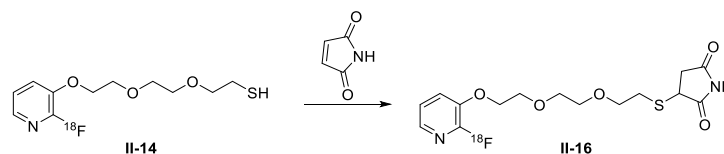


Schéma 77. Marquage au fluor-18 d'un maléimide

Tableau 9. Optimisation du marquage au fluor-18 du maléimide

Entrée	Concentration en maléimide	Solvant	Concentration en TCEP	Temps	Température	Conversion
1	1 mM	DMSO	10 mM	20 min	40 °C	0%
2	10 mM	MeCN	10 mM	15 min	40 °C	0%
3	500 mM	MeCN	10 mM	15 min	40 °C	100%
4	10 mM	MeCN/PBS (1:1)	10 mM	15 min	40 °C	11%
5	10 mM	MeCN	-	10 min	40 °C	100%

Les conditions de l'entrée 5 du Tableau 9 ont donc été utilisées pour marquer le PNA-DBCO-maléimide **II-7** au fluor-18 (Schéma 78).

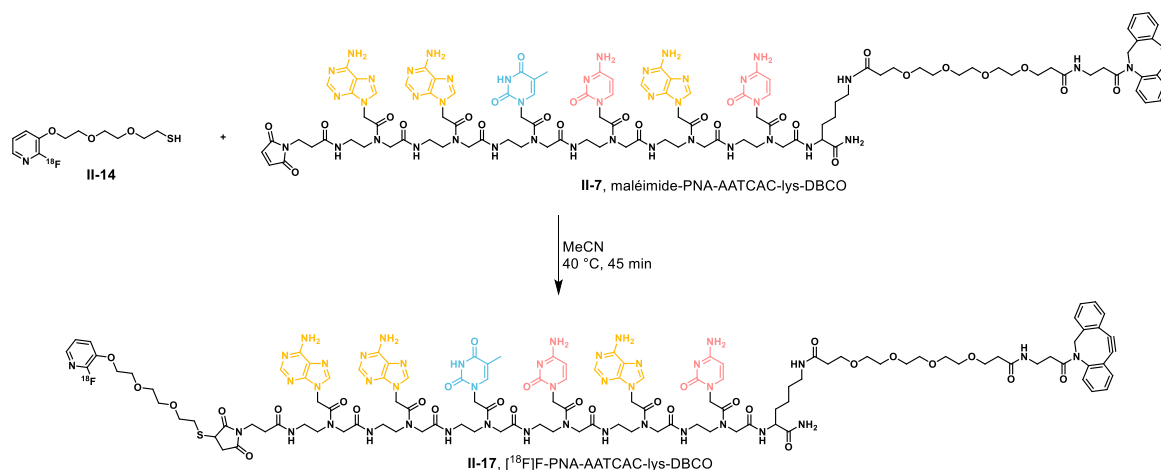


Schéma 78. Synthèse du  $[^{18}\text{F}]$ PNA-DBCO

Le PNA-DBCO maléimide **II-7** est incubé pendant 45 min à 40 °C avec le  $[^{18}\text{F}]$ **II-14** dans de l'acétonitrile. Un ratio de 1/2,2 pour  $[^{18}\text{F}]$ **II-14**/PNA **II-7** a été utilisé. Après incubation des deux réactifs, le composé  $[^{18}\text{F}]$ PNA-DBCO **II-17** a été purifié sur colonne d'exclusion stérique Minitrapp G10 (cut-off 700 Da). La purification est suivie par détection radioactive. L'échantillon dans l'acétonitrile a été déposé sur la colonne avec une activité de 1,8 mCi. L'échantillon pur a été récupéré dans un mélange PBS/DMSO (95:05) avec une activité de 0,601 mCi. En corrigeant l'activité détectée en fonction du temps écoulé, le PNA  $[^{18}\text{F}]$ PNA-DBCO **II-17** a été obtenu avec un rendement radiochimique de 38%.

Le marquage du PNA au fluor-18 a été efficace. Une fois la décroissance du fluor-18 finie, des analyses par masse ont été effectuées. La masse du  $[^{18}\text{F}]$ PyS-PNA-DBCO est bien observée (sous forme  $[^{18}\text{O}]$ PyS-PNA-DBCO après la décroissance).

## B. Etude du marquage de l'anticorps au fluor-18

### 1. Tests cellulaires

Des études de radiomarquage de l'anticorps synthétisé précédemment ont été effectuées. Ces études ont été effectuées au SHFJ, avec le Dr. Simon Specklin et la Dr. Estelle Porret.

Dans un premier temps, des études de radiomarquage de l'anticorps Ctx-PNA-CISyd **II-11** par le  $[^{18}\text{F}]$ PNA-DBCO **II-17** ont été effectuées sur des cellules tumorales (Figure 70).



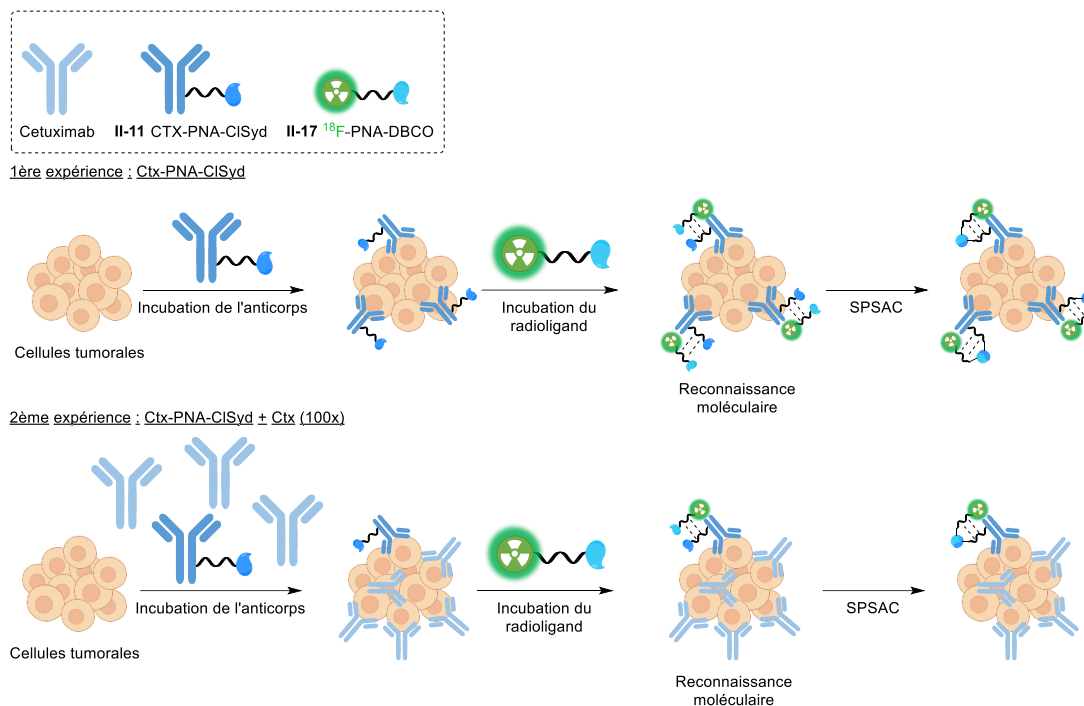


Figure 70. Marquage de cellules tumorales au fluor-18 par SPSAC combinée à de la reconnaissance moléculaire

Les cellules tumorales utilisées pour cette expérience sont des cellules A431, surexprimant EGFR. Pour vérifier que l'anticorps dérivatisé Ctx-PNA-CISyd **II-11** n'a pas perdu d'affinité pour son récepteur, deux expériences ont eu lieu. L'anticorps dérivatisé **II-11** a été incubé seul sur les cellules, ainsi qu'en présence d'un excès de Cetuximab non dérivatisé (x 100). Le Cetuximab non dérivatisé en excès va saturer les récepteurs présents sur les cellules, et beaucoup moins de Ctx-PNA-CISyd sera lié (Figure 70).

Les cellules A431 ont été incubées à 37 °C pendant 2 h sous agitation avec 10 µg de Ctx-PNA-CISyd **II-11** (expérience 1) ou 10 µg de Ctx-PNA-CISyd **II-11** + 1 mg de Cetuximab (expérience 2) dans 500 µL de tampon DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 1% BSA. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois au PBS pour enlever les anticorps non liés aux récepteurs. 20 équivalents de [<sup>18</sup>F]PNA-DBCO **II-17** (1,3 nmol, 96 µCi) ont alors été incubés à 37 °C pendant 20 minutes dans du tampon DMEM 1% BSA. Les cellules ont été lavées 3 fois au PBS, puis la radioactivité a été mesurée avec un compteur Gamma et corrigée avec le temps de demi-vie du fluor-18.

Les résultats obtenus montrent une différence conséquente de radioactivité détectée entre l'expérience 1 (Ctx-PNA-CISyd seul) et l'expérience 2 (Ctx-PNA-CISyd + Ctx en excès x100) (Figure 71). L'anticorps dérivatisé Ctx-PNA-CISyd **II-11** est déplaçable par un grand excès de Cetuximab, ce qui prouve que le composé **II-11** se lie bien sur son récepteur EGFR et n'a pas perdu de son affinité lors du couplage au PNA. Cette différence très significative de radioactivité détectée entre les deux expériences ( $p < 0,0001$ ) signifie également que la réaction entre le PNA-CISyd et le PNA-DBCO est très spécifique. Les résultats sont calculés en comparant la radioactivité détectée sur les cellules à la radioactivité totale. La majorité du PNA radiomarqué en excès ne se fixe pas à l'anticorps et est éliminé lors des étapes de lavages, c'est la raison pour laquelle le pourcentage de liaison par rapport à l'activité totale est si faible, de l'ordre de 1% (Figure 71).

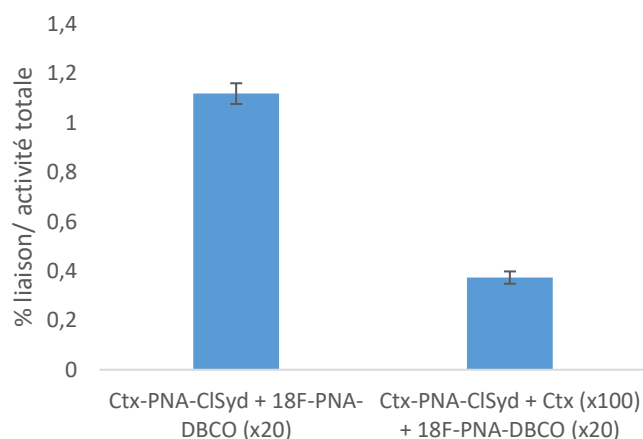


Figure 71. Résultats des expériences de marquage sur cellules, résultats obtenus par détection de la radioactivité.  
 $p < 0,0001$

Ces expériences sont très prometteuses, puisqu'elles confirment que l'anticorps Ctx-PNA-CISyd **II-11** a été marqué spécifiquement par le  $[^{18}\text{F}]$ PNA-CISyd **II-17** à la surface des cellules. Cela signifie que la réaction SPSAC accélérée par les brins PNAs a été efficace dans un milieu biologique complexe tel que celui utilisé en culture cellulaire.

A la vue de ces résultats très prometteurs, nous avons voulu étudier cette réaction lors d'une expérience de préciblage *in vivo*.

## 2. Etude *in vivo*

Les expériences présentées dans cette étude *in vivo* ont été réalisées par la Dr. Estelle Porret et le Dr. Charles Truillet au SHFJ.

La procédure expérimentale a été validée par le comité régional d'éthique et effectuée en accord avec les lignes directrices du ministère français de l'agriculture et des forêts (décret 2013-118) ainsi qu'avec les directives du conseil des communautés européennes (2010/63/UE).

Les expériences *in vivo* présentées dans ce paragraphe ont été réalisées exclusivement avec des souris « nude » athymiques femelles, possédant une tumeur sous-cutanée, sur un total de 18 souris. Des cellules tumorales A431 surexprimant EGFR ont été injectées et la tumeur s'est développée pendant douze jours.

Ces souris ont été divisées en trois groupes. Après douze jours de croissance de la tumeur, chaque groupe a reçu une injection.

Le premier groupe contient six souris et est un groupe contrôle. Dans ce groupe, l'anticorps n'a pas été injecté aux souris, seule une injection de NaCl 0,9% a eu lieu. Ce groupe sert de contrôle vis-à-vis de l'efficacité de l'injection du  $[^{18}\text{F}]$ PNA-DBCO seul, permet de déterminer sa biodistribution et de vérifier qu'il ne s'accumule pas de manière non spécifique à la tumeur ou dans d'autres organes.

Le deuxième groupe de six souris a reçu une injection contenant un mélange d'anticorps Cetuximab et d'anticorps dérivatisé Cetuximab-PNA-CISyd **II-11** dans un ratio Ctx/Ctx-PNA-CISyd 30/1. Il s'agit d'un autre groupe contrôle dont le but est de prouver le marquage spécifique *in vivo* sur l'anticorps. Le Cetuximab non dérivatisé va se lier à la cible EGFR de manière majoritaire. Le Cetuximab dérivatisé ne pourra pas se lier à sa cible et donc nous devrions observer un marquage beaucoup plus faible suite à l'injection du  $[^{18}\text{F}]$ PNA-DBCO.

Enfin, le troisième groupe de six souris est le groupe de préciblage. Une injection de l'anticorps Cetuximab-PNA-CISyd II-11 a été effectuée.

Par souris, 66,4 µg de Ctx-PNA-CISyd sont injectés dans les groupes 2 et 3. Dans le groupe 2, 2 mg de Ctx sont également injectés. Les injections se font dans un tampon NaCl 0,9%.

Après la première injection, trois jours se passent pour laisser le temps à l'anticorps de s'accumuler au niveau de la tumeur et de ne plus circuler dans les vaisseaux sanguins. Après ces trois jours, chaque souris subit une deuxième injection contenant le [<sup>18</sup>F]PNA-DBCO II-17. Sept équivalents de [<sup>18</sup>F]PNA-DBCO II-17 sont injectés par rapport au Ctx-PNA-CISyd II-11, soit 7,7 µg par injection avec une activité de 105 µCi.

Une heure après cette deuxième injection, des études de bio-distribution sont effectuées sur trois souris de chaque groupe. Les souris restantes de chaque groupe sont incubées trois heures de plus (soit 4 h au total). Une souris de chaque groupe est ensuite imagée par imagerie TEP au fluor-18. Puis, des études de biodistribution sont effectuées sur toutes les souris restantes de chaque groupe.

Les différents protocoles expérimentaux sont récapitulés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Protocoles des expériences in vivo sur les souris

Groupes Nombre de souris	1 <sup>ère</sup> injection J0	2 <sup>ème</sup> injection J3	Biodistribution		Imagerie TEP J3 + 4 h
			J3 + 1 h	J3 + 4 h	
1 (n = 6)	NaCl 0,9%	[ <sup>18</sup> F]PNA-DBCO (7 eq.)	n = 3	n = 3	n = 1
2 (n = 6)	Ctx-PNA-CISyd (1 eq.)/Ctx (30 eq.)	[ <sup>18</sup> F]PNA-DBCO (7 eq.)	n = 3	n = 3	n = 1
3 (n = 6)	Ctx-PNA-CISyd	[ <sup>18</sup> F]PNA-DBCO (7 eq.)	n = 3	n = 3	n = 1

La radioactivité présente dans chacun des organes après 1 h et après 4 h a été analysée (Figure 72, Figure 73). Pour chaque organe le pourcentage de dose injectée par gramme est évalué.

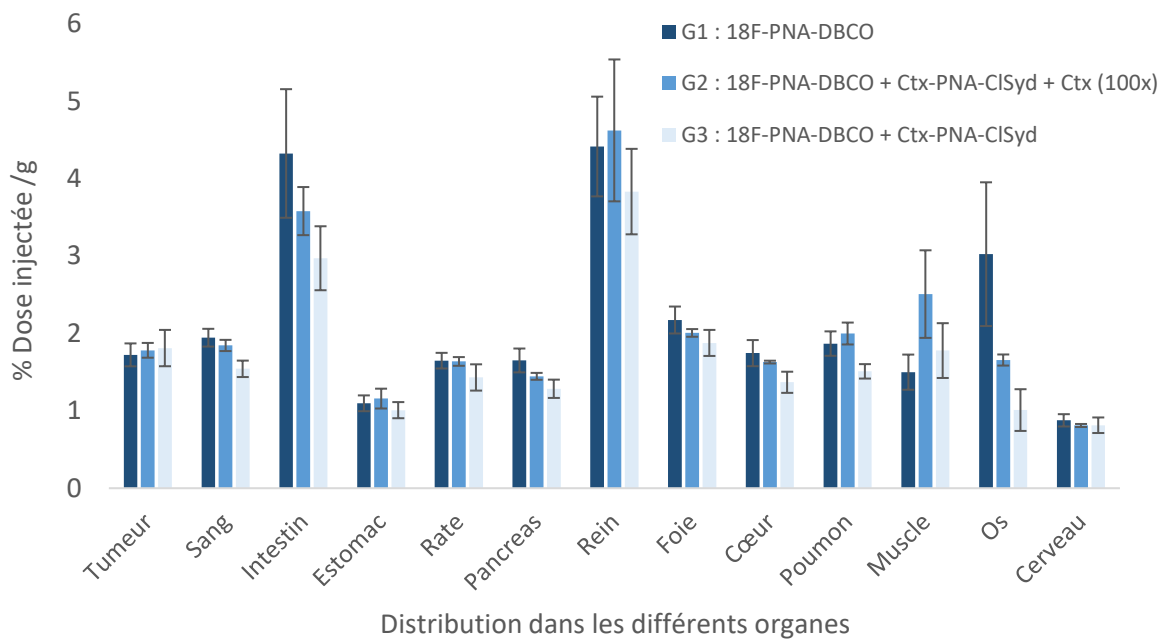


Figure 72. Bio-distribution 1 h après l'injection du [<sup>18</sup>F]PNA-DBCO

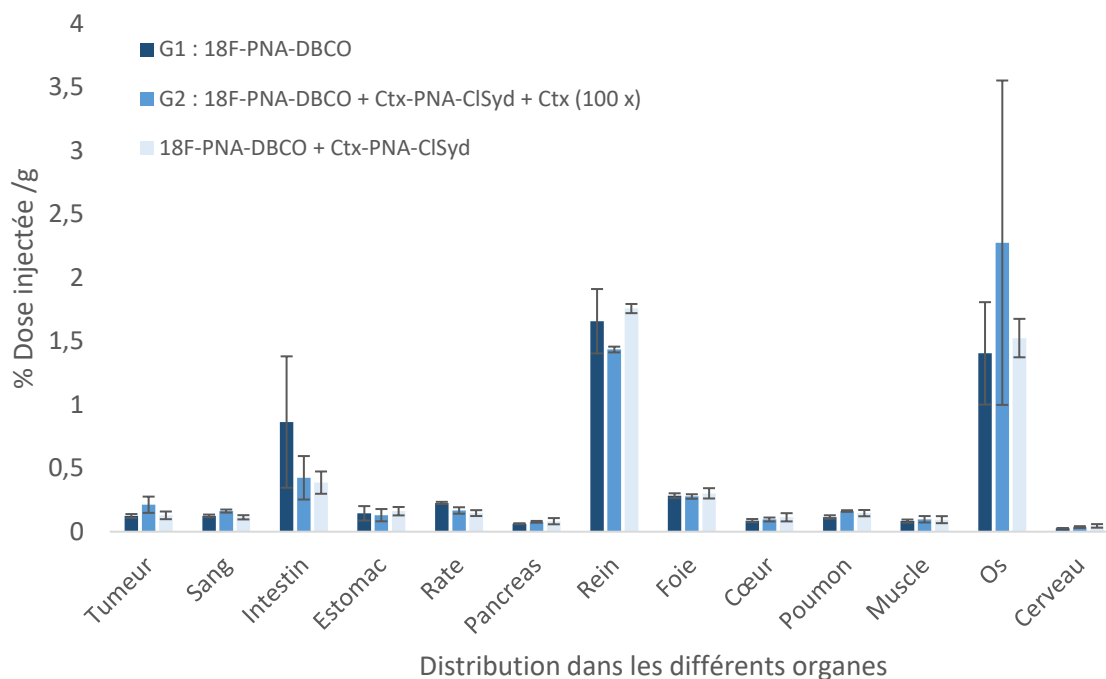


Figure 73. Bio-distribution 4 h après l'injection du [18F]PNA-DBCO

En comparant la biodistribution entre les trois groupes, nous observons que le préciblage n'a pas fonctionné et que le pourcentage de radioactivité est similaire quel que soit le groupe testé. En particulier, aucune différence notable n'est observée sur le site tumoral.

Après 1 h, de la radioactivité est détectée dans tous les organes analysés, et ce dans les trois groupes (Figure 72). A ce stade, il est probable que le PNA radiomarqué [18F]PNA-DBCO II-17 continue de circuler dans le corps, et se répartisse dans la plupart des organes.

Après 4 h, la radioactivité est détectée principalement dans les reins et dans les os et moins de 0,5% de la dose injectée est détectée sur le site tumoral (Figure 73). Le composé radioactif injecté [18F]PNA-DBCO a été en grande partie éliminé par le corps de la souris, tout comme les éventuels autres composés radioactifs qui auraient pu être engendrés. En effet, les reins sont l'organe d'élimination naturelle des composés, il est donc logique d'y retrouver le reste de la radioactivité. Les os sont quant à eux connus pour fixer l'ion fluorure. S'il restait des ions fluorure-18 lors de l'injection, ou si le fluor s'est détaché *in vivo* du PNA, ceux-ci se sont accumulés dans les os. La présence d'ions fluorure-18 libres expliquerait la présence de radioactivité dans plusieurs des organes très vascularisés comme le cœur ou le cerveau. Cette saturation des os par du fluor-18 indique qu'il y a peut-être eu un problème lors du marquage du PNA-DBCO-maléimide. En effet le jour de l'injection du [18F]PNA-DBCO, un problème matériel est survenu sur le cyclotron, et c'est le cyclotron de secours qui a dû être utilisé. De plus, il y a eu des difficultés lors de la purification du composé thiolé marqué au fluor-18 II-15. La dose de PNA réellement marquée au fluor-18 est peut-être en réalité plus faible qu'attendue.

Le fait qu'il n'y ait pas de différence d'élimination par les reins entre les groupes, plus particulièrement entre le groupe 3 (expérience de préciblage) et le groupe 1 ([18F]PNA-DBCO seul), montre que le [18F]PNA-DBCO ne s'est pas lié à la tumeur dans le groupe 3. Cette donnée est confirmée par le fait qu'il n'y ait pas de différence d'accumulation à la tumeur entre le groupe 3 et les autres groupes (Figure 74). De plus, il y a une baisse de la radioactivité avec le temps à la tumeur (y compris en normalisant la baisse naturelle de radioactivité avec le temps). La radioactivité détectée dans la

tumeur n'est donc pas spécifique, tout comme dans les autres organes. La présence de radioactivité dans la tumeur n'est pas le signe d'un marquage de l'anticorps.

L'expérience de préciblage du groupe 3 n'a donc pas été efficace et n'a pas permis un marquage sélectif de la tumeur.

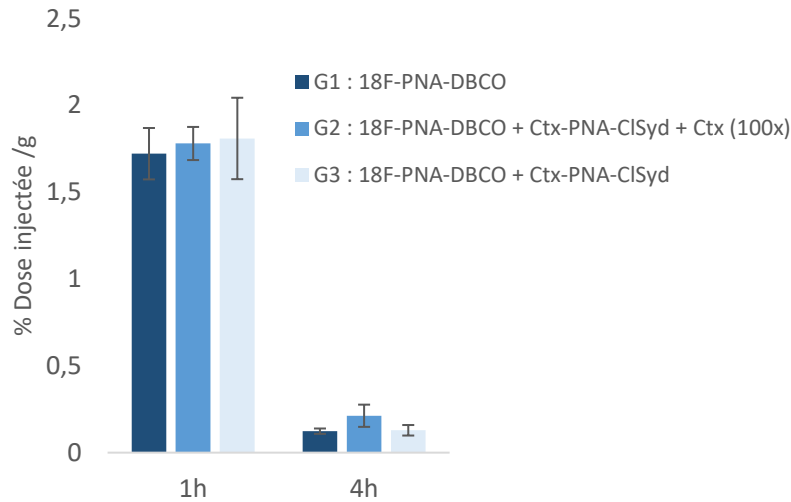


Figure 74. Evolution de la radioactivité au niveau de la tumeur

Les expériences d'imagerie TEP confirment les résultats observés lors de l'étude de la bio-distribution. La radioactivité est observée principalement dans les os et dans les reins, et les images obtenues ne permettent pas de distinguer la tumeur. L'intensité de l'image correspond au pourcentage de dose injectée par  $\text{cm}^3$  (ID/cc : Injected dose per  $\text{cm}^3$ )

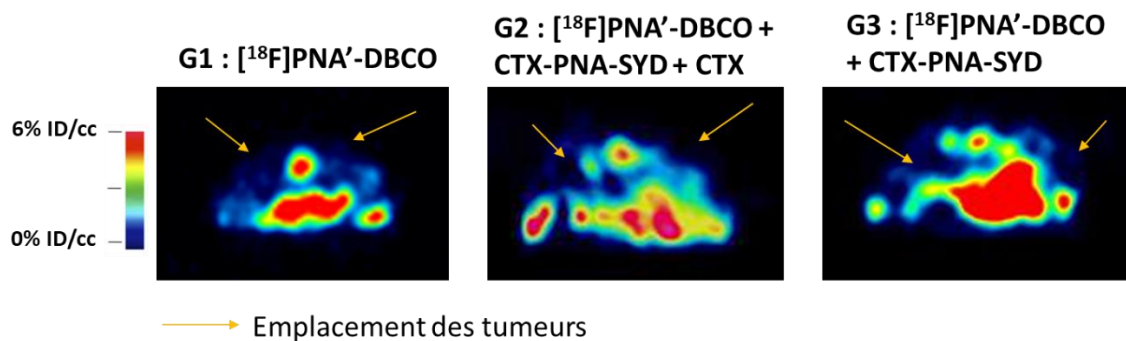


Figure 75. Images TEP des souris après 4 h, vue en tranche

Sur les images obtenues par imagerie TEP du fluor-18, les tumeurs ne sont pas visibles. L'essentiel de la radioactivité se trouve dans la colonne vertébrale (absorption des ions fluorure-18 par les os), dans les intestins et la vessie (élimination des composés marqués au fluor-18) (Figure 75). Sur les images des souris vue de haut, il n'est pas forcément possible de distinguer l'emplacement de la tumeur (Figure 76). Cependant, aucune radioactivité n'est détectée dans la zone concernée, la radioactivité observée se trouvant principalement au niveau des os (du bassin, du crâne ou des épaules) ainsi qu'au niveau des reins.

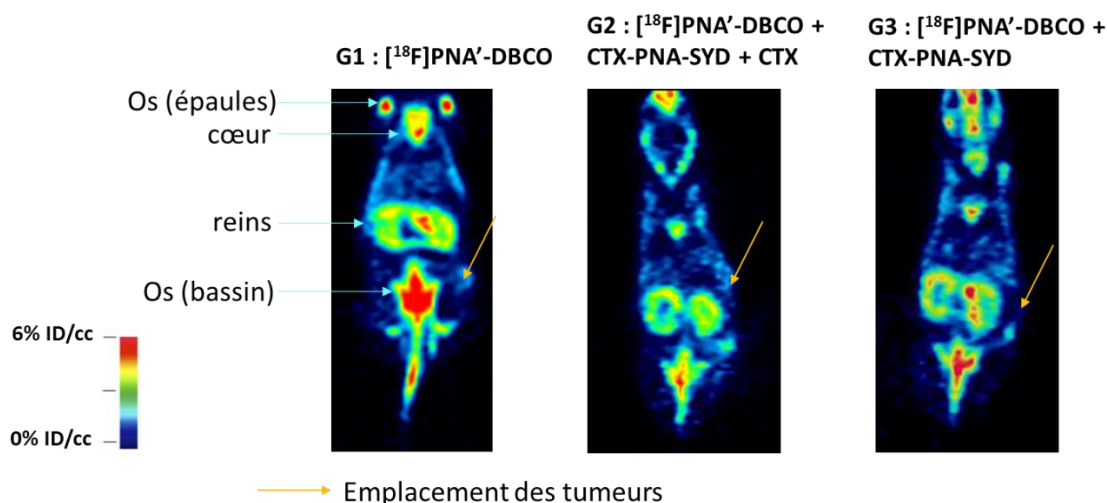


Figure 76. Images TEP des souris après 4 h, vue de haut

En conclusion, de la radioactivité a été observée de manière non spécifique. L'accumulation de celle-ci dans les os laisse à penser que des ions fluorure-18 libres étaient présents dans la solution injectée ou bien se sont formés *in vivo* suite à une dégradation du composé injecté. Il est possible que le radio-marquage du PNA n'ait pas été aussi efficace qu'estimé, ce qui peut jouer sur la quantité réelle de  $[^{18}\text{F}]\text{PNA-DBCO}$  injectée. Si le  $[^{18}\text{F}]\text{PNA-DBCO}$  était minoritaire par rapport au PNA-DBCO froid, la tumeur n'a pas pu être détectée, et ce même si la reconnaissance moléculaire a bien eu lieu.

Le modèle biologique est le même que lors de la preuve de concept de l'utilisation de la réaction de SPSAC pour du préciblage. Il ne semble pas être la source de l'échec de cette expérience de préciblage. Les tests d'affinité ont montré que l'anticorps modifié par les PNAs « Cetuximab-PNA-CISyd II-11 » n'a pas perdu son affinité pour le récepteur EGFR. L'anticorps Cetuximab-PNA-CISyd II-11 est censé s'être accumulé au niveau de la tumeur pendant les trois jours d'incubation et il est très peu probable qu'il ait été éliminé par la souris lors de sa circulation dans l'organisme. Des études pharmacocinétiques plus poussées de cet anticorps pourraient confirmer ce point.

Enfin, il est également possible que l'anticorps Cetuximab-PNA-CISyd II-11 se soit accumulé à la surface de la tumeur, que le  $[^{18}\text{F}]\text{PNA-DBCO II-17}$  ait circulé dans l'organisme et se soit retrouvé au niveau de l'anticorps mais que la réaction de SPSAC n'ait pas eu lieu. Nous pensons cependant que cette hypothèse est peu probable. En effet, il a été montré que la réaction de SPSAC entre une chlorosydnone et un DBCO marqué au fluor-18 était compatible avec l'approche de préciblage.<sup>111</sup> Même si la reconnaissance moléculaire entre les brins PNA n'avait pas eu l'efficacité escomptée, la réaction de SPSAC aurait dû avoir lieu, même avec une cinétique plus lente, et un certain radio-marquage spécifique aurait dû être observé.

Compte tenu du contexte dans lequel la radiosynthèse du  $[^{18}\text{F}]\text{PNA-DBCO II-17}$  s'est déroulée le jour de l'expérience *in vivo* (problème de cyclotron, impossibilité de contrôler la pureté radiochimique du composé avant injection), nous pensons que l'échec de cette expérience doit provenir d'un radiomarquage trop faible du PNA-DBCO II-17. Celui-ci se retrouve alors dilué dans du PNA-DBCO froid et des ions fluorures ce qui expliquerait les résultats de biodistribution obtenus.

Il n'est malheureusement pas possible de conclure à l'issue de cette expérience sur la viabilité de l'approche de préciblage combinant reconnaissance moléculaire des PNAs et chimie click. L'expérience

<sup>111</sup> M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jego, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403

menée n'est pas concluante, mais cela peut être dû à une variété de facteurs. Il aurait pu être intéressant de relancer cette expérience afin de limiter l'impact des facteurs extérieurs, cependant, les études *in vivo* sur les souris sont très coûteuses et très chronophages et cette expérience n'a pas pu être répétée.

### C. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons étudié le marquage d'un anticorps par du fluor-18 *via* une approche de préciblage s'appuyant sur la reconnaissance moléculaire et la chimie click (Figure 77). De nouveaux PNAs ont été synthétisés, inspirés de ceux mis en lumière lors du Chapitre 1 comme étant les plus rapides. Nous avons montré que l'accélération de la réaction par reconnaissance moléculaire s'appliquait aussi à la réaction de SPSAC entre une chlorosydnone et un cyclooctyne. Un bioconjugué anticorps-PNA-chlorosydnone a ensuite été préparé et un PNA-DBCO préalablement synthétisé a été marqué au fluor-18.

Des études *in cellulo* ont été réalisées. Le marquage au fluor-18 de l'anticorps a été observé avec une cinétique rapide et un temps d'incubation des cellules de moins de 20 min, grâce à la combinaison de la réaction de chimie click et de la reconnaissance moléculaire. Il a été prouvé que l'anticorps reconnaissait sa cible même en étant dérivatisé par plusieurs PNAs, ce qui a permis un radio-marquage au fluor-18 de cellules tumorales.

Des études *in vivo* ont également été réalisées. Malheureusement, celles-ci n'ont pas été concluantes et ne nous ont pas permis de conclure sur l'efficacité ou non de la stratégie de préciblage *in vivo* basée sur l'association PNA-chimie click. Les problèmes matériels rencontrés lors de l'expérience peuvent expliquer ce résultat, et ne nous permettent pas de conclure sur la viabilité de cette approche.

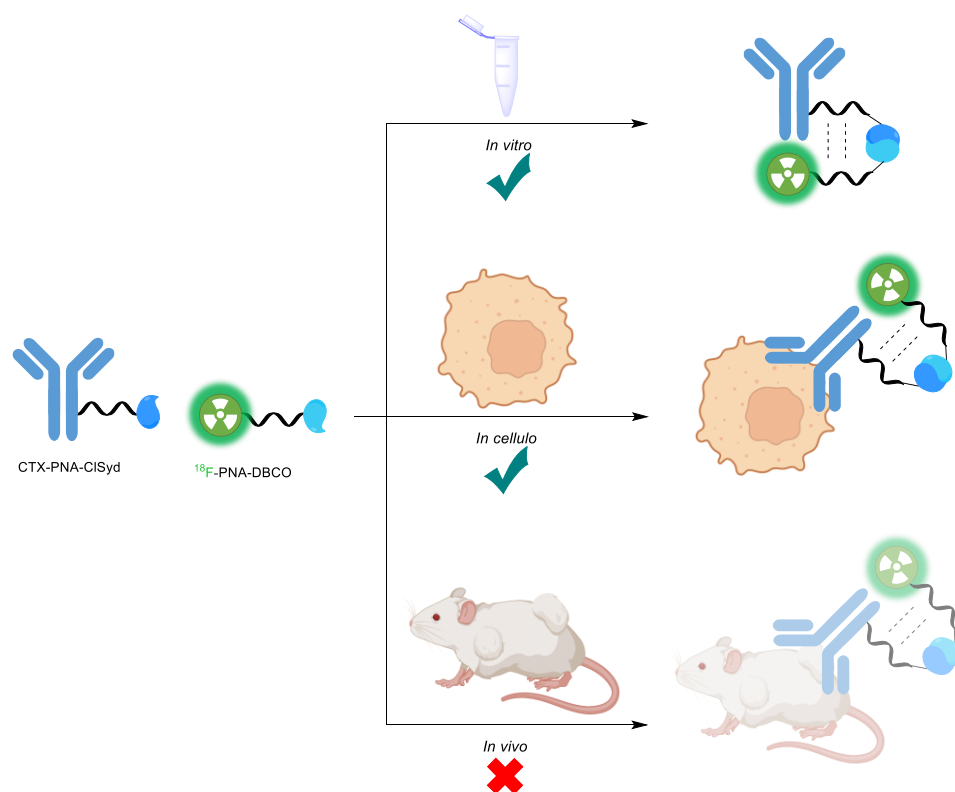


Figure 77. Récapitulatif des expériences de radiomarquage de l'anticorps

Afin de tirer des conclusions plus pertinentes sur cette approche de préciblage combinant chimie click et reconnaissance moléculaire, une nouvelle expérience in vivo serait nécessaire. Malheureusement ces expériences sont très coûteuses, complexes à organiser et prennent un temps conséquent.





# Chapitre 3. Synthèse de nouvelles iminosydnonnes par stratégie de $S_NAr$

## I. Introduction

Nous avons décrit dans les deux premiers chapitres nos travaux visant à accélérer la réaction entre les iminosydnonnes et les cyclooctynes, en utilisant le phénomène de reconnaissance moléculaire à l'aide de PNAs. Dans ce chapitre, nous souhaitons améliorer la cinétique de cette réaction à l'aide de nouvelles iminosydnonnes plus réactives, que nous souhaitons synthétiser selon une nouvelle voie de synthèse. Dans un premier temps, nous présenterons les différents types d'iminosydnonnes existant ainsi que les différentes voies de synthèse développées dans la littérature. Enfin, nous présenterons les objectifs du projet.

### A. Les iminosydnonnes et leurs voies de synthèse

Nous avons vu précédemment tout l'intérêt des composés mésoioniques, plus particulièrement les sydnones et les iminosydnonnes qui peuvent être impliquées dans des réactions de cycloadditions bioorthogonales. Pour ces différentes applications, il est très intéressant d'accéder à la plus grande diversité structurale possible, pour pouvoir élargir leur champ d'application.

Grâce au développement de différentes voies de synthèse, plusieurs catégories d'iminosydnonnes ont pu émerger (Figure 78). De par leur structure unique, leurs fonctionnalisations ne s'effectuent qu'en position N3, C4 ou N6. C'est le substituant présent en position N6 qui sera relargué lors d'une réaction de « click and release », et c'est aussi le type de substituant sur cette position qui influence le plus les cinétiques de cycloadditions. En effet, plus l'azote est riche en électrons, plus la cinétique de cycloaddition est rapide. Par conséquent, les iminosydnonnes sont divisées en catégories selon la fonction présente position N6.

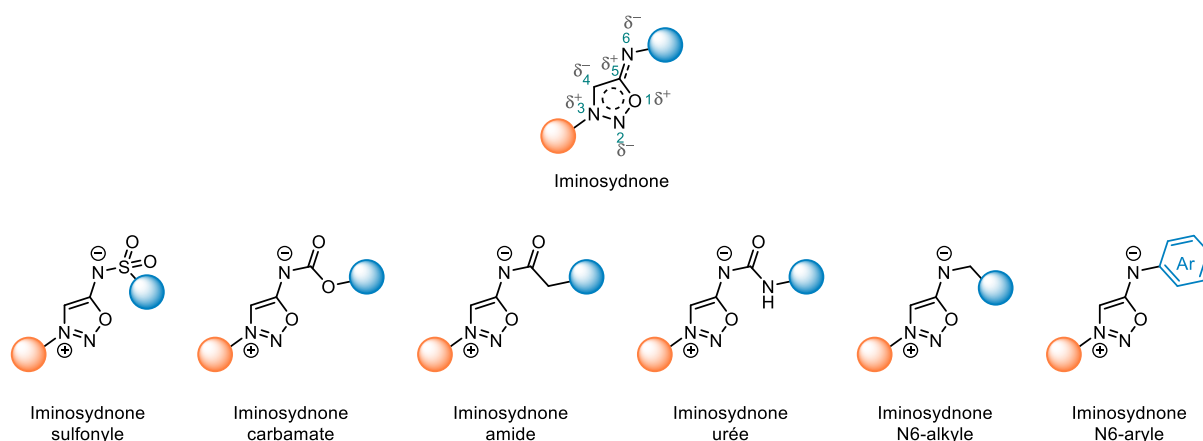


Figure 78. Différentes catégories d'iminosydnonnes

Les premières iminosydnonnes développées furent les iminosydnonnes amide, sulfonyle, carbamate et urée. Ces différents composés sont obtenus à partir d'un sel d'iminosydnone commun réagissant

avec un électrophile fort pour donner le produit voulu (Schéma 79a).<sup>112</sup> Ces conditions réactionnelles nécessitent parfois l'utilisation de composés dangereux comme le triphosgène, et de nombreuses optimisations sont souvent nécessaires pour obtenir des rendements acceptables. Une nouvelle voie de synthèse des iminosydnone urée a été récemment développée par notre laboratoire.<sup>113</sup> L'azote exocyclique N6 est activé par réaction avec du carbonyl-diimidazole (CDI), pour former une urée comportant un motif imidazole, qui est méthylé en imidazolium pour former un meilleur groupe partant. Cette nouvelle voie de synthèse permet une fonctionnalisation par des composés nucléophiles (Schéma 79b).

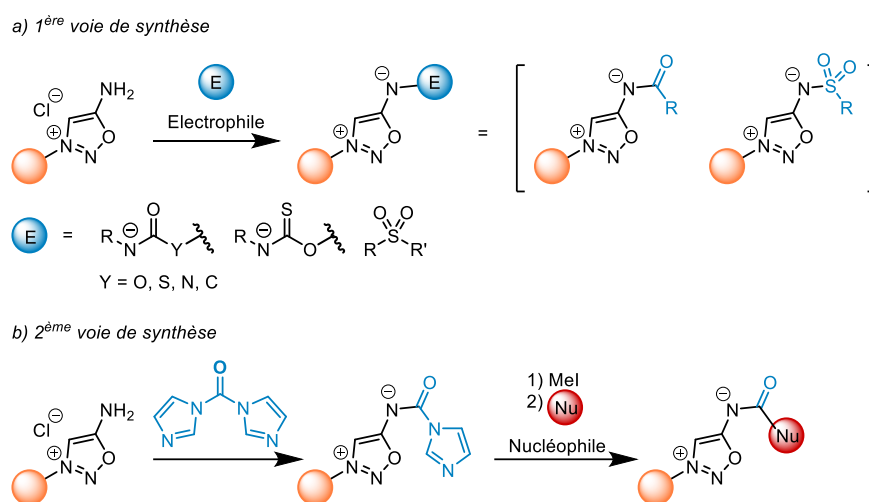


Schéma 79. Voies de synthèse des iminosydnone sulfonyle, carbamate et urée

Ces différentes voies de synthèse permettent d'avoir une plus grande variété de composés en position N-exocyclique, mais toujours avec la présence d'un carbonyle. Cela présente deux inconvénients majeurs. Le premier est que lors d'une réaction de « click and release », après une cycloaddition, l'isocyanate relargué est spontanément hydrolysé en sulfonamide, urée ou amide terminale. Ces fonctions sont limitantes et il n'est pas possible avec ces iminosydnone sulfonyle, carbamate et urée est leur cinétique de cycloaddition. En effet, en réaction avec le DBCO, les constantes de vitesse des iminosydnone sulfonyle, carbamate et urée sont respectivement autour de  $10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et  $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Ces constantes de vitesse ne sont pas très rapides et ne sont pas spécialement adaptées à toutes les applications biologiques.

Par conséquent, le développement d'autres catégories d'iminosydnone, en particulier avec des substitutions différentes en position N6, est extrêmement important. Des travaux récents du laboratoire (thèse de Maxime Ribéraud) ont montré que des substitutions aryl ou alkyl en position N6 pouvaient améliorer de façon très significative les cinétiques de cycloaddition. Plusieurs méthodes pour obtenir ces composés ont été développées récemment dans notre laboratoire. Ces méthodes feront prochainement l'objet d'une publication.

La première méthode développée est une amination réductrice par le tétra-acétoxyborohydrure de sodium. L'iminosydnone réagit avec un aldéhyde en présence d'un réducteur en milieu acide. Ainsi, il

<sup>112</sup> M. Riomet, E. Decuypere, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, and F. Taran, *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24, 8535–8541

<sup>113</sup> M. Riomet, K. Porte, L. Madegard, P. Thuéry, D. Audisio, and F. Taran, *Org. Lett.* **2020**, 22, 6, 2403–2408

est possible d'obtenir des iminosydnones substituées par un groupement alkyl en position N6 (Schéma 80).

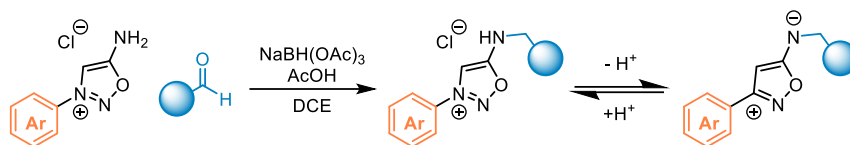


Schéma 80. Obtention de 6-*N*-alkyl-iminosydnones par amination réductrice

Cette méthode permet d'introduire une variété de fonctions chimiques en position N6, mais en pratique beaucoup d'aldéhydes se sont révélés incompatibles. Un alkyl-isocyanate est libéré après la réaction de « click and release » avec un cyclooctyne. En milieu aqueux, cet isocyanate alkylé est hydrolysé en amine primaire avec une vitesse plus faible que les isocyanates comportant une fonction carbonyle en position alpha. Il peut donc également réagir avec d'autres nucléophiles initialement présents dans le milieu. Les 6-*N*-alkyl-iminosydnones sont beaucoup plus réactives que les catégories d'iminosydnones précédentes, mais certaines d'entre elles sont parfois instables et peuvent se dégrader rapidement. Il est important de trouver un compromis entre la réactivité de ces composés et leur stabilité. En effet, plus l'azote exocyclique est enrichi, plus l'iminosydnone est réactive, mais moins elle est stable. Une bonne alternative serait d'avoir accès aux 6-*N*-aryl-iminosydnones, mais il n'est pas possible de les obtenir par amination réductrice.

Une nouvelle voie de synthèse pour obtenir des iminosydnones dérivées par un groupement aryl en N6 a été développée au laboratoire par Maxime Ribéraud, dans le cadre de son doctorat. Cette voie implique la synthèse directe du noyau iminosydnone, plutôt qu'une post-fonctionnalisation de l'azote N6. En partant de 2-nitroso-amino-acétamide, une réaction de cyclodéshydratation permet d'accéder au dérivé 6-*N*-arylique (Schéma 81).

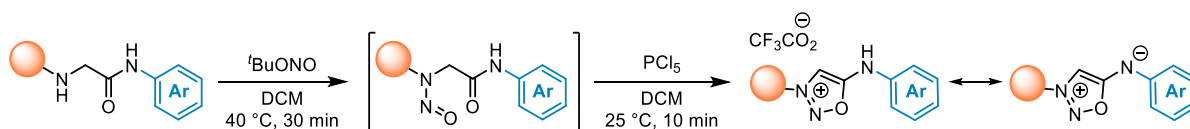


Schéma 81. Obtention de 6-*N*-aryl-iminosydnones par nitrosylation d'amino-acétamides, puis cyclodéshydratation

Cette méthode est très efficace et rapide, elle permet d'obtenir une variété de composés 6-*N*-aryl-iminosydnones. Cependant, les conditions relativement drastiques ( $\text{PCl}_5$ ) ne sont pas compatibles avec certaines fonctionnalités comme les fonctions alcool, acide carboxylique, alcyne ou même azoture. Les 6-*N*-aryl-iminosydnones cycloadditionnent rapidement en présence de DBCO, (Schéma 82), tout en étant plus stables que leurs homologues alkyls. Comme les 6-*N*-alkyl-iminosydnones, les 6-*N*-aryl-iminosydnones libèrent un isocyanate qui peut être hydrolysé ou réagir avec des nucléophiles présents dans le milieu. Cette propriété de libération d'un aryl-isocyanate peut être fort utile pour de futures applications, tel que le piégeage de bionucléophiles à l'intérieur de cellules.

Les 6-*N*-aryl-iminosydnones sont d'un grand intérêt de par leurs constantes de vitesse de cycloaddition plusieurs centaines de fois supérieures à celles des iminosydnones carbonylées (Schéma 82) mais aussi par leur stabilité.

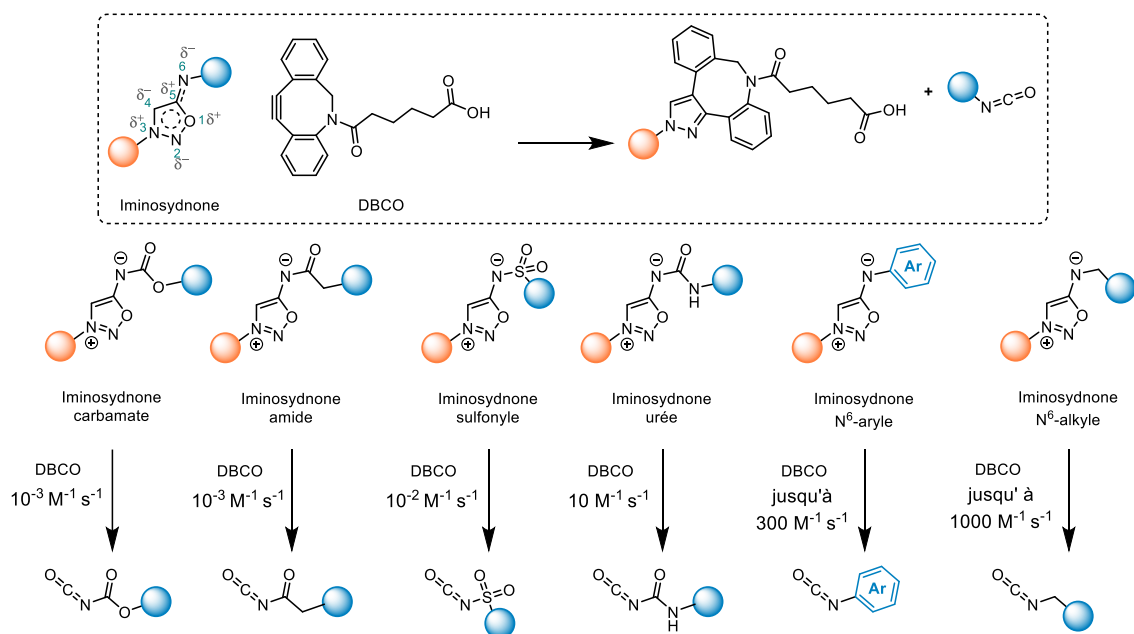


Schéma 82. Cinétiques de cycloaddition des différentes catégories d'iminosydones

## B. Objectifs du projet

Nous proposons dans ce chapitre de développer une nouvelle voie d'accès aux 6-*N*-aryl-iminosydones, en nous inspirant d'une méthode de synthèse décrite pour d'autres composés mésoioniques beaucoup moins étudiés, les sydnones méthides. Ces composés ont été synthétisés pour la première fois en 1985 par le groupe de Butsugan.<sup>114</sup> Remises au goût du jour par Schmidt et son équipe en 2021 pour des applications en chimie organométallique, les sydnones méthides sont très peu décrites.<sup>115</sup> Leur synthèse s'effectue en deux étapes, une première étape implique la triflation de la sydnone par de l'anhydride triflique, puis l'ajout d'un carbanion, préalablement formé en présence d'une base, permet d'accéder à la sydnone méthide désirée. Le carbanion est obtenu à partir de dérivés de méthylènes activés par des groupements électroattracteurs. Le mécanisme proposé par les auteurs implique la formation soit de la sydnone triflée, soit d'un dimère de sydnone qui subirait alors une substitution nucléophile aromatique ( $S_NAr$ ) par le carbanion (Schéma 83).

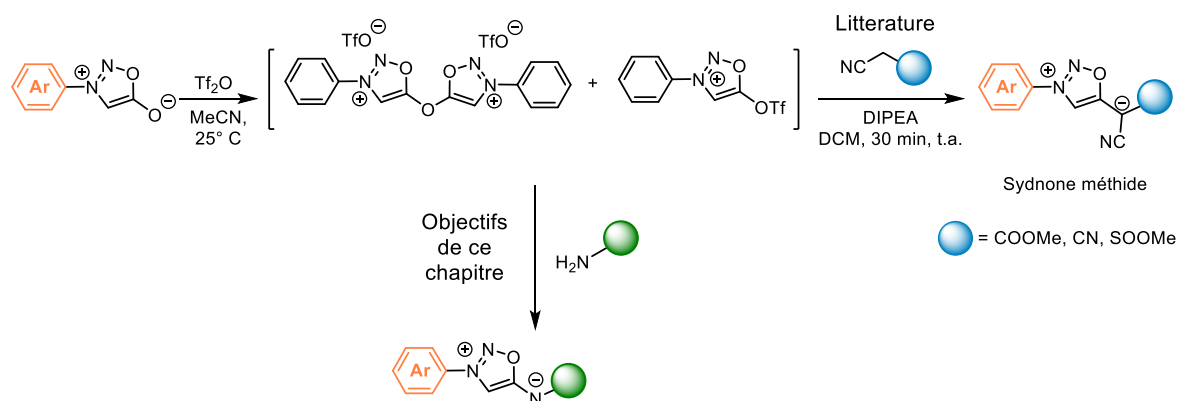


Schéma 83. Étude de la réaction de  $S_NAr$  pour obtenir des iminosydones

<sup>114</sup> S. Araki, J. Mizuya et Y. Butsugan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1985**, 1, 2439–2441

<sup>115</sup> S. Mummel, F. Lederle, E.G. Hübner, J.C. Namyslo, M. Nieger and A. Schmidt, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2021**, 60, 18882–18887

Cette voie de synthèse par substitution nucléophile aromatique ( $S_NAr$ ) ouvre de nouvelles perspectives de synthèse pour d'autres composés mésoioniques. Dans la continuité de ces travaux, nous étudierons dans cette partie la synthèse de 6-*N*-aryl-iminosydnone par réaction de  $S_NAr$ , en commençant par le développement et l'optimisation de la méthodologie, l'étude du mécanisme de la réaction puis en abordant son étendue. L'objectif est d'obtenir de nouvelles iminosydnone et d'évaluer l'étendue de la réaction en espérant que sa compatibilité fonctionnelle soit meilleure que celle de la réaction de cyclodéshydratation au  $PCl_5$ .

Cette nouvelle voie de synthèse offre la possibilité d'obtenir de nouveaux composés d'intérêt et ainsi d'explorer leur réactivité dans des réactions de cycloadditions.

## II. Exploration de la réaction

Avant d'étudier la réaction de  $S_NAr$  avec des amines, nous avons voulu étudier le mécanisme d'activation de la sydnone par le  $Tf_2O$ .

### A. Etude du mécanisme

D'après une étude du groupe de Butsugan en 1985,<sup>114</sup> la sydnone mise en présence de  $Tf_2O$  formerait exclusivement le dimère **III-2b** (Schéma 84), résultant de l'attaque de la sydnone sur elle-même une fois activée par  $Tf_2O$ . Cette hypothèse repose sur une analyse en RMN  $^{19}F$  du brut réactionnel montrant un unique pic à 87 ppm, ce qui exclut un mélange avec une forme triflée de la sydnone. Cependant, en 2021, l'équipe de Schmidt a revendiqué obtenir un mélange entre la forme dimère **III-2b** et la forme sydnone triflée **III-2a** (Schéma 84).

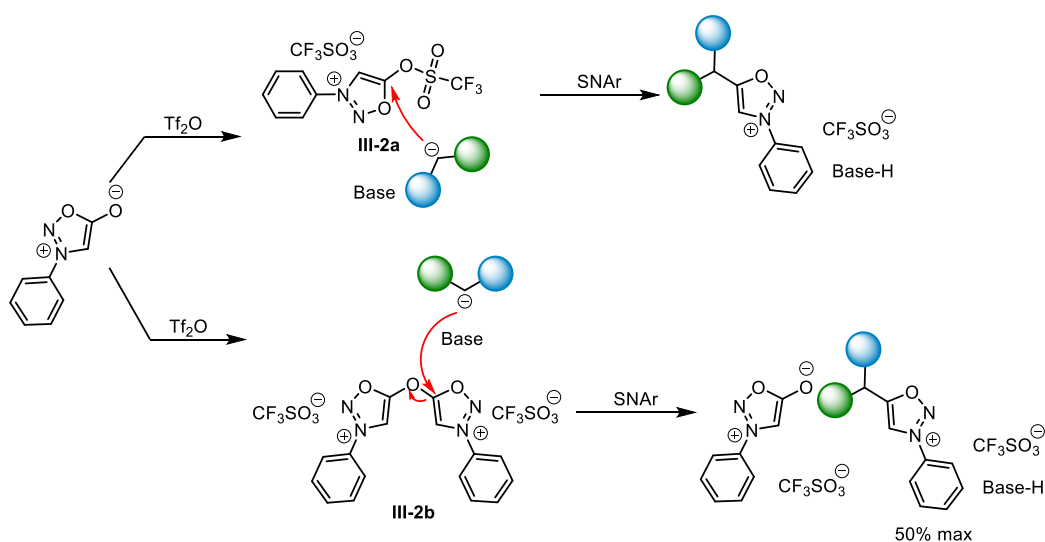


Schéma 84. Mécanismes supposés pour la réaction de  $S_NAr$

Le groupe de Schmidt a obtenu des rendements allant jusqu'à 71% pour la formation de sydnones méthides obtenues par  $S_NAr$  d'un carbanion sur la sydnone activée. Ces rendements vis-à-vis de la sydnone, qui est le réactif limitant, ne sont pas possibles si la forme dimère est la seule présente. Il est donc possible qu'un mélange des deux formes soit obtenu.

A la vue de ces différents résultats, nous avons voulu étudier le mécanisme d'activation de la sydnone, pour savoir quelles sont les formes obtenues et quelles sont les formes actives pour la réaction de  $S_NAr$ . Ces travaux ont été réalisés avec l'aide de Maxime Ribéraud, doctorant du laboratoire.

Une expérience avec de l'eau lourde  $[^{18}O]H_2O$  a été réalisée. Dans un premier temps, la sydnone **III-1** a été activée avec 0,5 équivalent de  $Tf_2O$ . Une RMN du fluor-19 a été effectuée afin de contrôler la consommation totale du  $Tf_2O$  avant ajout de l'eau lourde. Si la forme dimère **III-2b** est la forme active, alors seule de la sydnone marquée devrait être observée, avec un enrichissement isotopique de 50%. En revanche si la forme triflée **III-2a** est la forme active, le triflate peut être hydrolysé par l'eau lourde ( $[^{18}O]H_2O$ ) et du triflate marqué peut être observé (Schéma 85).

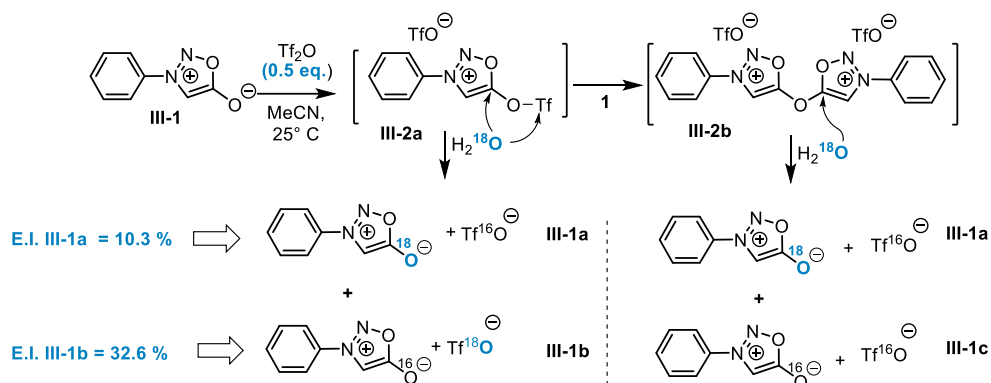


Schéma 85. Réaction de  $[^{18}O]H_2O$  sur la sydnone activée au  $Tf_2O$ , E.I. : enrichissement isotopique

Seul 0,5 équivalent de  $Tf_2O$  ont été ajoutés sur la sydnone afin de favoriser la forme dimère **III-2b**, ce qui donne un enrichissement isotopique théorique maximal de 50%, cependant, le produit marqué majoritairement observé dans la réaction est le sel **III-1b**  $[^{18}O]TfO^-$ , enrichi à hauteur de 32.6%. Il s'agit du produit d'hydrolyse résultant de l'addition nucléophile de l'eau lourde sur le soufre du triflate. La sydnone marquée à l' $^{18}O$  (**III-1a**), provenant de l'intermédiaire **III-2a** ou **III-2b**, ne représente qu'un quart du total des produits marqués : seul 10,3% d'enrichissement a été observé par spectrométrie de masse à haute résolution. Ces résultats semblent confirmer que la forme triflée **III-2a** est la principale espèce formée lors de la réaction avec l'anhydride triflique. De plus, ces résultats montrent une compétition entre la réaction de  $S_NAr$  et l'addition nucléophile sur l'atome de soufre du triflate.

## B. Optimisation de la $S_NAr$

Après avoir élucidé le mécanisme d'activation de la sydnone par l'anhydride triflique, nous avons commencé l'optimisation de la réaction de  $S_NAr$ . Cette optimisation a été effectuée sur la phényl-sydnone **III-1**. Cette sydnone est obtenue par nitrosylation de la *N*-phénylglycine par du *t*BuONO, suivie d'une cyclisation après ajout d'anhydride acétique. Cette sydnone est facile à obtenir en grande quantité et est un substrat électroniquement neutre.

Deux amines d'intérêt ont été choisies pour effectuer les réactions d'optimisation : l'aniline et la benzylamine. Ces deux amines permettent d'obtenir deux produits modèles, appartenant aux deux classes d'iminosydnones les plus réactives, respectivement les 6-*N*-aryl-iminosydnones et 6-*N*-alkyl-iminosydnones. Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de la réaction entre la sydnone **III-1** et la benzylamine (Schéma 86). Le suivi a été effectué par RMN en observant le déplacement du proton en position C4, qui passe de 6,7 ppm pour la sydnone, à plus de 8,6 ppm pour l'iminosydnone **III-3**. La benzylamine triflée observée a été quantifiée par LC-MS.

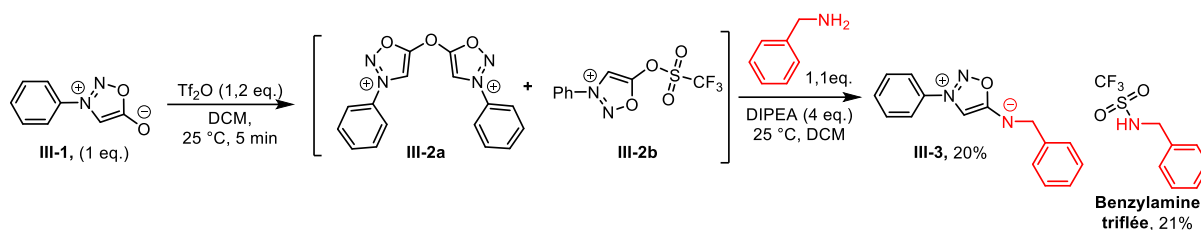


Schéma 86. Première tentative de  $S_NAr$  avec la benzylamine selon le protocole de Schmidt

Les premières conditions testées sont celles utilisées par le groupe de Schmidt pour former des sydnones méthides. La sydnone est dissoute dans le dichlorométhane, puis 1,2 équivalent de  $Tf_2O$  est ajouté à cette solution. Cette première solution est agitée à température ambiante pendant 5 minutes. Dans une autre solution sont dissouts 1,1 équivalent de benzylamine, ainsi que 4 équivalents de DIPEA. La première solution est ajoutée sur la deuxième, puis agitée à température ambiante pendant 2 h. 20% de conversion en iminosydnone attendue ont pu être détectés par RMN, ainsi que 21% de benzylamine triflée. La formation de cette dernière n'est pas surprenante puisqu'un excès de 0,2 équivalent de  $Tf_2O$  est utilisé dans la réaction. Ce résultat nous a encouragé à poursuivre cette étude par une optimisation des conditions réactionnelles en faisant varier la nature du solvant, de la base et d'éventuels additifs. Les temps de réaction ont été baissés à 15 min après addition de l'amine, puisqu'aucune évolution n'a été détectée après ce temps réactionnel.

Les premières conditions d'optimisation sont résumées Tableau 11.

Tableau 11. Premières conditions d'optimisation de la  $S_NAr$  avec la benzylamine

Entrée	Solvant	Base	Temp.	Benzylamine (eq)	% III-3	% Amine triflée
1	DCM	DIPEA	t.a.	1,1	20	21
2	DCM	DIPEA	40 °C	1,1	25	27
3	DCM	DIPEA	40 °C	2	31	27
4	MeCN	DIPEA	t.a.	1,1	31	40
5	MeCN	DIPEA	40 °C	2	39	40
6	MeCN	-	40 °C	2	30	40
7	MeCN	DMAP	40 °C	2	20	33
8	MeCN	DABCO	40 °C	2	47	3
9	MeCN	Pyridine	40 °C	2	Dégradation	n.d.
10	MeCN	Et <sub>3</sub> N	40 °C	2	50	36
11	MeCN	Et <sub>3</sub> N	60 °C	2	Dégradation	n.d.
12	MeCN	Et <sub>3</sub> N	80 °C	2	Dégradation	n.d.
13	THF	Et <sub>3</sub> N	40 °C	2	45	n.d.
14	Chloroforme	Et <sub>3</sub> N	40 °C	2	42	11
15	Toluène	Et <sub>3</sub> N	40 °C	2	55	n.d.
16	DMF	Et <sub>3</sub> N	40 °C	2	Dégradation	n.d.
17	Et <sub>3</sub> N	Et <sub>3</sub> N	40 °C	2	Dégradation	n.d.



Le rendement RMN en iminosydnone est faible avec les conditions utilisées par le groupe de Schmidt (Tableau 11, Entrée 1). En changeant le DCM pour de l'acétonitrile, la conversion de la réaction s'améliore, augmentant d'un tiers (Tableau 11, Entrée 4). L'utilisation de la benzylamine en excès plus important (2 équivalents au lieu de 1,1) donne un meilleur rendement en iminosydnone (Tableau 11, Entrées 2 et 3). La benzylamine triflée est observée en quantité importante, mais le nombre d'équivalents de benzylamine ne semble pas influencer sur ce résultat. Une augmentation de la température à 40 °C améliore le rendement en iminosydnone (Tableau 11, Entrées 2 et 5). Pour tenter d'augmenter d'avantage la conversion, la température a été augmentée à 60 °C et 80 °C, mais seule de la dégradation a été observée (Tableau 11, Entrées 11 et 12). Certaines iminosydnones sont instables à ces températures, il vaut donc mieux garder des conditions de température à 40 °C.

Nous avons également fait varier les bases utilisées dans cette réaction (Tableau 11, Entrées 5 à 9). Il est à noter que la réaction fonctionne en l'absence de base, avec une conversion de 30%. Le rendement augmente jusqu'à 50% dans le cas de la triéthylamine. En revanche, la présence de pyridine dans le milieu a entraîné une dégradation. Les amines ayant une action bénéfique sur la réaction sont les amines tertiaires, en particulier la triéthylamine qui permet d'augmenter le rendement d'une vingtaine de %. Le rôle de cette base dans cette réaction n'est pas très clair. Elle pourrait activer le Tf<sub>2</sub>O pour former une espèce plus électrophile, elle pourrait aussi réagir sur l'iminosydnone triflée et former un ammonium susceptible de subir une S<sub>N</sub>Ar en créant ainsi un meilleur groupe partant pour l'attaque nucléophile de la benzylamine sur la sydnone (Schéma 87). Si ce mécanisme d'action est possible, l'intermédiaire réactionnel ammonium n'a cependant jamais été observé par LC-MS ou par RMN.

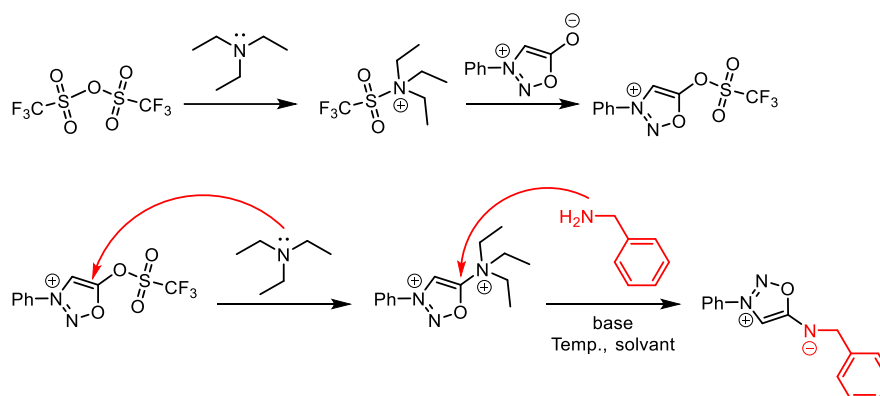


Schéma 87. Rôles possibles des amines tertiaires dans la réaction de S<sub>N</sub>Ar

Lors de la réaction, la benzylamine triflée est systématiquement observée en quantité non négligeable, supérieure au 20% qui seraient dus à l'excès de Tf<sub>2</sub>O, et ce avec la plupart des conditions testées. Il existe donc une véritable compétition entre la réaction de S<sub>N</sub>Ar et l'addition de l'amine sur le soufre de la sydnone triflée. L'implication de l'amine utilisée dans ces réactions parasites peut expliquer en partie les conversions relativement faibles observées (Schéma 88). Ce résultat est en adéquation avec ceux de l'étude mécanistique puisque la réaction majoritairement observée était l'hydrolyse du triflate.

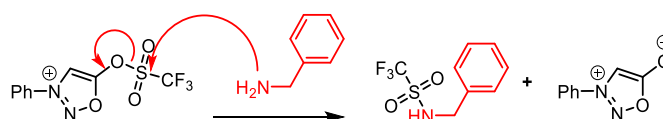


Schéma 88. Réaction parasite observée lors de la réaction de S<sub>N</sub>Ar

Une optimisation du solvant a également été effectuée (Tableau 11, Entrées 13 à 17). Les conversions en iminosydnone restent du même ordre de grandeur pour les différents solvants testés

Le rendement RMN est légèrement supérieur avec le toluène (Tableau 11, Entrée **15**), mais des problèmes de solubilité nous feront préférer l'acétonitrile pour la réaction de  $S_NAr$ . Le DMF est un solvant qui peut réagir avec le  $Tf_2O$  à la place de la sydnone, il est logique que la réaction n'ait pas fonctionné avec ce solvant (Figure 79), de même que pour la triéthylamine lorsque celle-ci est utilisée comme solvant (Tableau 11, Entrées **16** et **17**).

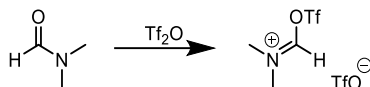


Figure 79. Espèce réactive formée dans le DMF

Les meilleures conditions se dégageant de cette optimisation sont l'acétonitrile comme solvant, en présence de deux équivalents de benzylamine, de quatre équivalents de triéthylamine et à 40 °C. Ces conditions permettent une conversion de 50% de la sydnone en iminosydnone souhaitée. Lors du suivi de la réaction, le produit est observé très rapidement, en moins de 10 minutes, et aucune évolution n'est observée après ce temps-là. La moitié de la sydnone **III-1** est retrouvée en fin de réaction.

Les conditions utilisées jusqu'à présent ne permettent qu'une conversion partielle de la sydnone en iminosydnone. Si ces résultats s'expliquent notamment par la compétition entre la réaction de  $S_NAr$  et celle de formation de la benzylamine triflée par addition nucléophile de la benzylamine sur le soufre du triflate, cela est peut-être également dû à l'activation partielle de la sydnone par le  $Tf_2O$ . Plusieurs agents activants ont donc été testés (Tableau 12, Figure 80). Ces essais ont été effectués par Maxime Ribéraud, doctorant du laboratoire.

Tableau 12. Optimisation de l'agent activant

Entrée	Agent activant (1,2 eq.)	% III-3
<b>1</b>	$Tf_2O$	50
<b>2</b>	$Ts_2O$	0
<b>3</b>	$TsCl$	0
<b>4</b>	TFAA	0
<b>5</b>	AcCl	0
<b>6</b>	TfCl	0

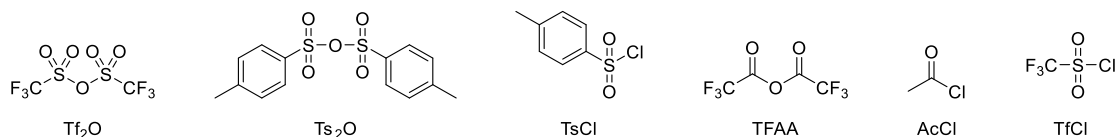


Figure 80. Structure des agents activants

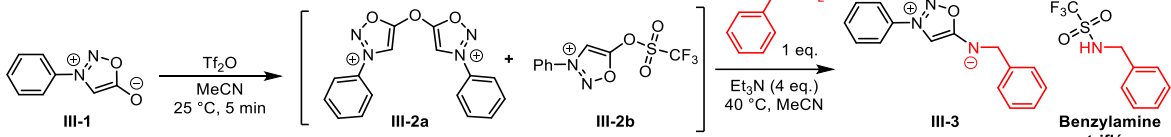
Aucun agent activant autre que le  $Tf_2O$  n'a permis une activation de la sydnone pour la réaction de  $S_NAr$ . Le  $Tf_2O$  reste donc le composé utilisé pour la suite des réactions.

Les conditions d'ajout des réactifs ont également été étudiées, avec l'ajout de la sydnone au goutte à goutte dans le  $Tf_2O$ , au lieu du  $Tf_2O$  sur la sydnone. De même, la solution contenant l'amine et la base a été ajoutée sur celle contenant la sydnone activée par le  $Tf_2O$  au lieu du contraire. Les réactifs ont

également été mélangés à  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  avant d'être chauffés à  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans une autre expérience. Aucune différence sur le taux de conversion n'a été observée en fonction de l'ordre d'ajout des réactifs.

L'optimisation de la réaction a été effectuée jusque-là avec la sydnone comme réactif limitant. Cependant, comme la conversion n'est pas complète, et qu'au moins 50% de sydnone restante est observée dans les meilleures conditions, nous avons voulu utiliser la sydnone en excès. De plus, dans l'optique d'étendre la réaction à des amines diversifiées, notamment des composés complexes comme des médicaments, il est intéressant de ne pas perdre de réactif pouvant être précieux et complexe à synthétiser. Ainsi, la réaction a été réalisée dans les conditions déterminées précédemment mais avec la sydnone en excès (Tableau 13).

Tableau 13. Variation du nombre d'équivalents



Entrée	Benzylamine (eq.)	Sydnone (eq.)	Tf <sub>2</sub> O (eq.)	% III-3	% Amine triflée
1	1	1	1,2	50	36
2	1	2	2	60	0
3	1	3	3	66	0

Quand la sydnone est en excès, le rendement brut de formation de l'iminosydnone augmente légèrement. Pour des amines complexes, il peut donc être intéressant d'utiliser la sydnone en excès. La benzylamine triflée n'a par ailleurs pas été observée lorsque la sydnone est en excès.

Cette optimisation, faite sur la benzylamine, permet d'obtenir environ 50% d'iminosydnone. Malgré nos efforts nous n'avons pas pu améliorer de façon significative ce rendement brut. Nous avons alors confirmé que cette réaction fonctionnait bien en batch. L'iminosydnone désirée **III-3** a été isolée avec un rendement de 40 % avec les conditions du Tableau 11 Entrée **10** : sydnone **III-1** (1 eq.), Tf<sub>2</sub>O (1,2 eq.), benzylamine (2 eq.), Et<sub>3</sub>N (4 eq.), MeCN,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Les 6-*N*-alkyl-iminosydnones étant moins stables que les 6-*N*-aryl-iminosydnones, nous avons voulu étendre cette optimisation en utilisant l'aniline comme amine modèle (Schéma 89).

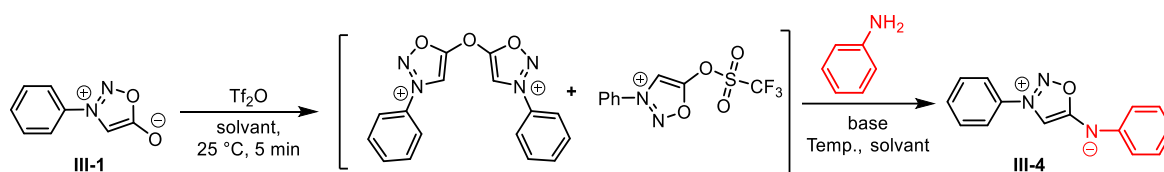
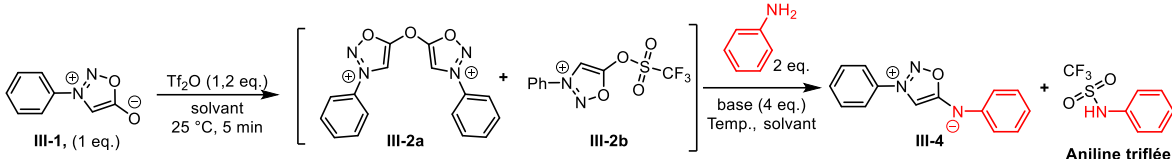


Schéma 89. Optimisation envisagée pour la synthèse de la 3,6-diphényl iminosydnone

Pour cette optimisation, l'utilisation de la LC-MS n'était pas possible car les temps de rétention de la sydnone et de l'iminosydnone-aryle sont les mêmes. Le suivi par RMN n'était pas possible non plus : en milieu basique, le proton du carbone C4 de l'iminosydnone **III-4** est très labile et cette position est déprotonée. Cela a pour conséquence un déplacement important de tous les pics aromatiques selon si l'iminosydnone est protonée ou non, ce qui rend le suivi RMN compliqué. Le produit **III-4** a donc été systématiquement isolé pour pouvoir déterminer le rendement de la réaction lors de cette partie de l'optimisation.

Nous avons dans un premier temps fait varier la température de réaction pour voir si cela pouvait avoir un effet (Tableau 14).

Tableau 14. Optimisation de la température pour l'obtention de l'iminosydnone III-4



Entrée	Base	Solvant	Température	Rendement (%)	% Aniline triflée
1	Et <sub>3</sub> N	MeCN	40 °C	44	19
2	Et <sub>3</sub> N	MeCN	60 °C	40	25
3	Et <sub>3</sub> N	MeCN	80 °C	40	17
4	NaH	THF	40 °C	Pas de conversion	n.d.
5	tBuONa	THF	40 °C	Dégradation	n.d.

Le produit de cette réaction III-4 ne se dégrade pas à de plus fortes températures (Tableau 14, Entrées 2 à 3), mais le rendement n'est pas amélioré par une augmentation de température au-delà de 40 °C, c'est donc la température qui est conservée pour l'obtention des 6-N-aryl-iminosydnones. Des bases plus fortes que celles investiguées auparavant ont été mises en réaction avec l'aniline (Tableau 14, Entrées 4 et 5). En déprotonant l'aniline, celle-ci pourrait devenir très fortement nucléophile et donc plus réactive. Les réactions ont été effectuées dans du THF pour pouvoir solubiliser les bases fortes. Seule la sydnone a été observée en utilisant de l'hydru de sodium, et une dégradation totale en présence de tert-butylate de sodium a été observée. Comme précédemment, l'amine triflée (ici l'aniline) a été observée. Les 20% d'aniline triflée observés correspondent principalement à l'excès de Tf<sub>2</sub>O présent dans la réaction. Finalement, les conditions optimisées en utilisant la benzylamine ont été utilisées pour isoler l'iminosydnone-phényle III-4 avec un rendement de 44 %. Ces conditions sont celles qui seront utilisées pour l'exemplification de la réaction.

Cette étude a montré qu'il était possible de synthétiser des 6-N-alkyl- mais aussi des 6-N-aryl-iminosydnones en utilisant une réaction de S<sub>N</sub>Ar sur des sydnones activées par un groupement triflate. Au cours de l'optimisation de cette réaction de nombreux paramètres ont été explorés (solvant, température, nature de la base, stœchiométrie, agent d'activation, etc.), mais malheureusement la réaction semble plafonner à un plateau autour de 50% de rendement. Malgré ces rendements moyens, nous avons voulu étudier l'étendue de la réaction, afin d'obtenir une diversité de nouvelles iminosydnones.

### III. Synthèse et propriétés des 6-N-aryl-iminosydnone par réaction $S_NAr$

#### A. Etendue de la réaction

Suite à ces travaux d'optimisation, nous avons voulu explorer l'étendue réactionnelle de la  $S_NAr$  pour la synthèse d'iminosydnone. Dans un premier temps, nous avons conservé la 6-N-phényl-sydnone- **III-1** et fait varier l'amine utilisée. Nous nous sommes focalisés sur les amines aromatiques, dans le but d'obtenir des 6-N-aryl-iminosydnone qui sont stables et réactives.

Comme nous l'avons vu précédemment, le point faible de cette nouvelle réaction est son manque d'efficacité en termes de rendements. En revanche, nous espérons que cette nouvelle méthode permettra d'obtenir des iminosydnone qu'il est impossible d'obtenir autrement, avec notamment une plus grande tolérance pour certaines fonctions chimiques que les voies de synthèse développées auparavant.

De nombreuses amines aromatiques avec des fonctions diversifiées ont ainsi été testées et il apparait que plusieurs fonctions chimiques sont compatibles avec cette réaction. Cependant, un inconvénient majeur est apparu : la purification des composés obtenus. Les iminosydnone obtenues sont très polaires, mais leur temps de rétention est très proche voire identique à celui de la sydnone en phase inverse. De plus, les 6-N-aryl-iminosydnone sont parfois instables sur silice et se dégradent lors d'une purification trop longue. Une méthode de purification générale a donc été développée pour ces composés. Une première purification rapide sur colonne se fait en phase normale sur silice. La sydnone est d'abord éluée avec du dichlorométhane, puis le reste des composés est élué avec un mélange DCM/MeOH (90/10). Ce mélange est ensuite purifié par chromatographie en phase inverse sur colonne C18 (phase mobile :  $H_2O/MeCN + 0,1\%$  TFA), avec un gradient allant de 100% eau à 100% acétonitrile sur 1 h. Les iminosydnone synthétisées sont alors obtenues sous forme protonée, (Schéma 90). En effet, en solution, seul un certain pourcentage de l'iminosydnone est sous forme mésoionique en fonction du pH, il y a un équilibre avec la forme protonée. Après purification en phase inverse avec des éluants contenant du TFA, le contre ion observé est l'ion  $CF_3COO^-$ .

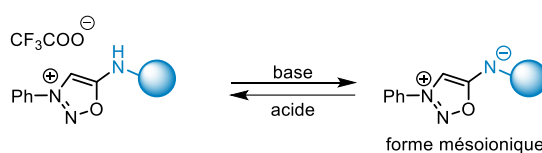


Schéma 90. Protonation/ Déprotonation de l'iminosydnone

Les taux de conversion parfois faibles observés rendent également la purification des composés plus complexes. En effet, lors de cette étude de la réaction, de nombreux produits ont été observés par LC-MS et RMN, mais sont présents en quantités trop faibles pour les isoler correctement. Cette faible conversion combinée à la difficulté de séparation entre le réactif et le produit font que dans certains cas les produits n'ont pas pu être isolés sous une forme suffisamment pure. Ces composés observés mais non isolés sont relativement stables dans le temps dans le milieu réactionnel et dans les conditions de purification utilisées.

La totalité de l'étude de l'étendue de la  $S_NAr$  avec des amines primaires est présentée Figure 81.

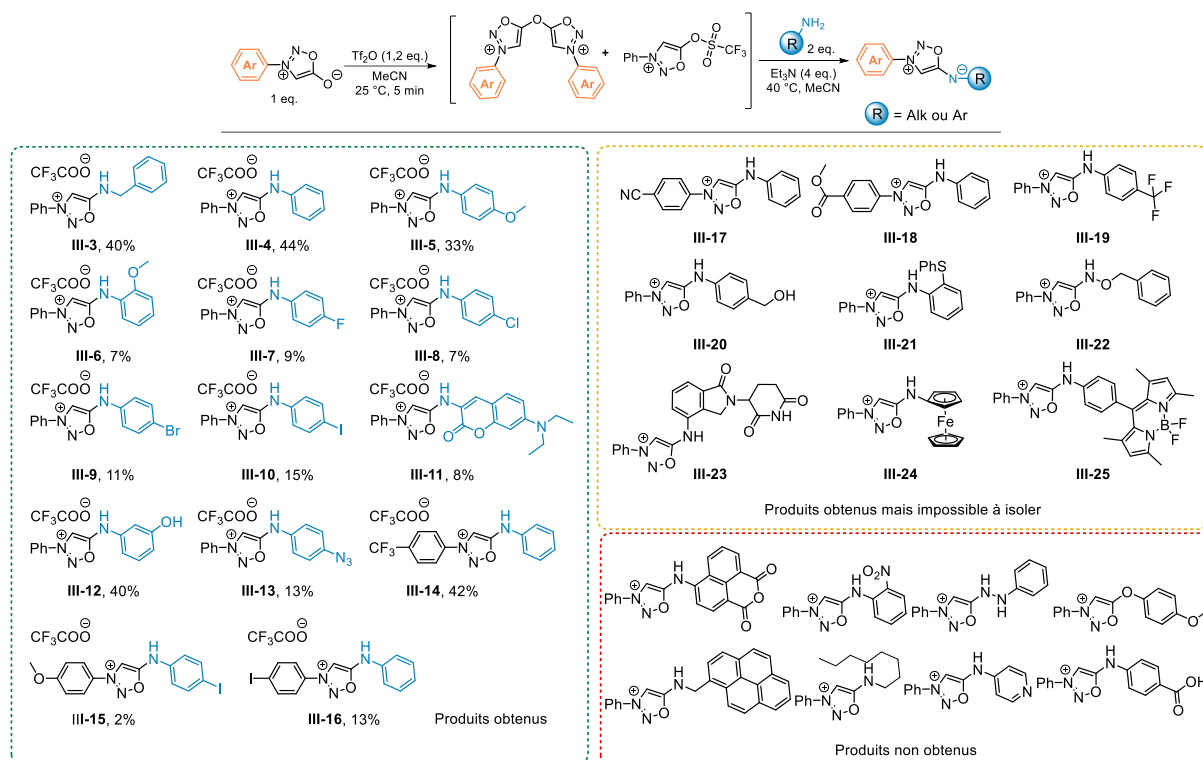


Figure 81. Etendue de la réaction de  $S_NAr$  entre une sydnone et une amine primaire

Les rendements isolés des composés obtenus sont assez faibles, inférieurs à 20% pour plus de la moitié d'entre eux. Nous avons déjà montré qu'une conversion totale n'était pas possible sur cette réaction, les amines utilisées sont pour la plupart moins réactives que l'aniline ou la benzylamine dans cette réaction, ce qui, couplé aux difficultés de purification, explique les faibles rendements isolés. En revanche, la sydnone **III-1** et l'amine utilisée peuvent être récupérées en partie lors de la purification. De plus, l'amine triflée est régulièrement observée lors de cette réaction, montrant une compétition entre la  $S_NAr$  et l'addition nucléophile de l'amine sur le soufre du triflate.

La réaction de  $S_NAr$  est favorisée pour des amines plus nucléophiles. Lorsque l'amine est enrichie par un groupement mésomère donneur sur son cycle aromatique, la réaction a lieu plus facilement, ce qui est le cas pour les composés **III-5** et **III-6** présentant des groupements méthoxy. En présence d'amines dérivatisées par des fonctions halogènes inductifs attracteurs, les rendements diminuent. En revanche le produit désiré n'est pas observé avec des amines trop peu nucléophiles comme la nitroaniline ou des phtalimides. Certaines fonctions (acides carboxyliques, longues chaînes aliphatiques) sont peu solubles dans les solvants compatibles avec la réaction de  $S_NAr$ , ce qui a un effet négatif sur la formation des iminosydnones attendues. Une hydrazine et une hydroxylamine ont été engagées dans cette réaction afin d'obtenir de nouvelles classes d'iminosydnones. Seules des traces de produit ont pu être observées avec la benzylhydroxylamine et une plus grande optimisation serait nécessaire pour isoler cette nouvelle classe d'iminosydnones. La présence de groupements électroattracteurs ( $CF_3$ , ester et cyano) en position N3 de la sydnone favorise la conversion de la réaction de  $S_NAr$ , ainsi plusieurs composés ont pu être obtenus (**III-14** à **III-16**) mais certains n'ont malheureusement pas pu être isolés (**III-17**, **III-18**).

Plusieurs fonctionnalités sont compatibles avec cette réaction de  $S_NAr$ . Contrairement à la voie  $PCl_5$  (nitrosylation puis cyclodéshydratation, Schéma 81), les fonctions phénol et azoture sont compatibles avec la  $S_NAr$ . Les composés **III-12** et **III-13** ont pu être obtenus avec succès ce qui n'était pas possible auparavant.

Plusieurs composés d'intérêt ont été envisagés dans cette réaction de  $S_NAr$ . Les réactions engagées avec des principes actifs (aminoferrocène, lenalidomide) n'ont donné les produits désirés que sous forme de traces. Une iminosydnone-coumarine (**III-11**) a été obtenue avec un rendement de 8%. Les propriétés de fluorescence de cette sonde seront étudiées par la suite. Cette sonde est très intéressante car c'est une coumarine-isocyanate qui sera relarguée lors d'une réaction de SPICC. Des études de relargage d'isocyanates sur cellules seront effectuées avec cette sonde.

Nous avons vu lors de cette étude, que la réaction était compatible avec des fonctions que l'on ne pouvait pas utiliser avec les autres méthodes de synthèse disponibles. La plus grosse limitation de cette méthodologie sont les faibles rendements, qui s'expliquent notamment par le mécanisme réactionnel, mais surtout par les difficultés de purification. Cependant cette voie de synthèse est rapide, et permet d'obtenir des iminosydnones d'intérêt en une seule étape. Une sonde iminosydnone-coumarine **III-11** a été obtenue et nous étudierons par la suite ses propriétés et son utilisation dans une application en imagerie cellulaire.

## B. Caractérisation et utilisation de la sonde fluorogénique III-11

### 1. Propriétés physico-chimiques du composé III-11

Nous avons dans cette partie étudié les propriétés d'absorbance et de fluorescence du composé Iminosydnone-coumarine **III-11** (Figure 82).

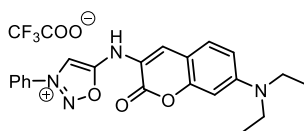


Figure 82. Sonde profluorescente iminosydnone-coumarine **III-11**

L'absorbance de la sonde **III-11** a été étudiée en fonction du pH du milieu, afin de déterminer son pKa. En effet, il existe un équilibre entre la forme protonée et déprotonée de l'iminosydnone, et c'est la forme déprotonée qui est mésoionique et qui peut réagir dans des réactions de cycloadditions (Schéma 91).

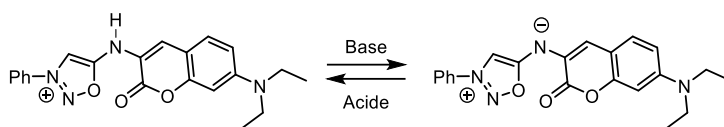


Schéma 91. Équilibre acido-basique entre la forme protonée et la forme mésoionique du composé **III-11**

Tout d'abord, un spectre d'absorbance du composé dans le PBS à pH 7,4 a été effectué afin de déterminer sa longueur d'onde d'excitation (Figure 83).

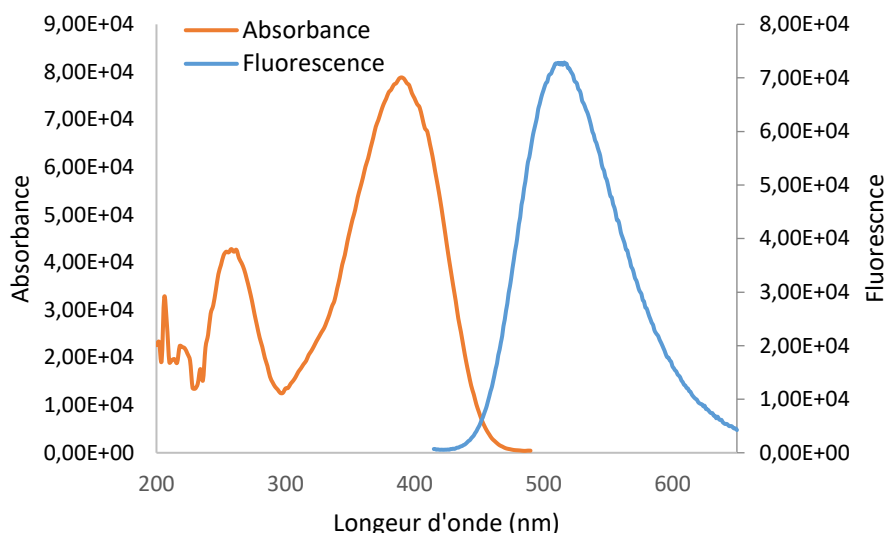


Figure 83. Spectres d'absorbance et de fluorescence de l'iminosydnone-coumarine **III-11** à 100  $\mu\text{M}$  dans le PBS 1 % DMSO,  $\lambda_{\text{ex}} = 404 \text{ nm}$ .

Deux pics d'absorbance sont visibles à 260 nm et à 404 nm. Le premier pic correspond à l'absorbance de la partie iminosydnone, et le deuxième à l'absorbance de la partie coumarine. Nous nous placerons donc à 404 nm pour exciter la sonde et observer sa fluorescence. Cette longueur d'onde est supérieure à 400 nm, qui est une longueur d'onde minimale des lasers utilisés pour les expériences sur cellules. Cette sonde présente donc un grand intérêt potentiel pour l'imagerie cellulaire.

Le spectre d'émission de fluorescence de la sonde Iminosydnone-coumarine **III-11** avec une excitation à 404 nm a été effectué (Figure 83). Le maximum d'émission de cette sonde se situe à 510 nm. Cette longueur d'onde d'émission sera utilisée par la suite pour les expériences de suivi fluorimétrique de la sonde. Afin de déterminer le pKa de la sonde Iminosydnone-coumarine **III-11**, des mesures de l'absorbance de la sonde en fonction du pH du milieu ont été effectuées dans le PBS à 100  $\mu\text{M}$  (Figure 84). En suivant l'évolution de l'absorbance à 410 nm, il est possible de déterminer le pKa de la sonde Iminosydnone-coumarine **III-11**. La diminution de l'absorbance à 410 nm en fonction du pH permet de déterminer un pKa de 4,9.

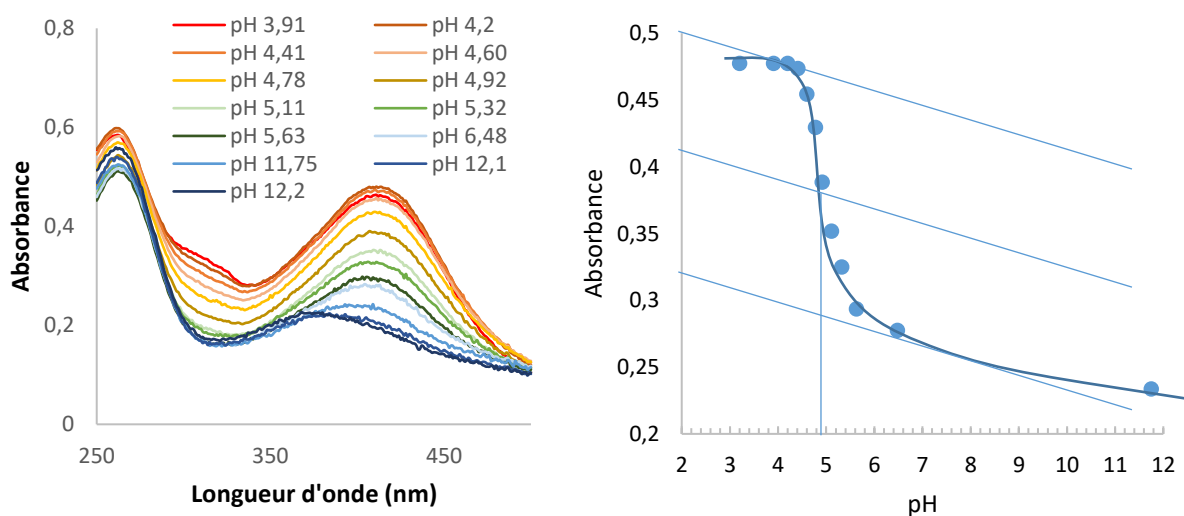


Figure 84. a) Evolution de l'absorbance de la sonde **III-11** en fonction du pH, PBS + AcOH + NaOH, 100  $\mu\text{M}$ . b) Suivi de l'absorbance en fonction du pH à 410 nm.



Une expérience de suivi de la fluorescence en fonction du pH a également été effectuée, avec une excitation à 404 nm et un suivi à 510 nm (Figure 85). La fluorescence augmente avec le pH, et un pKa de 4,7 a été déterminé, donnant un pKa moyen de  $4,8 \pm 0,1$ .

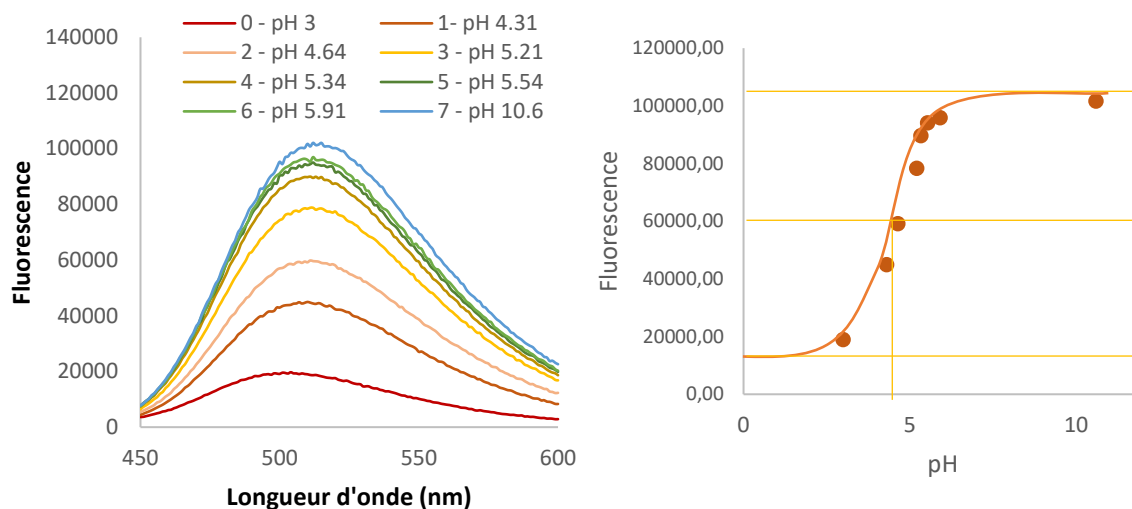


Figure 85. Evolution de la fluorescence de la sonde III-11 en fonction du pH,  $\lambda_{ex} = 404.4 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ , 100  $\mu\text{M}$  dans AcOH + NaOH.

Ce pKa de  $4,8 \pm 0,1$  étant assez acide, à pH physiologique (7,4), la majorité du composé est sous forme mésoionique (> 99%), ce qui favorise les réactions de click.

Après avoir déterminé les caractéristiques de la sonde III-11, sa réactivité dans une réaction de « click and release » avec le DBCO a été étudiée (Schéma 92). Pour cela, un suivi de fluorescence a été effectué.

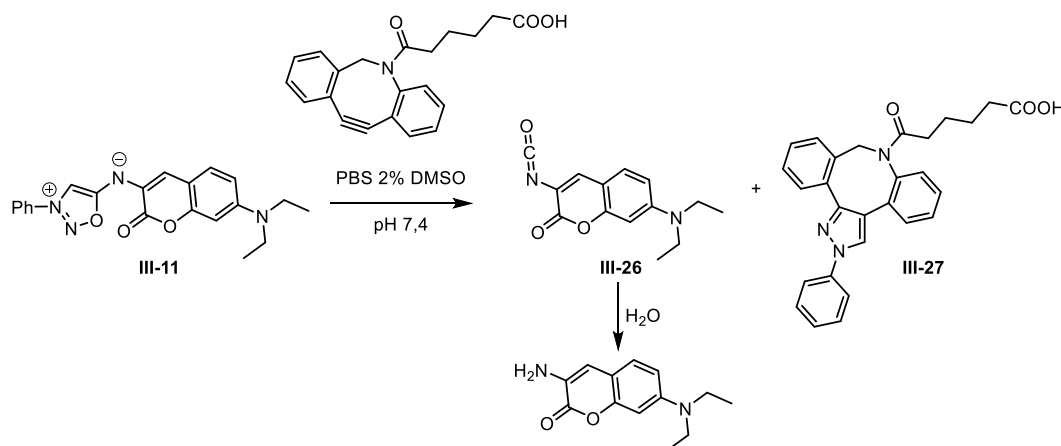


Schéma 92. Réaction de SPSAC entre la sonde Iminosydnone-coumarine III-11 et le DBCO

Dans le PBS et en absence de nucléophile, la coumarine isocyanate libérée III-26 est hydrolysée pour donner la coumarine amine dont les propriétés de fluorescence sont connues. Une première expérience de « click and release » a été faite en collectant des spectres d'émission successifs lors de la réaction, avec une longueur d'onde d'excitation de 404 nm (Figure 86).

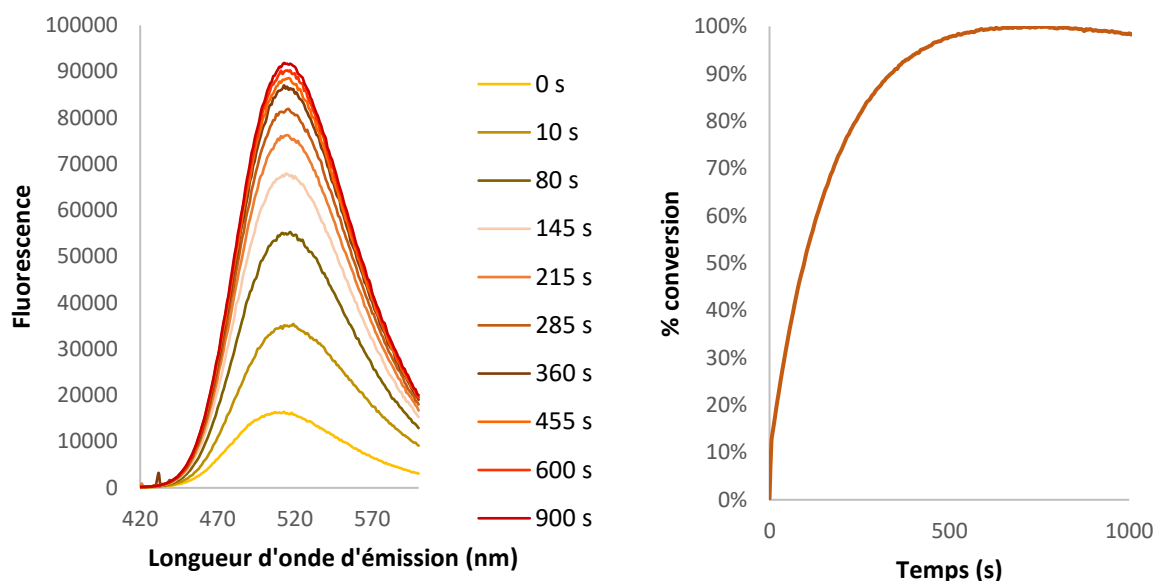


Figure 86. a) Spectres de fluorescence à différents temps lors de la réaction de "click and release" entre **III-11** et le DBCO. b) Cinétique de réaction entre **III-11** et le DBCO.  $\lambda_{ex} = 404 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ , [**III-11**] =  $10 \mu\text{M}$ , [DBCO] =  $15 \mu\text{M}$ ,  $25^\circ\text{C}$  dans le PBS  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,4$

La fluorescence observée augmente rapidement avec le temps jusqu'à atteindre un palier. La sonde est donc bien une sonde profluorescente. La fluorescence observée est multipliée par 4,5 entre l'iminosydnone-coumarine de départ et la coumarine relarguée : le turn-ON de cette sonde est donc de 4,5. Ce résultat était attendu, puisque les propriétés d'inhibition de fluorescence de la coumarine par le noyau iminosydnone sont connues.<sup>116</sup> En effet, certaines coumarines peuvent voir leur fluorescence inhibée par effet PeT (photoinduced electron transfer) selon le groupement qui leur est lié. Il a été montré dans notre laboratoire que c'était le cas lorsqu'une coumarine était liée à une iminosydnone urée.

Compte tenu des temps très courts d'analyses (inférieur à 10 min), il est probable que la fluorescence observée après la réaction de click-release soit celle de l'isocyanate **III-26** et non celle de l'amino-coumarine. En effet, l'hydrolyse d'isocyanates aromatiques dans l'eau à pH  $7,4$  nécessite des temps plus longs.<sup>117</sup> A noter que le signal de fluorescence ne change pas après des temps plus longs suggérant que les deux composés aient des propriétés de fluorescence très proches. Ceci a été confirmé en mesurant le spectre de fluorescence de l'aminocoumarine.

Un suivi cinétique de la réaction par mesure de fluorescence a été effectué. La longueur d'onde d'excitation est de  $404 \text{ nm}$ , et la longueur d'onde d'émission observée est de  $510 \text{ nm}$ . La réaction est suivie en prenant un point toutes les cinq secondes, avec 1 équivalent d'iminosydnone, à  $10 \mu\text{M}$ , et 1,5 équivalents de DBCO dans le PBS à  $25^\circ\text{C}$ .

Une constante de vitesse  $k = 533 \pm 19 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a été déterminée. Le temps de demi-réaction dans ces conditions est de  $100 \text{ s}$ . Cette constante de vitesse est élevée. Pour comparaison, les constantes de vitesse de la réaction de SPICC entre des iminosydnone urée et un DBCO sont de l'ordre de  $10 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La constante de vitesse est donc 50 fois supérieure à celles obtenues avec des iminosydnone-urée.

<sup>116</sup> M. Riomet, K. Porte, A. Wijkhuisen, D. Audisio and F. Taran, *Chem. Commun.*, **2020**, 56, 7183

<sup>117</sup> W. E. Brown, A Green, Thomas Cedel, and J. Cairns, *Environmental Health Perspectives*, **1987**, 72, 5–11

Les milieux biologiques regorgent de divers nucléophiles, en particulier le glutathion (GSH) dont la concentration peut atteindre 1 mM dans les cellules. Nous avons voulu voir si le signal de fluorescence de la sonde fluorogénique pouvait varier lorsque celle-ci était placée dans une solution de GSH. L'isocyanate libéré par réaction SPICC devrait réagir rapidement sur la fonction thiol du GSH ce qui pourrait modifier le signal fluorescent (Schéma 93).

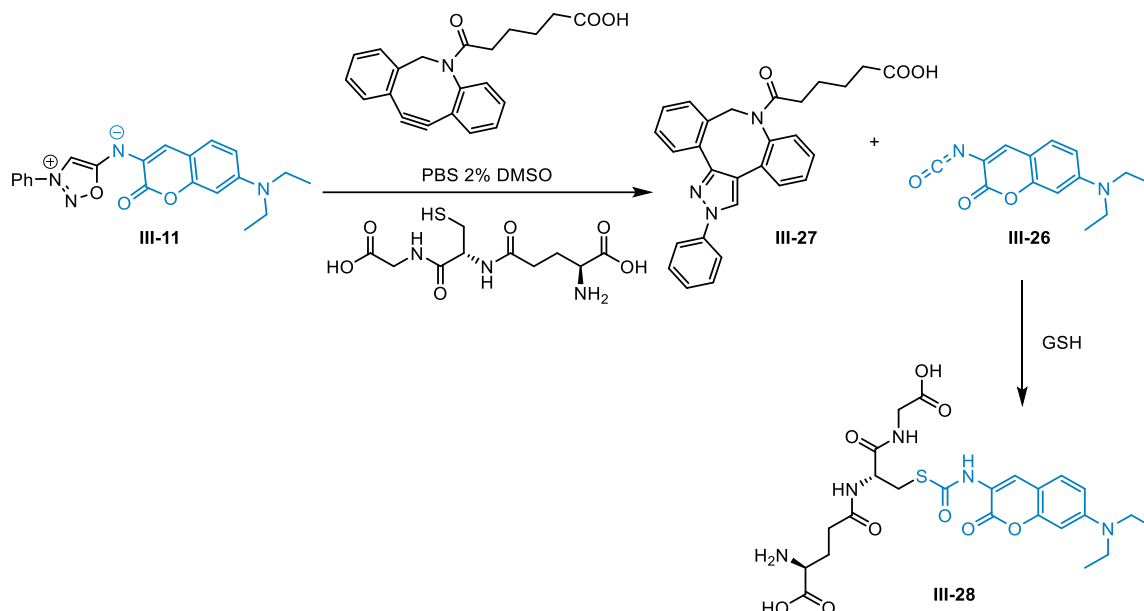


Schéma 93. Réaction de "click and release" entre l'iminosydnone-coumarine **III-11** et le DBCO, puis capture de l'isocyanate par du GSH

La réaction de SPICC entre l'iminosydnone **III-11** et le DBCO a été effectuée en présence d'un excès de GSH (10 eq.) Un mélange de coumarine hydrolysée et de coumarine-glutathion **III-28** a été observé par LC-MS. Lorsque la réaction de SPICC entre l'iminosydnone-coumarine et le DBCO en présence de glutathion a été suivie par fluorescence, une faible différence de fluorescence avec l'expérience sans glutathion a été observée. Cependant, les propriétés de fluorescence de l'adduit coumarine-GSH sont suffisamment proches de celles de l'isocyanate et de l'amino-coumarine pour permettre un suivi de la réaction SPICC dans ce milieu (Figure 87). Une constante de vitesse  $k = 552 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  est obtenue.

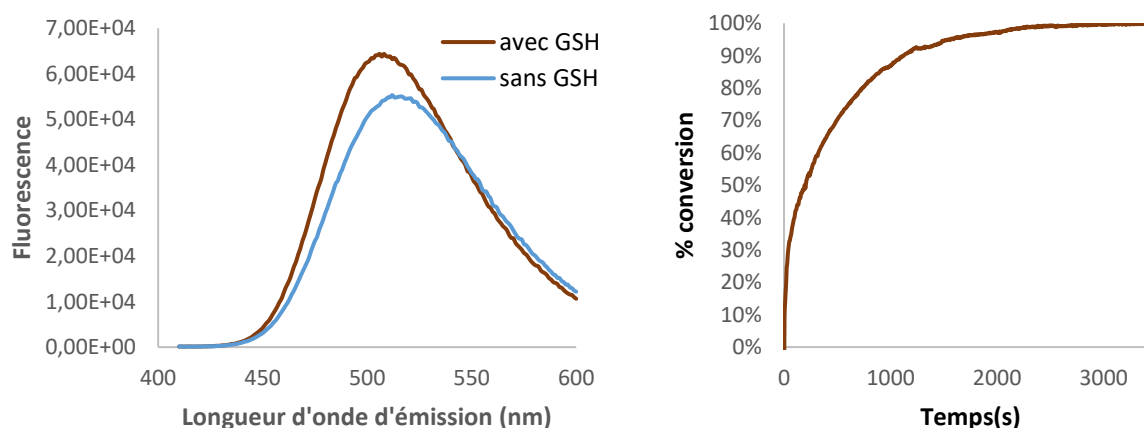


Figure 87. a) Comparaison de la fluorescence après 1 h de réaction entre l'IS-c **III-11** et le DBCO, avec ou sans GSH. b) Cinétique de réaction entre **III-11** et le DBCO, 10 eq. de GSH.  $\lambda_{ex} = 404 \text{ nm}$ ,  $[IS-c] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[DBCO] = 15 \mu\text{M}$ ,  $[GSH] = 100 \mu\text{M}$

L'isocyanate réagit donc bien avec des composés nucléophiles dans le milieu mais cela n'empêche pas le monitoring de la réaction par mesure de fluorescence. Fort de cette constatation, nous avons décidé d'effectuer un relargage de l'isocyanate-coumarine par réaction bioorthogonale de **III-11** avec un cyclooctyne dans les cellules, afin de voir s'il était possible de piéger des nucléophiles endogènes présents dans la cellule.

## 2. Expériences sur cellules

Les isocyanates sont des composés électrophiles intéressants. En présence de protéines, ils peuvent réagir notamment avec les résidus nucléophiles des différents acides aminés, comme les lysines ou les cystéines des protéines. Cependant, les isocyanates ont une stabilité limitée dans le temps et sont facilement hydrolysés en milieu aqueux. Il est donc intéressant de pouvoir libérer un isocyanate directement à l'intérieur des cellules.

Dans cette partie, nous avons désiré libérer un isocyanate lié à un fluorophore au sein d'une cellule afin de voir s'il était possible de marquer les protéines. Pour cela nous avons utilisé notre sonde iminosydnone-coumarine **III-11**, qui agit comme un isocyanate masqué. Ces expériences ont été réalisées par le Dr. Arnaud Chevalier à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN).

Des premières expériences de « click and release » *in cellulo* dans des cellules A549 ont été entreprises sur un microscope plein champ (Schéma 94). Dans un premier temps, les cellules vivantes ont été incubées avec la sonde Iminosydnone-coumarine **III-11** à 50  $\mu\text{M}$  pendant 2 h à 37 °C sous atmosphère humidifiée à 5% en  $\text{CO}_2$ . Après une étape de lavage afin de retirer l'excès de sonde qui ne serait pas rentré dans la cellule, les cellules ont été incubées avec du DBCO à 250  $\mu\text{M}$ . Des images des cellules ont ensuite été enregistrées à 5 min, 15 min, 30 min, 1 h et 2 h afin de suivre l'évolution du signal fluorescent intracellulaire (Figure 88).

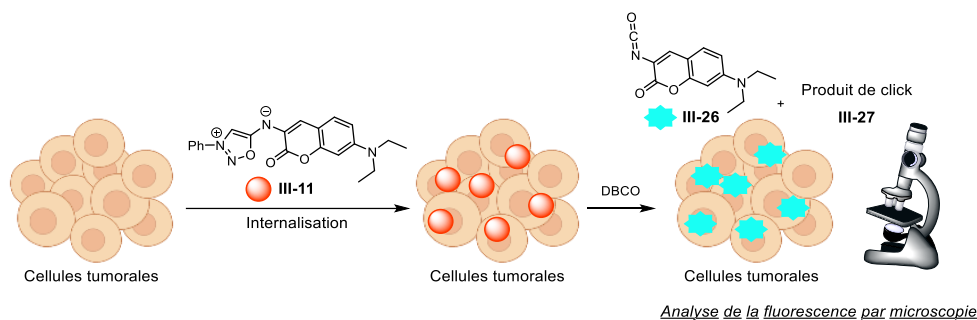


Schéma 94. Expérience de libération de coumarine sur cellules

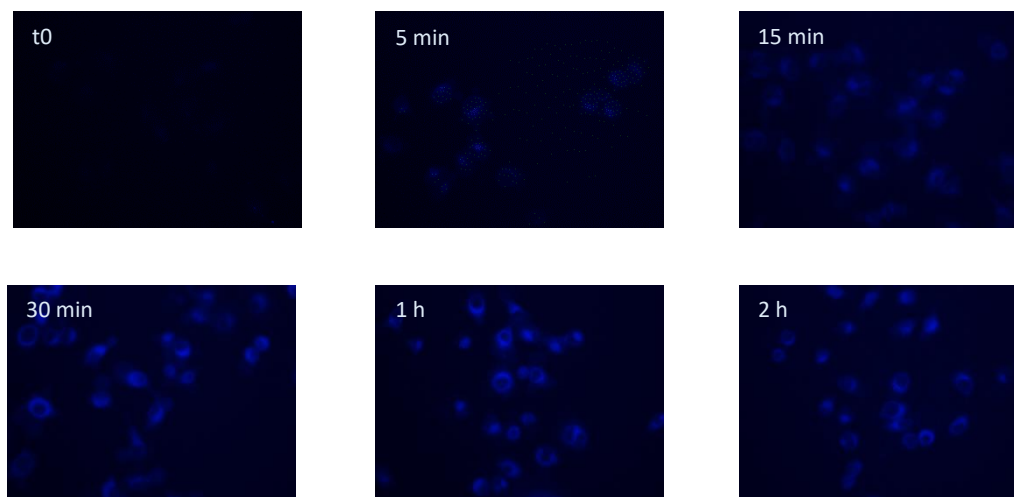


Figure 88. Images de microscopie sur cellules tumorales A549 sur microscope plein champ (Filtre DAPI, temps d'exposition 400ms). Réaction entre III-11 (50 µM) et DBCO (250 µM).

Une augmentation de la fluorescence est observée, et semble atteindre un palier après 30 minutes. Ces images semblent confirmer que la réaction de « click and release » a bien eu lieu, libérant un dérivé de coumarine fluorescente. La réaction est assez rapide, avec un temps de demi-réaction de 15 minutes. Ce temps n'est pas aussi rapide qu'*in vitro*, car il faut prendre en compte le temps de pénétration des réactifs dans la cellule. De plus, la concentration réelle dans les cellules est probablement bien inférieure à la concentration utilisée initialement. Par conséquent, les temps de réaction observés sont satisfaisants. Des mesures ont été réalisées sur les clichés grâce au logiciel ImageJ et ont permis de quantifier l'évolution de l'intensité du signal fluorescent intracellulaire au cours du temps (Figure 89). On observe que cette intensité est multipliée par un facteur d'environ 4 lors de la réaction *in cellulo* de la sonde III-11 avec le DBCO. Ces résultats sont cohérents avec le turn-ON de x 4,5 déterminé précédemment pour cette sonde lors des expériences réalisées *in vitro*.

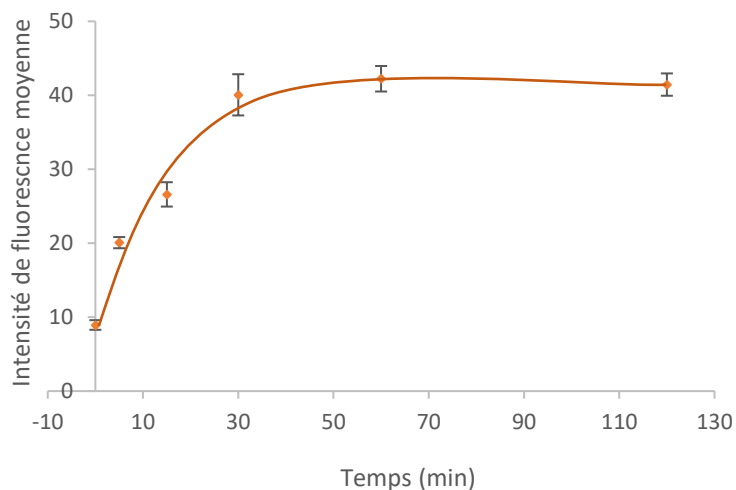


Figure 89. Evolution de l'intensité de fluorescence avec le temps dans les cellules A549,  $[III-11] = 50 \mu M$ ,  $[DBCO] = 250 \mu M$

Compte tenu de ces résultats prometteurs, nous avons entrepris des expériences de microscopie confocale permettant une acquisition plus précise du signal. De manière similaire à l'expérience précédente, la sonde III-11 a été incubée à  $50 \mu M$  pendant 2 h à  $37^\circ C$  sous atmosphère humidifiée à 5% en  $CO_2$ , puis après un lavage au PBS, le DBCO a été incubé à  $20 \mu M$  pendant 3h, afin d'obtenir le pallier observé lors des expériences précédentes. Les clichés obtenus sont présentés dans la Figure 90. Les réglages ont été effectués de telle sorte que le signal de la sonde seule se trouvait à peine visible, et ont été conservés à l'identique pour la mesure de la sonde après réaction avec le DBCO.

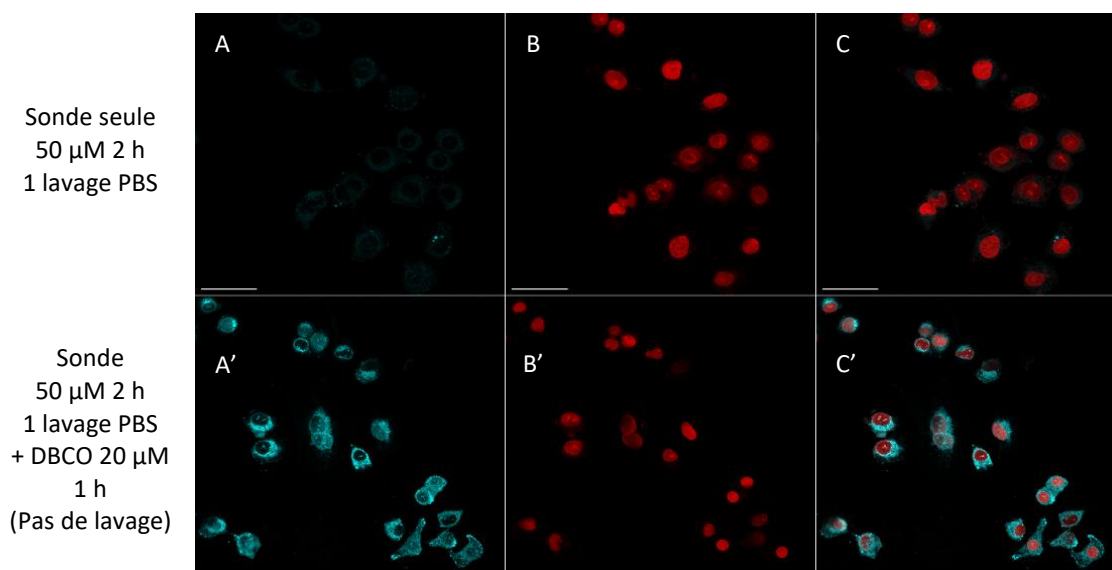


Figure 90. Images de microscopie sur cellules tumorales A549 sur microscope confocal, reconstitution en couleurs réelles. Réaction entre III-11 ( $50 \mu M$ ) et DBCO ( $250 \mu M$ ). A : Sonde,  $\lambda_{Ex} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 460-600 \text{ nm}$ ,. B : Noyau (NucSpot® Live 650,  $\lambda_{Exc} = 650 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 670-750 \text{ nm}$ ). C : Superposition de A et B. Scale Bar :  $50 \mu m$

Les images montrent un signal de fluorescence très faible pour la sonde seule qui est fortement exalté après 2 h de réaction avec le DBCO, ce qui confirme les résultats précédents. Nous avons par la suite effectué plusieurs étapes de lavage et enregistré de nouvelles images afin d'étudier l'influence des étapes de lavage sur l'intensité du signal de fluorescence (Figure 91).

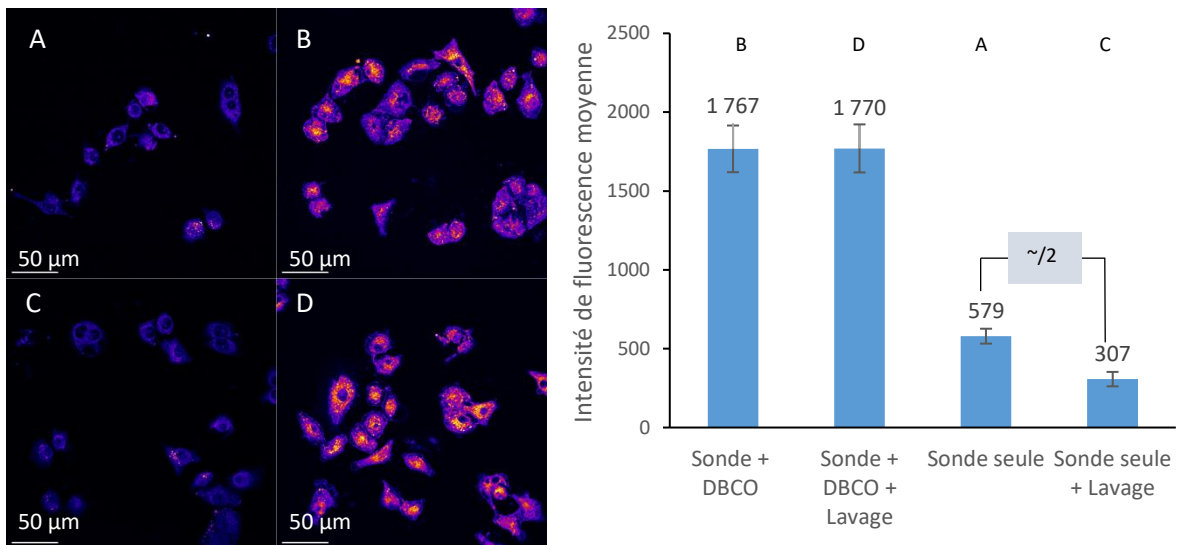


Figure 91. Etude de stabilité du marquage fluorescent suite aux lavages au PBS après réaction entre III-11 (50  $\mu$ M) et DBCO (250  $\mu$ M). A : sonde III-11 seule + 3 lavages PBS. B : sonde III-11 + 3 lavages PBS + DBCO. C : sonde III-11 seule + 3 lavages PBS. D : sonde III-11 + 3 lavages PBS + DBCO.

L'intensité du signal fluorescent intracellulaire a été mesurée pour les 4 clichés grâce au logiciel ImageJ ce qui nous a permis de comparer les résultats avec et sans lavage au PBS (Figure 91, droite). Le triple lavage au PBS engendre une diminution d'un facteur 2 du signal intracellulaire dans le cas de la sonde seule. En revanche, aucune diminution significative n'est observée après réaction avec le DBCO. Cette information semble suggérer que des nucléophiles endogènes à la cellule (protéines par exemple) ont piégé l'isocyanate III-26 formé lors de la réaction de la sonde avec le DBCO (Schéma 95), ce qui expliquerait pourquoi les étapes de lavages n'ont pas diminué le signal.

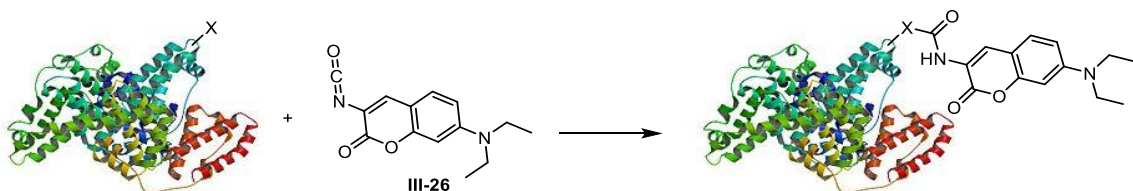


Schéma 95. Marquage de protéines par la coumarine-isocyanate III-39 relarguée dans les cellules

Ces différentes expériences semblent apporter la preuve que la sonde profluorescente Iminosydnone-coumarine III-11 est stable en milieu cellulaire, et peut réagir dans une réaction de « click and release » *in cellulo* afin de libérer un dérivé électrophile de coumarine qui peut alors être piégé par des nucléophiles endogènes tels que des protéines. Nous pouvons ainsi envisager l'utilisation de cet outil pour le marquage fluorescent permanent de cellules ou encore pour le marquage de protéines en cellules vivantes, contrôlé de manière spatio-temporelle par chimie « click and release », pour des applications en protéomique.

## IV. Synthèse et propriétés de 6-N-dialkyl-iminosydnones par réaction $S_NAr$

### A. Synthèse des 6-N-dialkyl-iminosydnones

Lors de l'étude de l'étendue de la réaction  $S_NAr$ , nous avons étudié la réactivité d'amines primaires pour former des iminosydnones. Dans la continuité de ce travail, nous avons également fait réagir des amines secondaires avec la phényl-sydnone activée par  $Tf_2O$ , et obtenu une nouvelle classe de composés (Figure 92). Ces composés ne sont pas des mésoioniques à proprement parler. En effet, contrairement aux iminosydnones, ces nouveaux composés ne possèdent pas de charge négative sur leur structure.

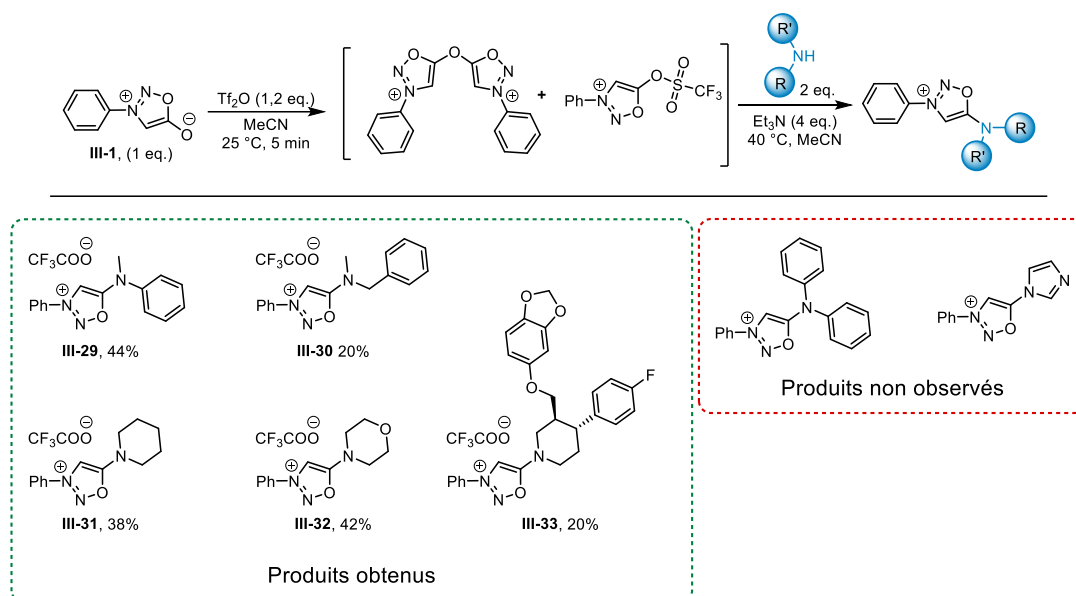


Figure 92. Réaction de  $S_NAr$  avec des amines secondaires

Plusieurs composés ont ainsi pu être isolés, avec des rendements entre 20% et 44%, relativement bons par rapport aux autres composés obtenus par réaction de  $S_NAr$  d'amines primaires sur des sydnones triflées. Ceci est en partie dû aux purifications plus aisées avec ce type de composés. Le composé **III-33** contenant un principe actif, la paroxétine, a pu être obtenu avec un rendement de 20%. Les amines secondaires alkyles sont plus réactives que les amines secondaires aromatiques dont le doublet est plus délocalisé. Les amines secondaires diaromatiques ne sont pas assez nucléophiles pour que le produit soit observé.

Des cristaux de l'iminosydnone **III-32** ont été obtenus et étudiés par diffraction des rayons X (Figure 93).



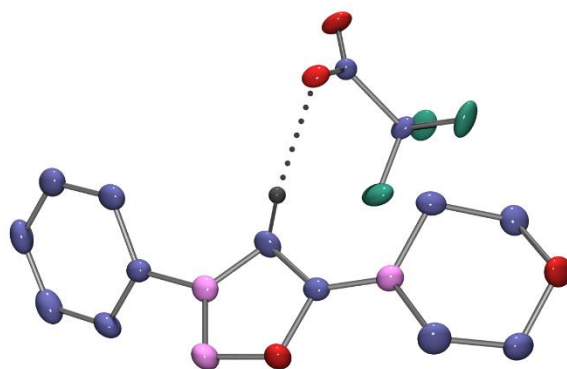


Figure 93. Structure cristallographique du composé III-32

Cette structure RX permet de confirmer l'obtention de 6-*N*-dialkyle-iminosydnones sous forme de sels de trifluoroacétate.

Des longueurs de liaisons à l'état solide ont pu être calculées. La liaison C5-N6 a une longueur de 1,319 Å. Une double liaison C=N classique a une longueur de 1,279 Å tandis qu'une liaison simple C-N a une longueur de 1,479 Å. Le doublet de l'azote est donc possiblement impliqué dans la mésomérie du cycle de l'iminosydnone, et la liaison C5-N6 a un fort caractère  $sp^2$ . De plus, le TFAO<sup>-</sup> fait une liaison hydrogène avec le proton du carbone en C4, ce qui pourrait traduire, à l'image des 6-*N*-aryl et 6-*N*-alkyl une relative acidité de ce proton.

## B. Etude de la réaction de cycloaddition

Les composés mésoioniques sont des dipôles, et c'est cette qualité de dipôle qui leur permet de réagir dans des réactions de cycloadditions 1,3 dipolaires. Les nouveaux composés obtenus n'étant pas des mésoioniques, nous avons voulu savoir s'ils étaient malgré tout capables de cycloadditionner avec des dipolarophiles. Nous avons donc fait réagir l'un de ces composés avec du DBCO (Schéma 96).

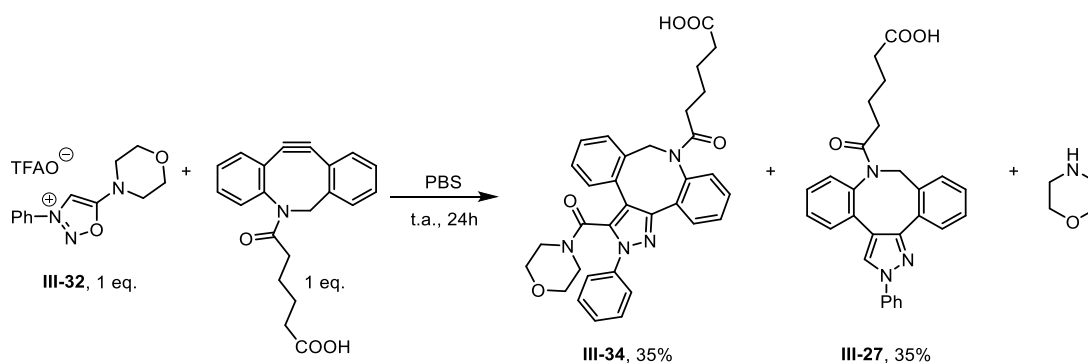


Schéma 96. Réaction de "click and release" entre le composé III-32 et le DBCO

Afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu, cette réaction a été suivie par RMN dans le DMSO- $d_6$ . Du dibromométhane a été utilisé comme étalon interne.

Dans un premier temps, la disparition de l'iminosydnone-morpholine III-32 a été suivie, en suivant la disparition du proton lié au carbone en position C4 à 9,13 ppm (Figure 94). Après 24 h, près de 90% de conversion de l'iminosydnone sont atteints. La constante de vitesse calculée pour la disparition de l'iminosydnone, qui correspond à la cinétique de click et de formation de l'intermédiaire réactionnel est de  $k = 3,1 \cdot 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Cette constante de vitesse est du même ordre de grandeur que les

constantes de vitesse des réactions de « click and release » pour les iminosydnone amides et carbamates.

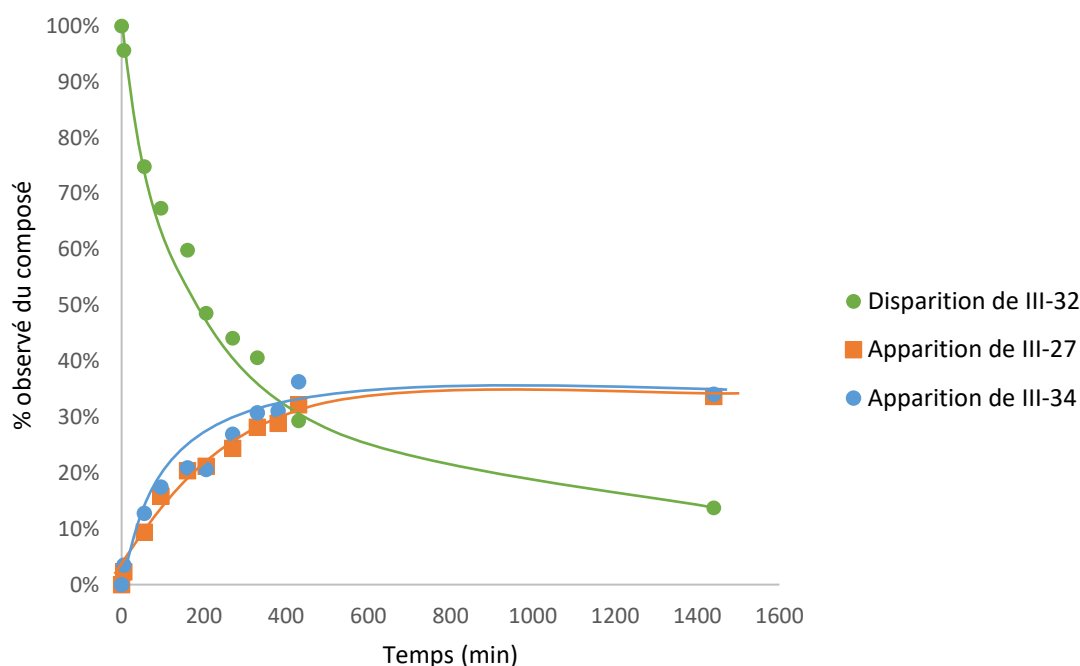


Figure 94. Suivi par RMN dans le DMSO-d6 de la réaction entre III-32 et du DBCO, 29 mM.

Deux produits principaux ont été observés en RMN. Le premier produit observé est le pyrazole III-27. Ce produit est suivi par intégration du singulet correspondant au proton du pyrazole à 8,72 ppm. Après 24 h, il n'y a plus d'évolution de la réaction et c'est 35% de l'iminosydnone qui a été transformée en pyrazole III-27. La présence de ce produit III-27 indique que la réaction de « click and release » relarguant la morpholine a bien eu lieu. La moitié de la quantité finale de produit obtenu est formée en 2 h.

Un autre produit est observé dans le milieu réactionnel par RMN. Il s'agit du composé III-34, pyrazole résultant de la cycloaddition du DBCO avec l'iminosydnone III-32 avec la morpholine liée au pyrazole par une liaison amide. Ce composé a été suivi en intégrant un doublet à 7,03 ppm, correspondant à un proton de cycle aromatique. Les deux produits formés, les pyrazoles III-27 et III-34, apparaissent dès 5 minutes de réaction et avec des cinétiques similaires. De plus, la concentration de ces deux composés est la même tout au long de la réaction et reste la même quand la réaction n'évolue plus et qu'il n'y a plus de conversion de l'iminosydnone. Pour III-34 comme pour III-27, la moitié de la quantité finale de produit est atteinte en 2 h.

Ces résultats de cycloaddition avec des iminosydnone non mésoioniques sont surprenants et différents mécanismes possibles ont été envisagés (Schéma 97).

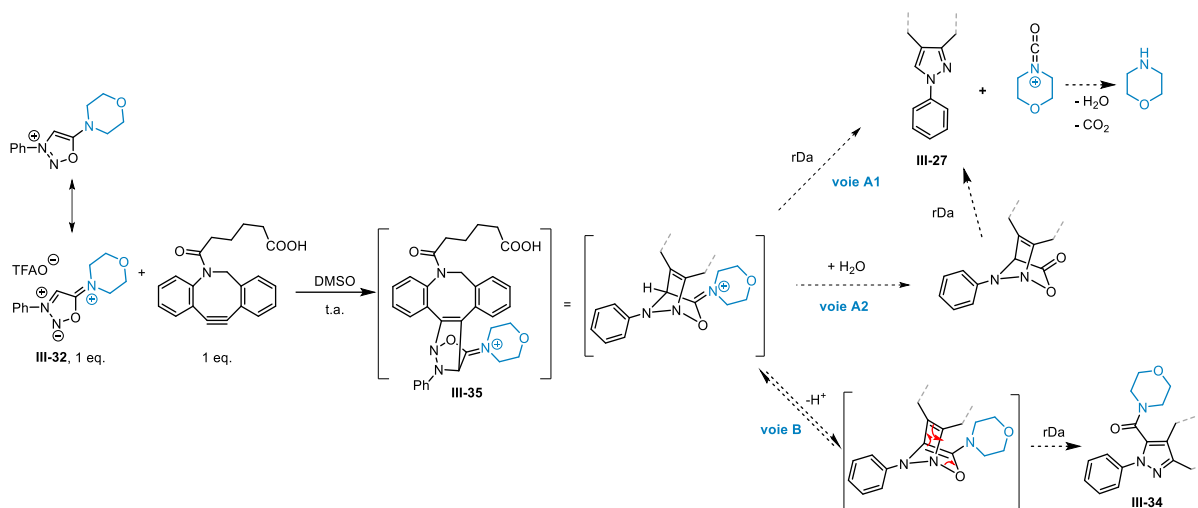


Schéma 97. Mécanismes envisagés pour la réaction entre l'iminosydnone-morpholine **III-32** et le DBCO

Les deux pyrazoles observés **III-27** et **III-34** sont formés à la même vitesse et en même quantité, ce qui suggère qu'ils sont obtenus *via* un intermédiaire commun. Cet intermédiaire pourrait être le composé **III-35** (Schéma 97), qui résulte de la cycloaddition du DBCO avec la forme mésomère mésoionique de l'iminosydnone **III-32**. Cet intermédiaire évoluerait ensuite selon deux réactions compétitives : la formation de **III-27** par la voie A et la formation de **III-34** par la voie B. La formation du pyrazole **III-27** indique une réaction de « click and release » comme pour les autres classes d'iminosydnones. L'imminium **III-35** peut s'engager dans une réaction de rétro Diels-Alder (voie A1) ou être hydrolysé pour donner un intermédiaire très réactif qui réagit immédiatement dans une réaction de rétro Diels-Alder avec libération de CO<sub>2</sub> (voie A2). La formation du composé **III-34** implique un transfert de proton suivi d'une réaction de rétro Diels-Alder sans libération de la morpholine. L'étape limitante est la cycloaddition de l'iminosydnone avec le DBCO, et les différentes réactions de rétro Diels-Alder à partir de l'intermédiaire **III-35** devraient être toutes beaucoup plus rapides, les intermédiaires n'étant pas observés.

La réaction de cycloaddition entre l'iminosydnone-morpholine et le DBCO a été suivie par LC-MS et les différentes masses des composés décrits ont été observées, confirmant nos hypothèses. Deux pics UV correspondant au composé **III-34** sont visibles, ce qui s'explique par la présence de régioisomères **III-34a** et **III-34b**, selon l'angle de réaction du DBCO avec l'iminosydnone.

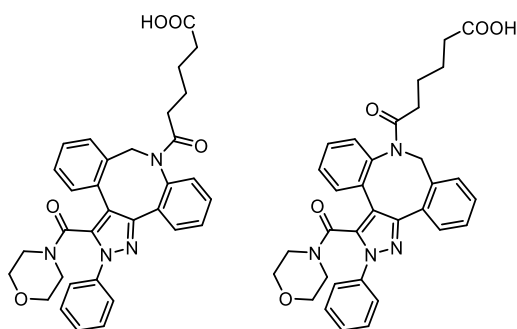


Figure 95. Régioisomères **III-34a** et **III-34b**

Nous avons montré que les 6-*N*-dialkyles-iminosydnones peuvent cycloadditionner avec des cyclooctynes pour former des pyrazoles mais aussi libérer en partie l'amine tertiaire connectée en position N6 de la structure iminosydnone. Afin de pouvoir estimer le potentiel de cette réaction pour

la libération de composés bioactifs, la réaction de cycloaddition avec le DBCO a par la suite été testée sur le composé **III-33**.

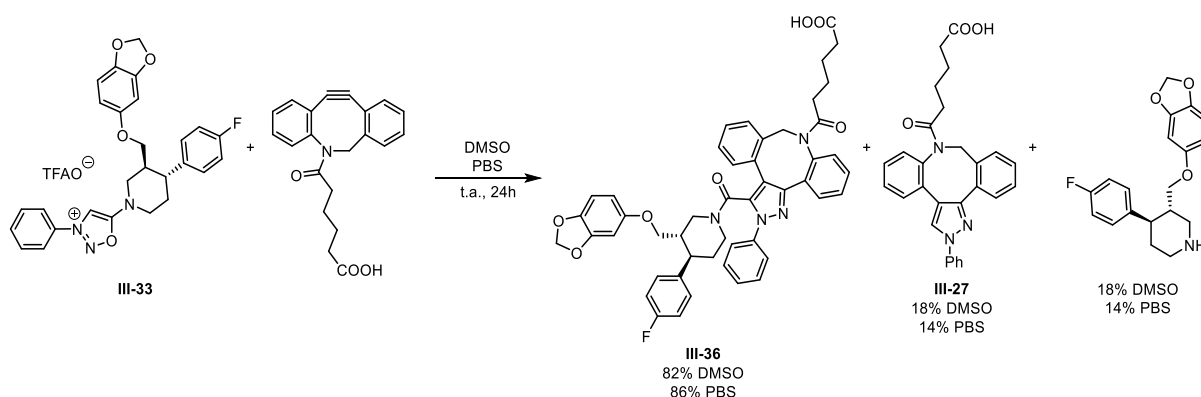


Schéma 98. Réaction de « click and release » entre le composé **III-33** et le DBCO

Nous avons voulu suivre le relargage d'un principe actif, la paroxétine, par réaction de « click and release » avec le DBCO. Cette réaction a dans un premier temps été suivie par LC-MS dans le DMSO à 300  $\mu\text{M}$ . Le 2-fluoro-4-nitrophénol a été utilisé comme étalon interne. Un étalonnage de la paroxétine par rapport à l'étalon interne nous a permis de quantifier la paroxétine relarguée par spectrométrie de masse. La paroxétine est observée ainsi que les composés **III-36** et **III-27**. 18% de l'iminosydnone est convertie en paroxétine et pyrazole **III-27** (Figure 96). Après un peu plus de 14h, la moitié de la quantité finale observée est atteinte, ce qui équivaut à une constante de vitesse de formation de  $k = 0,065 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La réaction a été relancée dans le PBS à 200  $\mu\text{M}$ . La vitesse de réaction est beaucoup plus rapide dans le PBS que dans le DMSO, avec une constante de vitesse de formation de  $k = 2,77 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . L'augmentation de la vitesse de réaction dans l'eau par rapport au DMSO est un phénomène connu pour les réactions de cycloaddition.

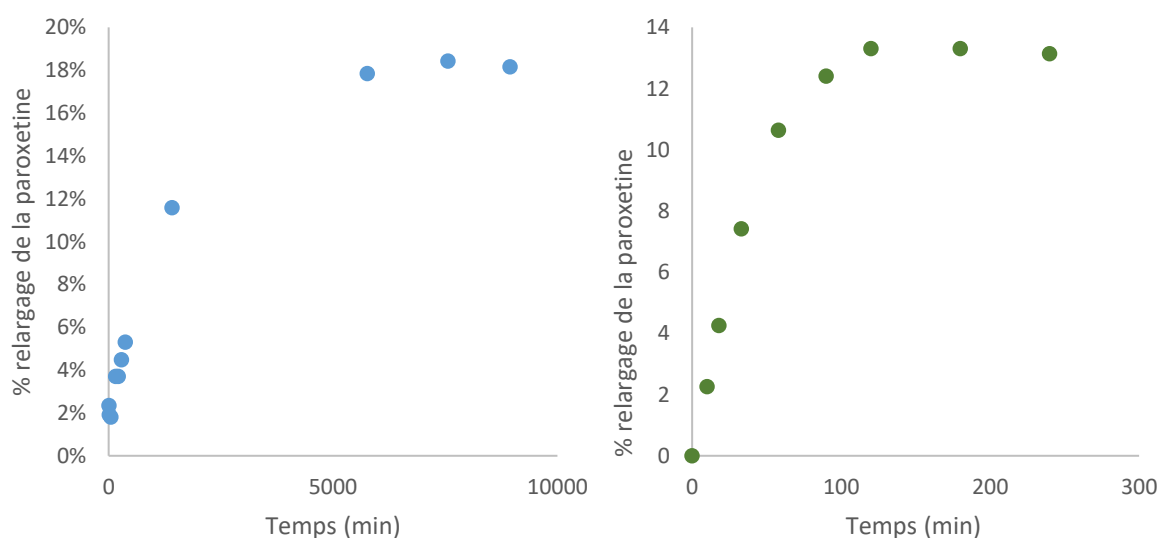


Figure 96. Relargage de la paroxétine lors de la réaction de **III-33** et du DBCO acide. Gauche : DMSO, 300  $\mu\text{M}$ , Droite : PBS, 200  $\mu\text{M}$

En revanche, le changement de milieu ne modifie pas de façon significative les rapports de pourcentages de produits formés. Après 2h de réaction dans le PBS, la conversion finale en paroxétine

de 14% est atteinte et n'évolue plus. Ce résultat est surprenant puisque dans le cas du composé **III-32** une quantité équivalente des deux pyrazoles s'était formée et 35% d'amine était libérée. Une explication pourrait être un transfert de proton plus rapide de l'intermédiaire réactionnel, conduisant au pyrazole **III-36**, que la réaction de rDA permettant la libération de la paroxétine.

Nous avons donc confirmé que les 6-*N*-dialkyl-iminosydnone peuvent être utilisées comme substrats pour des réactions de cycloaddition avec des cyclooctynes. Cette réaction génère deux pyrazoles différents et libère de façon partielle une amine secondaire, le tout avec une valeur de constante cinétique non négligeable. Cette réactivité est intéressante et pourrait être exploitée pour la libération contrôlée de principes actifs contenant une amine secondaire si un moyen permettant d'éviter le transfert de proton de l'intermédiaire **III-35** pouvait être trouvé. Un moyen simple consisterait à utiliser une 6-*N*-dialkyl-iminosydnone substituée en position C4.

### C. Perspectives

La nouvelle classe de composés synthétisée ouvre de nouvelles voies pour la chimie bioorthogonale. Deux voies réactionnelles semblent être en compétition, l'une libérant une amine ainsi qu'un pyrazole déjà décrit lors des réactions de SPSAC et SPICC, et l'autre permettant d'obtenir un pyrazole substitué en position C4.

Des travaux sont en cours pour mieux appréhender l'étendue de la réaction de cycloaddition entre les 6-*N*-dialkyl-iminosydnone et des alcynes tendus. Les conditions de réaction ont une influence sur la cinétique réactionnelle, et pourraient avoir une influence sur la proportion des différents produits obtenus.

La réaction de cycloaddition avec ces nouveaux composés peut être utilisée dans le but de relarguer sélectivement des amines secondaires dans des réactions de « click and release », comme c'est déjà le cas pour les iminosydnone. Pour l'instant, cette réaction de « click and release » est partielle et assez lente, mais l'utilisation de bromo-iminosydnone pourrait résoudre ces deux problèmes en évitant le transfert de proton à l'origine de la formation du pyrazole polysubstitué et en accélérant la cycloaddition (Schéma 99).

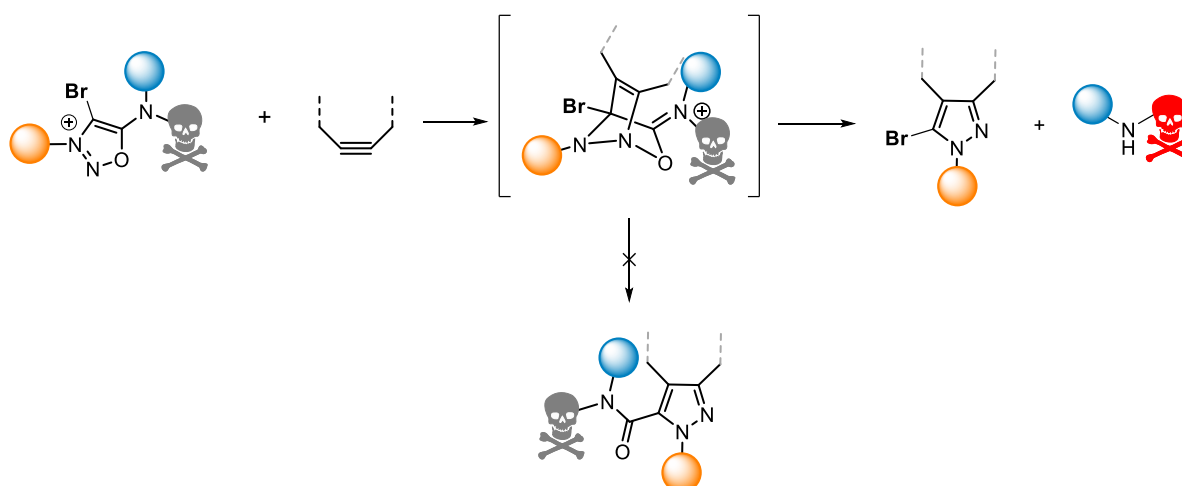


Schéma 99. Première perspective : Relargage d'une amine secondaire

Cette réaction offre une autre application possible en synthèse hétérocyclique : la synthèse de pyrazoles polysubstitués (Schéma 100). Des pyrazoles complexes pourraient ainsi être obtenus assez simplement par l'addition d'arynes sur une 6-*N*-dialkyl-iminosydnone. Des essais avec différents

dérivés du benzyne dans différentes conditions sont en cours au laboratoire afin d'étudier le potentiel de cette nouvelle méthode de synthèse d'indazoles fonctionnalisés. Il sera également intéressant d'effectuer des essais de cycloadditions avec des alcynes terminaux en présence de cuivre, afin de déterminer l'étendue de cette réaction.

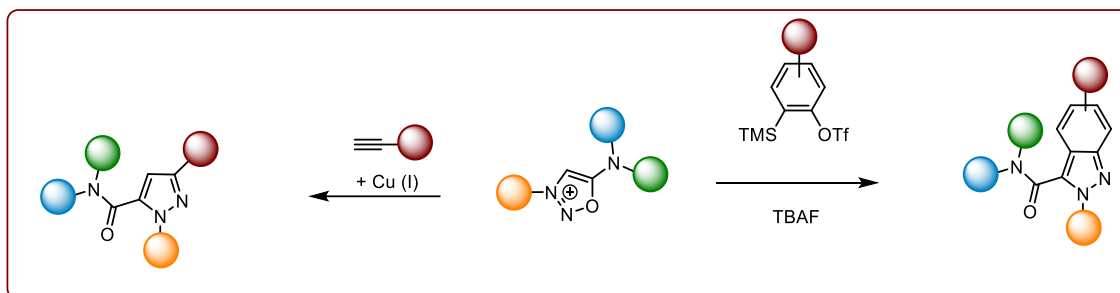


Schéma 100. Deuxième application : Synthèse de pyrazoles et d'indazoles polysubstitués

## V. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons développé une nouvelle méthodologie de synthèse des iminosydones par substitution nucléophile aromatique. L'exemplification de cette réaction a soulevé des questionnements sur son mécanisme. Si plusieurs composés aux fonctionnalités variées ont pu être isolés, de nombreuses molécules n'ont pu être obtenues voire même observées. C'est l'une des limitations de cette réaction.

Néanmoins, une sonde pro-fluorescente a été obtenue et utilisée pour du marquage de protéines intra-cellulaire, grâce à l'isocyanate relargué par réaction de « click and release ».

Cette nouvelle voie de synthèse a pu être appliquée à la synthèse de nouveaux composés, les 6-*N*-dialkyl-iminosydones. Ces composés ne sont pas des mésoioniques, mais peuvent quand même réagir dans des réactions de cycloadditions. L'étude du comportement de ces nouveaux composés dans des réactions de cycloadditions apporte un jour nouveau sur les mécanismes à l'œuvre dans toutes les réactions de « click and release ». En effet, lors de l'étude des iminosydones classiques, nous avons toujours supposé que seule la forme mésoionique cycloadditionnait. Les résultats obtenus pour ces nouveaux composés interrogent : il est possible que la forme protonée, et donc non mésoionique des iminosydones cycloadditionne également, mais beaucoup plus difficilement et plus lentement.

Nous avons fait une première exemplification de composés et montré que cette réaction était compatible avec de multiples fonctionnalités, mais le champ à explorer reste encore large. Une meilleure compréhension des mécanismes de cette réaction laisse espérer une optimisation future du nombre de composés obtenus et de leur rendement.



# Conclusion générale

Depuis une vingtaine d'années, la chimie bioorthogonale est en véritable essor. Son avènement s'est concrétisé cette année par l'attribution du Prix Nobel de Chimie à C. Bertozzi, B. Scharpless et M. Meldal. Elle est devenue un outil chémobiologique essentiel avec de nombreuses applications biologiques y compris *in vivo*. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur une réaction bioorthogonale développée dans notre laboratoire : la réaction de SPICC, cycloaddition entre une iminosydnone et un cyclooctyne permettant de libérer un composé d'intérêt (Schéma 101).

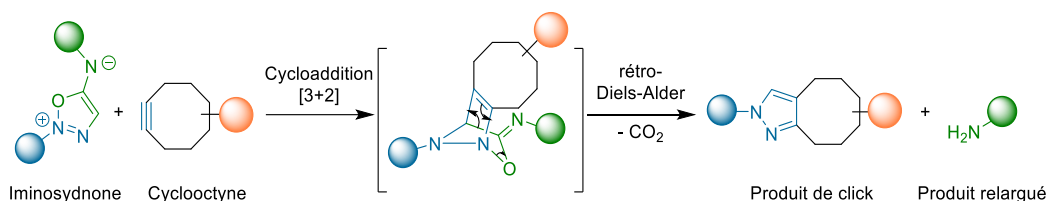


Schéma 101 Réaction de "click and release" entre une iminosydnone et un cyclooctyne

Cette réaction pourrait être utilisée pour libérer des principes actifs *in vivo* de manière contrôlée si elle possédait une cinétique de réaction plus élevée. Nous nous sommes donc attelés dans un premier temps à rendre cette réaction suffisamment rapide pour qu'elle puisse avoir lieu à basses concentrations en milieu biologique. Pour cela, nous avons utilisé la reconnaissance moléculaire entre deux brins PNAs complémentaires. Nous avons réussi à accélérer cette réaction de manière très satisfaisante et des cinétiques extrêmement rapides ont pu être obtenues, concurrençant même les cinétiques de « click and release » du système Tz-TCO, le plus rapide connu à ce jour. Notre réaction devient un pseudo-ordre 1 : elle ne dépend alors plus de la concentration du milieu, et est compatible avec des réactions en milieu biologique (Schéma 102).

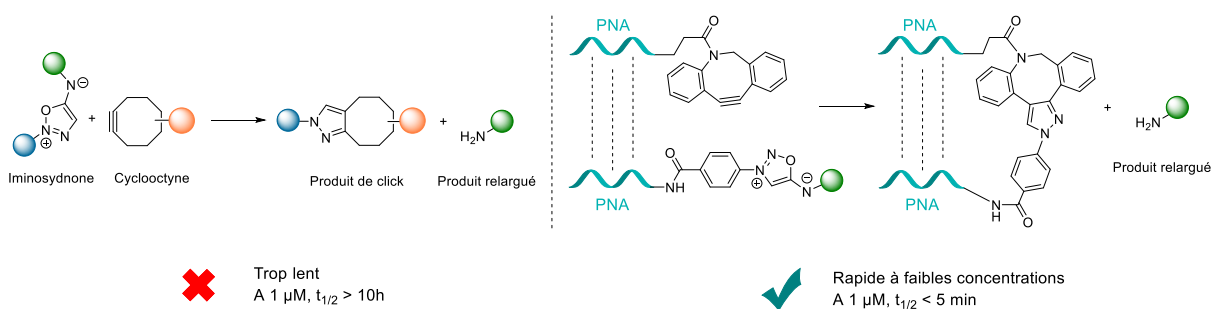


Schéma 102 Accélération de la réaction de "click and release" par reconnaissance moléculaire entre PNAs

Des PNAs de différentes tailles ont été synthétisés, et le couple de PNAs complémentaires aux meilleures cinétiques a été choisi pour différentes applications.

Des bioconjugués ont été obtenus, et une réaction de « click and release » accélérée par reconnaissance moléculaire a permis de libérer un fluorophore depuis une protéine avec des cinétiques rapides. Malheureusement notre objectif de pouvoir coupler deux protéines avec une cinétique rapide n'a pas été atteint (Schéma 103). Ce projet est encore à l'étude avec de nouveaux PNAs, et la perspective à plus long terme est de pouvoir effectuer des applications de détection rapide de protéines et d'anticorps.



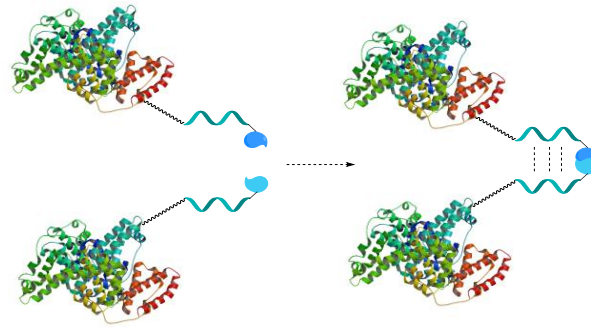


Schéma 103 Objectif d'application : couplage de protéines assisté par PNAs

L'application initialement envisagée de libération d'un principe actif *in vivo* accélérée par reconnaissance moléculaire n'a pas abouti non plus, les composés désirés présentant de nombreuses difficultés de synthèse.

Une dernière application biologique pour les PNAs précédemment synthétisés a été envisagée. Il s'agit d'une stratégie de préciblage s'appuyant sur la reconnaissance moléculaire entre PNAs et la chimie click. L'objectif est de pouvoir cibler les récepteurs membranaires caractéristiques des tumeurs grâce à un anticorps, puis d'injecter un traceur radioactif se liant rapidement à l'anticorps afin de détecter la tumeur. Grâce à cette stratégie, le temps de présence dans l'organisme du traceur radioactif est réduit, car celui-ci n'est injecté que lorsque l'anticorps a atteint sa cible et a pu s'y accumuler.

Mes travaux se sont d'abord axés sur la synthèse d'un bioconjugué comportant un anticorps, un PNA et une chlorosydnone, puis sur la synthèse d'un PNA complémentaire lié à un cyclooctyne. Des cinétiques entre ces deux partenaires de click ont donné une constante de vitesse élevée et de pseudo-ordre 1, compatible avec l'application désirée.

Un protocole de marquage du PNA-cyclooctyne au fluor-18 a été développé par le Dr. Simon Specklin au SHFJ. Des cellules tumorales ont pu être marquées au fluor-18 par la Dr. Estelle Porret et le Dr. Charles Truillet grâce à cette stratégie de préciblage (Schéma 104).

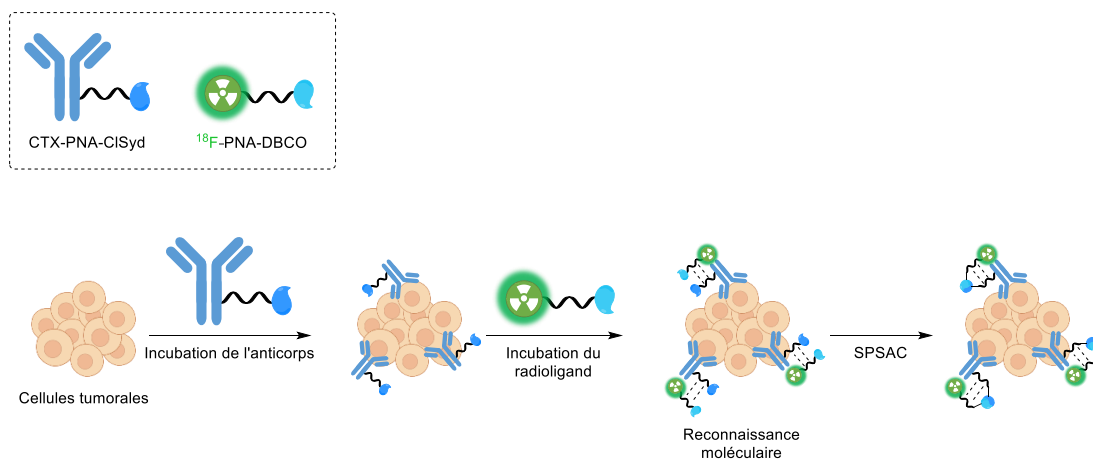


Schéma 104 Objectif de l'expérience de préciblage au fluor 18

À la suite de ces résultats, une expérience *in vivo* a eu lieu. Malheureusement celle-ci n'a pas été concluante et des problèmes expérimentaux nous empêchent de conclure sur la viabilité de cette approche.

Enfin, les travaux de cette thèse se sont axés sur le développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse d'iminosydones. Cette nouvelle voie de synthèse en une étape permet d'obtenir une variété de 6-*N*-aryl-iminosydones par substitution nucléophile aromatique d'une amine sur une sydnone (Schéma 105).

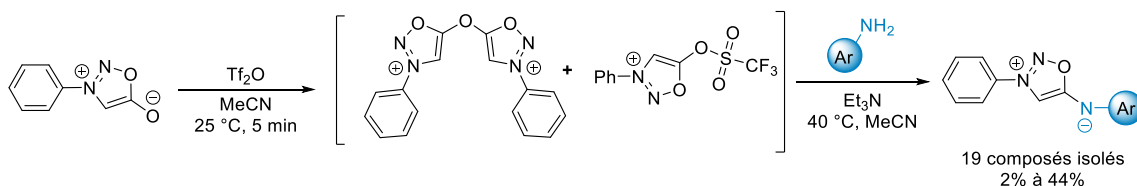


Schéma 105 Nouvelle voie de synthèse des 6-*N*-aryl-iminosydones par  $S_NAr$

Cette voie de synthèse a permis d'obtenir de nouveaux composés avec des fonctionnalités diverses, dont une sonde profluorescente. Les rendements obtenus avec cette voie de synthèse restent malheureusement faibles, mais des études sont en cours au laboratoire pour tenter de les améliorer.

Un nouveau type de composés a également été obtenu par cette voie de synthèse, en faisant réagir des amines secondaires : les 6-*N*-dialkyl-iminosydones. Ces composés ne sont pas des composés mésoioniques, cependant ils réagissent dans des réactions de cycloaddition (Schéma 106). L'étude mécanistique de la réaction de cycloaddition entre ces composés et un alcyne tendu est très intéressante pour mieux comprendre la réactivité des iminosydones. De plus, de nouveaux pyrazoles polysubstitués peuvent être obtenus, ouvrant la voie pour une nouvelle méthode de synthèse de ces composés.

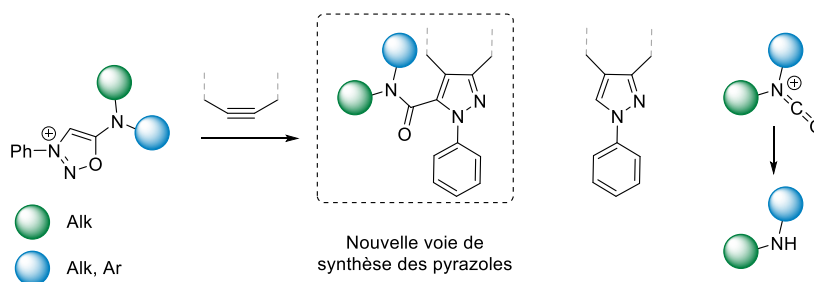


Schéma 106 Réaction de cycloaddition entre les 6-*N*-dialkyle-iminosydones et un alcyne tendu



---

# Partie expérimentale

---

## I. General information

All chemical products commercially available were purchased from Sigma-Aldrich, Acros and Fluka and used without further purification. All anhydrous solvents were purchased in anhydrous form and used without further purification. THF was dried from sodium/benzophenone under nitrogen. Dichloromethane was distilled from calcium hydride under nitrogen.

Reactions were monitored by TLC carried out on silica 0,25 EM (60 F254, Merck) using UV light as visualizing agent and basic aqueous permanganate as developing agent.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C NMR (100 MHz) were measured on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from residual solvents peaks and coupling constants are reported as Hertz (Hz). Splitting patterns are designated as singlet (s), broad singlet (br. s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintet (quint), heptuplet (hept), multiplet (m). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

Electrospray mass spectra were obtained using an ESI-Quadripole autopurify, Waters (pump: 2545, mass: ZQ2000) mass Spectrometer.

High resolution mass spectroscopy of the final compounds were determined using a Xevo® G2-XS QTof

Infrared spectra (IR) were obtained on a Perkin Elmer system 2000 FT-IR spectrophotometer or a Perkin Elmer UATR TWO FTIR spectrophotometer and are reported as wavelength numbers (cm<sup>-1</sup>).

Melting points (Mp) were obtained on a BÜCHI Melting Point B-545 and are reported in °C.

Absorbances were measured on a UV JASCO V-750 equipped with an injection module (GSP-909) and a Peltier (EHCS-760).

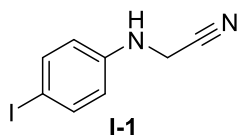
Fluorescence spectra were obtained on an Edinburgh FS5 spectrofluorometer with SC20 module.

Purification on reversed phase chromatography were done with a Pruriflash® XS520Plus (Columns: BIOTAGE® SNAP Cartridge KP-C18-SH-120g or KP-C18HS-60g) or by Supercritical fluid chromatography (SFC) JASCO®.

## II. Experimental part : Chapitre 1

### A. Synthetic procedure and analytical data

#### 2-((4-iodophenyl)amino)acetonitrile – I-1



C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>I  
MW: 258.06 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow powder  
90%

To a suspension of 4-iodoaniline (28 g, 0.13 mol, 1 eq.) in MeCN (300 mL), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21 g, 0.15 mol, 1.2 eq.) and NaI (19 g, 0.13 mmol, 1 eq.) were added. Chloroacetonitrile (16 mL, 0.26 mol, 2 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred and was refluxed for 65 hours, under argon atmosphere. The dark mixture was allowed to cool down at room temperature and was filtered on a pad of Celite (rinsing with EtOAc). The filtrate was washed with brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> before concentration under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, from 8/2 to 7/3 heptane/EtOAc) to afford the desired product **I-1** as a yellow powder (33 g, 0.11 mol, 90%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), NH unobserved.

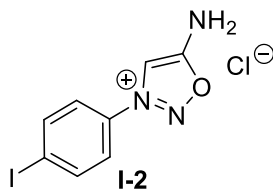
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 144.8, 138.3 (2C), 116.7, 115.8 (2C), 81.7, 32.6.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3375, 2256.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 259

Mp: 113 –115 °C.

#### 5-amino-3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – I-2



C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>IClN<sub>3</sub>O  
MW: 323.52 g.mol<sup>-1</sup>  
Beige powder  
84%

**I-1** (30 g, 0.11 mol, 1 eq.) was suspended in DCM and <sup>t</sup>BuONO (39.2 mL, 0.33 mol, 3 eq.) was added to this solution. After completion of the reaction, the mixture was evaporated and suspended in freshly dried HCl 4M in dioxane (125 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon. Et<sub>2</sub>O was added and the precipitate was collected by filtration, washed with Et<sub>2</sub>O to afford the product as a beige powder (31.8 g, 0.10 mol, 84%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.96 (s, 2H), 8.67 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H).

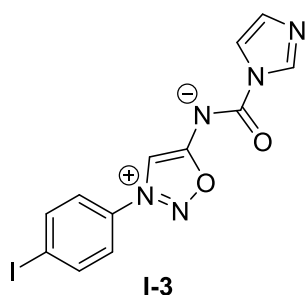
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.4, 139.1 (2C), 132.4, 124.4 (2C), 102.4, 101.6.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 1675, 829.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-Cl]<sup>+</sup> 288

Mp: 209–211 °C.

(1*H*-imidazole-1-carbonyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide – I-3



C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 381.13 g.mol<sup>-1</sup>  
Beige solid  
89%

To a solution of 1,1'-carbonyldiimidazole (1.1 g, 6.8 mmol, 1.1 eq.) in a mixture MeCN/DMF (9 mL/3 mL) was added I-2 (2 g, 6.2 mmol, 1 eq.). The solution was stirred at room temperature for 3 hours before being concentrated under reduced pressure. The resulting solid was washed with water and Et<sub>2</sub>O to afford the desired product as a beige solid (2.1 g, 5.5 mmol, 89%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 9.03 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.14-8.12 (m, 2H), 7.92-7.90 (m, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.01 (s, 1H).

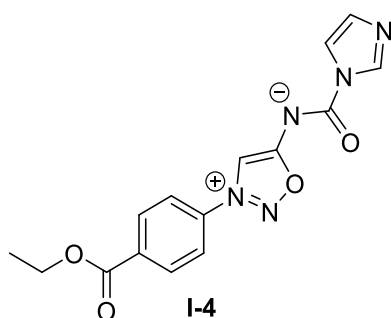
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 174.3, 153.1, 139.0 (2C), 136.8, 133.2, 129.4, 124.3 (2C), 117.3, 106.5, 100.8.

IR (cm<sup>-1</sup>): 1671, 1570, 1374, 1296, 1008, 976.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 382

Mp: 221 – 223 °C.

(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(1*H*-imidazole-1-carbonyl)amide – I-4



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 327.30 g.mol<sup>-1</sup>  
Beige solid  
93%

Compound I-3 (1 g, 2.62 mmol, 1 eq.) was dissolved in a mixture of absolute EtOH (15 mL) and Et<sub>3</sub>N (15 mL). PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (184 mg, 0.26 mmol, 0.1 eq.) was added and the reaction mixture was kept under a CO atmosphere for 18 hours and heated at 80 °C. The solvent was evaporated and the crude mixture was charged on a plug of silica. Impurities were removed by first filtrating with DCM, and then the desired product was obtained by flushing the plug with EtOAc. After evaporation of this filtrate, the product was obtained as a beige solid (0.8 g, 2.44 mmol, 93%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.45 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.36-8.34 (m, 2H), 7.93-7.91 (m, 2H), 7.64-7.62 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 4.45 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

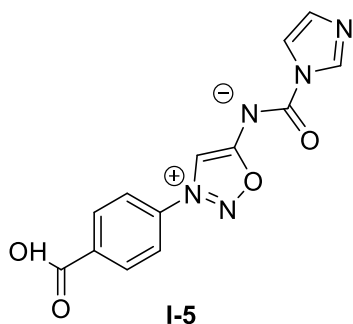
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 175.1, 164.3, 154.7, 137.6, 136.3, 135.3, 132.0 (2C), 129.8, 121.7 (2C), 117.3, 104.6, 62.2, 14.3.

IR (cm<sup>-1</sup>): 1718, 1666, 1575, 1371, 1278, 846, 769.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 328

Mp: 159 – 161 °C.

(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(1H-imidazole-1-carbonyl)amide – I-5



C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 299.25 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
Quantitative

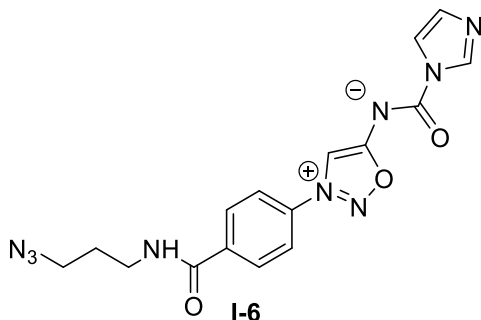
Iminosynone **I-4** (1.2 g, 3.7 mmol, 1 eq.) was suspended in a mixture of THF/H<sub>2</sub>O (1/1, 74 mL). Then, NaOH (148 mg, 3.7 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 3 hours. DCM was added to the mixture for extraction. The aqueous layer was acidify to pH 4 and the precipitated solid was filtered. The compound **I-5** was obtained as a yellow solid and engaged directly in the next step.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): not stable enough

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): not stable enough

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 300

(3-(4-((3-azidopropyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(1H-imidazole-1-carbonyl)amide – I-6



C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 381.36 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
65%

The crude compound **I-5** was solubilized in anhydrous DMF (37 mL). HATU (1.4 g, 3.7 mmol, 1 eq.) and DIPEA (2.6 mL, 14.8 mmol, 4 eq.) were then added and the mixture was stirred for few minutes at room temperature. Then 3-azidopropan-1-amine (741 mg, 7.4 mmol, 2 eq.) was added and the solution was stirred for 18 hours at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by column chromatography eluting with 100% AcOEt. The desired compound **I-6** was obtained as a yellow solid in 65% yield over two steps (917 mg, 2.4 mmol).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.47 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.14 – 8.05 (m, 2H), 7.97 – 7.91 (m, 2H), 7.64 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.62 (dd, *J* = 12.5, 6.5 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.97 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H).

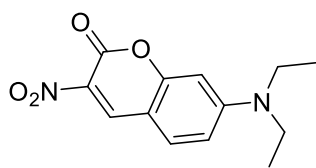
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD, δ ppm): 176.5, 168.0, 155.3, 140.4, 138.6, 137.1, 130.6 (2C), 129.7, 123.7 (2C), 118.9, 107.4, 50.4, 38.8, 29.8.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2925, 2098, 1660, 1574, 1471, 1436, 1372, 1353, 1297, 1225, 1209, 1094, 1052, 1010, 976, 847, 777, 655.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 382

Mp: 158 – 160 °C

7-(diethylamino)-3-nitro-2H-chromen-2-one – SI-1



SI-1

C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 262.27 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
55%

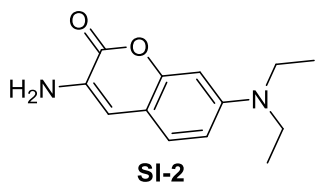
This compound was prepared as previously described in the literature.<sup>118</sup>

To 4-diethylaminosalicylaldehyde (1.4 g, 7.2 mmol, 1 eq.) and ethyl nitroacetate (0.8 mL, 7.2 mmol, 1 eq.) was added pipéridine (0.1 mL) and acetic acid (0.2 mL) in *n*-butanol (20 mL). The mixture was stirred under reflux (117 °C) for 24 hours. The reaction was cooled to room temperature. The solid was filtered and washed with water to give the desired compound **SI-1** as an orange solid (1.04 g, 4.0 mmol, 55%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.73 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.50 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 263

3-amino-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one – SI-2



SI-2

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 232.28 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
62%

This compound was prepared as previously described in the literature.<sup>118</sup>

SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (3.2 g, 14 mmol, 7.5 eq.) was suspended in concentrated HCl (10 mL). Then the coumarin **SI-1** was added slowly, by little portion, and the mixture was stirred at room temperature for 4 hours. After addition of ice in the mixture, the pH was increase to 11-12 by addition of NaOH 5M. During this time, the temperature was keep under 15 °C. Et<sub>2</sub>O was added and the mixture was extracted. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. The obtained oil was triturated in heptane to give the pure compound **SI-2** as a yellow solid (286 mg, 1.23 mmol, 62%).

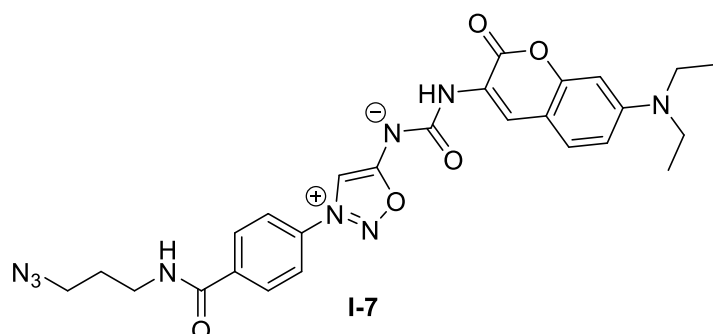
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 3.35 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.16 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), NH<sub>2</sub> unobserved.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 233

<sup>118</sup> K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603–4606.



(3-(4-((3-azidopropyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)carbamoyl)amide – I-7



C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 545.56 g.mol<sup>-1</sup>  
Red solid  
45%

The compound **I-6** (31.3 mg, 0.082 mmol, 1 eq.) was solubilized in anhydrous acetonitrile (0.8 mL) and methyl iodide (20  $\mu$ L, 0.328 mmol, 4 eq.) was added. The solution was stirred for 18 hours at room temperature. After complete conversion, the solvent and excess of methyl iodide were evaporated under vacuum to give the activated iminosydnone. The crude mixture was then solubilized in anhydrous acetonitrile (0.8 mL). The coumarin **SI-2** (19 mg, 0.082 mmol, 1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (11  $\mu$ L, 0.082 mmol, 1 eq.) were added and the mixture was stirred at 80 °C for two hours. The mixture was extracted with DCM and the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. The crude was purified by silica column chromatography (2% MeOH in DCM). The desired compound **SI-7** was obtained as a red solid (22 mg, 0.040 mmol, 45%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8.36 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.01 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.88 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (br.s, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.58 (dd,  $J$  = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.46 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 3.60 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.50 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.37 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 1.96 (quint,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 1.18 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 6H),

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 173.2, 165.7, 159.9, 159.6, 152.3, 149.1, 139.1, 135.9, 129.4 (2C), 128.3, 122.9, 121.9 (2C), 120.6, 109.8, 109.1, 102.5, 97.6, 49.9, 44.9 (2C), 38.5, 28.8, 12.7 (2C).  
IR (cm<sup>-1</sup>): 3413, 3339, 2971, 2930, 2097, 1704, 1650, 1606, 1497, 1407, 1353, 1244, 1194, 1130.

LCMS (ESI)  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup> 546

HRMS (ESI)  $m/z$ : C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculated = 546.2213, [M+H]<sup>+</sup> measured = 546.2214

Mp: 183 – 184 °C.

## General procedure A for PNA synthesis on solid support

Preparation of different solutions:

- **Deblock Solution:** 40 mL of piperidine + 160 mL of DMF
- **Base solution:** 3.4 mL of DIPEA + 3.5 mL of 2,6-lutidine with 93.1 mL of DMF
- **Cleavage solution:** 10.7 g of phenol in solution in 85 mL of TFA and 5 mL of triisopropylsilane (TIS)

Kaiser Test solutions:

- **Solution A:** 500 mg of ninhydrin in 10 mL of EtOH
- **Solution B:** 33 g of phenol in 3.125 mL of EtOH
- **Solution C:** 0.2 mL of NaCN solution (8.6 mg in 13 mL of water) in 10 mL of pyridine

Preparation of PNA monomer:

Prepare a vial containing 5 eq. of the desired PNA monomers (112.5  $\mu\text{mol}$ ) and 4.5 eq. of HATU.

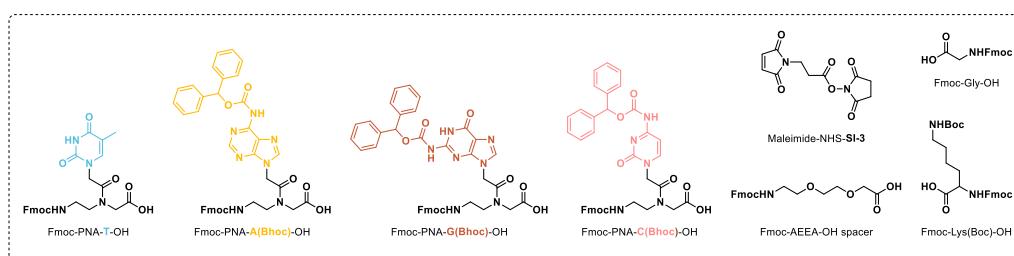


Table S1. Quantity of compound for preparation of PNA monomers mixture.

Mixture	Molecular weight (g/mol)	Mass (mg)	HATU mass (mg)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.60	52.7	38.5
Fmoc-PNA-A(Bhoc)-OH	725.76	81.6	38.5
Fmoc-PNA-T-OH	506.52	57.0	38.5
Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH	701.74	78.9	38.5
Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH	741.76	83.4	38.5
Fmoc-AEEA-OH spacer	385.42	43.4	38.5
Acetyl chloride (10 eq.)	78.50	16.0 (14.4 $\mu\text{L}$ )	/
5-hexynoic acid (10 eq.)	112.13	25.5 (24.6 $\mu\text{L}$ )	38.5
Fmoc-Gly-OH	297.31	33.4	38.5
Maleimide-NHS SI-3	266.21	29.9	38.5

### Procedure:

In a 10 mL syringe which is equipped with a frit at the bottom was introduced 99 mg (22.5  $\mu\text{mol}$ ) of a polystyrene resin beads TentaGel S RAM (Rapp Polymer) 0.23 mmol/g.

### Swelling of the resin:

Draw up around 4 mL of DMF into the syringe. Shake the syringe for 1 hour on a mechanical shaker with 400 rpm. Discard the DMF by pushing out the solvent from the syringe.

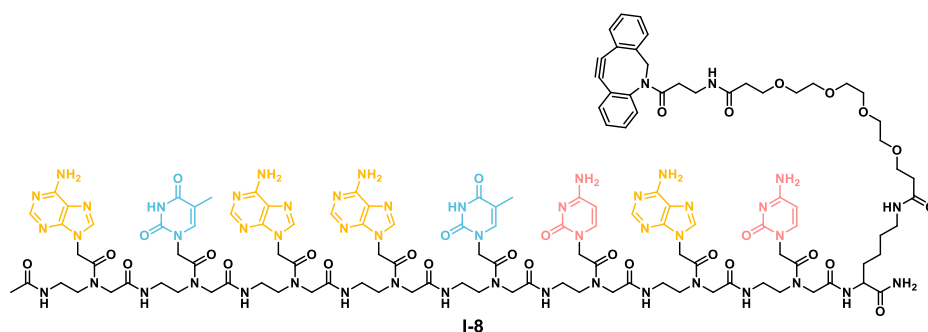
1. **Deprotection of the Fmoc group:** Draw up 4 mL of the Deblock solution into the syringe. Shake the syringe for 2 min, 400 rpm. Discard the Deblock solution.
2. **Washing step:** Draw up 4 mL of DMF, shake manually for 30 s. Discard the solvent. Repeat 4 times. Wash once with DCM and then with DMF again.
3. Repeat the deprotection (step 1) for 10 min instead of 2 min.
4. Repeat Wash step.
5. **Activation of acid:** mix the PNA monomer (+ HATU) with the Base solution in a vial. Shake the mixture.

Table S2. Volume of Base Solution and time for acid activation.

Mixture	Volume Base Solution ( $\mu\text{L}$ )	Time (min)
Fmoc-Lys(Boc)-OH + HATU	600	2
Fmoc-PNA- <b>A</b> (Bhoc)-OH + HATU	1200	5
Fmoc-PNA- <b>T</b> -OH + HATU	600	2
Fmoc-PNA- <b>C</b> (Bhoc)-OH + HATU	1000	7
Fmoc-PNA- <b>G</b> (Bhoc)-OH + HATU	600	2
Fmoc-AEEA-OH spacer + HATU	600	2
Acetyl chloride	600	2
5-hexynoic acid	600	2
Fmoc-Gly-OH	600	2
Maléimide-NHS <b>SI-3</b>	600	2

6. Draw up the solution into the syringe. Add 200  $\mu\text{L}$  of the base solution to the vial to wash out the residual non-dissolved PNA. Draw up into the syringe. Shake the syringe for 1 hour on mechanical shaker (400 rpm). Discard the solution by pushing out the solution from the syringe.
7. Wash step.
8. **Kaiser Test** to assess the success of the coupling. Take a few beads out of the syringe and transfer them to a test tube. Add two drops of Solutions **A**, **B** and **C**. Heat up the mixture for 1 min at 120 °C in an oil bath. Look at the color of the beads. If they are blue, repeat steps 5-7. If they are colorless/yellow, go to step 9.
9. The whole procedure (1-8) is repeated until the desired PNA sequence is completely built.
10. **Cleavage step for control:** Take a few beads from the syringe and put it in a new syringe with a frit at the bottom. Draw up around 2 mL of the Cleavage solution and shake the syringe for 90 min on a mechanical shaker with 400 rpm. Transfer the solution to a Falcon Tube and evaporate the solution carefully.
11. Do a direct introduction mass analysis to confirm all the mass. If the mass is good, go to step 12. If is not, the sequence as to be done again from the beginning.
12. Difference between the three PNAs.
  - For PNA-**DBCO**: cleavage of all the product from the resin. Draw up around 3 mL of a solution of 5% TIS in TFA and shake the syringe for 90 min on a mechanical shaker with 400 rpm. Transfer the solution to a Falcon Tube. Repeat this step 3 times. Evaporate the solution in the Falcon Tube carefully and precipitate in  $\text{Et}_2\text{O}$ . The white solid correspond to PNA **1-int**.
  - For PNA-**ImSyd-Coum**: go to step 13 for the click reaction with the iminosydnone.
13. Separate the resin in approximately 3 parts (around 7.5  $\mu\text{mol}$  of PNA)

14. **Click reaction.** Mix 1.7 eq of N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum **SI-7** (13 μmol, 7 mg), CuI (2.7 mg, 11.25 μmol, 1.5 eq.), 300 μL of DIPEA and 1.8 mL of DMF. Shake the mixture 2 minutes.
15. Draw up the solution into the syringe. Add 200 μL of DMF to the vial to wash out the residual non-dissolved CuI. Draw up into the syringe. Once the syringe contains the reagents/solvents, introduce the syringe in a balloon and put it under N<sub>2</sub> atm, protect the balloon from light with aluminium foil. Shake the balloon for 24 hours on mechanical shaker (400 rpm). Discard the solution by pushing out the solution from the syringe.
16. **Washing step.** Do the usual washing step + once with CH<sub>3</sub>CN; EDTA 0.1M<sub>(aq)</sub>; CH<sub>3</sub>CN.
17. **Cleavage step for control:** Take a few beads from the syringe and put it in a new syringe with a frit at the bottom. Draw up around 2 mL of a solution of 5% TIS in TFA and shake the syringe for 90 min on a mechanical shaker with 400 rpm. Transfer the solution to a Falcon Tube and evaporate the solution carefully.
18. Do a direct introduction mass analysis to confirm all the mass. If the mass is good, go to step 19. If is not, repeat the steps 14-16.
19. **Cleavage from the resin:** Draw up around 3mL of a solution of 5% TIS in TFA and shake the syringe for 90min on a mechanical shaker with 400rpm. Transfer the solution to a Falcon Tube. Repeat this step 3 times. Evaporate the solution in the Falcon Tube carefully and precipitate in Et<sub>2</sub>O.
20. Purification of the final PNA by prep HPLC.



$C_{124}H_{157}N_{51}O_{31}$   
 MW: 2857.95 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 2.4%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-8-int** was prepared on solid support.

**Sequence:** Lys(Boc); c(Bhoc); a(Bhoc); c(Bhoc); t; a(Bhoc); a(Bhoc); t; a(Bhoc); acid acetic.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate **I-8-int** (30 mg, 0.013 mmol, 1 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.3 mL). DBCO-PEG4-NHS (8.4 mg, 0.013 mmol, 1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (35 μL, 0.260 mmol, 20 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-8** was obtained as a white solid with less than 5% yield (1.5 mg, 0.53 μmol).

- **HRMS (ESI) *m/z*:**  $C_{124}H_{157}N_{51}O_{31}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 3$  to  $6$
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 953.4165,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 953.4163
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 715.3142,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 715.3142
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 572.4528,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 572.4529
- $[M+6H]^{6+}$  calculated = 477.2119,  $[M+6H]^{6+}$  measured = 477.2120
- Molecular Mass  $[M+H]^+$  2857.2316, Std. Deviation: 0.00257614

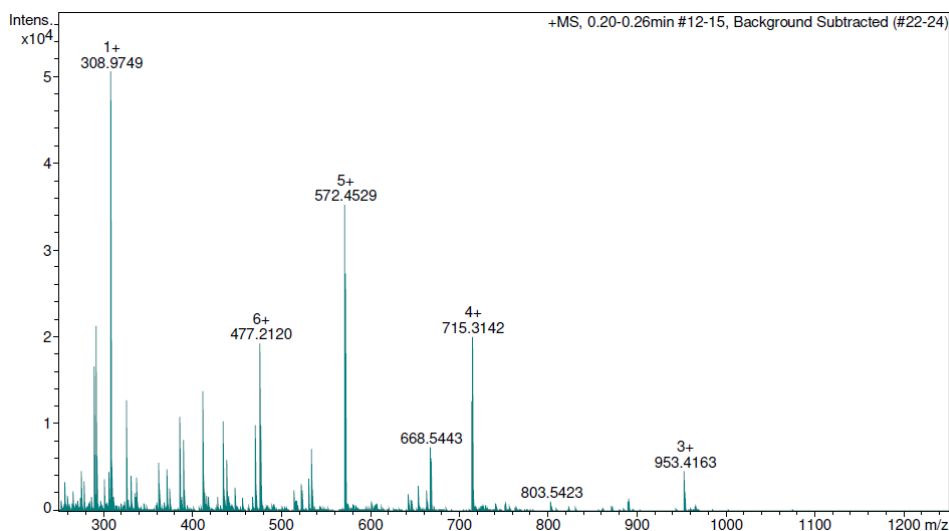
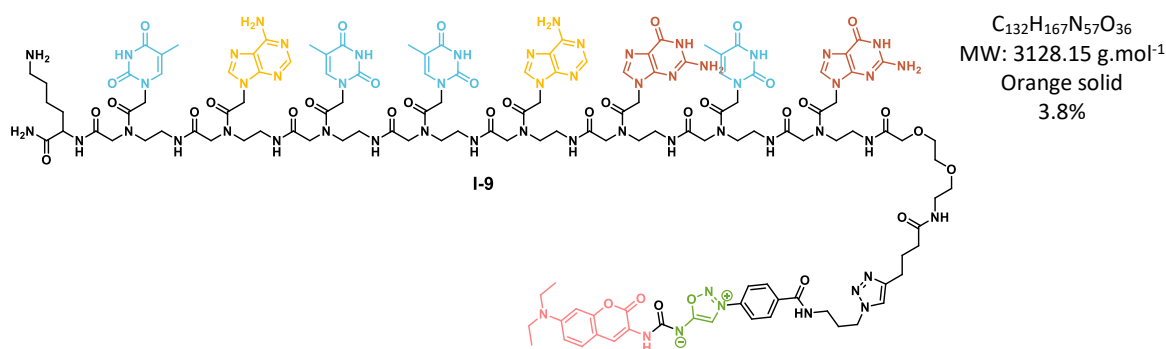


Figure S1. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **I-8**

PNA-ImSyd-Coum complementary – I-9



Using the general procedure **A**, the PNA **6** was prepared on solid support.

Sequence: Lys(Boc); t; a(Bhoc); t; t; a(Bhoc); g(Bhoc); t; g(Bhoc); AEEA spacer; hexynoic acid; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum **I-7**.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-9** was obtained as an orange solid with less than 5% yield (2.7 mg, 0.86 μmol).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{132}H_{167}N_{57}O_{36}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 3$  to  $7$
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 1043.7729,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 1043.7727
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 782.8307,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 782.8313
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 626.4660,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 626.4662
- $[M+6H]^{6+}$  calculated = 522.2229,  $[M+6H]^{6+}$  measured = 522.2231
- $[M+7H]^{7+}$  calculated = 447.7635,  $[M+7H]^{7+}$  measured = 447.7636
- Molecular Mass  $[M+H]^+$  3127.2975, Std. Deviation: 0.00453367

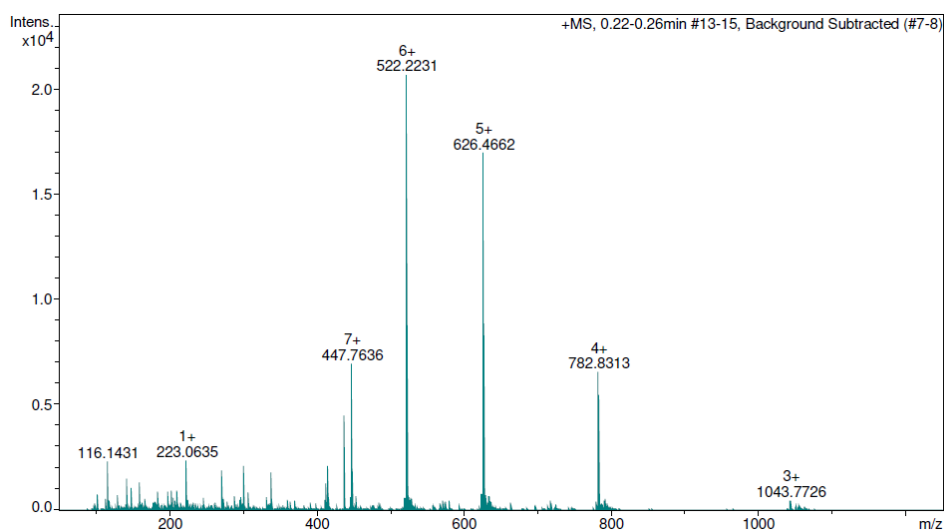
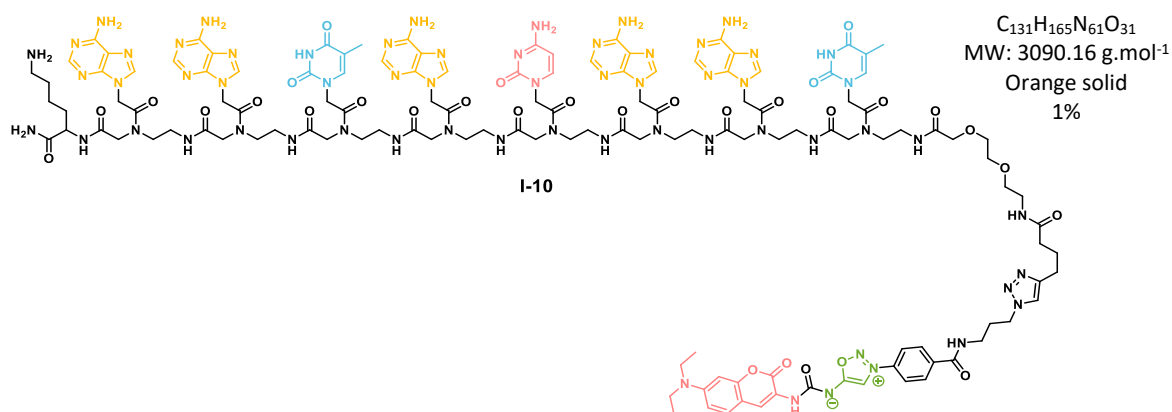


Figure S2. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-Coum complementary **I-9**

## PNA-ImSyd-Coum mismatch – I-10



Using the general procedure **A**, the PNA **I-10** was prepared on solid support.

Sequence: Lys(Boc); a(Bhoc); a(Bhoc); t; a(Bhoc); c(Bhoc); a(Bhoc); a(Bhoc); t; **AEEA** spacer; **hexynoic acid**; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum **I-7**.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-10** was obtained as an orange solid with less than 5% yield (0.7 mg, 0.23 μmol).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{131}H_{165}N_{61}O_{31}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 4$  to  $8$
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 773.3363,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 773.3362
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 618.8705,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 618.8700
- $[M+6H]^{6+}$  calculated = 515.8933,  $[M+6H]^{6+}$  measured = 515.8931
- $[M+7H]^{7+}$  calculated = 442.3381,  $[M+7H]^{7+}$  measured = 442.3384
- $[M+8H]^{8+}$  calculated = 387.1718,  $[M+8H]^{8+}$  measured = 387.1722
- Molecular Mass  $[M+H]^+$  3089.3199, Std. Deviation: 0.00531696

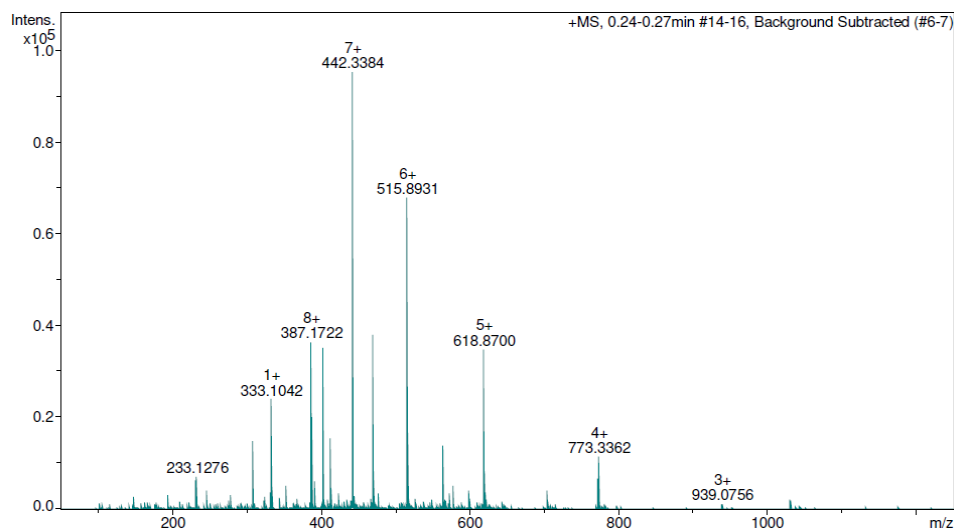
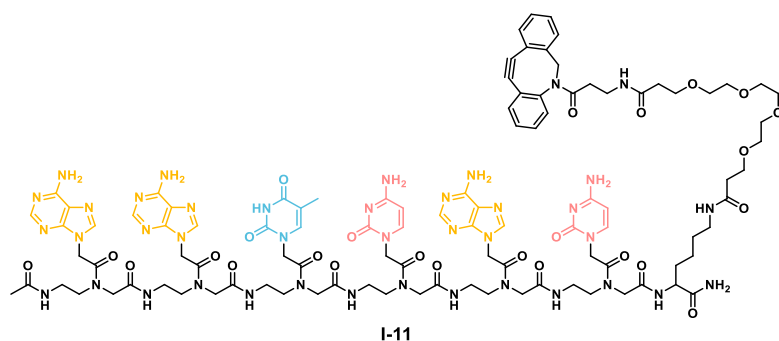


Figure S3. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-Coum mismatch **I-10**

PNA-DBCO-6 bases – I-11



$C_{102}H_{130}N_{40}O_{25}$   
 MW: 2316.42 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 5%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-11-int** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys(Boc)**; **c(Bhoc)**; **a(Bhoc)**; **c(Bhoc)**; **t**; **a(Bhoc)**; **a(Bhoc)**; **acetic acid**.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate PNA **I-11-int** was purified by prep HPLC. The purified intermediary product (12.2 mg, 6.85 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.15 mL). Et<sub>3</sub>N (18.5 μL, 0.137 mmol, 20 eq.) and DBCO-PEG4-NHS (4.45 mg, 6.85 μmol, 1.0 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-11** was obtained as a white solid (2.7 mg, 1.17 μmol, 5% yield).

- **HRMS (ESI) *m/z***:  $C_{102}H_{130}N_{40}O_{25}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 4$  to  $5$
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 579.7612,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 579.7616
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 464.0104,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 464.0110
- Molecular Mass  $[M+H]^+$  2316.0228, Std. Deviation: 0.00459245

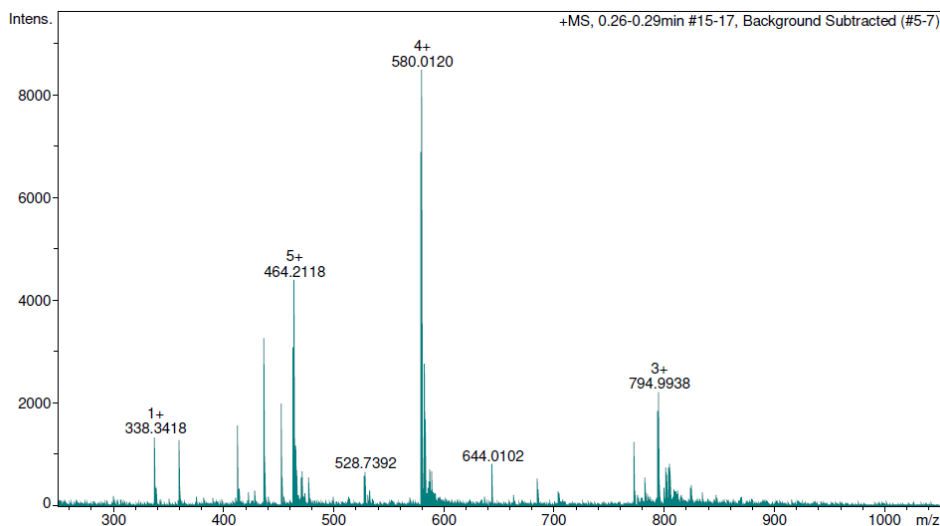
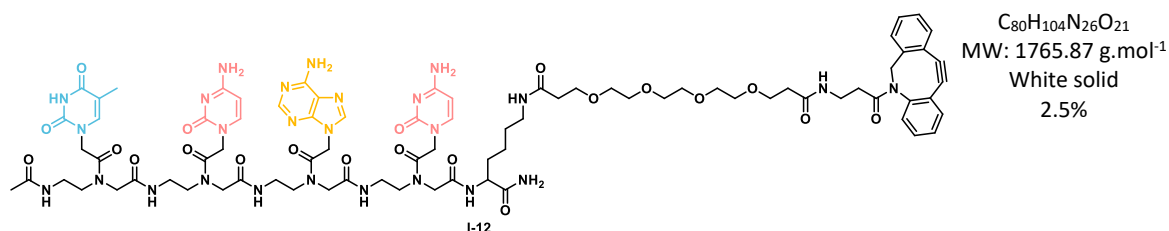


Figure S4. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO I-11



## PNA-DBCO-4 bases – I-12



Using the general procedure **A**, the PNA **I-12-int** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys(Boc)**; **c(Bhoc)**; **a(Bhoc)**; **c(Bhoc)**; **t**; **acetic acid**.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate PNA **I-12-int** (10 mg, 8.12 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.2 mL). Et<sub>3</sub>N (21.9 μL, 0.164 mmol, 20 eq.) and DBCO-PEG4-NHS (5.28 mg, 8.12 μmol, 1.0 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-12** was obtained as a white solid with less than 5% yield (1 mg, 0.57 μmol, 2.5% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{80}H_{104}N_{26}O_{21}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$  to  $4$
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 883.400744,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 883.402388
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 589.270929,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 589.271133
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 451.692204,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 451.692359

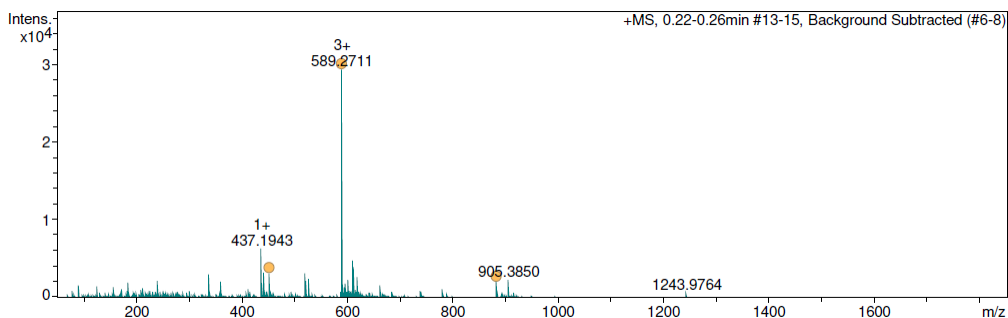
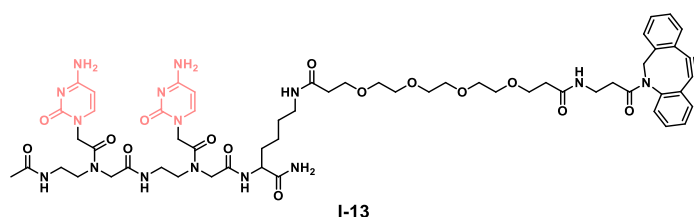


Figure S5. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **I-12**

PNA-DBCO-2 bases – I-13



$C_{58}H_{77}N_{15}O_{15}$   
 MW: 1224.34 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 1.8%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-13-int** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys(Boc)**; **c(Bhoc)**; **c(Bhoc)**; **acetic acid**.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate **I-13-int** (10 mg, 5.62 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.2 mL). Et<sub>3</sub>N (15.2 μL, 0.112 mmol, 20 eq.) and DBCO-PEG4-NHS (3.65 mg, 5.62 μmol, 1.0 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-13** was obtained as a white solid with less than 5% yield (0.5 mg, 0.4 μmol 1.8% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{58}H_{77}N_{15}O_{15}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 1$  to  $3$
- $[M+H]^+$  <sub>calculated</sub> = 1224.580146,  $[M+H]^+$  <sub>measured</sub> = 1224.578319
- $[M+2H]^{2+}$  <sub>calculated</sub> = 612.793455,  $[M+2H]^{2+}$  <sub>measured</sub> = 612.794274
- $[M+3H]^{3+}$  <sub>calculated</sub> = 408.866070,  $[M+3H]^{3+}$  <sub>measured</sub> = 408.865271

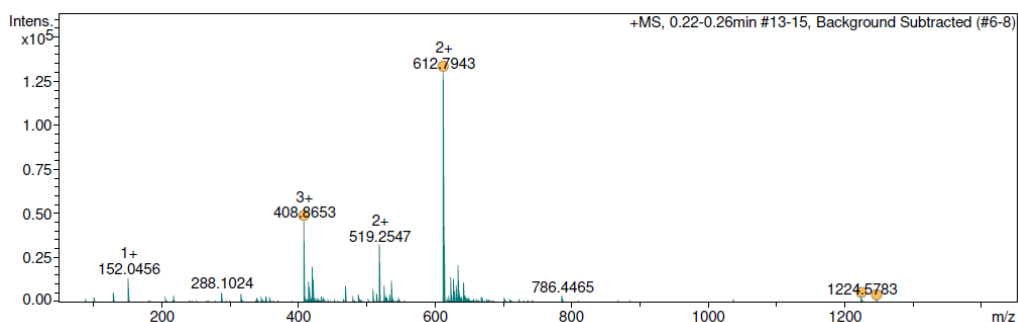
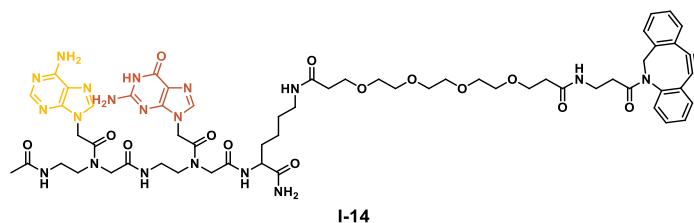


Figure S6. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **I-13**

PNA-DBCO-2 bases – I-14



$C_{60}H_{77}N_{19}O_{14}$   
 MW: 1288.39 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 3.5%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-14-int** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys(Boc)**; **g(Bhoc)**; **a(Bhoc)**; **acetic acid**.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate **I-14-int** (10 mg, 7.76 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.2 mL). Et<sub>3</sub>N (20.9 μL, 0.155 mmol, 20 eq.) and DBCO-PEG4-NHS (5.04 mg, 7.76 μmol, 1.0 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-14** was obtained as a white solid with less than 5% yield (1 mg, 0.8 μmol, 3.5% yield).

- **HRMS (ESI) *m/z*:** C<sub>60</sub>H<sub>77</sub>N<sub>19</sub>O<sub>14</sub> [M+nH]<sup>n+</sup> with n = 1 to 4
- [M+H]<sup>+</sup> calculated = 1288.597015, [M+H]<sup>+</sup> measured = 1288.596837
- [M+2H]<sup>2+</sup> calculated = 644.802146, [M+2H]<sup>2+</sup> measured = 644.801201
- [M+3H]<sup>3+</sup> calculated = 430.203856, [M+3H]<sup>3+</sup> measured = 430.203725
- [M+2H+Ca]<sup>4+</sup> calculated = 332.391446, [M+2H+Ca]<sup>4+</sup> measured = 332.391029

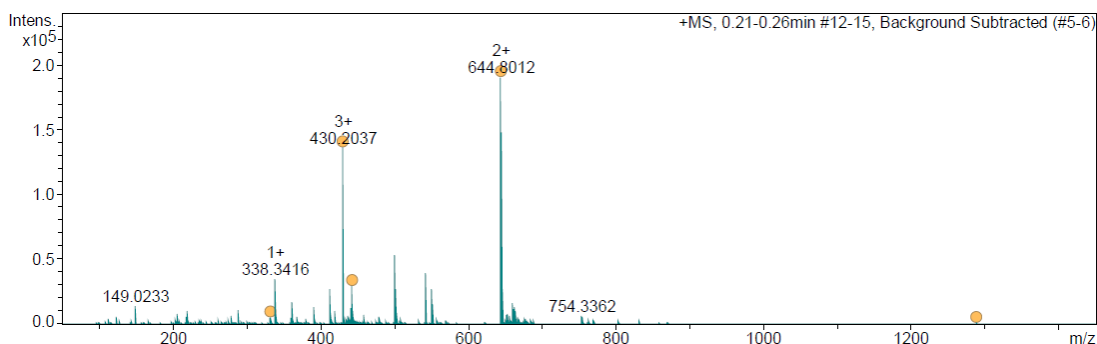
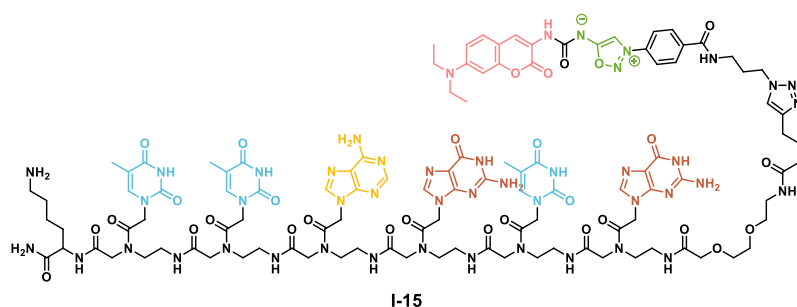


Figure S7. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **I-14**

PNA-ImSyd-Coum-6 bases – I-15



$C_{110}H_{140}N_{46}O_{30}$   
 MW: 2586.62 g.mol<sup>-1</sup>  
 Orange solid  
 27%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-15** was prepared on solid support.

Sequence: Lys(Boc); t; t; a(Bhoc); g(Bhoc); t; g(Bhoc); AEEA spacer; hexynoic acid; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum I-7.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-15** was obtained as an orange solid (16 mg, 6.2 μmol, 27% yied).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{110}H_{140}N_{46}O_{30}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 4$  to  $6$
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 647.2789,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 647.2796
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 518.0246,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 518.0246
- $[M+6H]^{6+}$  calculated = 431.8550,  $[M+6H]^{6+}$  measured = 431.8552
- Molecular Mass  $[M+H]^+$  2586.0939, Std. Deviation: 0.00333654

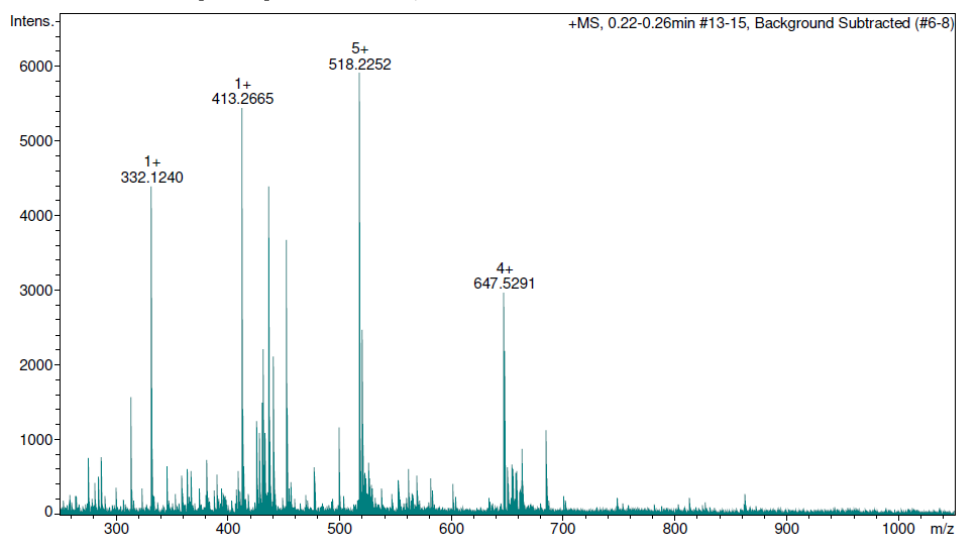
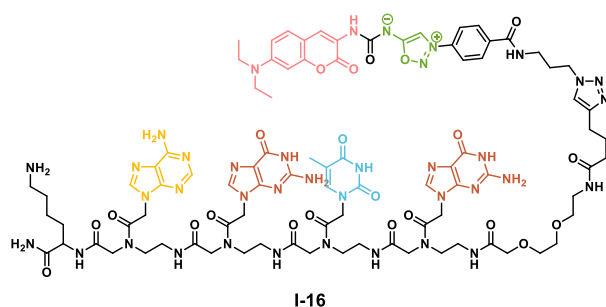


Figure S8. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum I-15

PNA-ImSyd-Coum-4 bases – I-16



$C_{88}H_{112}N_{38}O_{22}$   
MW: 2052.88 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
32%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-16** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys**(Boc); **a**(Bhoc); **g**(Bhoc); **t**; **g**(Bhoc); **AEEA** spacer; **hexynoic acid**; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum **I-7**.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-16** was obtained as an orange solid (15 mg, 7.3 μmol, 32% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{88}H_{112}N_{38}O_{22}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 3$  to  $6$
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 685.3024,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 685.3013
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 514.2286,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 514.2286
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 411.5843,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 411.5844
- $[M+6H]^{6+}$  calculated = 343.1548,  $[M+6H]^{6+}$  measured = 343.1550
- Molecular Mass  $[M+H]^+$  2053.8925, Std. Deviation: 0.00207787

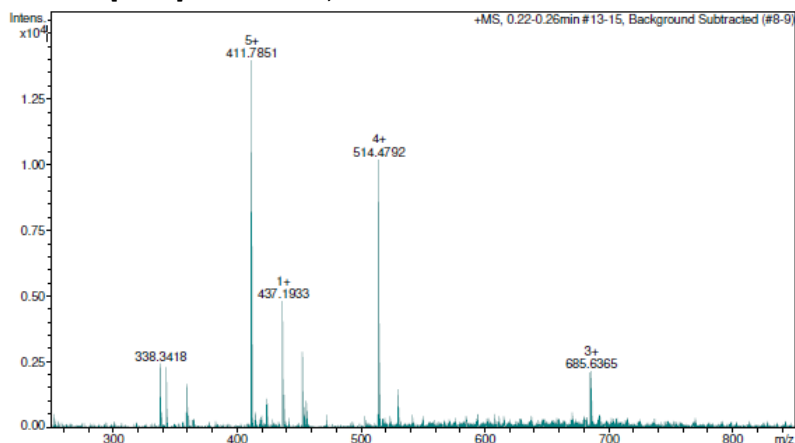
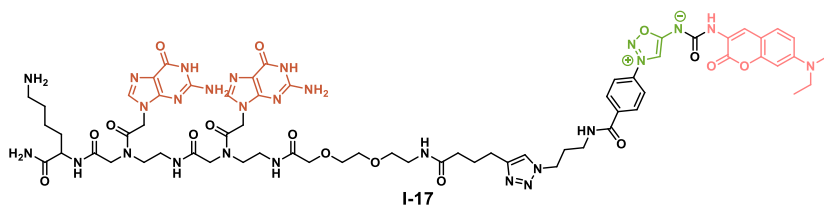


Figure S9. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum **I-16**

## PNA-ImSyd-Coum-2 bases – I-17



$C_{66}H_{85}N_{27}O_{16}$   
MW: 1511.67 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
61%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-17** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys(Boc)**; **g(Bhoc)**; **g(Bhoc)**; **AEEA** spacer; **hexynoic acid**; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum **I-7**.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-17** was obtained as an orange solid (7.6 mg, 13.9  $\mu$ mol, 61% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{66}H_{85}N_{27}O_{16}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$  to  $5$
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 756.840656,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 756.841827
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 504.896196,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 504.897244
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 378.923966,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 378.925122
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 303.340628,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 303.341051

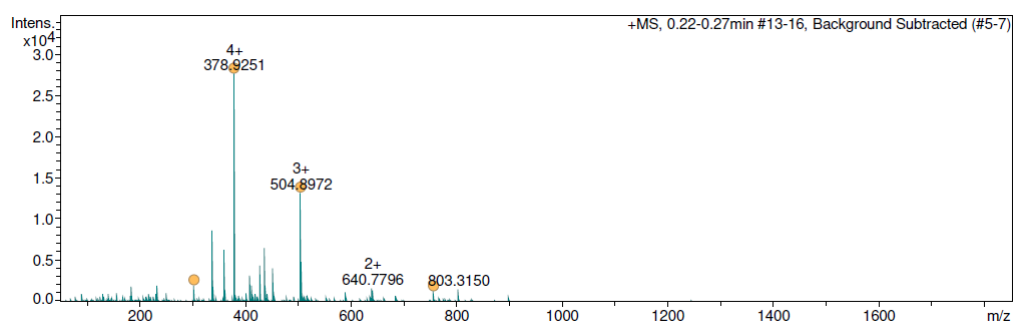
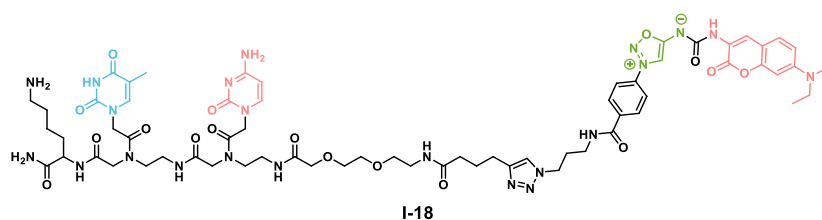


Figure S10. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum **I-17**

## PNA-ImSyd-Coum-2 bases – I-18



$C_{65}H_{86}N_{22}O_{17}$   
MW: 1447.54 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
30%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-18** was prepared on solid support.

**Sequence:** Lys(Boc); t(Bhoc); c(Bhoc); AEEA spacer; hexynoic acid; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum **I-7**.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-18** was obtained as an orange solid (9.8 mg, 6.77  $\mu$ mol, 30% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$ :**  $C_{65}H_{86}N_{22}O_{17}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$  to  $4$
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 724.334341,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 724.334737
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 483.225320,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 483.226251
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 362.670809,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 362.671702

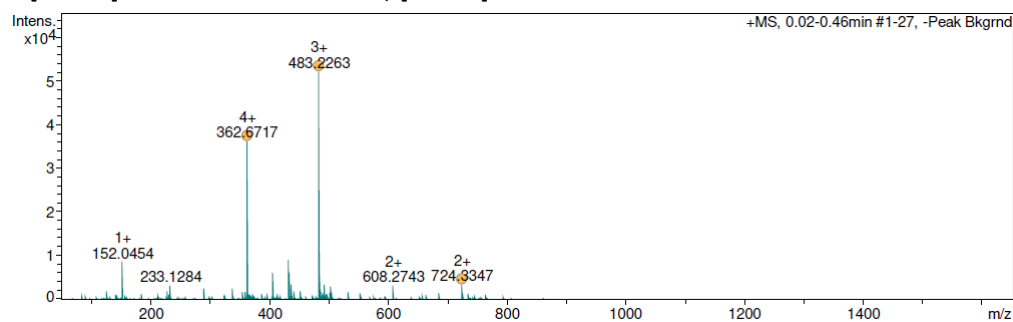
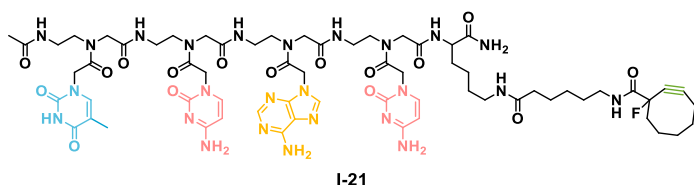


Figure S11. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum **I-18**

PNA-MFCO-4 bases – I-21



$C_{65}H_{90}FN_{25}O_{16}$   
MW: 1496.59 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
15%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-21-int** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys(Boc)**; **c(Bhoc)**; **a(Bhoc)**; **c(Bhoc)**; **t**; **acetic acid**.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate PNA **I-21-int** was purified by prep HPLC. The purified intermediary product (7.5 mg, 6.091 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.1 mL). Et<sub>3</sub>N (16.4 μL, 121.8 μmol, 20 eq.) and MFCO-NHS-ester (1 eq, 6.091 μmol, 7.5 mg) were then added and the mixture was stirred at room temperature. The desired compound **I-21** was obtained as a white solid (4.9 mg, 3.3 μmol, 15% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$** :  $C_{65}H_{90}FN_{25}O_{16}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$  to  $3$
- $[M+2H]^{2+}$  <sub>calculated</sub> = 748.856347,  $[M+2H]^{2+}$  <sub>measured</sub> = 748.857095
- $[M+3H]^{3+}$  <sub>calculated</sub> = 499.574664,  $[M+3H]^{3+}$  <sub>measured</sub> = 499.574282

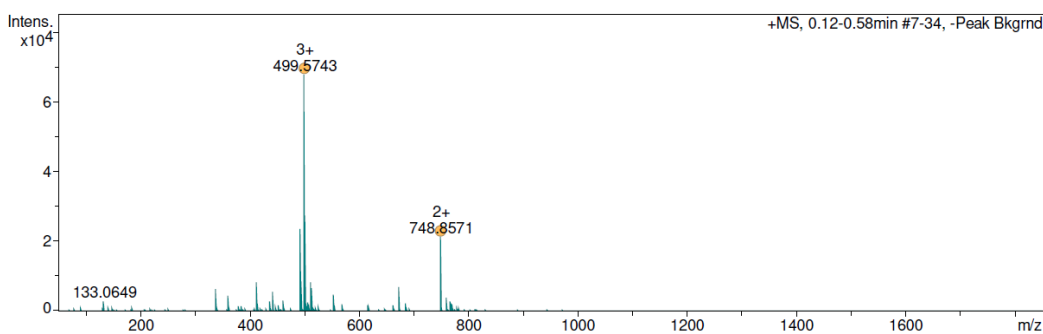
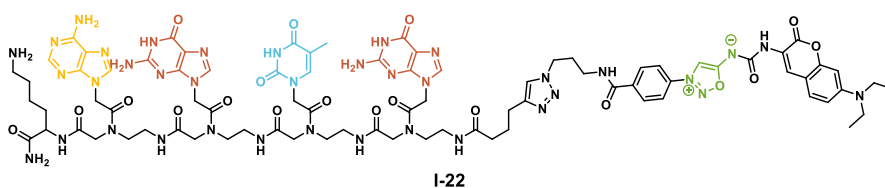


Figure S12. HRMS (ESI) spectrum of PNA-MFCO **I-21**



PNA-ImSyd-Coum-4 bases – I-22



$C_{82}H_{101}N_{37}O_{19}$   
 MW: 1907.81 g.mol<sup>-1</sup>  
 Orange solid  
 23%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-22** was prepared on solid support.

**Sequence:** Lys(Boc); a(Bhoc); g(Bhoc); t; g(Bhoc; hexynoic acid; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum I-7.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-22** was obtained as an orange solid (10 mg, 5.2 μmol, 23% yield).

- **HRMS (ESI) *m/z*:**  $C_{82}H_{101}N_{37}O_{19}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$  to  $6$
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 954.910999,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 954.911302
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 636.943091,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 636.943525
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 477.959137,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 477.959692
- $[M+5H]^{5+}$  calculated = 382.568765,  $[M+5H]^{5+}$  measured = 382.569396
- $[M+6H]^{6+}$  calculated = 318.975184,  $[M+6H]^{6+}$  measured = 318.975099

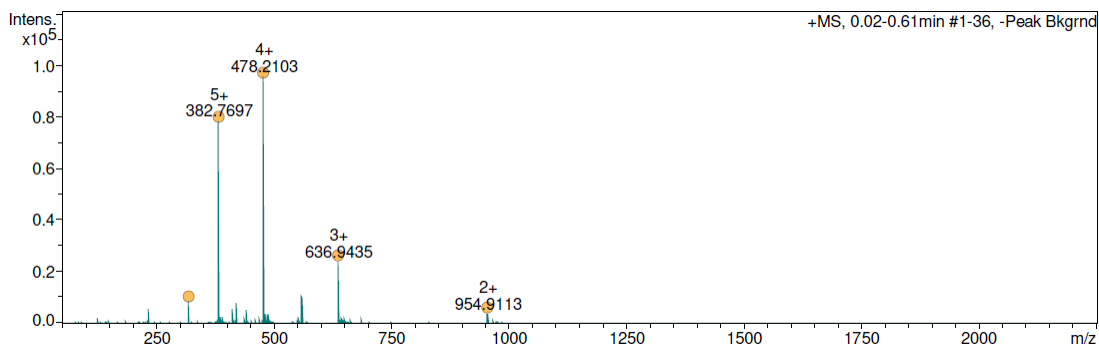
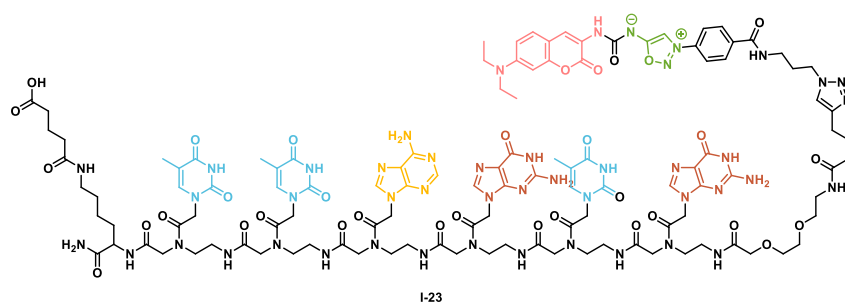


Figure S13. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum **I-22**

## PNA-ImSyd-Coum – I-23



$C_{115}H_{146}N_{46}O_{33}$   
MW: 2700.72 g·mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
Quantitative

**I-15** (14.5 mg, 5.6  $\mu$ mol, 1 eq.) was dissolved in dry DMF (2000  $\mu$ L). Glutaric anhydride (0.64 mg, 5.6  $\mu$ mol, 1eq.) was added and the mixture was stirred at 40 °C for 2h. After that, DMF was removed under *vacuo* to afford **I-23** as an orange solid (22 mg, 5.6  $\mu$ mol, quantitative).

- **HRMS (ESI) *m/z***:  $C_{115}H_{146}N_{46}O_{33}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 3$  to  $4$
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 900.711283,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 900.711345
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 675.786287,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 675.786024

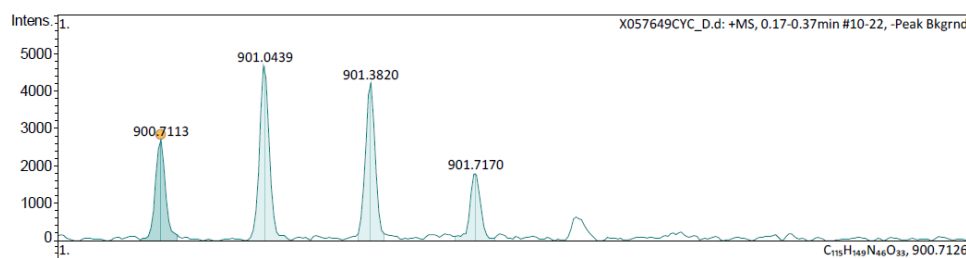


Figure S14. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum **I-23**

## **General procedure B for PNA-protein coupling/ PNA-antibody coupling**

### *Preparation of different solutions:*

- Coupling buffer: 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3 in miliQ water
- Saline buffer : 0.9 M NaCl in miliQ water

- Acid-Lysine coupling

This procedure applies for the coupling of PNAs with a carboxylic acid end.

A solution of PNA-NHS was firstly prepared by incubation of PNA-COOH (1.0 equiv.), TSTU (1.1 equiv.) and Et<sub>3</sub>N (1.1 equiv.) in dry DMF (50 µL) at 25 °C for 18 hours. This solution was then added to a solution of protein/antibody in coupling buffer. The mixtures were then incubated at 25°C for 4 hours and the resulting protein/antibody-PNA complex was obtained and purified.

- Maleimide-thiol coupling

This procedure applies for the coupling of PNAs with a maleimide end.

The PNA is dissolved in 50 µL of dry DMF. This solution was then added to a solution of protein/antibody in saline buffer. The mixtures were then incubated at 25°C for 4 hours and the resulting protein/antibody-PNA complex was obtained and purified.

## **General procedure C for protein purification**

### *Preparation of different solutions:*

- Washing buffer: 0.15 M NaCl + 50 mM phosphate in miliQ water

The derivatised protein were purified by Zeba™ Spin Desalting Columns, 40K MWCO, 5 mL. The column was emptied from stockage solution (centrifugation, 2 min, 1000 rpm), washed three times with washing buffer (centrifugation, 2 min, 2 min and 4 min, 1000 rpm). The sample was added and centrifugated (4 min, 1000 rpm) and recovered in a falcon tube.

## **General procedure D for antibody purification by protein A**

The antibodies derivatised with PNA were purified by protein A purification. The antibodies were at a concentration between 1 and 2 mg/mL.

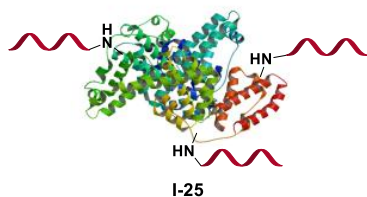
### *Preparation of different solutions:*

- Elution buffer: Glycine 0.1M in miliQ water, pH 2.58
- Washing buffer : potassium phosphate 20 mM in miliQ water
- Neutralizing buffer : potassium phosphate 1M in miliQ water
- Saline buffer : 0.9 M NaCl in miliQ water

- 1) Make a 1 ml protein A bead-bed in the column, slowly pour beads into column and rinse bottle with distilled water and add to column. Tap to remove air bubbles. Always leave an extra ml of liquid above bead bed, do not let beads dry out.
- 2) Wash column with 10 mL of miliQ water.

- 3) Equilibrate the column with 10 mL of washing buffer.
- 4) Before adding the antibody solution on the column, check pH is around 8.
- 5) Pour the antibody solution in the column and collect it. Pour the sample again on the column at least 7 times to leave time to the antibody to bind to the protein A.
- 6) Pour 2\*5mL of washing buffer on the column. To help remove free PNAs, add 0.1% tween to this buffer. Check absorbance at 280 nm to ensure that at the end of the wash, nothing is coming out of the column.
- 7) Elute the antibody with elution buffer.
- 8) Collect the elution in 2 mL vials containing 500  $\mu$ L of neutralizing buffer, pH=7.4. Mix the vial gently in order to neutralize.
- 9) Check the fractions absorbance at 280 nm to know which vials contain the antibody.
- 10) When there is no more absorbance in the vials, stop the elution.
- 11) Pool together the vials showing absorbance at 280 nm to collect all the antibody.
- 12) Do a dialysis in a saline buffer.
- 13) Check absorbance at 280 nm.
- 14) Do a MALDI analysis or SDS Page.

#### BSA-PNA-ImSyd-coum – I-25



Using the general procedure **B**, the BSA-PNA-ImSyd-Coum complex **I-25** was synthesized.

Coupling of BSA and PNA-ImSyd-Coum **I-23**.

PNA/BSA ratio: 50/1

PNA-ImSyd-Coum **I-23** (2 mg, 746.5 nmol, 1.0 eq.), TSTU (1.1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (1.1 eq.) were dissolved in dry DMF (50  $\mu$ L) at 25 °C for 18h. PNA-ImSyd-coum-NHS was obtained. This solution was then added to 950  $\mu$ L of a solution of BSA (1mg/mL) in coupling buffer. The mixtures were then incubated at 25 °C for 4 hours. The mixture was purified using the general procedure **C** and BSA-PNA-ImSyd-coum **I-25** was obtained in solution.

The mean numbers of PNA-iminosydones moieties grafted per protein were determined by mass spectrometry analysis (MALDI). An average number of 3 PNA-iminosydones were incorporated.

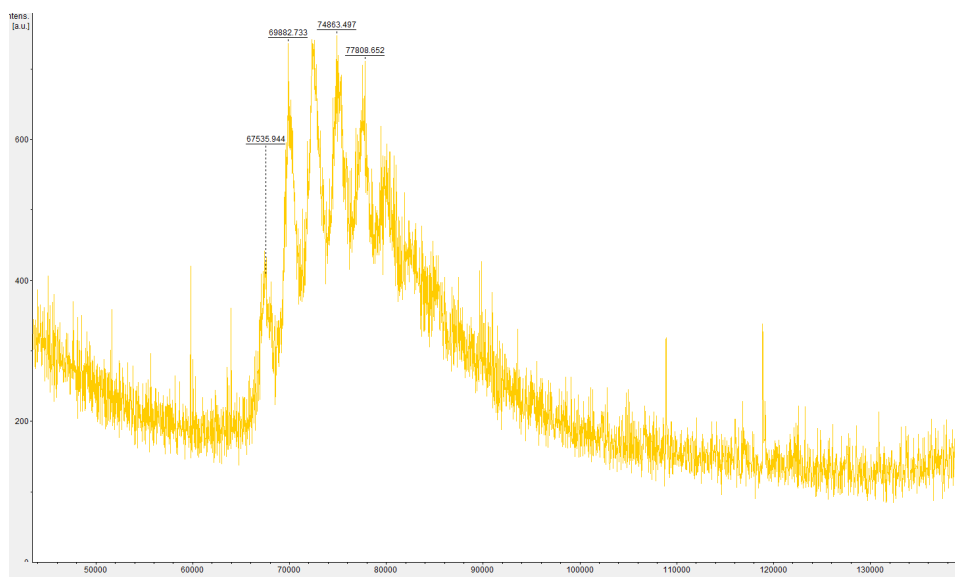
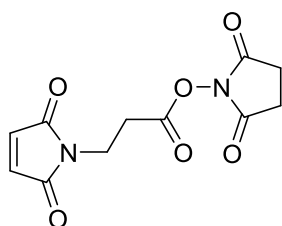


Figure S15. MALDI analysis of BSA-PNA-ImSyd-Coum I-25

**2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoate – SI-3**



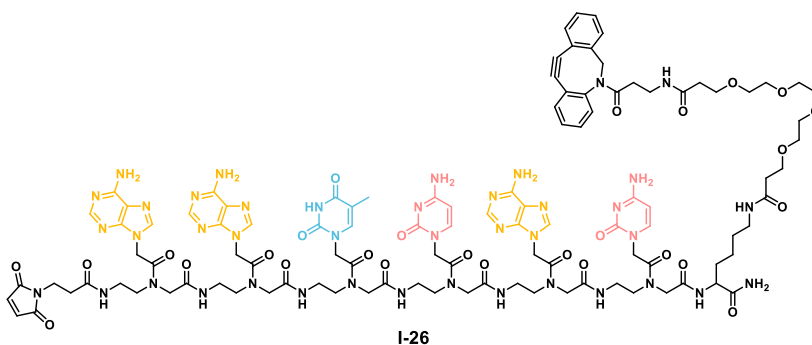
**SI-3**

$C_{11}H_{10}N_2O_6$   
 MW: 266.21 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 86%

The compound **SI-3** was obtained according to literature.<sup>119</sup>

3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoic acid (0.5 g, 3.0 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (50 mL) and the solution was cooled to 0°C. EDC·HCl (0.675 g, 3.6 mmol, 1.2 eq.) and NHS (0.9 g, 3.6 mmol, 1.2 eq.) were sequentially added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated under reduced pressure and the crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to give the NHS ester as a white solid (688 mg, 86%).

**PNA-DBCO-maléimide – I-26**



**I-26**

$C_{107}H_{133}N_{41}O_{27}$   
 MW: 2425.50 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 13%

<sup>119</sup> L. Bodero, S. Parente, F. Arrigoni, A. Klimpel, I. Neundorff, S. Gazzola, U. Piarelli, *Eur. J.O.C.*, **2021**, 17, 2383 – 2387

Using the general procedure **A**, the PNA **I-26** was prepared on solid support.

Sequence: **Lys(Boc)**; **c(Bhoc)**; **a(Bhoc)**; **c(Bhoc)**; **t**; **a(Bhoc)**; **a(Bhoc)**; **maleimide NHS SI-3**.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate PNA **I-26-int** was purified by prep HPLC. The purified intermediary product (38.15 mg, 20.1 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.15 mL). Et<sub>3</sub>N (54.3 μL, 401 μmol, 20 eq.) and DBCO-PEG4-NHS (13 mg, 20.1 μmol, 1.0 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-26** was obtained as a white solid (7.3 mg, 3.0 μmol, 13% yield).

- **HRMS (ESI) *m/z***: C<sub>107</sub>H<sub>133</sub>N<sub>41</sub>O<sub>27</sub> [M+nH]<sup>n+</sup> with n = 3 to 5
- [M+3H]<sup>3+</sup> calculated = 809.017096, [M+3H]<sup>3+</sup> measured = 809.016497
- [M+4H]<sup>4+</sup> calculated = 607.014641, [M+4H]<sup>4+</sup> measured = 607.014651
- [M+5H]<sup>5+</sup> calculated = 485.813973, [M+5H]<sup>5+</sup> measured = 485.813619

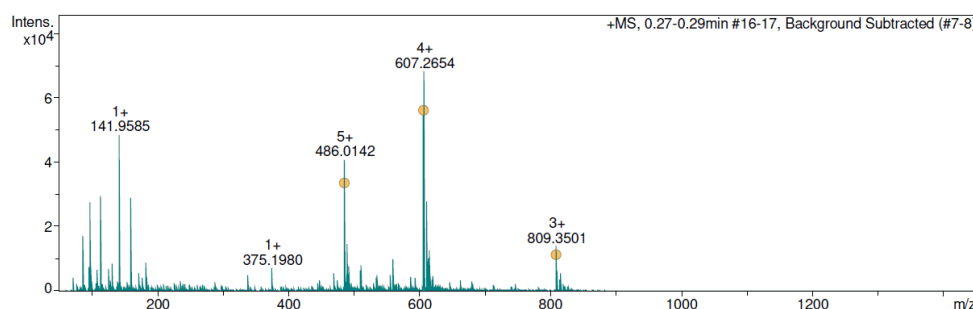
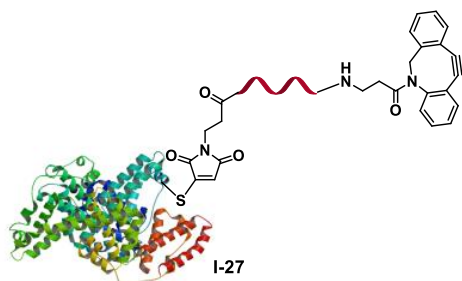


Figure S16. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **I-26**

#### BSA-PNA-DBCO-maleimide – **I-27**



Using the general procedure **B**, the BSA-PNA-DBCO complex **I-27** was synthesized.

Coupling of BSA and PNA-DBCO **I-26**.

PNA/BSA ratio : 28/1

PNA-DBCO maleimide **I-26** (1 mg, 412 nmol, 28 eq.), was dissolved in dry DMF (50 μL). This solution was then added to 950 μL of a solution of BSA (1mg/mL) in saline buffer. The mixtures were then incubated at 25 °C for 4 hours. The mixture was purified using the general procedure **C** and BSA-PNA-DBCO **I-27** was obtained in solution.

The mean numbers of PNA-DBCO moieties grafted per protein was determined by mass spectrometry analysis (MALDI) (Figure S17). An average number of 0.5 PNA-DBCO were incorporated.

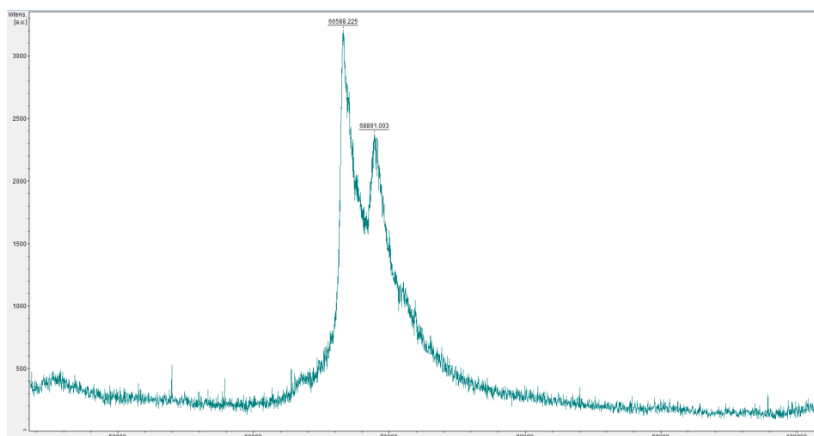
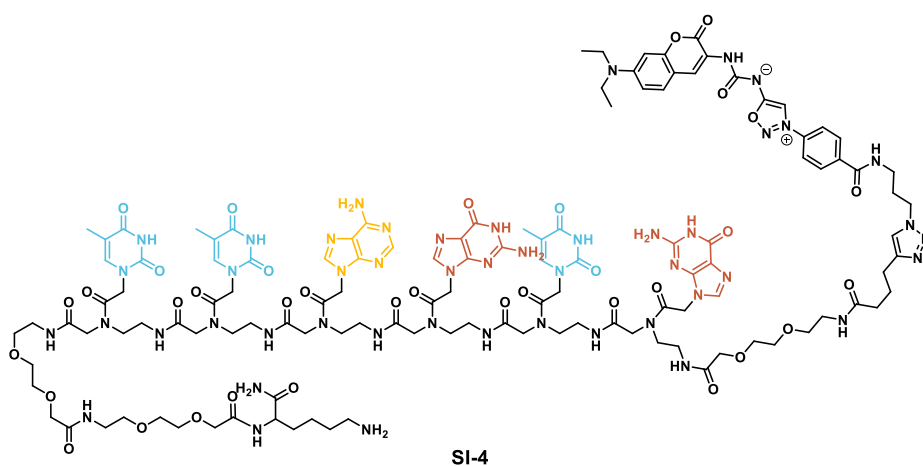


Figure S17. MALDI analysis of BSA-PNA-DBCO I-27

### PNA-ImSyd-Coum – SI-4



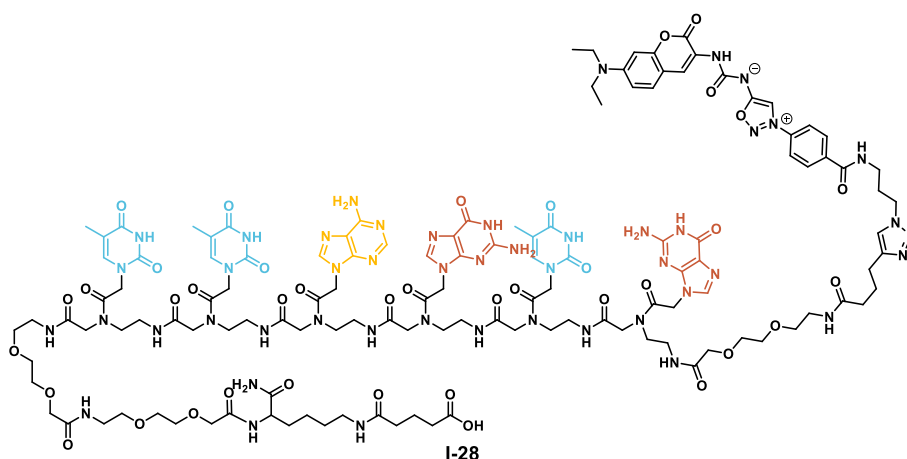
$C_{122}H_{162}N_{48}O_{36}$   
 MW: 2876.94 g.mol<sup>-1</sup>  
 Orange solid  
 34%

Using the general procedure **A**, the PNA **SI-4** was prepared on solid support.

**Sequence:** Lys(Boc); AEEA spacer ; AEEA spacer ; t; t; a(Bhoc); g(Bhoc); t; g(Bhoc); AEEA spacer; hexynoic acid; N<sub>3</sub>-ImSyd-Coum I-7.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **SI-4** was obtained as an orange solid (22 mg, 7.65 μmol, 34% yied) and engaged directly in the next step.

### PNA-ImSyd-Coum – I-28



$C_{127}H_{168}N_{48}O_{39}$   
 MW: 2991.04 g.mol<sup>-1</sup>  
 Orange solid  
 Quantitative

**SI-4** (22 mg, 7.65  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was dissolved in dry DMF (300  $\mu\text{L}$ ). Glutaric anhydride (0.87 mg, 7.65  $\mu\text{mol}$ , 1eq.) was added and the mixture was stirred at 40  $^{\circ}\text{C}$  for 2h. After that, DMF was removed under *vacuo* to afford **I-28** as an orange solid (22 mg, 7.65  $\mu\text{mol}$ , quantitative).

- **HRMS (ESI)  $m/z$ :**  $\text{C}_{127}\text{H}_{168}\text{N}_{48}\text{O}_{39}$   $[\text{M}+\text{nH}]^{\text{n}+}$  with  $n = 2$  to 4
- $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $_{\text{calculated}} = 1495.6398$ ,  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $_{\text{measured}} = 1495.6371$
- $[\text{M}+\text{HNa}]^{2+}$   $_{\text{calculated}} = 1506.6307$ ,  $[\text{M}+\text{HNa}]^{2+}$   $_{\text{measured}} = 1506.6288$
- $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$   $_{\text{calculated}} = 997.4213$ ,  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$   $_{\text{measured}} = 997.4250$
- $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$   $_{\text{calculated}} = 748.5678$ ,  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$   $_{\text{measured}} = 748.5709$

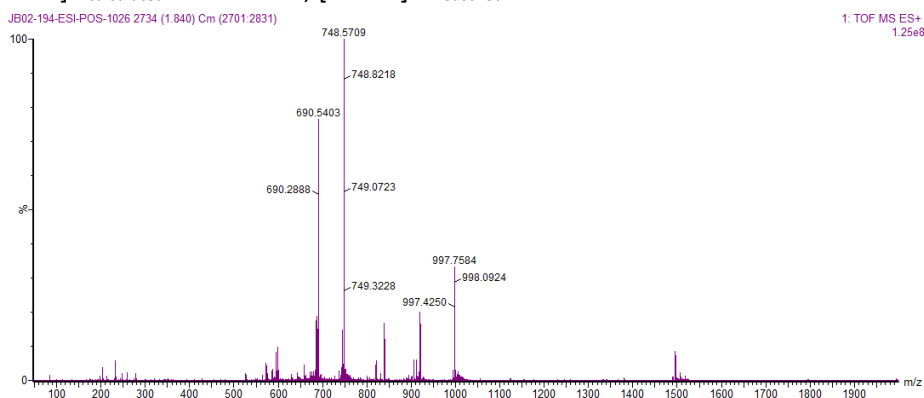


Figure S18. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum **I-28**

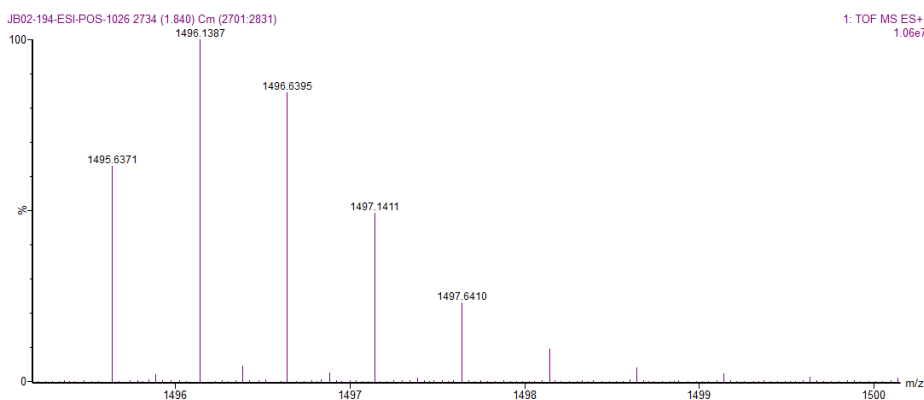
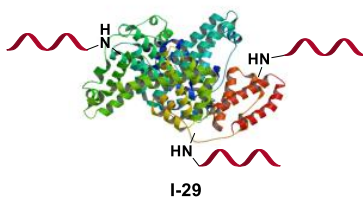


Figure S19. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ImSyd-coum **I-28**





Using the general procedure **B**, the BSA-PNA-ImSyd-Coum complex **I-29** was synthesized.

Coupling of BSA and PNA-ImSyd-Coum **I-28**.

PNA/BSA ratio : 20/1

PNA-ImSyd-Coum **I-28** (0.87 mg, 291 nmol, 1.0 eq.), TSTU (1.1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (1.1 eq.) were dissolved in dry DMF (50  $\mu$ L) at 25 °C for 18 h. PNA-ImSyd-coum-NHS was obtained. This solution was then added to 950  $\mu$ L of a solution of BSA (1mg/mL) in coupling buffer. The mixtures were then incubated at 25 °C for 4 hours. The mixture was purified using the general procedure **C** and BSA-PNA-ImSyd-coum **I-29** was obtained in solution.

The mean numbers of PNA-iminosydnone moieties grafted per protein were determined by mass spectrometry analysis (MALDI). An average number of 2 PNA-Iminosydnone were incorporated.

The concentration of the sample was determined by UV absorbance and was confirmed by kinetic with a large excess of PNA-DBCO.

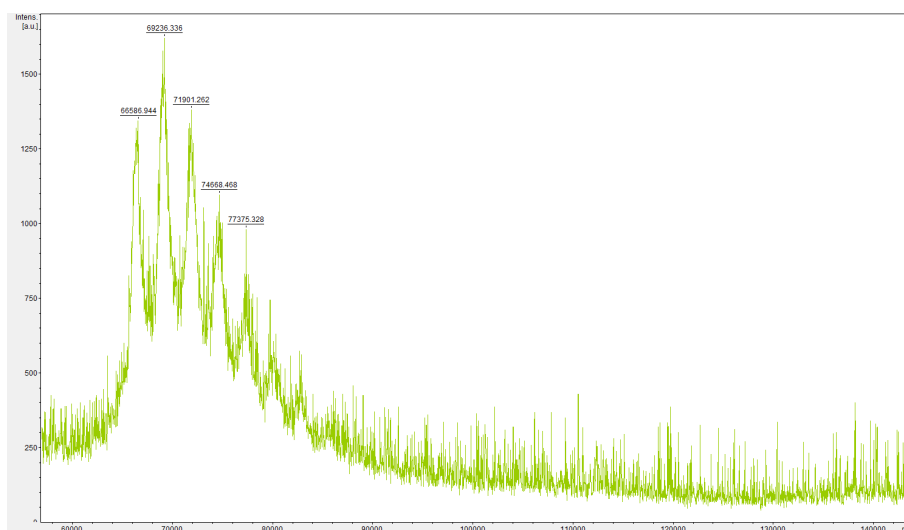


Figure S20. MALDI analysis of BSA-PNA-ImSyd-Coum **I-29**

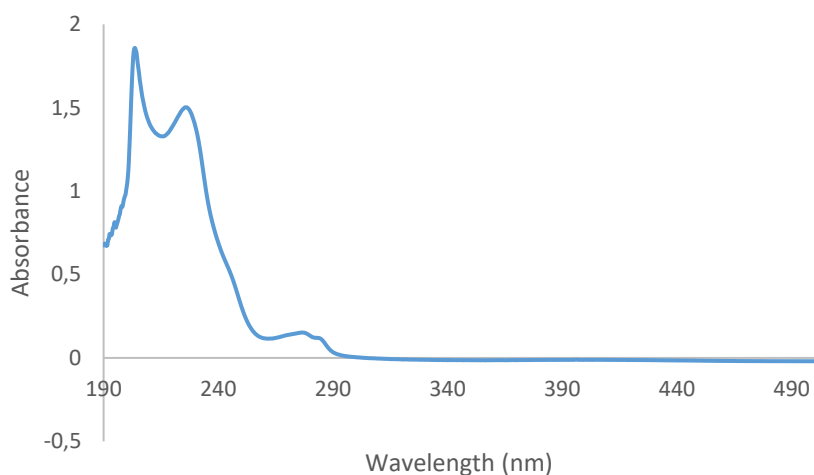
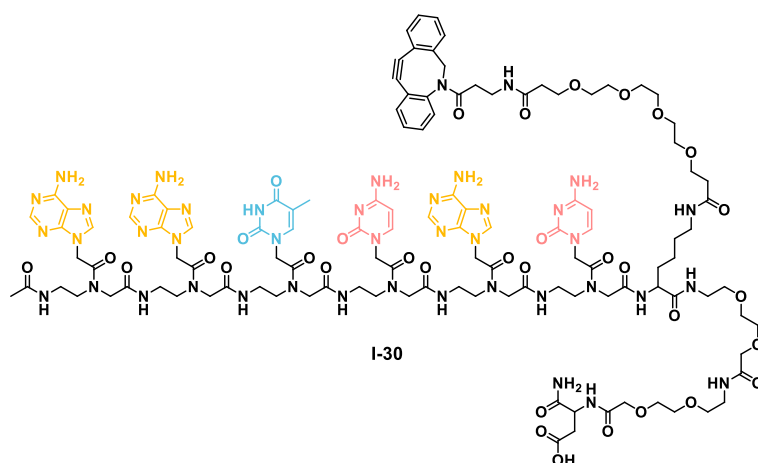


Figure S21. UV spectrum of BSA-ImSyd-coum sample I-29

**PNA-DBCO-acide – I-30**



$C_{118}H_{157}N_{43}O_{34}$   
 MW: 2721.82 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 22%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-30** was prepared on solid support.

**Sequence:** Asp(OtBu); AEEA spacer; AEEA spacer; Lys(Boc); c(Bhoc); a(Bhoc); c(Bhoc); t; a(Bhoc); a(Bhoc); acetic acid.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate PNA **I-30-int** was purified by prep HPLC. The purified intermediary product (43.7 mg, 20 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.15 mL). Et<sub>3</sub>N (54 μL, 400 μmol, 20 eq.) and DBCO-PEG4-NHS (13 mg, 20 μmol, 1.0 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-30** was obtained as a white solid (13.25 mg, 4.87 μmol, 22% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$**   $C_{118}H_{157}N_{43}O_{34}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$  to  $4$
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 1361.1017,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 1361.1006
- $[M+HNa]^{2+}$  calculated = 1372.0927,  $[M+HNa]^{2+}$  measured = 1372.0950
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 908.0626,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 908.0689
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 681.2970,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 681.3022

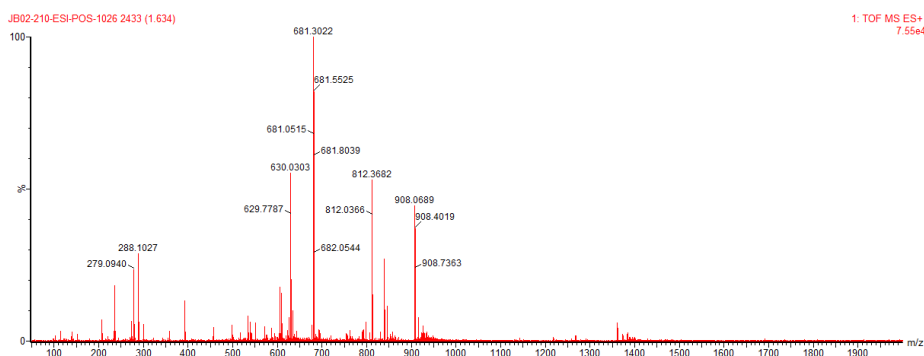


Figure S22. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **I-30**

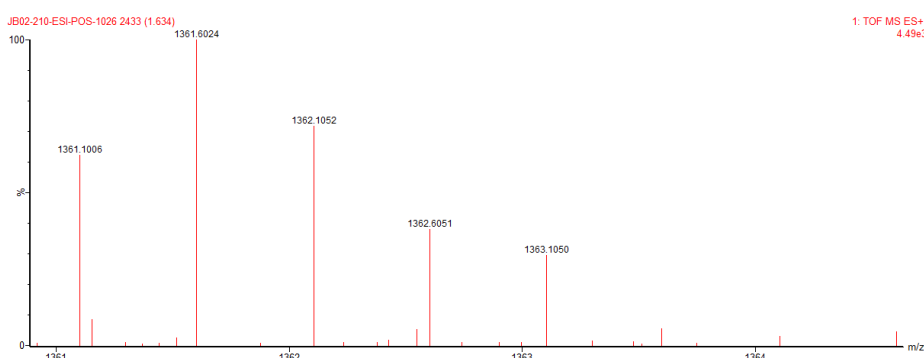
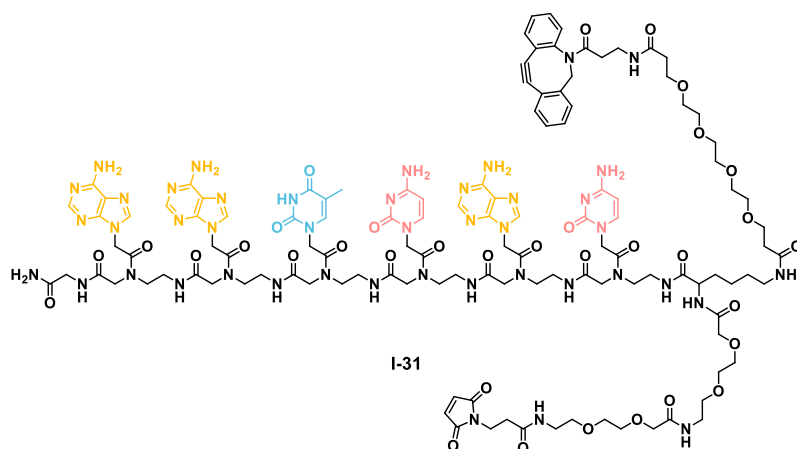


Figure S23. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **I-30**

### PNA-DBCO-maléimide – **I-31**



$C_{121}H_{158}N_{44}O_{34}$   
 MW: 2771.20 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 12%

Using the general procedure **A**, the PNA **I-31** was prepared on solid support.

**Sequence:** Fmoc-Gly-OH; **a**(Bhoc); **a**(Bhoc); **t**; **c**(Bhoc); **a**(Bhoc); **c**(Bhoc); **Lys**(Boc); **AEEA** spacer; **AEEA** spacer; **maleimide NHS SI-3**.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate PNA **I-31-int** was purified by prep HPLC. The purified intermediary product (49 mg, 22 μmol, 1.0 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.15 mL). Et<sub>3</sub>N (60.7 μL, 450 μmol, 20 eq.) and DBCO-PEG4-NHS (14.6 mg, 22.5 μmol, 1.0 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-31** was obtained as a white solid (7.63 mg, 2.75 μmol, 12% yield).

- **HRMS (ESI) *m/z*:** C<sub>121</sub>H<sub>158</sub>N<sub>44</sub>O<sub>34</sub> [M+nH]<sup>n+</sup> with n = 2 to 4

- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 1385,6072,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 1385,6057
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 924,7407,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 924,7385
- $[M+4H]^{4+}$  calculated = 693.7997,  $[M+4H]^{4+}$  measured = 693.8025

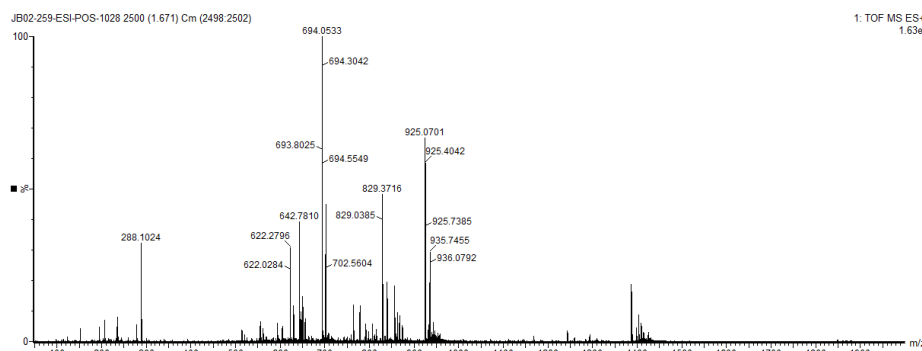


Figure S24. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO I-31

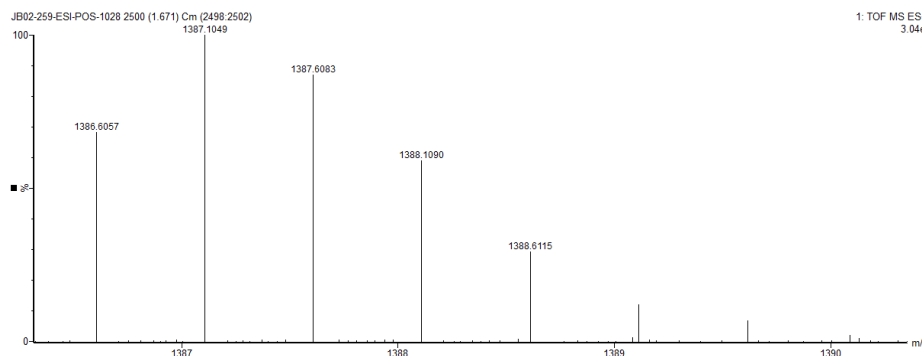
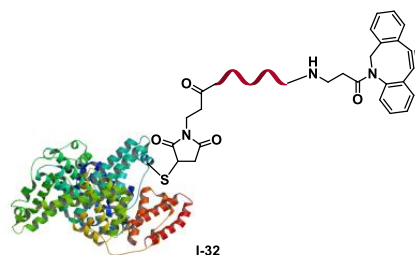


Figure S25. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO I-31

### BSA – PNA-DBCO maleimide – I-32



Using the general procedure **B**, the BSA-PNA-DBCO conjugate **I-32** was synthesized.

Coupling of BSA and PNA-DBCO **I-31**.

PNA/BSA ratio: 10/1

PNA-DBCO maleimide **I-31** (2.27 mg, 819 nmol 1 eq.) was dissolved in dry DMF (50  $\mu$ L) at 25 °C. This solution was then added to 950  $\mu$ L of a solution of BSA (1mg/mL) in saline buffer. The mixtures were then incubated at 25 °C for 2 hours. The mixture was purified using the general procedure **C** and BSA-PNA-DBCO **I-32** was obtained in solution.

The mean numbers of PNA-DBCO moieties grafted per protein were determined by mass spectrometry analysis (MALDI). An average number of 1 PNA-DBCO were incorporated.

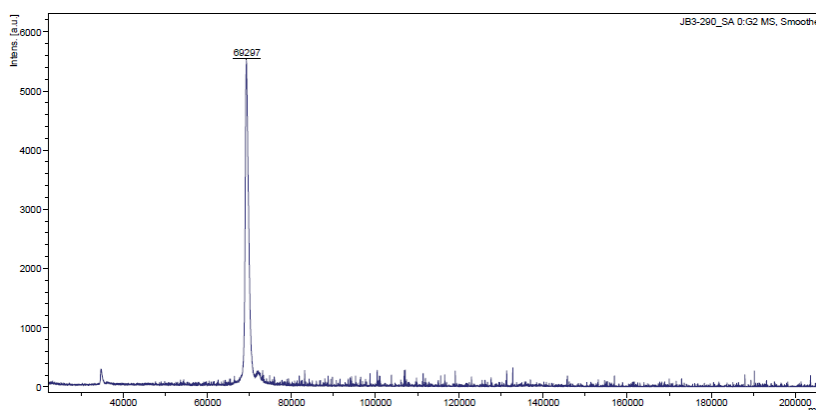


Figure S26. MALDI analysis of BSA-PNA-DBCO I-32

#### Antibody anti-KPC-416-PNA-DBCO-maléimide – I-35 (not obtained)

The antibody anti-KPC-416 was first thioled with *N*-succinimidyl *S*-acetylthioacetate (SATA) in order to have several accessible thiol on the antibody. Deprotonated lysines react with the NHS ester.

To 3 mg of antibody in water solution at 9.138 mg/mL ( $M = 150$  kDa, 20 nmol, 1 eq.) was added borate buffer (30  $\mu$ L, pH = 9.5). The total volume of antibody was 320  $\mu$ L. 20  $\mu$ L of a 5 mg/mL solution of SATA in DMF were added to the solution (400 nmol, 20 eq.). The solution was incubated for 1h.

The solution was purified according to the general procedure **C** to go back to pH = 7. The concentration in antibody was then determined by UV spectroscopy on Nanodrop by measuring the absorbance at  $\lambda=280$  nm.  $Abs_{280} = 3.256$ ,  $\epsilon = 1.4$ , 2.21 mg of antibody in 1 mL of solution were collected, the concentration is 15.53 nmol/mL. The solution of thioled antibody **I-33** was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Coupling of thioled Antibody anti-KPC-416 **I-34** and PNA-DBCO-maleimide **I-31**.

First the acetylated SH were deprotected by adding hydroxylamine (0.1 M final concentration) to the antibody solution. The solution was vortexed and then incubated for 30 min. The free thiols were then quantified by Ellman test. DAR = 10. There are 10 free thiols moieties per antibody. The solution of thioled-antibody **I-34** is then engaged directly with the PNAs for coupling.

Antibody / PNA ratio : 1/50. 5eq. of PNA per free thiol.

PNA-DBCO-maleimide **I-31** (2.27 mg, 820 nmol, 50 eq.) was dissolved in DMF (20  $\mu$ L) and added to the solution of antibody anti-KPC-416 **I-34** and incubated for 1h. Some precipitate is present in the solution. The solution is purified by protein A according to the general procedure **D** to give a solution at 433  $\mu$ g/mL.

The derivatised antibody was the analysed by MALDI analysis. The coupling didn't work, maybe due to solubility problems. Some kinetics and ELISA tests were done on this antibody and didn't show results, confirming the hypothesis that the PNA-derivatised antibody isn't present or at a very low concentration.

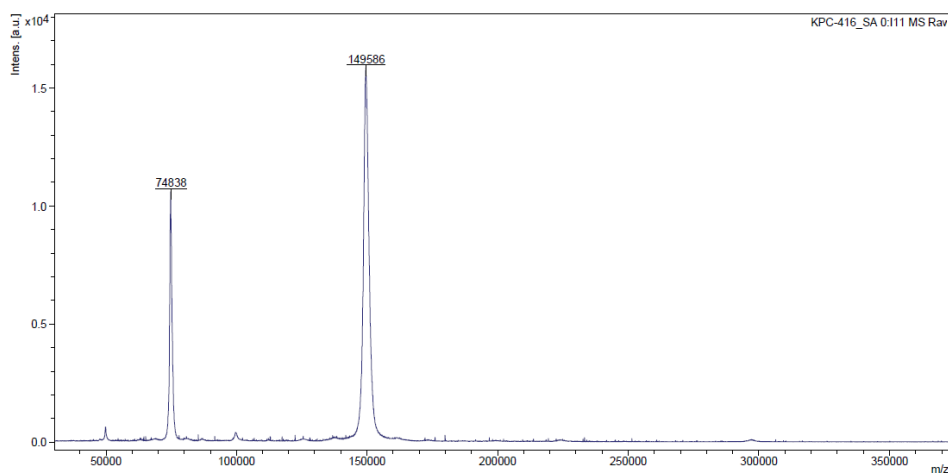


Figure S27. MALDI analysis of non derivatised thioed anti-KPC-416 antibody **I-33**

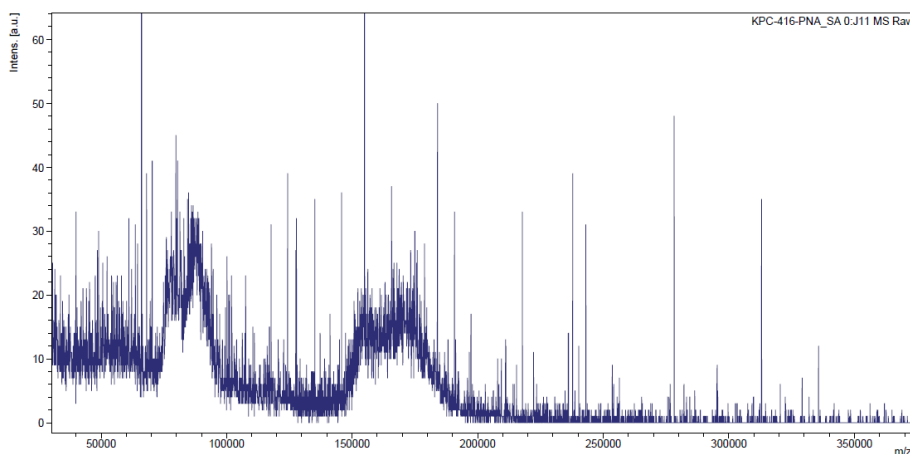
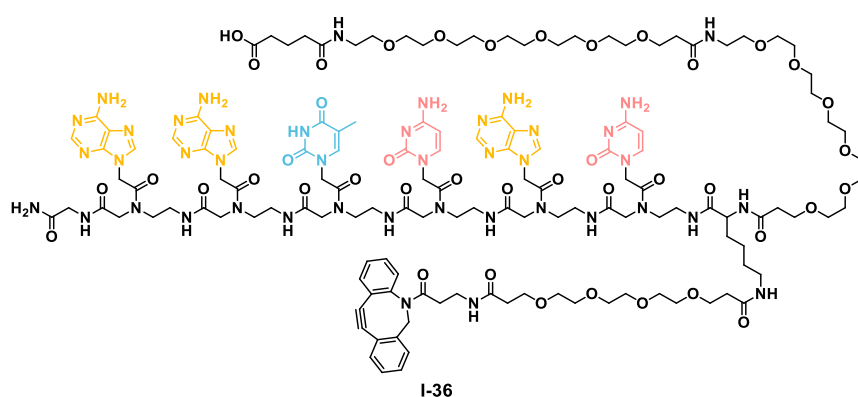


Figure S28. MALDI analysis of derivatised anti-KPC-416 antibody with PNA-DBCO maleimide **I-31**

### PNA-DBCO-acide – **I-36**



$C_{137}H_{195}N_{43}O_{42}$   
 MW: 3116.33 g.mol<sup>-1</sup>  
 Colourless oil  
 Yield: 10%

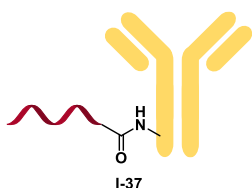
Using the general procedure **A**, the PNA **I-36-int** was prepared on solid support.

**Sequence:** Gly; A(Bhoc); A(Bhoc); T; C(Bhoc); A(Bhoc); C(Bhoc); Lys(Boc); Fmoc-NH-(PEG)<sub>5</sub>-COOH ; Fmoc-NH-(PEG)<sub>5</sub>-COOH ; glutaric anhydride.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate **I-36-int** was solubilized in anhydrous DMF (2 mL). DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS (14.5 mg, 22.5 μmol, 1 eq.) in DMF (0.9 mL) and Et<sub>3</sub>N (61 μL, 0.45 mmol, 20 eq.) were added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC and the desired compound **I-36** was obtained as a colourless oil (7.5 mg, 2.4 μmol, 10%).

- **HRMS (ESI) *m/z***: C<sub>137</sub>H<sub>195</sub>N<sub>43</sub>O<sub>42</sub> [M+nH]<sup>n+</sup> with n = 1 to 5:
- [M+H]<sup>+</sup><sub>calculated</sub> = 3115.4524, [M+H]<sup>+</sup><sub>measured</sub> = 3115.4526
- [M+2H]<sup>2+</sup><sub>calculated</sub> = 1558.2301, [M+2H]<sup>2+</sup><sub>measured</sub> = 1558.2307
- [M+3H]<sup>3+</sup><sub>calculated</sub> = 1039.1560, [M+3H]<sup>3+</sup><sub>measured</sub> = 1039.1559
- [M+4H]<sup>4+</sup><sub>calculated</sub> = 779.6190, [M+4H]<sup>4+</sup><sub>measured</sub> = 779.6192
- [M+5H]<sup>5+</sup><sub>calculated</sub> = 623.8967, [M+5H]<sup>5+</sup><sub>measured</sub> = 623.8969

**Anti-KPC-416 – PNA-DBCO – I-37**



Using the general procedure **B**, the anti-KPC-416-PNA-DBCO conjugate **I-37** was synthesized.

Coupling of anti-KPC-416 and PNA-DBCO **I-36**.

PNA/mab ratio: 10/1

PNA-DBCO **I-36** (1 mg, 321 nmol, 1.0 eq.), TSTU (1.1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (1.1 eq.) were dissolved in dry DMF (50 μL) at 25 °C for 18 h. PNA-DBCO-NHS was obtained. This solution was then added to 950 μL of a solution of anti-KPC-416 (1 mg/mL) in coupling buffer. The mixtures were then incubated at 25 °C for 4 hours. The mixture was purified using the general procedure **D** and anti-KPC-416-PNA-DBCO **I-37** was obtained in solution.

The mean numbers of PNA-DBCO moieties grafted per protein were determined by mass spectrometry analysis (MALDI). An average number of 0,5 PNA-DBCO were incorporated.

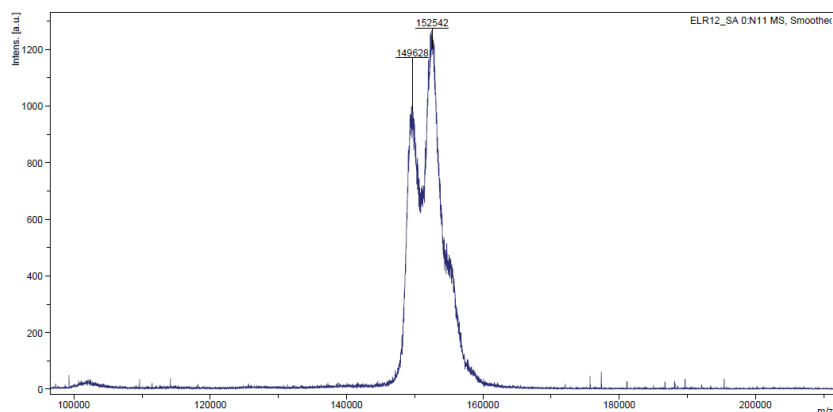
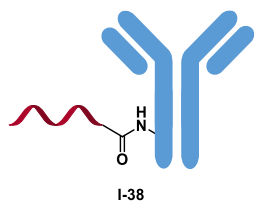


Figure S29. MALDI analysis of anti-KPC-416-PNA-DBCO **I-37**



Using the general procedure **B**, the Ctx-PNA-DBCO conjugate **I-38** was synthesized.

Coupling of Ctx and PNA-DBCO **I-36**.

PNA/mab ratio: 10/1

PNA-DBCO **I-36** (1 mg, 321 nmol, 1.0 eq.), TSTU (1.1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (1.1 eq.) were dissolved in dry DMF (50 μL) at 25 °C for 18 h. PNA-DBCO-NHS was obtained. This solution was then added to 950 μL of a solution of Ctx (1mg/mL) in coupling buffer. The mixtures were then incubated at 25 °C for 4 hours. The mixture was purified using the general procedure **D** and Ctx-PNA-DBCO **I-38** was obtained in solution.

The mean numbers of PNA-DBCO moieties grafted per protein were determined by mass spectrometry analysis (MALDI). An average number of 1 PNA-DBCO were incorporated.

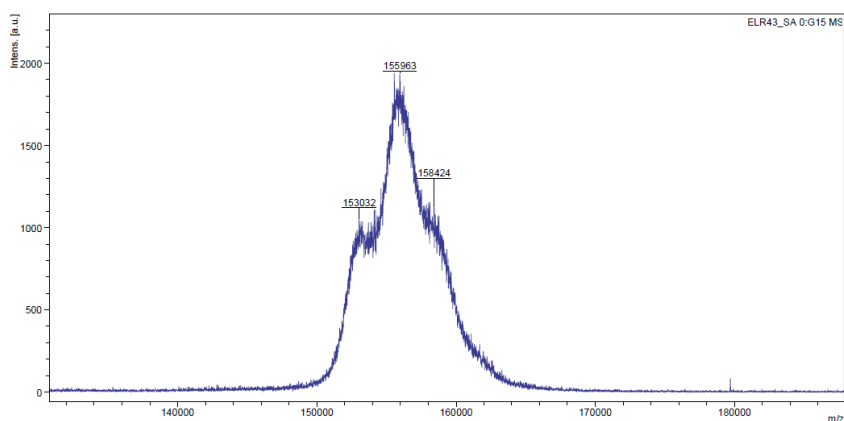
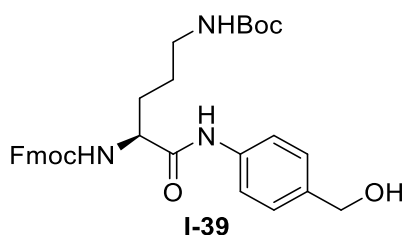


Figure S30. MALDI analysis of Ctx-PNA-DBCO **I-38**



*(9H-fluoren-9-yl)methyl tert-butyl (5-((4-(hydroxymethyl)phenyl)amino)-5-oxopentane-1,4-diyl) (S)-dicarbamate – I-39*



C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>  
MW: 559.66 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
75%

A solution of Fmoc-Orn(Boc)-OH (500 mg, 1.1 mmol, 1 eq.) and EEDQ (544 mg, 2.2 mmol, 2 eq.) in a mixture of DCM/MeOH (2/1, 30 mL) was stirred for 20 minutes at room temperature. 4-aminobenzylalcohol (271 mg, 2.2 mmol, 2 eq.) was then added and the mixture was stirred overnight. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. Et<sub>2</sub>O was added and the solution was filtered to give the desired product **I-39** as a white solid (462 mg, 0.82 mmol, 75%).

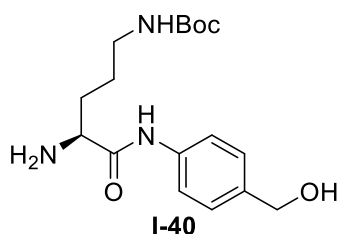
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD, δ ppm):** 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.66 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 4.55 (s, 2H), 4.38 (dd, *J* = 6.6, 2.9 Hz, 2H), 4.26 – 4.16 (m, 2H), 3.11 – 3.03 (m, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 1H), 1.76 – 1.65 (m, 1H), 1.58 – 1.42 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), NH and OH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD, δ ppm):** 173.2, 158.6, 158.5, 145.3, 145.2, 142.6 (2C), 138.8, 138.6, 128.8 (2C), 128.6 (2C), 128.2 (2C), 126.2 (2C), 121.4 (2C), 120.9 (2C), 80.0, 67.9, 64.8, 56.8, 48.4, 40.7, 30.7, 28.8 (3C), 27.6.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3318, 2974, 2478, 2068, 2068, 1668, 1609, 1515, 1449, 1365, 1249, 1158, 1117, 1014, 980, 824, 758, 740, 621, 533.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M+H]<sup>+</sup> 560

*tert-butyl (S)-4-amino-5-((4-(hydroxymethyl)phenyl)amino)-5-oxopentyl)carbamate – I-40*



C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 337.42 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
80%

Compound **I-39** (1.5 g, 2.68 mmol, 1 eq.) was treated with a solution of 20% piperidine in DCM (27 mL) at room temperature. Upon completion of reaction, reaction mixture was evaporated and purified over column chromatography, expected product eluting with 5% MeOH in DCM. Evaporation afforded **I-40** as a white solid (724 mg, 2.15 mmol, 80%).

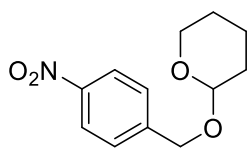
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD, δ ppm):** 7.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 3.44 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.07 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.81 – 1.70 (m, 1H), 1.65 – 1.51 (m, 3H), 1.42 (s, 9H), NH and OH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD, δ ppm):** 175.8, 158.6, 138.7, 138.6, 128.6 (2C), 121.2 (2C), 79.9, 64.8, 56.3, 41.0, 33.7, 28.8 (3C), 27.3.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3300, 2974, 2931, 2867, 1673, 1605, 1451, 1412, 1365, 1308, 1165, 1013, 824, 779.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M+H]<sup>+</sup> 338

2-((4-nitrobenzyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran – I-42



I-42

C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>  
MW: 237.26 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow oil  
97%

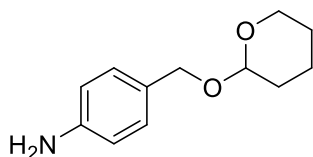
The compound I-42 was synthesized as described in literature.<sup>120</sup>

To a solution of 4-nitrobenzyl alcohol (1 g, 6.5 mmol, 1 eq.) in dry DCM (20 mL), add 3,4-dihydro-2H-pyran (887 μL, 9.8 mmol, 1.5 eq.) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (163 mg, 0.65 mmol, 0.1 eq.). The solution was stirred at room temperature for 18 h before being concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography, eluting with 100% DCM. The product I-42 was obtained as a yellow oil (1.5 g, 6.32 mmol, 97%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): δ 8.19 – 8.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.51 – 7.39 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.81 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 4.66 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.85 – 3.77 (m, 1H), 3.53 – 3.46 (m, 1H), 1.86 – 1.76 (m, 1H), 1.74 – 1.67 (m, 1H), 1.66 – 1.57 (m, 1H), 1.55 – 1.49 (m, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): δ 147.4, 146.3, 127.9 (2C), 123.7 (2C), 98.4, 67.8, 62.4, 30.6, 25.5, 19.4.

4-(((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)aniline – I-43



I-43

C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>  
MW: 207.27 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
98%

The compound I-43 was synthesized as described in literature.<sup>120</sup>

To a solution of I-42 (750 mg, 3.16 mmol, 1 eq.) in MeOH at 0 °C, Zn (2.06 g, 31.6 mmol, 10 eq.) is added. NH<sub>4</sub>Cl (1.69 g, 31.6 mmol, 10 eq.) is added by portions and the solution was stirred at room temperature for 3 h. The solution was filtrated on celite and washed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure to give the desired compound as a white solid (642 mg, 3.1 mmol, 98%).

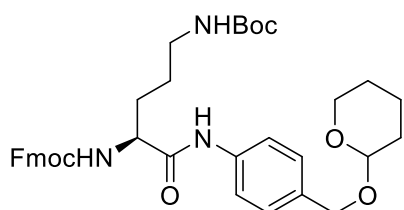
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.62 – 4.57 (m, 2H), 4.32 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.85 (ddd, *J* = 11.4, 8.3, 3.3 Hz, 1H), 3.50 – 3.44 (m, 1H), 1.83 – 1.73 (m, 1H), 1.68 – 1.60 (m, 1H), 1.54 (ddd, *J* = 11.5, 8.2, 3.9 Hz, 2H), 1.49 – 1.40 (m, 2H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 147.4, 146.2, 127.9 (2C), 123.7 (2C), 98.4, 67.7, 62.4, 30.6, 25.5, 19.4.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> = 208.

<sup>120</sup> D. Niculescu-Duvaz, I. Niculescu-Duvaz, F. Friedlos, J. Martin, R. Spooner, L. Davies, R. Marais, and C. J. Springer, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 26, 5297–5309

(9H-fluoren-9-yl)methyl tert-butyl ((4S)-5-oxo-5-((4-(((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)phenyl)amino)pentane-1,4-diyl)dicarbamate – **I-44**



**I-44**

C<sub>37</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>  
MW: 643.78 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
97%

A solution of Fmoc-Orn(Boc)-OH (295 mg, 0.65 mmol, 1 eq.) and EEDQ (247 mg, 1.3 mmol, 2 eq.) in a mixture of DCM/MeOH (2/1, 6 mL) was stirred for 20 minutes at room temperature. **I-43** (269 mg, 1.3 mmol, 2 eq.) was then added and the mixture was stirred overnight. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography eluting with a gradient of DCM/MeOH from 100/0 to 95/5. The desired compound **I-44** was obtained as a white solid (400 mg, 0.63 mmol, 97%).

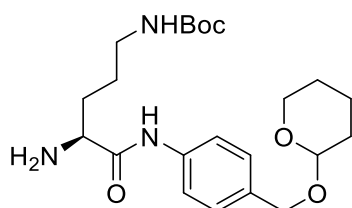
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.63 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.59 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 5.75 (s, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.73 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.68 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.47 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.96 – 3.86 (m, 1H), 3.57 – 3.50 (m, 1H), 3.09 (s, 1H), 1.89 – 1.80 (m, 1H), 1.77 – 1.65 (m, 4H), 1.63 – 1.50 (m, 5H), 1.44 (s, 9H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.6, 157.2, 156.8, 156.8, 150.5, 144.0, 143.8, 141.4, 137.3, 136.2, 134.4, 129.6, 128.7, 127.9, 127.8 (2C), 127.2, 126.7, 125.2, 121.2, 120.1 (2C), 120.1, 97.7, 79.7, 68.5, 67.2, 62.3, 53.5, 47.3, 30.7, 28.6 (3C), 26.9, 25.6, 19.5.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3130, 3039, 2807, 1707, 1400.

**LCMS (ESI) *m/z*:** 645

tert-butyl ((4S)-4-amino-5-oxo-5-((4-(((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)phenyl)amino)pentyl)carbamate – **I-45**



**I-45**

C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 421.5380 g.mol<sup>-1</sup>  
Transparent oil  
45%

Compound **I-44** (44 mg, 0.068 mmol, 1 eq.) was treated with a solution of 20% piperidine in DCM (5 mL) at room temperature. Upon completion of reaction, reaction mixture was evaporated and purified over column chromatography, expected product eluting with 5% MeOH in DCM. Evaporation afforded **I-45** as a transparent oil (13.5 mg, 0.031 mmol, 45%).

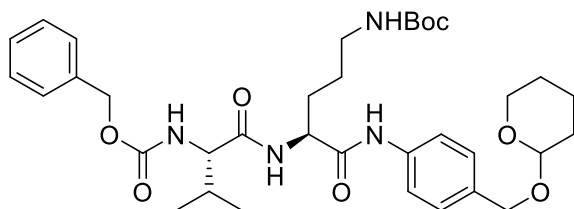
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 9.41 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.73 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.69 – 4.66 (m, 1H), 4.47 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 3.91 (ddd, *J* = 11.4, 8.2, 3.2 Hz, 1H), 3.57 – 3.47 (m, 2H), 3.16 (dd, *J* = 12.6, 6.4 Hz, 2H), 1.98 – 1.89 (m, 1H), 1.88 – 1.79 (m, 1H), 1.76 – 1.55 (m, 9H), 1.43 (s, 9H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 173.3, 156.3, 137.3, 134.0, 128.9, 128.7 (2C), 119.5 (2C), 97.7, 68.5, 62.3, 55.0, 32.2, 30.7, 28.5 (3C), 26.5, 25.6, 25.5, 19.5.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2937, 2870, 1681, 1519, 1411, 1365, 1250, 1162, 1027.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> = 422.

*tert*-butyl ((4*S*)-4-((*S*)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-5-oxo-5-((4-(((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)methyl)phenyl)amino)pentyl)carbamate – **I-46**



**I-46**

C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>  
MW: 654.81 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
65%

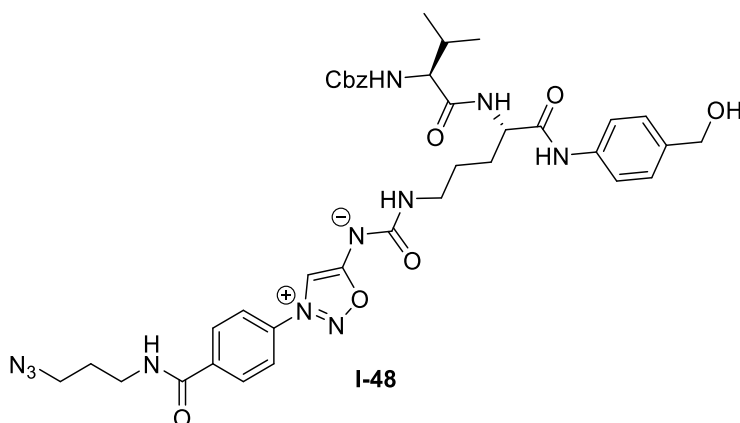
Cbz-L-Val-OH (25.2 mg, 100 μmol, 1 eq.), HATU (36.1 mg, 95 μmol, 0.95 eq.) and DIPEA 343 μL, 200 μmol, 2 eq.) were solubilized in anhydrous MeCN (5 mL) and stirred for 10 minutes at room temperature. The compound **I-45** (38 mg, 87.7 μmol, 0.9 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 45 minutes. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography eluting with heptane/EtOAc 5/5. The desired compound **I-46** was obtained as a white solid (37.3 mg, 56.8 μmol, 65%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.76 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.37 – 7.27 (m, 7H), 7.03 (s, 1H), 5.49 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.16 – 5.04 (m, 2H), 4.86 – 4.63 (m, 4H), 4.46 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.15 – 4.05 (m, 1H), 3.90 (ddd, *J* = 11.4, 8.2, 3.1 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 10.5, 4.6 Hz, 1H), 3.38 (s, 1H), 3.10 (s, 1H), 2.80 (s, 2H), 2.16 (t, *J* = 16.9 Hz, 1H), 1.92 (d, *J* = 22.1 Hz, 1H), 1.84 (dt, *J* = 15.9, 4.6 Hz, 1H), 1.75 – 1.49 (m, 11H), 1.42 (s, 9H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 172.0, 137.4, 128.7 (4C), 128.3 (2C), 128.2 (2C), 120.1 (2C), 97.7, 79.8, 68.5 (2C), 67.3, 62.3 (2C), 60.7, 38.8, 31.3, 30.7, 29.8, 29.3, 28.6 (3C), 27.2, 25.6 (2C), 19.5 (2C), 19.4, 18.0.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> = 656.

Azide-ImSyd-ValCit-PABOH – **I-48**



**I-48**

C<sub>38</sub>H<sub>45</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>  
MW: 783.85 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
53%

The compound **I-6** (61 mg, 0.16 mmol, 1.3 eq.) was solubilized in anhydrous acetonitrile (1.6 mL) and methyl iodide (40 μL, 0.64 mmol, 4 eq.) was added. The solution was stirred for 18 hours at room temperature. After complete conversion, the solvent and excess of methyl iodide were evaporated under vacuum to give the activated iminosydnone **I-6-int**.

The compound **I-46** (79 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) was solubilized at room temperature in pure TFA (184  $\mu$ L, 20 eq.) and stirred for 1h30. After completion, the mixture was evaporated to give the deprotected compound **I-47**.

The crude compound **I-47** (1 eq.) and DIPEA (207  $\mu$ L, 1.2 mmol, 10 eq.) were suspended in  $\text{CHCl}_3$  (1.2 mL) and stirred for few minutes. Then the activated iminosydnone (1.3 eq.) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. After evaporation of the solvent, the crude was purified by silica column chromatography (5% MeOH in DCM) to give the compound **I-48** (24 mg, 0.03 mmol, 26%) as a yellow solid.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm): 9.94 (s, 1H), 8.81-8.79 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.14-8.09 (m, 5H), 7.53 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.36-7.30 (m, 6H), 7.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.04-7.02 (m, 1H), 5.10-5.03 (m, 3H), 4.44-4.38 (m, 3H), 3.95-3.91 (m, 1H), 3.43 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.12-3.05 (m, 2H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.75-1.70 (m, 1H), 1.67-1.61 (m, 1H), 1.56-1.42 (m, 2H), 1.23 (s, 1H), 0.86 (dd,  $J = 15.9$ , 6.8 Hz, 6H), OH unobserved.

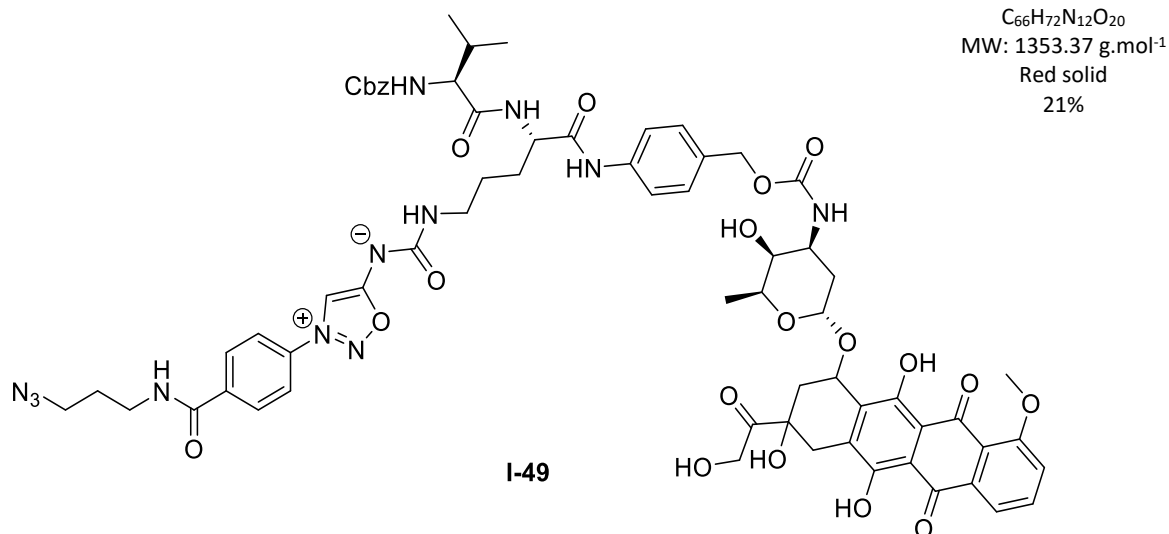
$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm): 171.7, 171.2, 170.4, 164.7, 160.8, 156.1, 137.9, 137.5, 137.0, 135.5, 129.0 (2C), 128.3 (2C), 127.7, 127.6 (2C), 126.9 (2C), 122.1 (2C), 118.9 (2C), 102.3, 65.4, 62.5, 60.1, 53.2, 48.5 (2C), 36.8, 30.4, 29.6, 28.2 (2C), 26.4, 19.2, 18.1.

LC-MS (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  784.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3279, 3062, 2928, 2096, 1632, 1514, 1414, 1287, 1219, 1118.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_{11}\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated = 784.352534,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  measured = 784.352031

#### Azide-ImSyd-ValCit-PABC-Doxorubicine – I-49



The compound **I-48** (24 mg, 0.031 mmol, 1 eq.) was solubilized in dry DMF (0.3 mL) and DIPEA (16  $\mu$ L, 0.092 mmol, 3 eq.) was added. The solution was stirring for few minutes. Then, PNP carbonate (18 mg, 0.062 mmol, 2 eq.) was added and the mixture was stirred for 2 hours at room temperature under Argon. After complete conversion, a solution of 10% citric acid and EtOAc were added. After extraction, the organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated to give the activated intermediate **I-49-int**.

Under Argon, Doxorubicine.HCl (26.7 mg, 0.046 mmol, 1.5 eq.) was put in solution in dry DMF (0.3 mL) and DIPEA (16  $\mu$ L, 0.092 mmol, 3 eq.) was added until to reach a basic pH (9-9.5). The mixture was protected from light and the intermediate **I-49-int** was added. The mixture was stirred at room

temperature for 3 hours. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC\* to give the compound **I-49** as a red solid (9 mg, 0.0067 mmol, 21%).

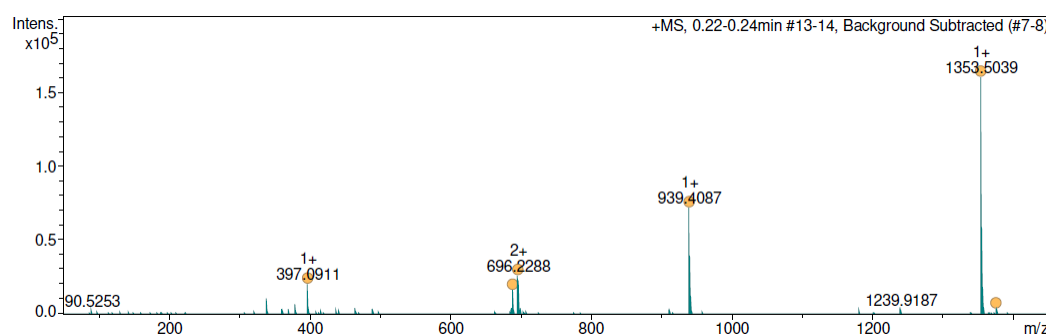
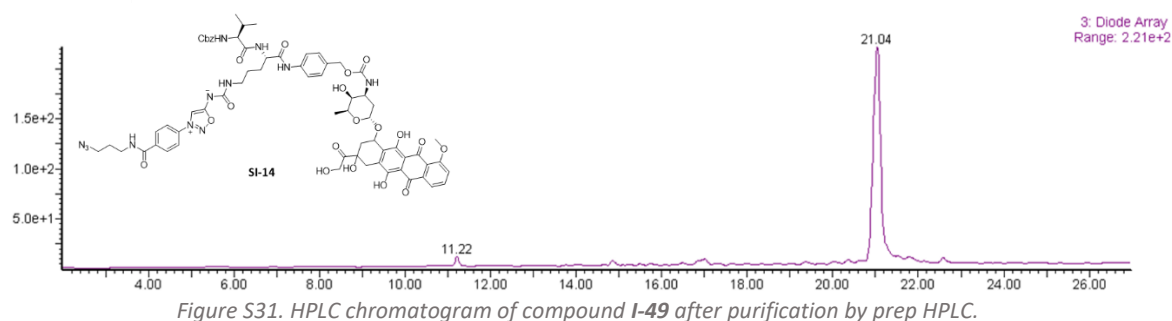
\*Conditions for prep HPLC: HDO column, solvent A: H<sub>2</sub>O, 0.1% HCOOH, solvent B: MeCN, 0.1% HCOOH. Gradient:

Time (min)	Percentage solvent A	Percentage solvent B
0	95	5
24	30	70
24.1	0	100
30	0	100
30.1	95	5
35	95	5

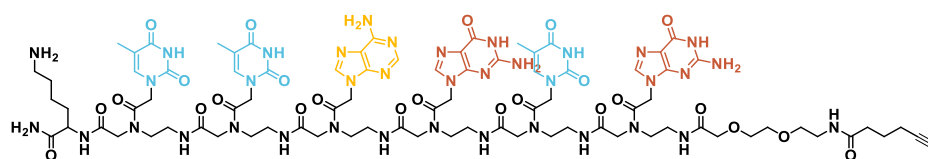
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD (1/1), δ ppm):** 8.37 (br.s, 1H), 8.18 (br.s, 1H), 8.12-8.06 (m, 2H), 7.99-7.88 (m, 3H), 7.82-7.77 (m, 1H), 7.47-7.45 (m, 3H), 7.29-7.18 (m, 6H), 6.65-6.63 (m, 1H), 6.20-6.18 (m, 1H), 5.43-5.42 (1H), 5.21-5.19 (m, 1H), 5.07-5.05 (m, 2H), 4.97-4.88 (m, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.17-4.16 (m, 1H), 4.04-3.99 (m, 3H), 3.87-3.82 (m, 1H), 3.67-3.62 (m, 1H), 3.58 (br.s, 1H), 3.48 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.19-3.11 (m, 2H), 3.05-2.96 (m, 1H), 2.36-2.32 (m, 1H), 2.16-1.99 (m, 2H), 1.92-1.83 (m, 3H), 1.78-1.68 (m, 2H), 1.63-1.55 (m, 2H), 1.38-1.36 (m, 5H), 1.27-1.24 (m, 3H), 0.95-0.90 (m, 6H), OH and some NH unobserved.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M+H]<sup>+</sup> 1353.

**HRMS (ESI) *m/z*:** C<sub>66</sub>H<sub>73</sub>N<sub>12</sub>O<sub>20</sub> [M+H]<sup>+</sup><sub>calculated</sub> = 1353.505859, [M+H]<sup>+</sup><sub>measured</sub> = 1353.505756



## PNA-alkyne – I-50



$C_{84}H_{113}N_{37}O_{25}$   
MW: 2041.06 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
30%

I-50

Using the general procedure **A**, the PNA **I-50** was prepared on solid support.

**Sequence:** Lys(Boc); t; t; a(Bhoc); g(Bhoc); t; g(Bhoc); AEEA spacer; hexynoic acid.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-50** was obtained as a white solid (14 mg, 6.86  $\mu$ mol, 30% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$ :**  $C_{84}H_{113}N_{37}O_{25}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 1$  to  $2$ :
- $[M+H]^+$  calculated = 2040.8787,  $[M+H]^+$  measured = 2040.8785
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 1020.9432,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 1020.9428

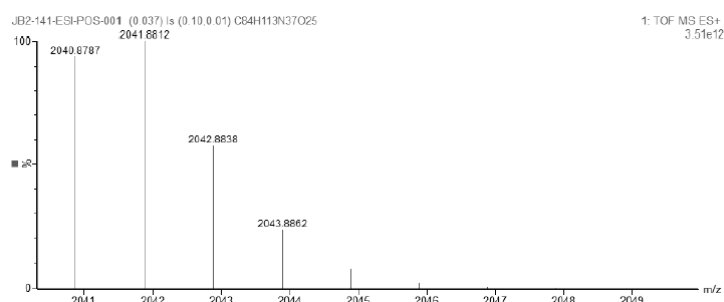


Figure S33. HRMS (ESI) spectrum of PNA-alkyne I-50

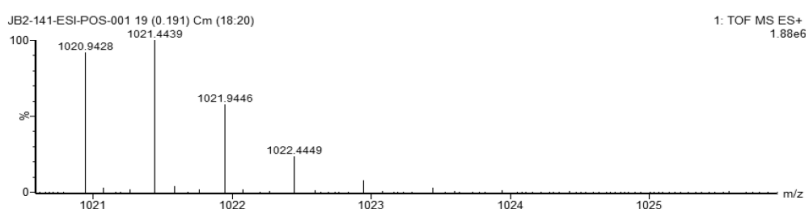
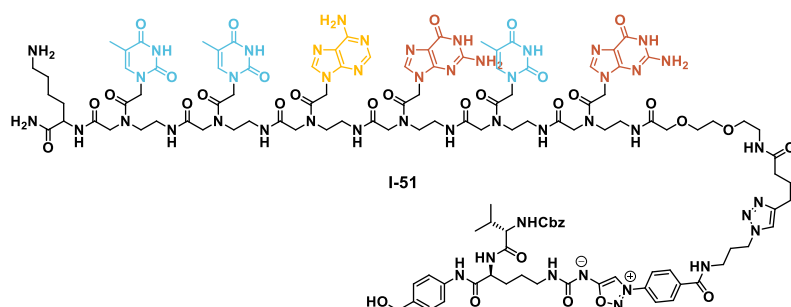


Figure S34. HRMS (ESI) spectrum of PNA-alkyne I-50

**PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH – I-51**



$C_{122}H_{158}N_{48}O_{33}$   
 MW: 2824.91 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 72%

In a vial was added **I-48** (0.38 mg, 0.49  $\mu$ Mol, 1 eq.),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0.12 mg, 0.49  $\mu$ mol, 1 eq.), THPTA (0.43 mg, 0.98  $\mu$ mol, 2 eq.) and aminoguanidine hydrochloride (0.27 mg, 2.45  $\mu$ mol, 5 eq.) in water (100  $\mu$ L) and DMF (100  $\mu$ L). The vial was stirred at rt for 30 minutes. Then NaAsc (0.19 mg, 0.98  $\mu$ mol, 2 eq.) was added. The resulting solution was stirred for further 30 minutes. Then PNA-Alkyne **I-50** (1 mg, 0.49  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to the mixture that was stirred at rt for 30 more minutes. The mixture was purified by prep HPLC and **I-51** was obtained as a white solid (1 mg, 0.35  $\mu$ mol, 72% yield).

- **HRMS (ESI)  $m/z$ :**  $C_{122}H_{158}N_{48}O_{33}$   $[M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$ :
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 1412.6158,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 1412.6165

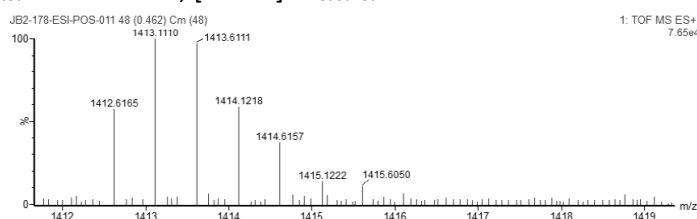
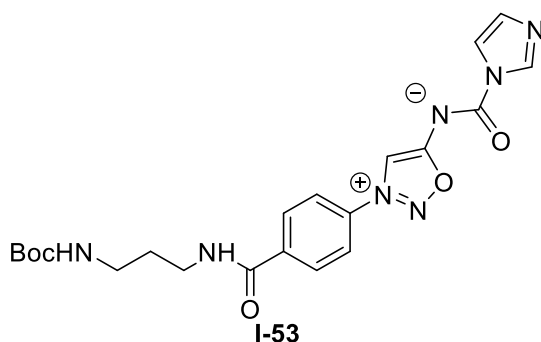


Figure S35. HRMS (ESI) spectrum of PNA-Iminosydnone-Valine-Citrulline-PABOH **I-51**

**(3-(4-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)carbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(1H-imidazole-1-carbonyl)amide – I-53**



$C_{21}H_{25}N_7O_5$   
 MW: 455.48 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 22%

The crude compound **I-5** (107 mg, 358  $\mu$ mol, 1 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (2 mL). HATU (177 mg, 465  $\mu$ mol, 1.3 eq.) and DIPEA (124.6  $\mu$ L, 716  $\mu$ mol, 2 eq.) were then added and the mixture was stirred for few minutes at room temperature. Then *N*-boc-1,3-propanediamine (74.8 mg, 430  $\mu$ mol, 1.2 eq.) was added and the solution was stirred for 18 hours at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by column chromatography eluting with 100% AcOEt. The desired compound **I-53** was obtained as a yellow solid in 22% yield over two steps (36.5 mg, 80.2  $\mu$ mol, 22%).



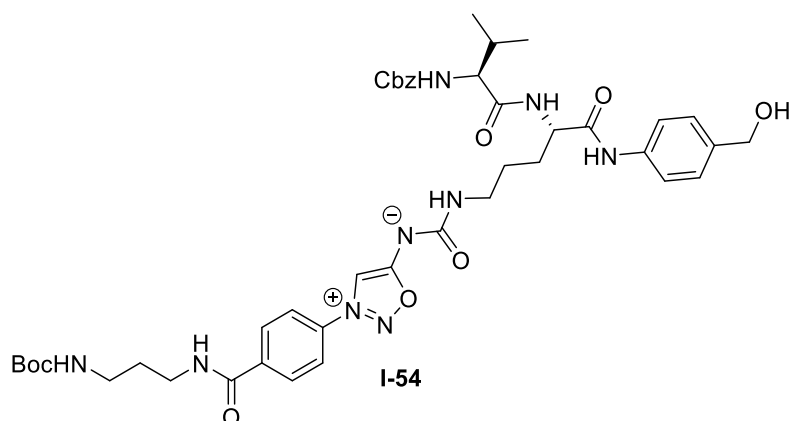
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.46 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 3.52 (dd, *J* = 12.0, 6.1 Hz, 2H), 3.25 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.77 – 1.69 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 175.1, 157.5, 154.6, 139.7, 137.6, 135.1, 129.8 (2C), 129.6, 121.8 (2C), 117.5, 104.7, 79.9, 37.0, 36.3, 29.9, 28.5 (3C), 19.1.

**LC-MS (ESI) *m/z*:** [M+H-imidazole]<sup>+</sup> 388

**NHBoc-ImSyd-Valcit-PABOH – I-54**

C<sub>43</sub>H<sub>55</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>  
MW: 857.97 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
40%



The compound **I-53** (36.5 mg, 80.2 μmol, 1 eq.) was solubilized in anhydrous acetonitrile (1.6 mL) and methyl iodide (20 μL, 320.8 μmol, 4 eq.) was added. The solution was stirred for 18 hours at room temperature. After complete conversion, the solvent and excess of methyl iodide were evaporated under vacuum to give the activated iminosydnone **I-54-int**.

The compound **I-46** (48.4 mg, 61.7 μmol, 1 eq.) was solubilized at room temperature in pur TFA (200 μL) and stirred for 1h30. After completion, the mixture was evaporated to give the deprotected compound **I-47**.

The crude compound **I-47** (1 eq.) and DIPEA (107 μL, 617 μmol, 10 eq.) were suspended in CHCl<sub>3</sub> (1.2 mL) and stirred for few minutes. Then the activated iminosydnone **I-54-int** (1.3 eq.) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. After evaporation of the solvent, the crude was purified by silica column chromatography (5% MeOH in DCM) to give the compound **I-54** (20.98 mg, 24.5 μmol, 40%) as a yellow solid.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD, δ ppm):** 8.12 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.28 – 7.17 (m, 7H), 5.30 – 5.25 (m, 2H), 5.02 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 4.54 (dd, *J* = 9.2, 4.4 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.97 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.76 (s, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.26 (dt, *J* = 3.3, 1.6 Hz, 1H), 2.03 (dq, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 1.91 – 1.83 (m, 1H), 1.69 (dt, *J* = 12.3, 6.2 Hz, 3H), 1.54 (dd, *J* = 13.3, 6.3 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.88 (dd, *J* = 15.7, 6.8 Hz, 6H), OH and NH unobserved.

**LC-MS (ESI) *m/z*:** [M+H]<sup>+</sup> 858

**HRMS (ESI) *m/z*:** C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup><sub>calculated</sub> = 858,4150, [M+H]<sup>+</sup><sub>measured</sub> = 858,4154

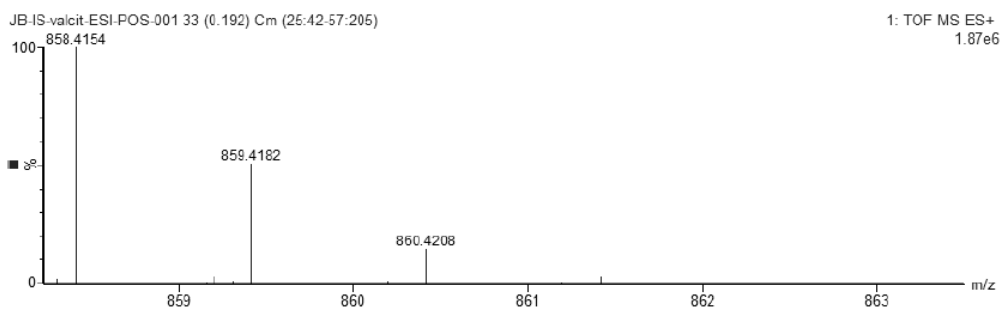
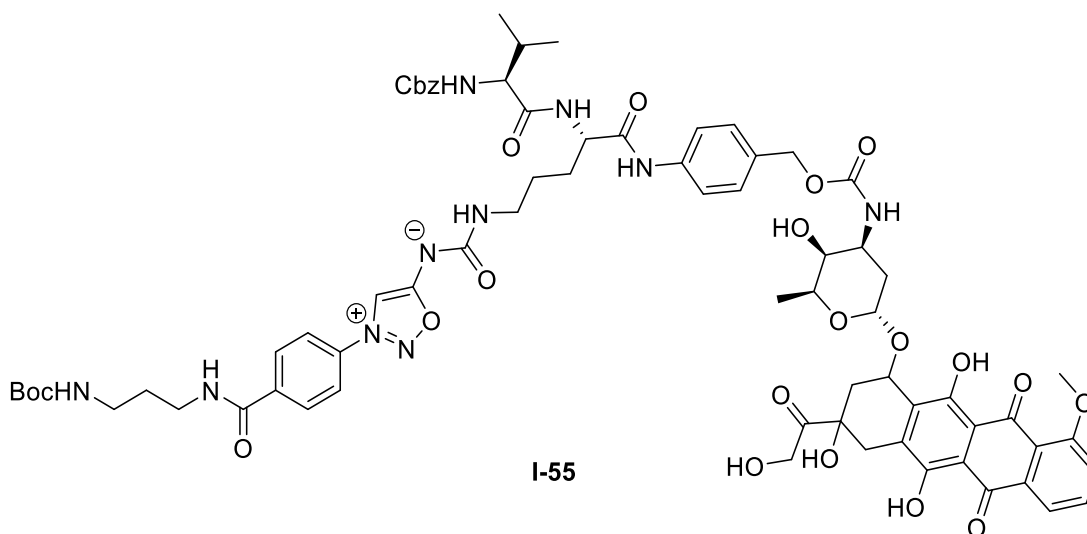


Figure S36. HRMS (ESI) spectrum of NHBoc-ImSyd-ValCit-PABOH I-54

**BocNH-ImSyd-ValCit-PABC-Doxorubicine – I-55**



The compound **I-54** (20.98 mg, 24.4  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was solubilized in dry DMF (0.3 mL) and DIPEA (13  $\mu\text{L}$ , 73.2  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) was added. The solution was stirring for few minutes. Then, PNP carbonate (14.9 mg, 24.4  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) was added and the mixture was stirred for 2 hours at room temperature under Argon. After complete conversion, a solution of 10% citric acid and EtOAc were added. After extraction, the organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated to give the activated intermediate **I-55-int**.

Under Argon, Doxorubicine.HCl (21.23 mg, 36.6  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq.) was put in solution in dry DMF (0.8 mL) and DIPEA (13  $\mu\text{L}$ , 73.2  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) was added until to reach a basic pH (9-9.5). The mixture was protected from light and the intermediate **I-55-int** was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC\* to give the compound **I-55** as a red solid (8.5 mg, 5.95  $\mu\text{mol}$ , 24%).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD,  $\delta$  ppm):** 8.80 (s, 1H), 8.28 – 8.13 (m, 4H), 8.00 (d,  $J = 7.6$  Hz, 3H), 7.79 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 3.4$  Hz, 8H), 5.46 – 5.25 (m, 2H), 5.22 (s, 1H), 5.06 (dd,  $J = 8.8, 2.6$  Hz, 3H), 4.98 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 4.93 (s, 1H), 4.79 – 4.71 (m, 2H), 4.04 (d,  $J = 2.4$  Hz, 5H), 3.95 (s, 2H), 3.47 – 3.42 (m, 2H), 3.17 – 3.13 (m, 2H), 3.06 – 2.96 (m, 2H), 2.63 (s, 1H), 2.38 – 2.28 (m, 1H), 2.06 (dd,  $J = 14.7, 4.4$  Hz, 2H), 1.94 (s, 6H), 1.75 (dd,  $J = 12.0, 4.3$  Hz, 4H), 1.70 – 1.58 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.20 – 1.15 (m, 3H), 0.94 – 0.88 (m, 6H), OH non observed.

**LCMS (ESI)  $m/z$ :**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  1427

**HRMS (ESI)  $m/z$ :**  $\text{C}_{71}\text{H}_{83}\text{N}_{10}\text{O}_{22}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $_{\text{calculated}} = 1427.5684$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $_{\text{measured}} = 1427.5692$

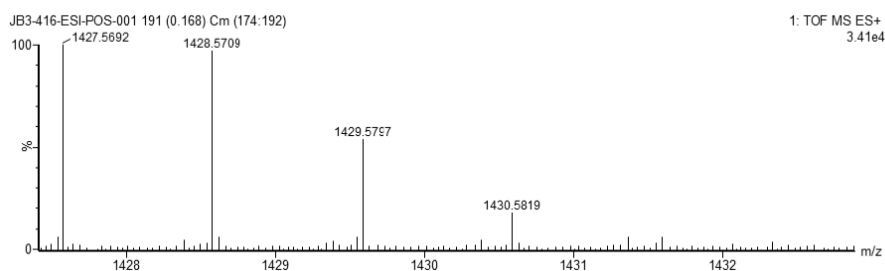
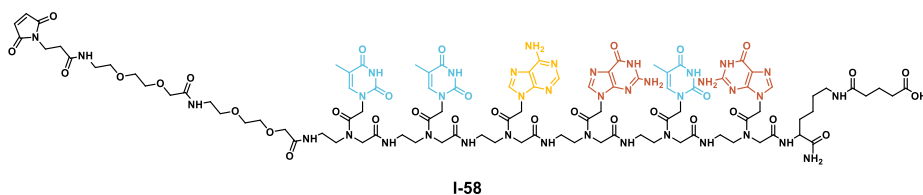


Figure S37. HRMS (ESI) spectrum of NHBoc-ImSyd-Valcit-Doxo I-55

### PNA-acide-maléimide – I-58



Using the general procedure **A**, the PNA **I-58-int** was prepared on solid support.

**Sequence:** Lys(Boc); g(Bhoc); t; g(Bhoc); a(Bhoc); t; t; AEEA spacer; AEEA spacer; maleimide NHS SI-3.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **I-58-int** was obtained as a white solid (26.8 mg, 11.06  $\mu\text{mol}$ , 49% yield).

**I-58-int** (14 mg, 6.24  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was dissolved in dry DMF (300  $\mu\text{L}$ ). Glutaric anhydride (0.71 mg, 6.24  $\mu\text{mol}$ , 1eq.) was added and the mixture was stirred at 40 °C for 2 h. After that, DMF was removed under *vacuo* to afford **I-58** as a yellow oil (26.8 mg, 11.06  $\mu\text{mol}$ , quantitative).

- **HRMS (ESI)  $m/z$ :**  $\text{C}_{96}\text{H}_{129}\text{N}_{39}\text{O}_{33}$   $[\text{M}+\text{nH}]^{\text{n}+}$  with  $n = 1$  to  $2$ :
- $[\text{M}+\text{H}]^+$   $_{\text{calculated}} = 2356.9693$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 2356.9636$
- $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$   $_{\text{calculated}} = 1178.9885$ ,  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}_{\text{measured}} = 1178.9857$

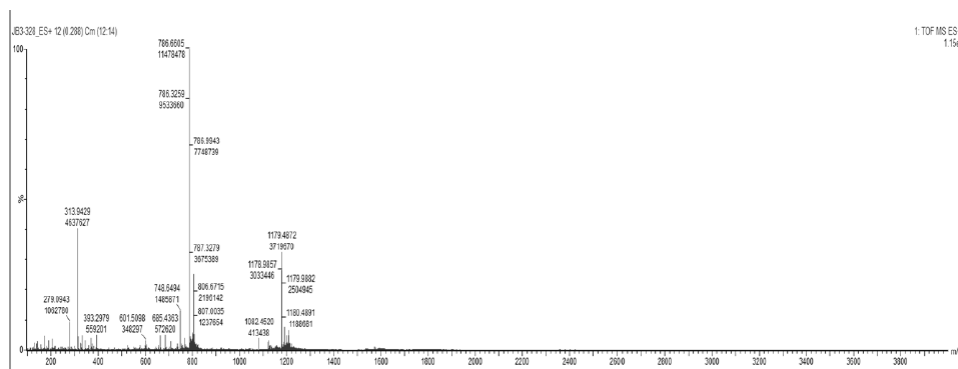


Figure S38. HRMS (ESI) spectrum of PNA-acide-maleimide I-58

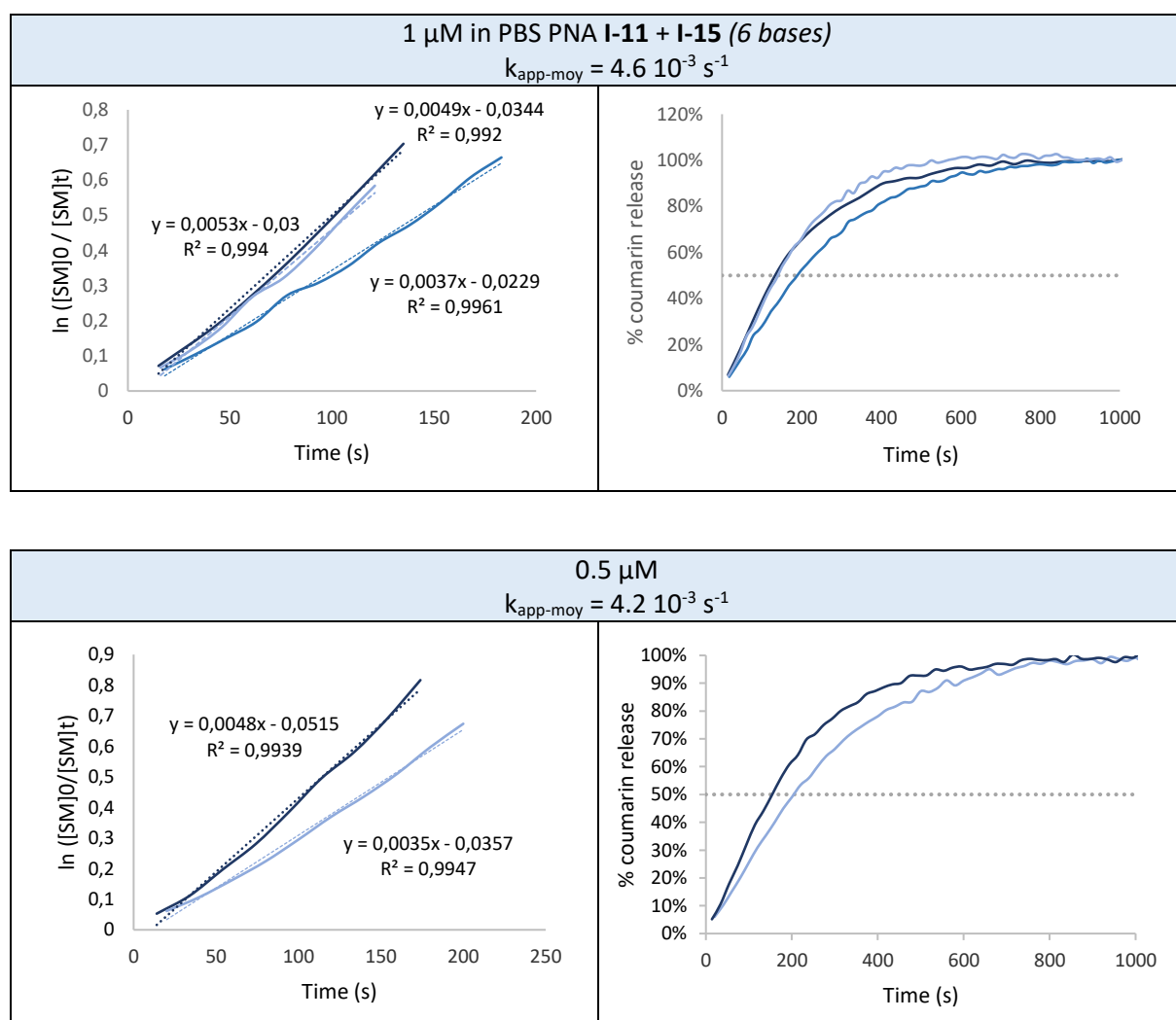
## B. Kinetic experiments and physical properties

### Protocol for kinetic study of coumarin release for complementary PNAs of several sizes

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu\text{L}$  of PNA-ImSyd-coum, **I-15**, **I-16**, **I-17** and **I-18** (100  $\mu\text{M}$  in DMSO) in 2.94 mL of PBS, final concentration: 1, 0.5, 0.1 or 0.05  $\mu\text{M}$ . To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of the complementary PNA-DBCO, **I-11**, **I-12**, **I-13** and **I-14** (100  $\mu\text{M}$  in DMSO, 1 eq.). The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 387 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500 nm) was made under stirring.

This reaction is considered as a pseudo first order. To determine the apparent constant ( $k_{\text{app}}$ ) of the reaction,  $\ln([\text{SM}]_0/[\text{SM}]_t)$  is plotted versus time. The results obtained for the different PNAs are illustrated below.

Table S3. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNAs **I-11** and **I-15**



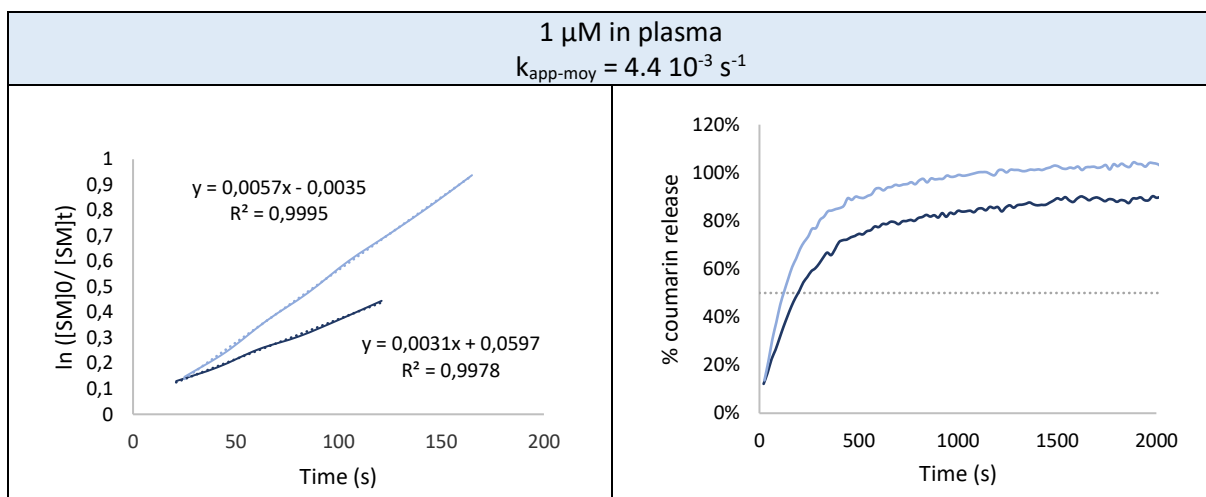
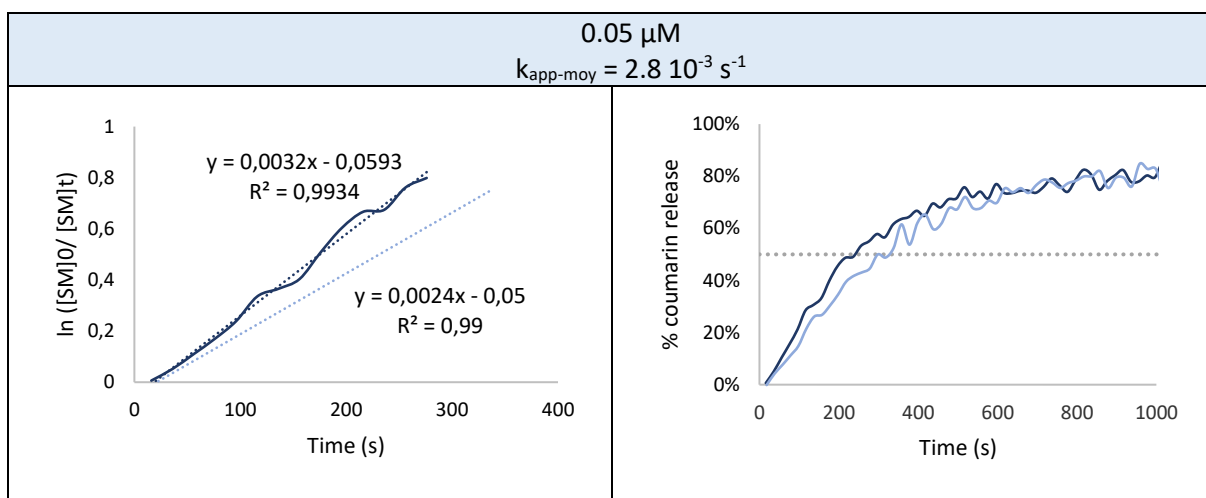
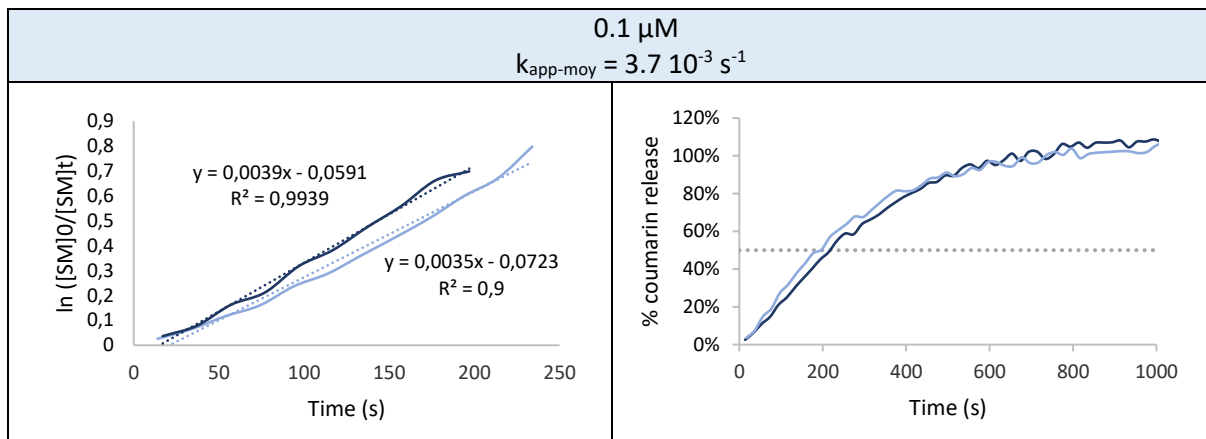
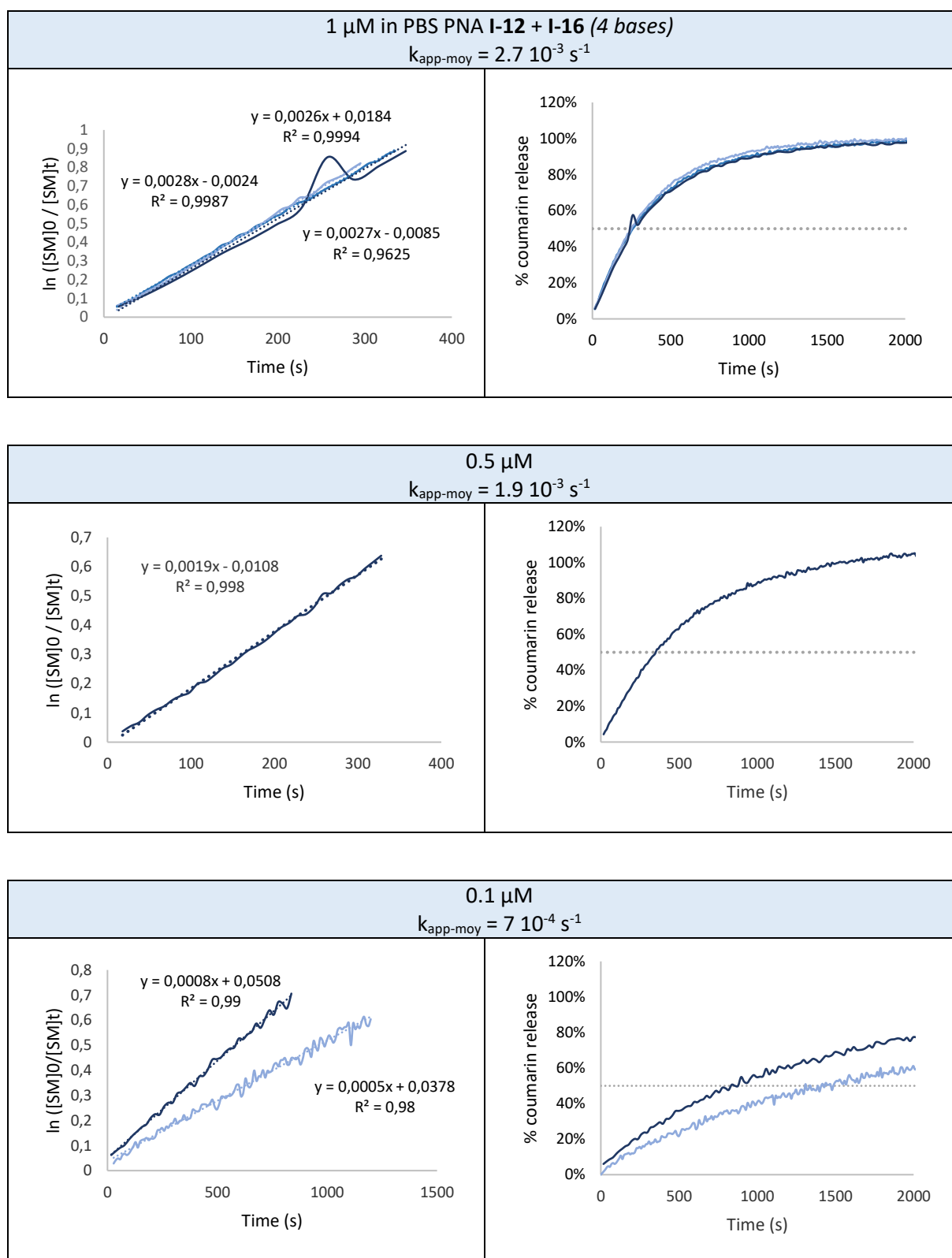


Table S4. Conversion of the iminosynnone compound during the click and release reaction for PNAs I-12 and I-16



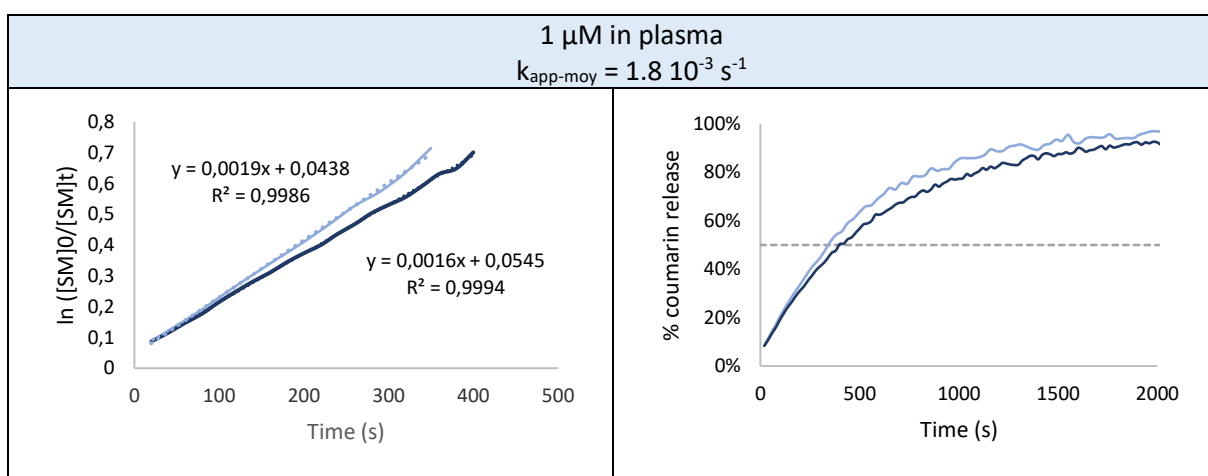
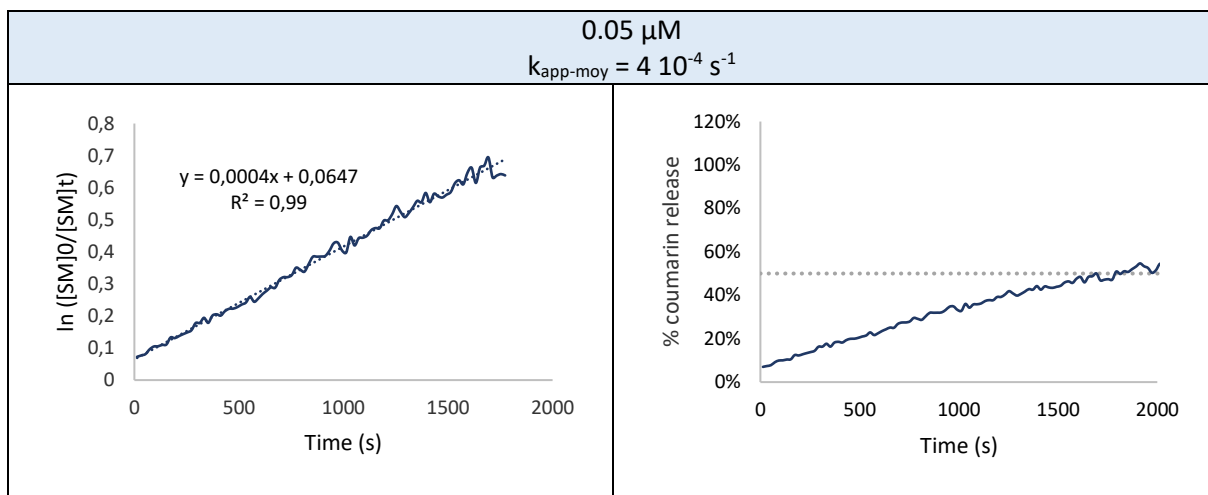


Table S5. Conversion of the iminosynone compound during the click and release reaction for PNAs I-13 and I-17

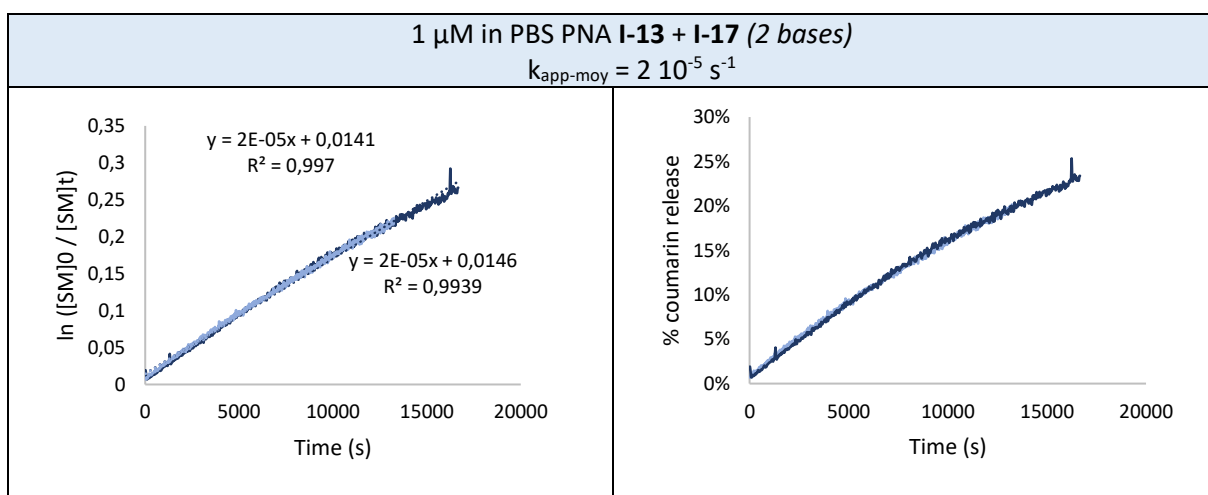
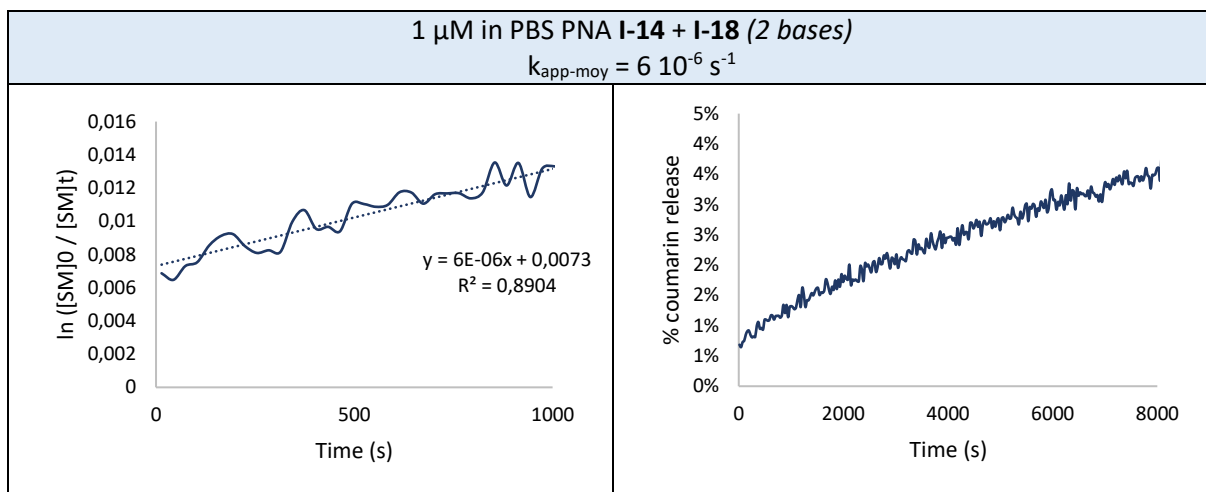


Table S6. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNAs I-14 and I-18



Protocol for kinetic study of coumarin release for PNA-iminosydnone-coumarin + DBCO acid

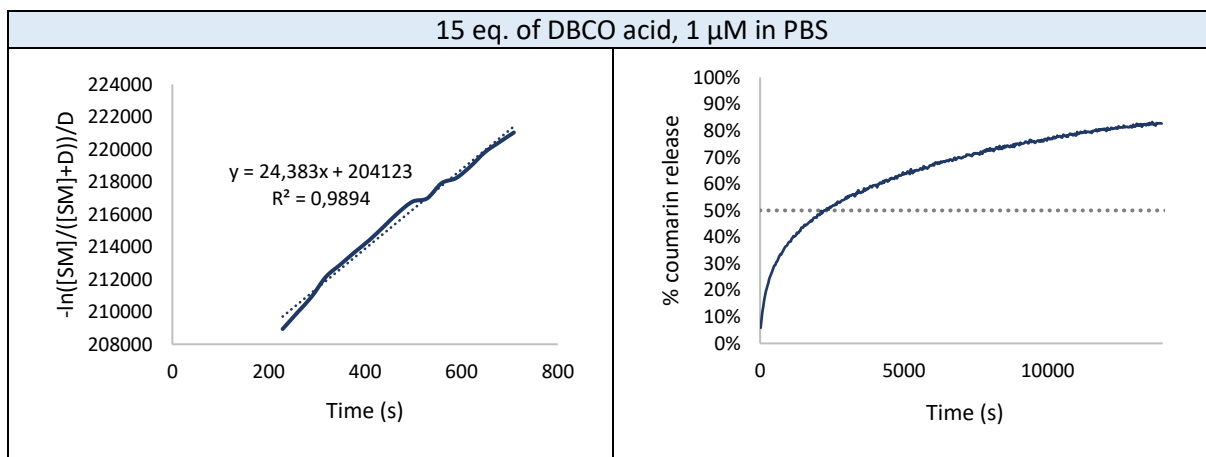
Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu\text{L}$  of PNA-ImSyd-coum I-11 (100  $\mu\text{M}$  in DMSO) in 2.94 mL of PBS, final concentration: 1  $\mu\text{M}$ . To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of DBCO solution (1.5 or 0.15 mM in DMSO, 15 eq. or 1.5 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 387 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500 nm) was made under stirring.

Second order reaction rate was determined by plotting  $-\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$  versus time and analyzing by linear regression (Equation S1). Second order rate constant corresponds to the determined slope.

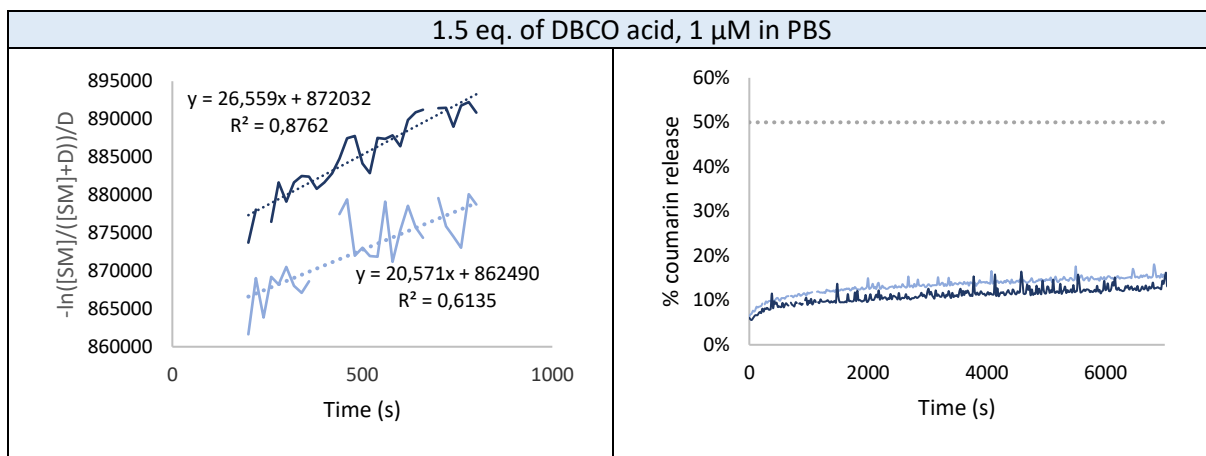
$$\frac{-\ln\left(\frac{[A]}{[B]}\right)}{[A]_0 - [B]_0} = kt + \text{const}$$

Equation S1. [A]—concentration of iminosydnone (M); [B]—concentration of DBCO (M); t—reaction time (s).

Table S7. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNA 1 and DBCO acid







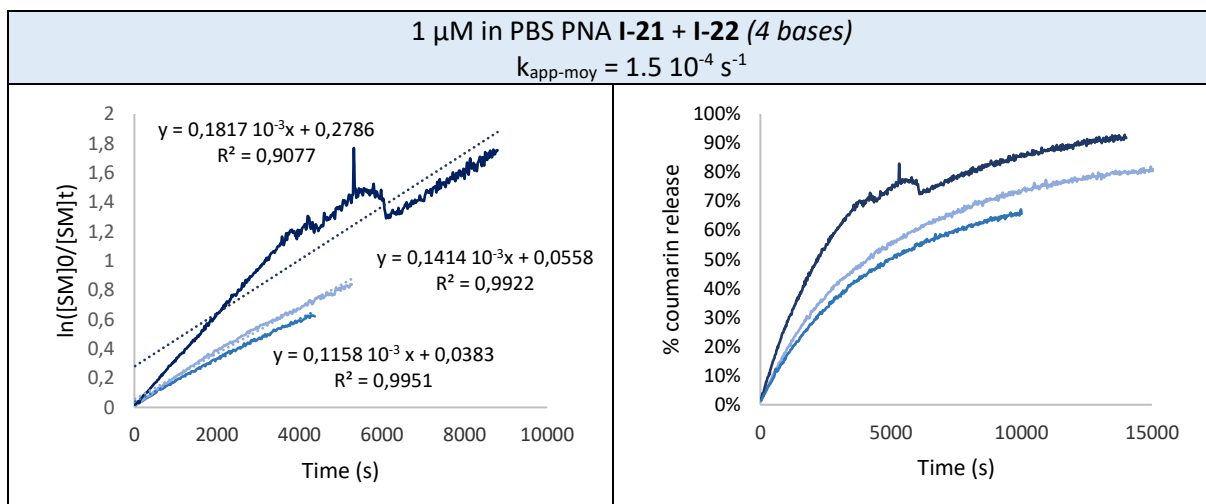
The release of the coumarin urea is slower with 1.5 eq ( $t_{1/2} = 75480$  s) of DBCO-Acid than with 15 eq. of DBCO-Acid ( $t_{1/2} = 2220$  s)  $\rightarrow$  Order 2 click and release reaction.

Kinetic value:  $k = 24 \pm 2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Protocol for kinetic study of coumarin release for PNA-iminosydnone-coumarin + PNA-MFCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu$ L of PNA-ImSyd-coum **I-22** (100  $\mu$ M in DMSO) in 2.94 mL of PBS, final concentration: 1  $\mu$ M. To the solution was added 30  $\mu$ L of PNA-MFCO **I-21** solution (100  $\mu$ M in DMSO, 1 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 387 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500 nm) was made under stirring.

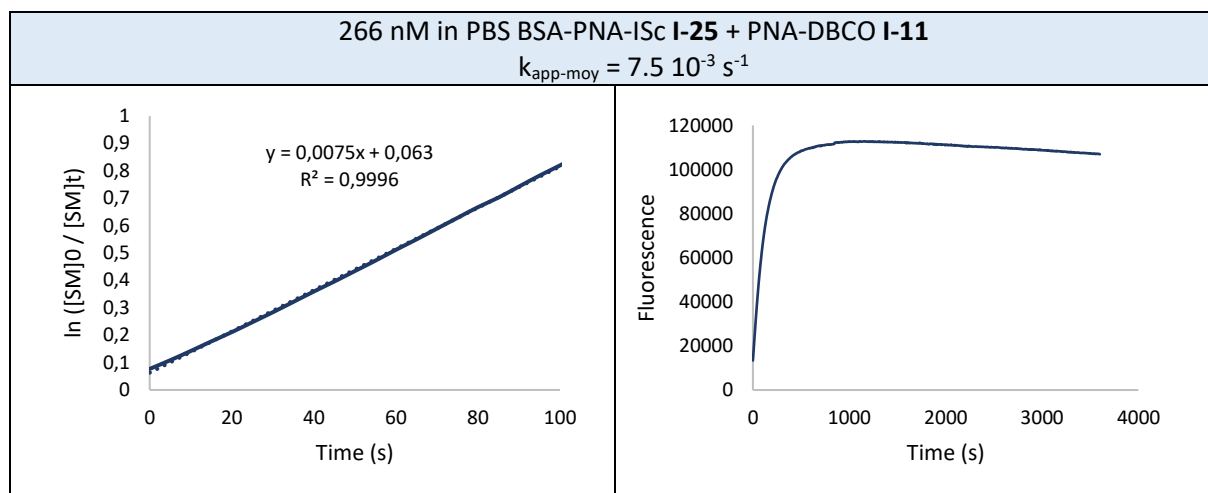
*Table S8. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNAs I-21 and I-22*



Protocol for kinetic study of coumarin release for BSA-PNA-iminosydnone-coumarin + PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu$ L of BSA-PNA-ImSyd-coum **I-25** (8.6  $\mu$ M in saline buffer) in 940  $\mu$ L of PBS, final concentration in PNA: 266 nM. To the solution was added 30  $\mu$ L of PNA-DBCO **I-11** solution (100  $\mu$ M in DMSO, 3.5 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 387 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500 nm) was made under stirring.

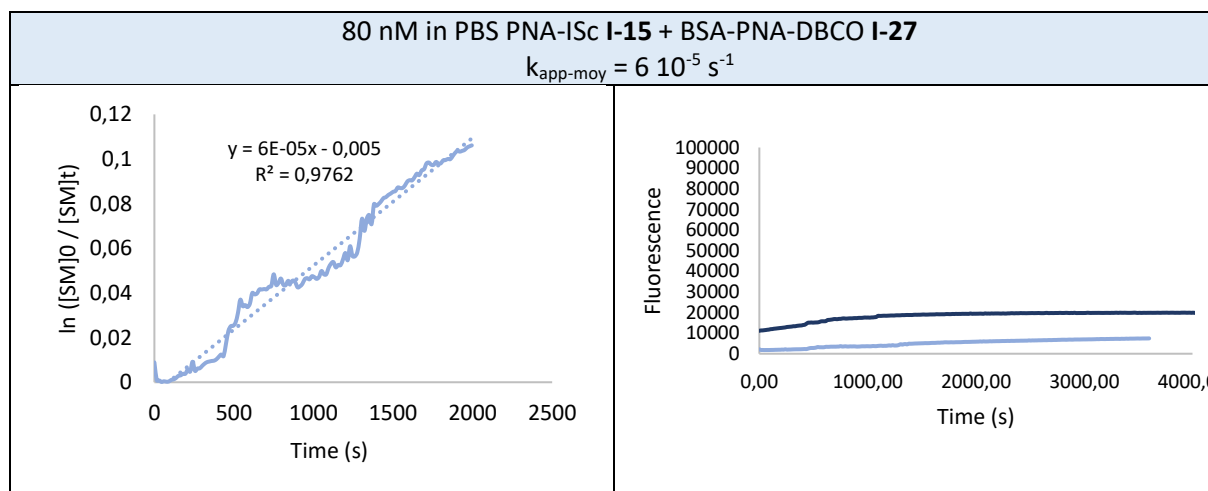
Table S9. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for BSA-PNA I-25 and PNA I-18



Protocol for kinetic study of coumarin release for PNA-iminosydnone-coumarin + BSA-PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 3  $\mu\text{L}$  of PNA-ImSyd-coum I-15 (100  $\mu\text{M}$  in DMSO, 10 eq.) in 967  $\mu\text{L}$  of PBS, final concentration in PNA: 80 nM. To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of BSA-PNA-DBCO I-27 solution (8  $\mu\text{M}$  in saline buffer, 1 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{ex}$ : 387 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm) was made under stirring.

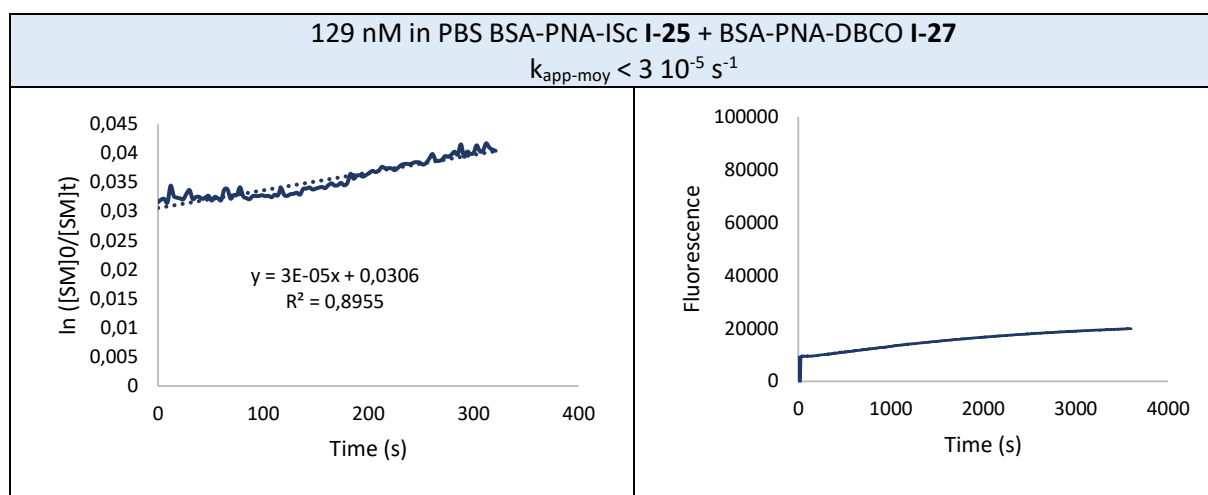
Table S10. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for BSA-PNA I-27 and PNA I-15



Protocol for kinetic study of coumarin release for BSA-PNA-iminosydnone-coumarin + BSA-PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 15  $\mu\text{L}$  of BSA-PNA-ImSyd-coum I-25 (8.6  $\mu\text{M}$  in saline buffer) in 970  $\mu\text{L}$  of PBS, final concentration in PNA-IS-coum: 129 nM. To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of BSA-PNA-DBCO I-27 solution (8  $\mu\text{M}$  in saline buffer, 1 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{ex}$ : 387 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm) was made under stirring.

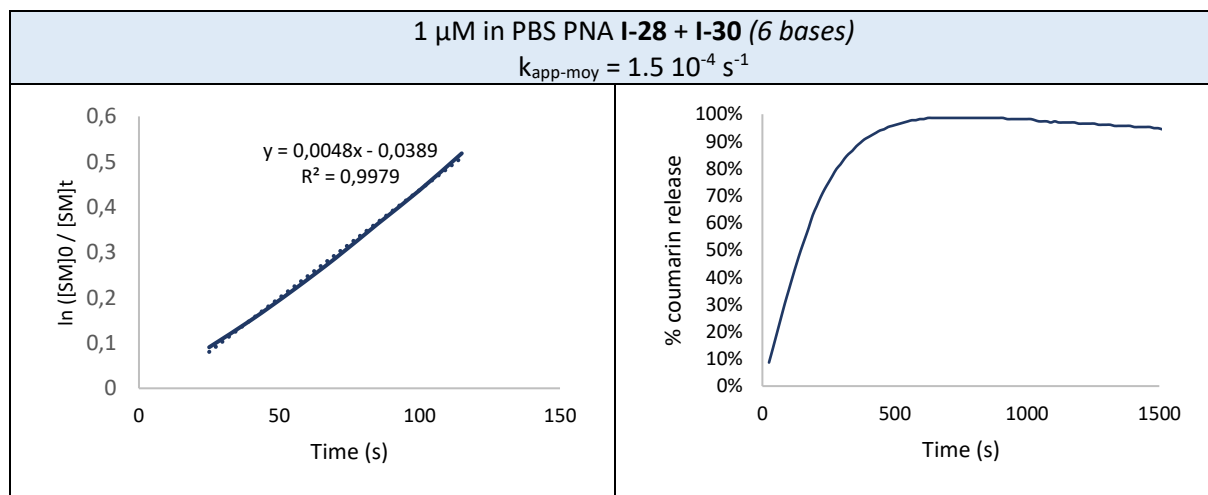
Table S11. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for BSA-PNA I-25 and I-27



Protocol for kinetic study of coumarin release for PNA-iminosydnone-coumarin + PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu\text{L}$  of PNA-ImSyd-coum I-28 (100  $\mu\text{M}$  in DMSO, 10 eq.) in 2.94 mL of PBS, final concentration in PNA: 1  $\mu\text{M}$ . To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of BSA-PNA-DBCO I-30 solution (100  $\mu\text{M}$  in DMSO, 1 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{ex}$ : 387 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm) was made under stirring.

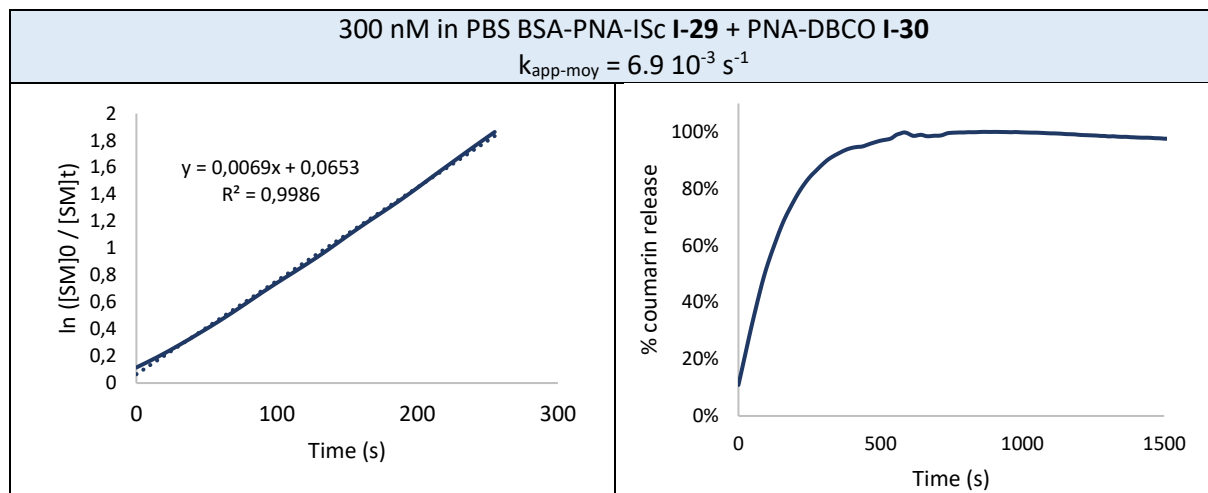
Table S12. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNA I-28 and PNA I-30



Protocol for kinetic study of coumarin release for BSA-PNA-iminosydnone-coumarin + PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu\text{L}$  of BSA-PNA-ImSyd-coum I-29 (9.8  $\mu\text{M}$  in saline buffer) in 940  $\mu\text{L}$  of PBS, final concentration in PNA: 300 nM. To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of PNA-DBCO I-30 solution (100  $\mu\text{M}$  in DMSO, 3 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{ex}$ : 387 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm) was made under stirring.

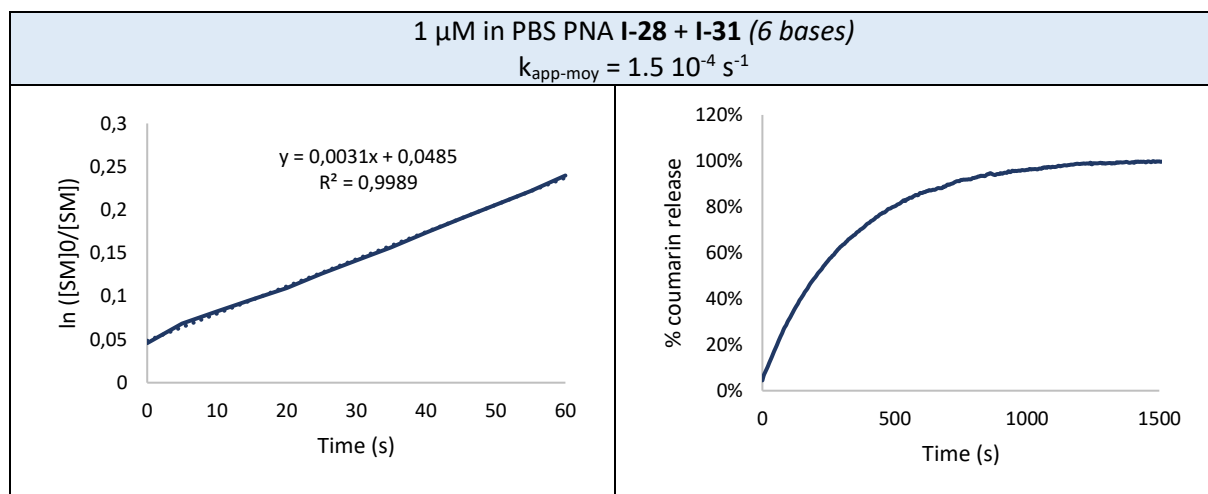
Table S13. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for BSA-PNA I-29 and PNA I-30



Protocol for kinetic study of coumarin release for PNA-iminosydnone-coumarin + PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu\text{L}$  of PNA-ImSyd-coum **I-28** (100  $\mu\text{M}$  in DMSO, 10 eq.) in 2.94 mL of PBS, final concentration in PNA: 1  $\mu\text{M}$ . To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of BSA-PNA-DBCO **I-31** solution (100  $\mu\text{M}$  in DMSO, 1 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{ex}$ : 387 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm) was made under stirring.

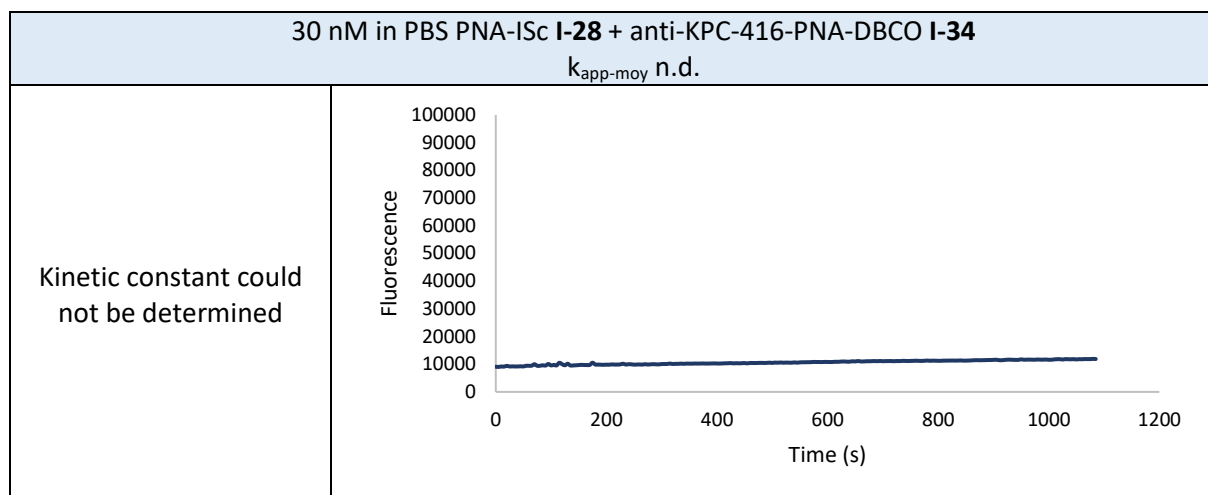
Table S14. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNA I-28 and PNA I-31



Protocol for kinetic study of coumarin release for PNA-iminosydnone-coumarin + anti-KPC-416-PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 15  $\mu\text{L}$  of PNA-ImSyd-coum **I-28** (30  $\mu\text{M}$  in DMSO, 15 eq.) in 975  $\mu\text{L}$  of PBS, final concentration in PNA-IS-coum: 450 nM. To the solution was added 10  $\mu\text{L}$  of anti-KPC-416-PNA-DBCO **I-34** solution (2.88  $\mu\text{M}$  in saline buffer, 1 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{ex}$ : 387 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm) was made under stirring.

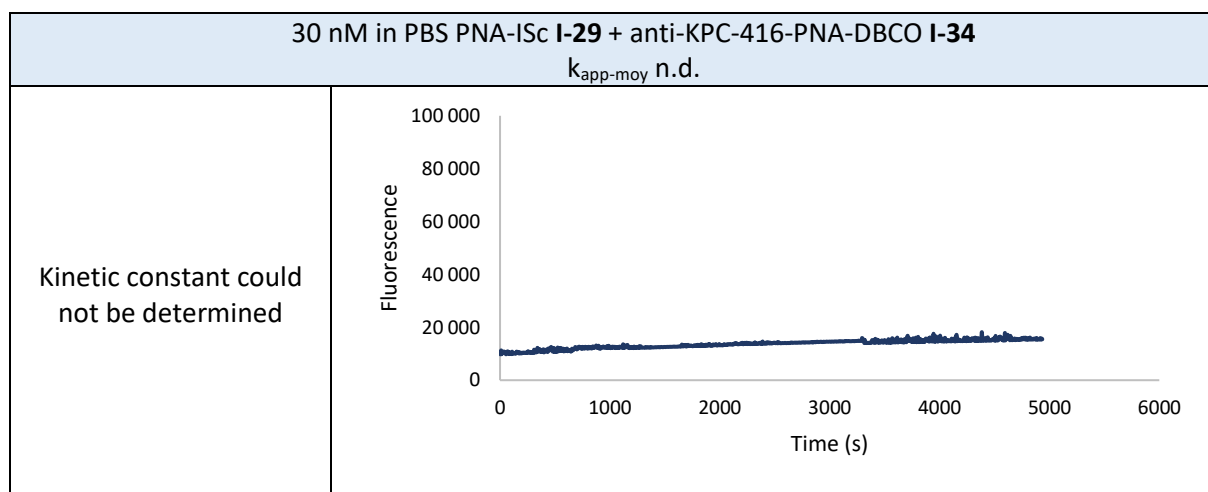
Table S15. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNA I-28 and mab-PNA I-34



Protocol for kinetic study of coumarin release for BSA-PNA-iminosydnone-coumarin + anti-KPC-416-PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 500 nm with an excitation of 387 nm according the following protocol: In a vial was added 15  $\mu$ L of BSA-PNA-ImSyd-coum I-29 (9  $\mu$ M in saline buffer) in 975  $\mu$ L of PBS, final concentration in PNA-IS-coum: 130 nM. To the solution was added 15  $\mu$ L of anti-KPC-416-PNA-DBCO I-34 solution (2.88  $\mu$ M in saline buffer, 1 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{ex}$ : 387 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm) was made under stirring.

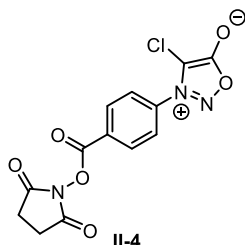
Table S16. Conversion of the iminosydnone compound during the click and release reaction for PNA I-29 and mab-PNA I-34



### III. Experimental part : Chapitre 2

#### A. Synthetic procedure and analytical data

##### 4-chloro-3-(4-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate – II-4

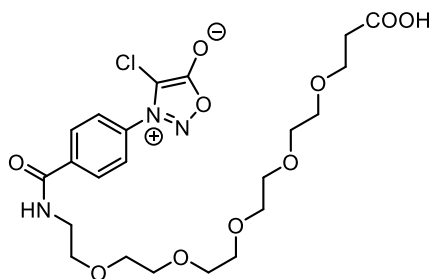


II-4

C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>  
MW: 337.67 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
46%

The compound II-4 was synthesized as describe in the literature.<sup>121</sup>

##### 3-(4-(((17-carboxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)carbamoyl)phenyl)-4-chloro-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate – II-5



II-5

C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>10</sub>  
MW: 531.94 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown oil  
43%

SI-1 (50.0 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DMF (1.4 mL) and 1-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecan-18-oic acid (49.5 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) was added to the solution followed by triethylamine (38  $\mu$ L, mmol, 2.0 equiv.). The mixture was stirred at room temperature overnight. After that, DMF was removed under *vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 9/1) to afford II as a brown oil (33.5 mg, 0.06 mmol, 43%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.73 – 3.56 (m, 22H), 2.54 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), COOH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 174.5, 165.6, 163.9, 138.7, 134.7, 129.4 (2C), 124.5 (2C), 105.6, 70.6, 70.5, 70.4, 70.3, 70.3, 70.3, 70.2, 70.0, 69.7, 66.5, 40.1, 35.0.

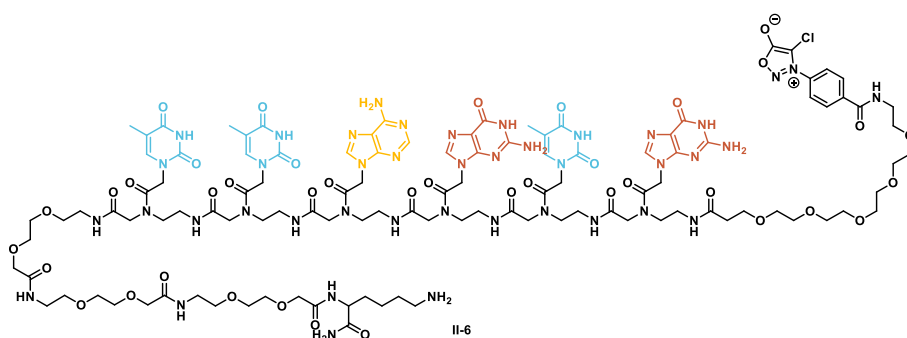
IR (cm<sup>-1</sup>): 2873, 1784, 1744, 1654, 1545, 1503, 1451, 1350, 1295, 1219, 1102, 1040, 860, 706.

LCMS (ESI): *m/z* [M]<sup>+</sup> 531.

HRMS (ESI): C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>10</sub>[M+H]<sup>+</sup> calculated : 532.1698; [M+H]<sup>+</sup> found : 532.1701.

<sup>121</sup> M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jego, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403

PNA-ClSyd – II-6

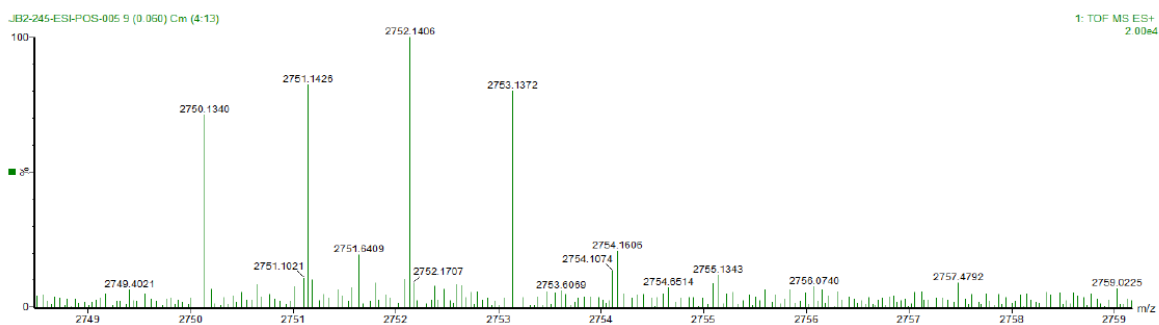


C<sub>112</sub>H<sub>157</sub>ClN<sub>42</sub>O<sub>39</sub>  
 MW: 2751.19 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 32%

Using the general procedure A, the PNA II-6 was prepared on solid support.

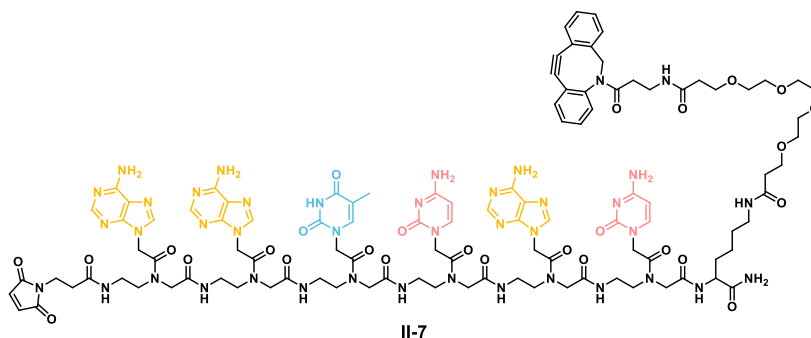
Sequence: Lys(Boc); Fmoc-AEEA-OH; Fmoc-AEEA-OH; Fmoc-AEEA-OH; t; t; a(Bhoc); g(Bhoc); t; g(Bhoc); Chlorosydnone-PEG-acid II-5.

After cleavage from the resin, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound II-6 was obtained as a white solid with 32% yield (19.7 mg, 7.17 μmol).



- HRMS (ESI) *m/z*: C<sub>112</sub>H<sub>157</sub>ClN<sub>42</sub>O<sub>39</sub> [M+nH]<sup>n+</sup> with n = 1 to 2
- [M+H]<sup>+</sup> calculated = 2750,1360, [M+H]<sup>+</sup> measured = 2750,1340
- [M+2H]<sup>2+</sup> calculated = 1386,5629, [M+2H]<sup>2+</sup> measured = 1386,5636
- [M+HNa]<sup>2+</sup> calculated = 1397,5538, [M+HNa]<sup>2+</sup> measured = 1397,5536

PNA-DBCO – II-7



C<sub>107</sub>H<sub>133</sub>N<sub>41</sub>O<sub>27</sub>  
 MW: 2425.50 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 11%

Using the general procedure A, the PNA **II-7-int** was prepared on solid support.

**Sequence:** Lys(Boc); c(Bhoc); a(Bhoc); c(Bhoc); t; a(Bhoc); a(Bhoc); N-Succinimidyl 3-maleimidopropionate.

After cleavage from the resin and precipitation in Et<sub>2</sub>O, the crude intermediate (50 mg, 26.4 μmol, 1 eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.5 mL). DBCO-PEG4-NHS (17 mg, 26.4 μmol, 1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (35.6 μL, 264 μmol, 20 eq.) were then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. After evaporation of the solvent, the crude was purified by prep HPLC. The desired compound **II-7** was obtained as a white solid with 11% yield (6.05 mg, 2.49 μmol).

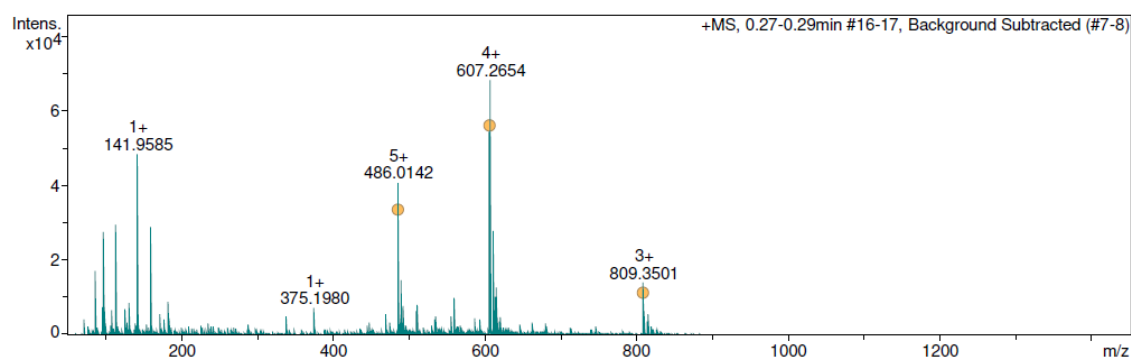
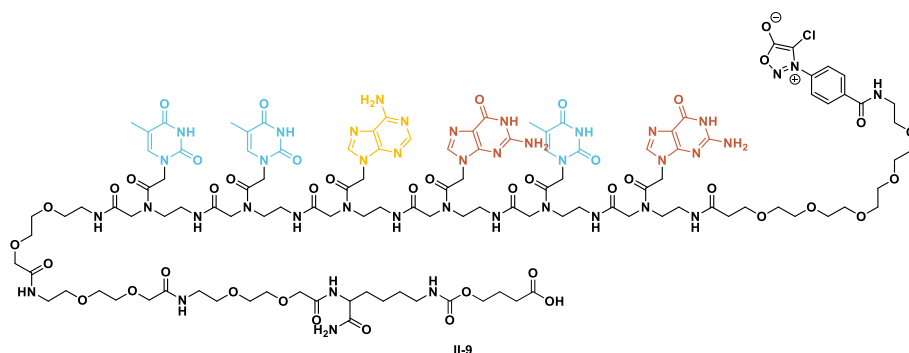


Figure S40. HRMS (ESI) spectrum of PNA-DBCO **II-7**

- **HRMS (ESI) *m/z*:** C<sub>107</sub>H<sub>133</sub>N<sub>41</sub>O<sub>27</sub> [M+nH]<sup>n+</sup> with n = 3 to 5
- [M+3H]<sup>3+</sup> calculated = 809.017096, [M+3H]<sup>3+</sup> measured = 809.016497
- [M+4H]<sup>4+</sup> calculated = 607.014641, [M+4H]<sup>4+</sup> measured = 607.014651
- [M+5H]<sup>5+</sup> calculated = 485.813973, [M+5H]<sup>5+</sup> measured = 485.813619

#### PNA-ClSyd-acide – **II-9**



C<sub>117</sub>H<sub>163</sub>ClN<sub>42</sub>O<sub>42</sub>  
 MW: 2865.293 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow oil  
 Quantitative

**II-6** (19.7 mg, 7.17 μmol, 1 eq.) was dissolved in dry DMF (300 μL). Glutaric anhydride (0.82 mg, 7.17 μmol, 1eq.) was added and the mixture was stirred at 40 °C for 2h. After that, DMF was removed under *vacuo* to afford **II-9** as a yellow oil (20.5 mg, 7.17 μmol, quantitative).



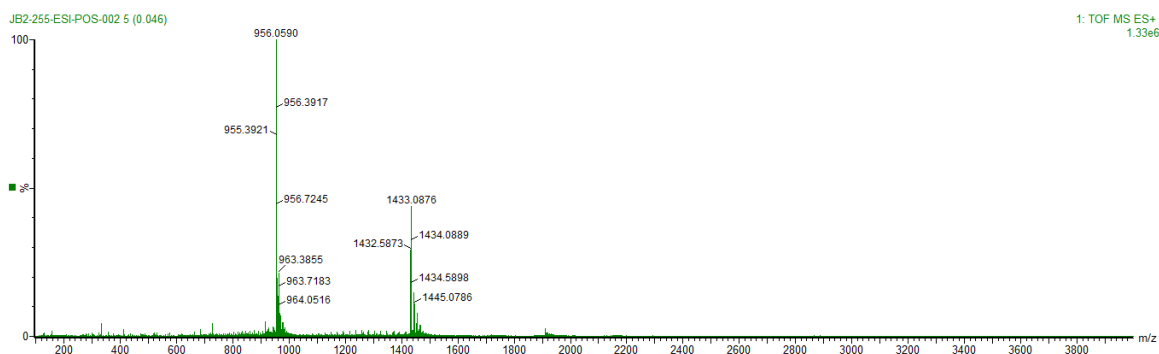
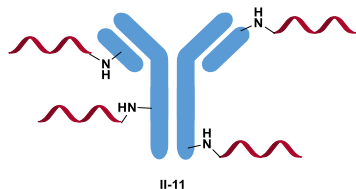


Figure S41. HRMS (ESI) spectrum of PNA-ClSydnone II-9

- HRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{117}H_{163}ClN_{42}O_{42} [M+nH]^{n+}$  with  $n = 2$  to  $3$
- $[M+2H]^{2+}$  calculated = 1432,5878,  $[M+2H]^{2+}$  measured = 1432,5873
- $[M+3H]^{3+}$  calculated = 955,3945,  $[M+3H]^{3+}$  measured = 955,3921

### Cetuximab-PNA-ClSyd – II-11



PNA- ClSyd-NHS II-10 was firstly prepared by incubation of **PNA-ClSyd-COOH SI.7** (1.0 equiv.), TSTU (1.1 equiv.) and  $Et_3N$  (1.1 equiv.) in dry DMF at 25 °C for 5 hours. Then 50  $\mu$ L of this solution (100/1, PNA- ClSyd –NHS II-10/Ctx) was then added to 1000  $\mu$ L of a solution of Ctx in labeling buffer (2 mg/mL in 0.1 M  $NaHCO_3$  pH 8.3). The mixtures were then incubated at 25°C for 4 hours and the resulting Ctx-PNA-ClSyd II-11 was purified *via* protein A purification using the general procedure **D**.

The mean number of PNA-Cl-Syd moieties grafted per antibody was determined by mass spectrometry analysis (MALDI). An average number of 4 PNA-Cl-Syd were incorporated.

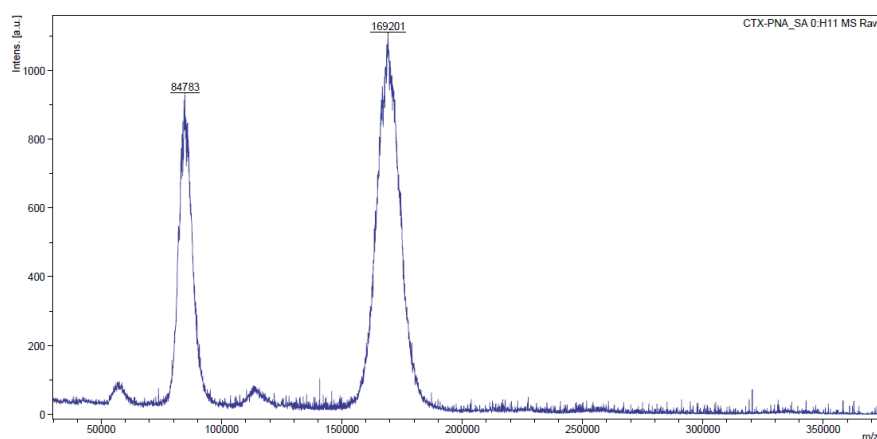


Figure S42. MALDI Analysis of Cetuximab -PNA-ClSyd II-11

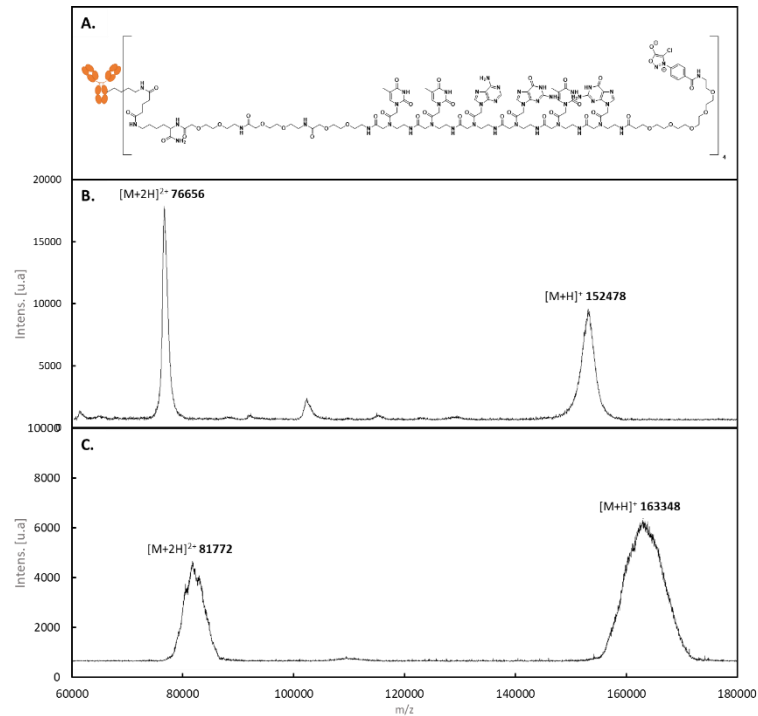


Figure S43. Structure of CTX-PNA-CISYD (A), MALDI analysis of non-conjugated Cetuximab (B), CTX-PNA-CISyD conjugate from reaction with 100 eq. PNA-NHS (C).

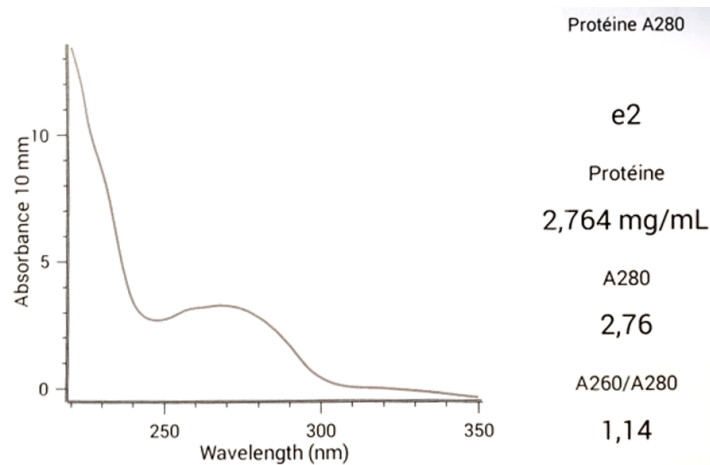


Figure S44. UV spectrum of CTX-PNA-CI-Syd II-11

Determination of Ctx-PNA-CISyD II-11 concentration by Bicinchoninic Acid (BCA) assay after conjugation

In a 96-well plate, 90  $\mu$ L of the BCA Working Reagent solution were added to 10  $\mu$ L of the CTX-PNA-SYD solution and incubated 30 min at 37  $^{\circ}$ C. After waiting 5 min that the temperature cooling down to room temperature, the absorbance of the solution at 562 nm was measured on a microplate spectrophotometer (CLARIO Start Plus, BM6 LABTECH). The mAb concentration is determined by comparison to a standard calibration curved made with Bovin serum albumin (BSA) protein at concentration ranging from 0.2 to 1g/L. The concentration of the sample is 0.34 mg/mL.

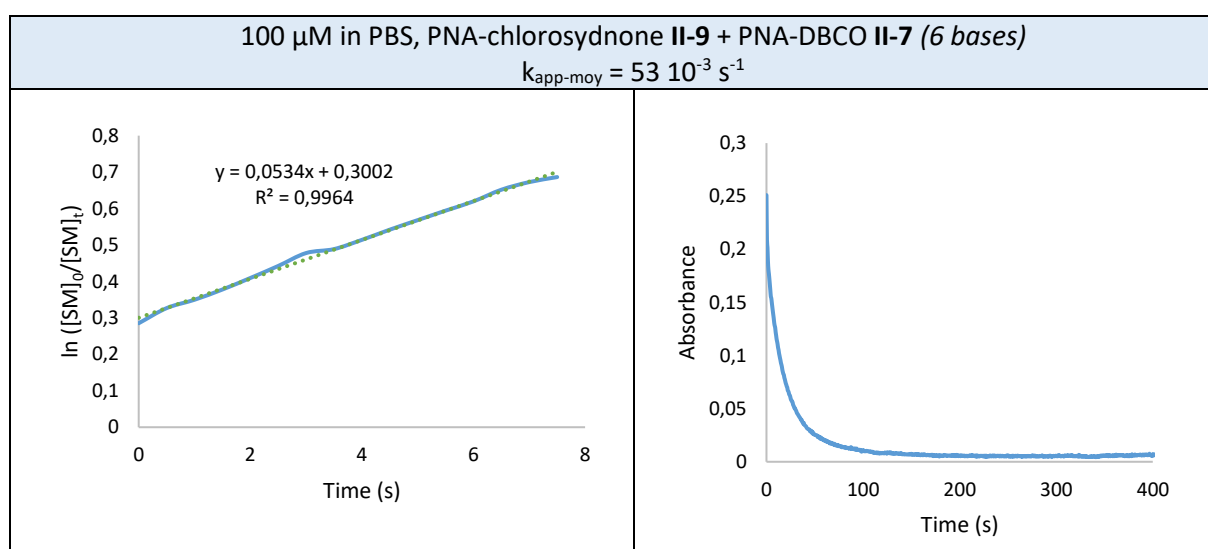
## B. Kinetic experiments

### Protocol for kinetic study click reaction between PNA-chlorosydnone and PNA-DBCO

Reaction kinetics were monitored by measuring absorbance signal at 310 nm to follow the disparition of the chlorosydnone moety's absorbance. In a vial was added 30  $\mu\text{L}$  of PNA-chlorosydnone **II-9** (10 mM in DMSO, 1 eq.) in 2940  $\mu\text{L}$  of PBS. The final concentration is 100  $\mu\text{M}$ . To the solution was added 30  $\mu\text{L}$  of the complementary PNA-DBCO **II-7** (10 mM in DMSO, 1 eq.). The absorbance measurement of the solution ( $\lambda_{\text{abs}} = 310 \text{ nm}$ ) was made under stirring at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

This reaction is considered as a pseudo first order. To determine the apparent constant ( $k_{\text{app}}$ ) of the reaction,  $\ln([SM]_0/[SM]_t)$  is plotted versus time. The results obtained for the different PNAs are illustrated in Table S17.

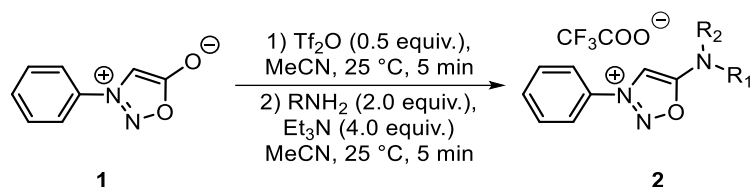
Table S17. Cinétique PNA **SI-7** + PNA **SI-5** 100  $\mu\text{M}$



## IV. Experimental part : Chapitre 3

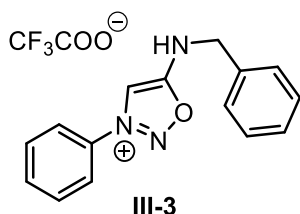
### A. Synthetic procedure and analytical data

**General procedure E for the nucleophilic aromatic substitution:**



**1** was dissolved in dry MeCN (0.1 M) under argon atmosphere in a dry schlenk tube and  $\text{Tf}_2\text{O}$  (1.2 equiv.) was added to the solution at room temperature. After 5 min, a solution of the amine (2.0 eq.) and triethylamine (4.0 eq.) in dry MeCN (0.1 M) was added the mixture. After 30 min, volatiles were removed under reduced pressure and the crude mixture was rapidly purified by column chromatography on silica gel (DCM to DCM 10% MeOH) in order to remove the excess of amine. Finally, the crude mixture was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour) to give the desired trifluoroacetate  $N^6$ -aryl sydnone imine salt.

#### 5-(benzylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium trifluoromethanolate – III-3



$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$   
MW: 365.31 g.mol<sup>-1</sup>  
Beige solid  
40%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure E, the compound **III-3** was obtained in 40% yield (45 mg, 123  $\mu\text{mol}$ , 40%).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 12.40 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.81 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.74 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.66 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.39-7.28 (m, 3H), 4.72 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 168.3, 134.9, 134.1, 132.6, 130.8 (2C), 129.0 (2C), 128.4, 128.0 (2C), 121.9 (2C), 102.0, 47.2. (Carbons of trifluoroacetate missing).

**$^{19}\text{F}$  NMR (300 MHz,  $\text{MeOD}-d_4$ ,  $\delta$  ppm):** -77.3.

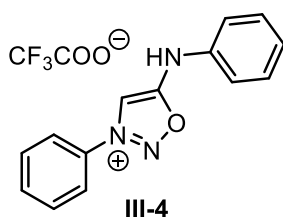
**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3364, 2988, 1669, 1454, 1356, 765.

**LCMS (ESI)  $m/z$ :**  $[\text{M}-\text{CF}_3\text{COO}]^+$ : 252

**HRMS (ESI):**  $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}]^+$  calculated : 252.1137;  $[\text{M}]^+$  found : 252.1138.

**Mp:** 143 – 144 °C.

3-phenyl-5-(phenylamino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-4



C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 351.28 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
44%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-4** was obtained in 44% yield (48 mg, 136 μmol, 44%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 8.94 (s, 1H), 8.13 – 8.06 (m, 2H), 7.92 – 7.85 (m, 1H), 7.84 – 7.78 (m, 2H), 7.56 (ddd, *J* = 9.2, 5.6, 1.9 Hz, 2H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.42 – 7.34 (m, 1H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 168.2, 137.1, 135.3, 134.6, 131.8 (2C), 131.2 (2C), 127.8, 123.7 (2C), 121.3 (2C), 104.5. (Carbons of trifluoroacetate missing).

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): -77.13.

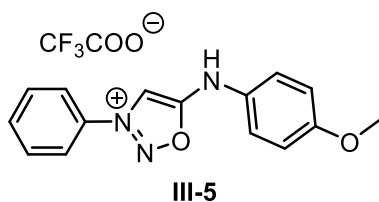
IR (cm<sup>-1</sup>): 1677, 1590, 1528, 1500, 1419, 1191, 1130, 986, 799, 747, 718, 680, 612.

LCMS (ESI): *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 238

HRMS (ESI): [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 238.0980; [M]<sup>+</sup> found : 238.1015.

Mp: 80 – 82 °C.

5-((4-methoxyphenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-5



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 381.31 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
33%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-5** was obtained in 33% yield (38.8 mg, 102 μmol, 33%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 8.68 (s, 1H), 7.99 – 7.95 (m, 2H), 7.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.34 – 7.31 (m, 2H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 167.7, 159.3, 134.4, 133.8, 131.0 (2C), 128.9, 122.9, 122.9 (2C), 115.5 (2C), 103.1, 55.3, 54.0. (Carbons of trifluoroacetate missing).

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): -78.80.

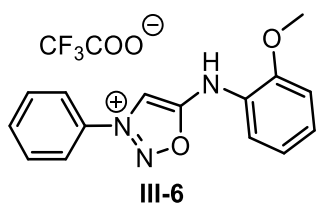
IR (cm<sup>-1</sup>): 3423, 1723, 1666, 1514, 1455, 1204, 1146, 801, 725.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 268

HRMS (ESI): [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> calculated : 268.1087; [M]<sup>+</sup> found : 268.1086.

Mp: 204 – 206 °C.

5-((2-methoxyphenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-6



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
 MW: 381.3 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 7%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-6** was obtained in 7% yield (7.8 mg, 21 μmol, 7%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm)**: 8.67 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.84 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.57 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.41 – 7.33 (m, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.3, 0.7 Hz, 1H), 7.10 (td, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm)**: 168.7, 153.2, 135.2, 134.6, 131.8 (2C), 129.6, 125.4, 123.7 (2C), 123.3, 122.3, 113.4, 104.6, 56.5 (Carbons of trifluoroacetate missing).

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm)**: -78.80.

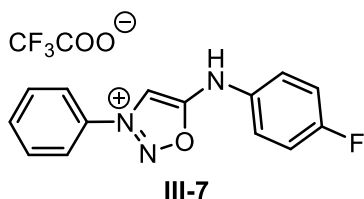
**IR (cm<sup>-1</sup>)**: 3074, 1665, 1595, 1504, 1466, 1199, 1130, 799, 749.

**LCMS (ESI)**: *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 268

**HRMS (ESI)**: [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> calculated : 268.1086; [M]<sup>+</sup> found : 268.1084.

**Mp**: 194 – 195 °C.

5-((4-fluorophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-7



C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 369.3 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow sticky solid  
 9%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-7** was obtained in 9% yield (10.5 mg, 18.4 μmol, 9%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm)**: δ 8.86 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.26 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm)**: 135.3, 134.2, 131.8 (2C), 124.0, 123.9, 123.7 (2C), 118.1, 117.8. (not enough product to see all pics). (Carbons of trifluoroacetate missing).

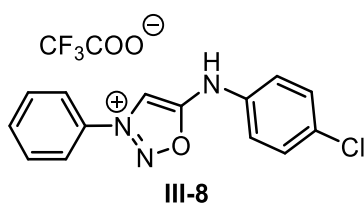
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm)**: -116.96, -77.12.

**IR (cm<sup>-1</sup>)**: 3416, 1669, 1513, 1204, 1147, 801, 726.

**LCMS (ESI) *m/z***: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 256

**HRMS (ESI)**: [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 256.0886; [M]<sup>+</sup> found : 256.0888.

5-((4-chlorophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-8



C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 385.7 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow sticky solid  
 7%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-8** was obtained in 7% yield (8.42 mg, 21.8 μmol, 7%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 7.96 – 7.93 (m, 2H), 7.77 – 7.67 (m, 3H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H). NH and C4 proton missing.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 168.1, 135.9, 135.4, 134.5, 133.0, 131.9 (2C), 131.3 (2C), 123.7 (2C), 122.9 (2C), 104.8. (Carbons of trifluoroacetate missing).

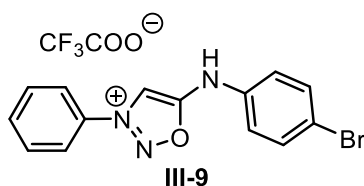
<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): -77.36.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3081, 1677, 1587, 1496, 1199, 1136, 831, 763.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 272

HRMS (ESI): [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 272.0591 ; [M]<sup>+</sup> found : 272.0596.

5-((4-bromophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-9



C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 430.2 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow sticky solid  
 11%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-9** was obtained in 11% yield (15 mg, 34.9 μmol, 11%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 8.95 (s, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 2H), 7.88 – 7.83 (m, 1H), 7.81 – 7.73 (m, 3H), 7.69 – 7.65 (m, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 168.0, 136.4, 135.4, 134.2 (2C), 131.8 (2C), 131.4, 123.7 (2C), 123.0, 122.7, 120.5, 104.9. (Carbons of trifluoroacetate missing).

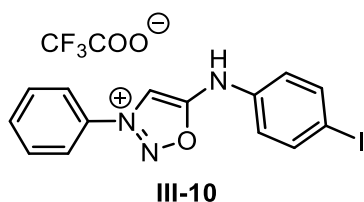
<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): -77.42.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3077, 1677, 1492, 1205, 1139.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 318

HRMS (ESI): [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 316.0085 ; [M]<sup>+</sup> found : 316.0092.

5-((4-iodophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-10



C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 477.2 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 15%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-10** was obtained in 15% yield (21.5 mg, 45 μmol, 15%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** δ 8.96 (s, 1H), 8.12 – 8.05 (m, 2H), 7.91 – 7.84 (m, 3H), 7.83 – 7.76 (m, 2H), 7.29 – 7.22 (m, 2H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 167.9, 140.3 (2C), 137.0, 135.4, 134.5, 131.9 (2C), 123.7 (2C), 123.0 (2C), 104.9, 91.0. (Carbons of trifluoroacetate missing).

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** -77.23.

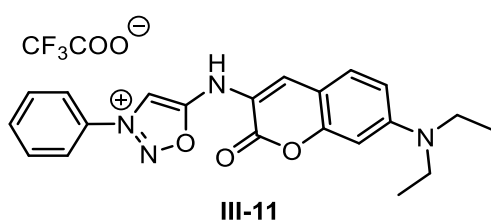
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1668, 1479, 1488, 1472, 1403, 1373, 1308, 1198, 1132, 1064, 1007, 991, 823, 798, 761, 718, 680.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 364

**HRMS (ESI):** [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>IN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 363.9947; [M]<sup>+</sup> found : 363.9950.

**Mp:** 149 – 152 °C.

5-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-11



C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 490.4 g.mol<sup>-1</sup>  
Red sticky solid  
8%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-11** was obtained in 8% yield (12.3 mg, 25 μmol, 8%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 8.77 (s, 1H), 8.10 – 7.99 (m, 3H), 7.84 (ddd, *J* = 6.6, 3.8, 1.2 Hz, 1H), 7.80 – 7.72 (m, 2H), 7.47 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.49 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.20 (dd, *J* = 11.4, 4.3 Hz, 6H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 195.9, 168.3, 168.1, 156.2, 152.5, 135.3, 131.9 (3C), 130.7, 123.6 (2C), 111.3, 108.5, 105.4, 98.1, 54.8, 45.8 (2C), 12.7 (3C). (Carbons of trifluoroacetate missing).

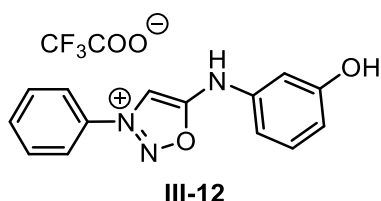
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** -77.21.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3400, 1671, 1204, 1138, 800, 723.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 377

**HRMS (ESI):** [C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> calculated : 377.1615 ; [M]<sup>+</sup> found : 377.1616.

5-((3-hydroxyphenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-12



C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 367.3 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow sticky solid  
40%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-12** was obtained in 40% yield (45 mg, 123 μmol, 40%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 8.76 (s, 1H), 7.99 – 7.92 (m, 2H), 7.77 – 7.71 (m, 1H), 7.66 (dd, *J* = 10.5, 4.9 Hz, 2H), 7.20 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.80 (ddd, *J* = 9.9, 6.2, 2.1 Hz, 2H), 6.65 (ddd, *J* = 8.3, 2.2, 0.7 Hz, 1H), NH and OH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 168.0, 160.2, 138.0, 135.2, 134.5, 132.0, 131.7 (2C), 123.7, 114.7, 111.9, 108.3, 104.5. (Carbons of trifluoroacetate missing).

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** -77.48.

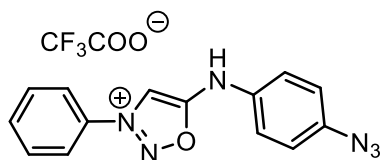


IR (cm<sup>-1</sup>): 3421, 1660, 1461, 1199, 1146, 852, 800, 726.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+ CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 254

HRMS (ESI): [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> calculated : 254.0930; [M]<sup>+</sup> found : 254.0938.

5-((4-azidophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-13



III-13

C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 367.3 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
13%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-13** was obtained in 13% yield (15 mg, 41 μmol, 13%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 8.89 (s, 1H), 8.09 – 8.04 (m, 2H), 7.89 – 7.83 (m, 1H), 7.81 – 7.75 (m, 2H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 168.1, 140.0, 135.3, 133.9, 131.8 (2C), 123.7 (2C), 123.2 (2C), 123.1, 121.6 (2C), 104.6. (Carbons of trifluoroacetate missing).

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): -77.35.

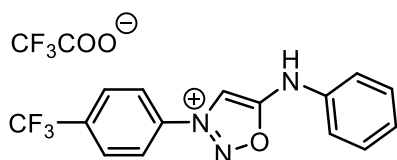
IR (cm<sup>-1</sup>): 3364, 2119, 1672, 1591, 1507, 1285, 1200, 1131, 835, 799, 720.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 279

HRMS (ESI): [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>6</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 279.0995; [M]<sup>+</sup> found : 279.0994.

Mp: Degradation at 180 °C

5-(phenylamino)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-14



III-14

C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 385.7 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
42%

Starting from CF<sub>3</sub>-phenylsydnone using general procedure **E**, the compound **III-14** was obtained in 42% yield (50 mg, 130 μmol, 42%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 9.03 (s, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.57 – 7.50 (m, 2H), 7.49 – 7.44 (m, 2H), 7.39 – 7.32 (m, 1H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 168.5, 137.0, 131.3 (2C), 129.1-129.0 (q, *J*=3.8 Hz, 2C), 128.0, 125.0 (2C), 121.5 (2C), 121.4 (2C), 105.2. (Carbons of trifluoroacetate missing and CF<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): -77.00, -64.69.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3070, 1676, 1592, 1324, 1181, 1134, 1069, 848.

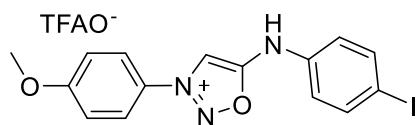
LCMS (ESI) *m/z*: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 306

HRMS (ESI): [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 306.0858; [M]<sup>+</sup> found : 306.0855.

Mp: 128 – 130 °C.

5-((4-iodophenyl)amino)-3-(4-methoxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-15

C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>I N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 507.21 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow sticky solid  
2%



**III-15**

Starting from *p*-methoxy-phenylsydnone using general procedure **E**, the compound **III-15** was obtained in less than 2% yield (3 mg, 6  $\mu$ mol, 2%).

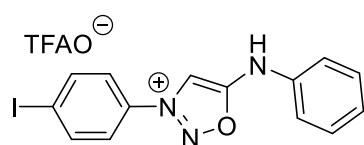
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm):** 8.82 (s, 1H), 8.02 – 7.96 (m, 2H), 7.85 – 7.80 (m, 2H), 7.71 – 7.66 (m, 2H), 7.05 – 7.00 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), NH unobserved.

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm):** not enough product obtained.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 394

**HRMS (ESI):** [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>I<sub>N</sub><sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> calculated : 394.0052; [M]<sup>+</sup> found : 394.0049.

**3-(4-iodophenyl)-5-(phenylamino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-16**



**III-16**

C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>I<sub>N</sub><sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 477.18 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow sticky solid  
 13%

Starting from *p*-iodo-phenylsydnone using general procedure **E**, the compound **III-16** was obtained in 13% yield (18.5 mg, 39  $\mu$ mol, 13%).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm):** 8.94 (s, 1H), 8.18 – 8.13 (m, 2H), 7.86 – 7.81 (m, 2H), 7.56 – 7.49 (m, 2H), 7.48 – 7.44 (m, 2H), 7.38 – 7.33 (m, 1H), NH unobserved.

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm):** 168.14, 141.11 (2C), 137.03, 131.21 (2C), 127.79, 125.04 (2C), 121.31 (2C), 121.29, 104.52, 101.80. (Carbons of trifluoroacetate missing).

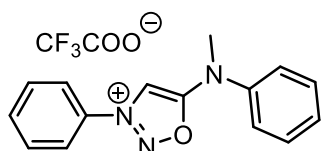
**$^{19}\text{F}$  NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm):** -77.25.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3059, 2923, 2852, 1664, 1590, 1498, 1424.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 364

**HRMS (ESI):** [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>I<sub>N</sub><sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 363.9948; [M]<sup>+</sup> found : 363.9952.

**5-(methyl(phenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-29**



**III-29**

C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 379.3 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow sticky solid  
 40%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-29** was obtained in 40% yield.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm):** 8.71 (s, 1H), 8.05 – 7.99 (m, 2H), 7.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.5, 6.9 Hz, 2H), 7.64 – 7.50 (m, 5H), 3.76 (s, 3H).

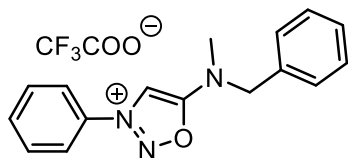
**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm):** 169.8, 142.0, 135.2, 134.5, 131.8 (2C), 131.7 (2C), 130.5, 125.7, 125.7, 123.5 (2C), 104.4, 40.8. (Carbons of trifluoroacetate missing).

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** -77.13.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 252

**HRMS (ESI):** [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 252.1137; [M]<sup>+</sup> found : 252.1132

**5-(benzyl(methyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-30**



**III-30**

C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 379.3 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow sticky solid  
20%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-30** was obtained in 20% yield (23.6 mg, 62 μmol, 20%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 8.00 – 7.95 (m, 2H), 7.82 – 7.76 (m, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 2H), 7.44 – 7.30 (m, 5H), 4.81 (s, 2H), 3.24 (s, 3H), C4 proton non observed.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 169.9, 163.8-162.8 (q, J = 35.1 Hz, TFAO-), 135.2, 134.7, 134.6, 131.8 (2C), 130.3 (2C), 129.9, 129.3 (2C), 123.4 (2C), 122.4-113.7 (q, J = 291.9 Hz, TFAO-), 97.8, 56.7, 36.9.

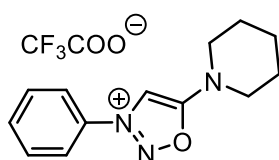
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** -77.18.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3390, 3067, 1671, 1455, 1201, 1134, 800.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 266

**HRMS (ESI):** [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 266,1293; [M]<sup>+</sup> found : 266,1291.

**3-phenyl-5-(piperidin-1-yl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-31**



**III-31**

C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 343.3 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange sticky solid  
38%

Starting from phenylsydnone **1** using general procedure **E**, the compound **III-31** was obtained in 38% yield (40 mg, 117 μmol, 38%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 8.95 (s, 1H), 8.11 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.90 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.83 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.91 – 3.84 (m, 4H), 1.88 – 1.76 (m, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 168.4, 134.9, 134.2, 131.7 (2C), 123.22 (2C), 103.2, 49.2 (2C), 25.6 (2C), 23.6 (Carbons of trifluoroacetate missing).

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** -77.04.

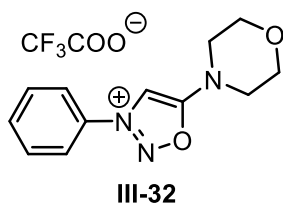
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3090, 2954, 1748, 1670, 1448, 1303, 1207, 1183, 1133, 799.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 230

**HRMS (ESI):** [C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> calculated : 230,1293; [M]<sup>+</sup> found : 230,1293.

**5-morpholino-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-32**

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 345.3 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
42%



Starting from phenylsyringone **1** using general procedure **E**, the compound **III-32** was obtained in 42% yield (45 mg, 130  $\mu$ mol, 42%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm)**: 8.68 (s, 1H), 7.93 – 7.88 (m, 2H), 7.76 – 7.70 (m, 1H), 7.69 – 7.62 (m, 2H), 3.72 (dt, *J* = 9.8, 4.6 Hz, 8H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm)**: 169.2, 135.2, 134.5, 131.9 (2C), 123.4 (2C), 103.2, 66.4 (2C), 47.9 (2C). (Carbons of trifluoroacetate missing).

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm)**: -77.12.

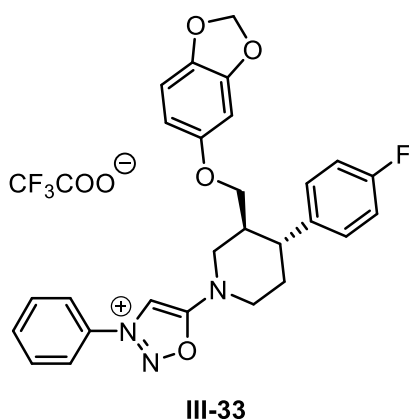
**IR (cm<sup>-1</sup>)**: 3386, 3072, 2870, 1672, 1451, 1289, 1201, 1115, 1031, 901.

**LCMS (ESI) *m/z***: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 232

**HRMS (ESI)**: [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> calculated : 232.1087; [M]<sup>+</sup> found : 232.1088.

**Mp**: 187 – 190 °C.

*5-((3S,4R)-3-((benzo[d][1,3]dioxol-5-yloxy)methyl)-4-(4-fluorophenyl)piperidin-1-yl)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-33*



C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>  
MW: 587.5276 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow sticky solid  
20%

Starting from phenylsyringone **1** using general procedure **E**, the compound **III-33** was obtained in 20% yield (36.2 mg, 61.7  $\mu$ mol, 20%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm)**: 8.83 (s, 1H), 8.06 – 8.02 (m, 2H), 7.89 – 7.83 (m, 1H), 7.82 – 7.75 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 7.05 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.22 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 5.86 (dd, *J* = 1.8, 1.1 Hz, 2H), 4.39 (dd, *J* = 13.4, 3.0 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 9.8, 2.9 Hz, 1H), 3.66 – 3.55 (m, 3H), 3.05 (td, *J* = 11.5, 4.4 Hz, 1H), 3.00 – 2.83 (m, 1H), 2.50 – 2.38 (m, 1H), 2.17 – 2.01 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm)**: 169.0, 164.5, 162.1, 155.5, 149.7, 143.4, 139.5 (d, *J* = 3.2 Hz), 135.2, 134.6, 131.9 (2C), 130.4 - 130.3 (d, *J* = 7.9 Hz, 2C), 123.4 (2C), 116.6 - 116.4 (d, *J* = 21.4 Hz, 2C), 108.8 - 106.7 (d, *J* = 211.9 Hz), 103.1, 102.5, 98.9, 69.4, 51.5, 49.1, 43.8, 42.6, 33.7. (Carbons of trifluoroacetate missing).

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm)**: -117.62, -79.98, -76.93.

**IR (cm<sup>-1</sup>)**: 3072, 2924, 1665, 1488, 1469, 1181, 1125, 1030.

**LCMS (ESI) *m/z***: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> : 474.

**HRMS (ESI)**: [C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> calculated : 474,1829; [M]<sup>+</sup> found : 474,1831.

## B. Physical properties and kinetic experiments

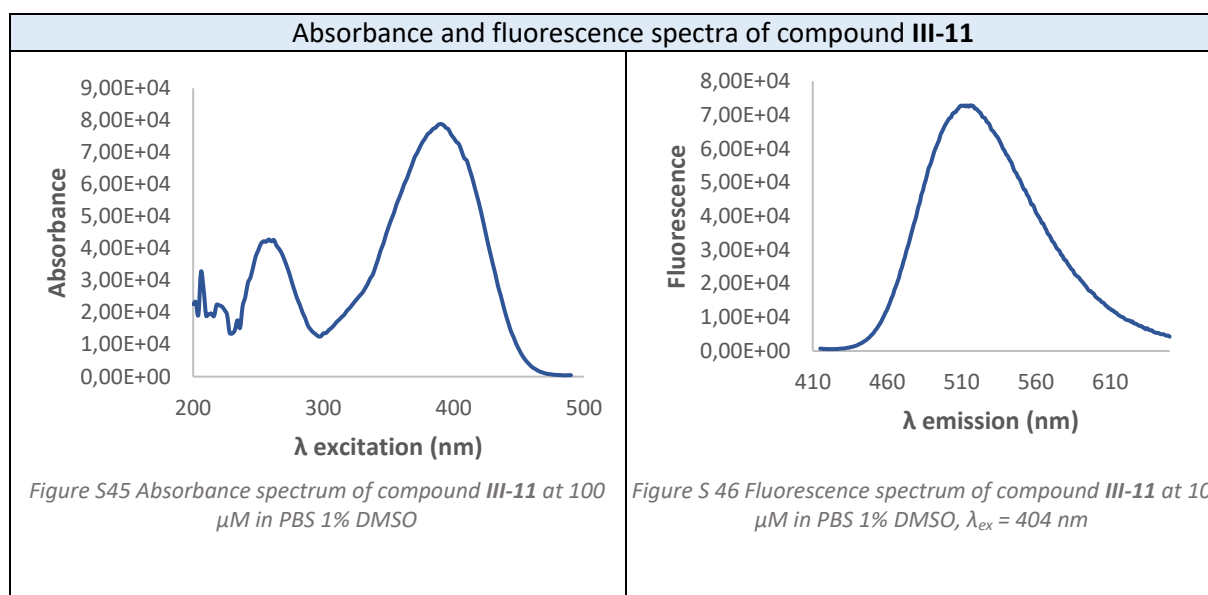
### 1. Physical properties

Physical properties of the iminosydnone-coumarin probe **III-11** were monitored.

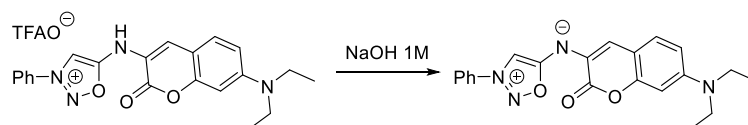
Absorbance spectrum of the probe **III-11** was performed at 100  $\mu\text{M}$  in PBS 1% DMSO. Two maximums of absorbance were determined: 260 nm and 404.4 nm. The excitation wavelength for coumarin fluorescence was determined through the absorbance spectrum.  $\lambda_{\text{ex}} = 404.4$  nm. This wavelength was used for the excitation of the probe in the fluorescence spectrum.

Fluorescence spectrum of the probe **III-11** was performed at 10  $\mu\text{M}$  in PBS 1% DMSO,  $\lambda_{\text{ex}} = 404.4$  nm. A maximum of fluorescence was determined at 510 nm.

Table S18. Absorbance and fluorescence spectra of compound **III-11** in PBS 1% DMSO



### Protocol for pKa determination of compound **III-11**



To a 100  $\mu\text{M}$  solution of the iminosydnone **III-11** in AcOH (0.1 M) was progressively added NaOH (1M). The pH of the solution was measured after each addition and the absorbance spectrum was recorded for each point (from pH 3.2 to pH 12.2).

The pKa of the compound **III-11** was determined by plotting the absorbance characteristic of the protonated compound (410 nm) versus pH.

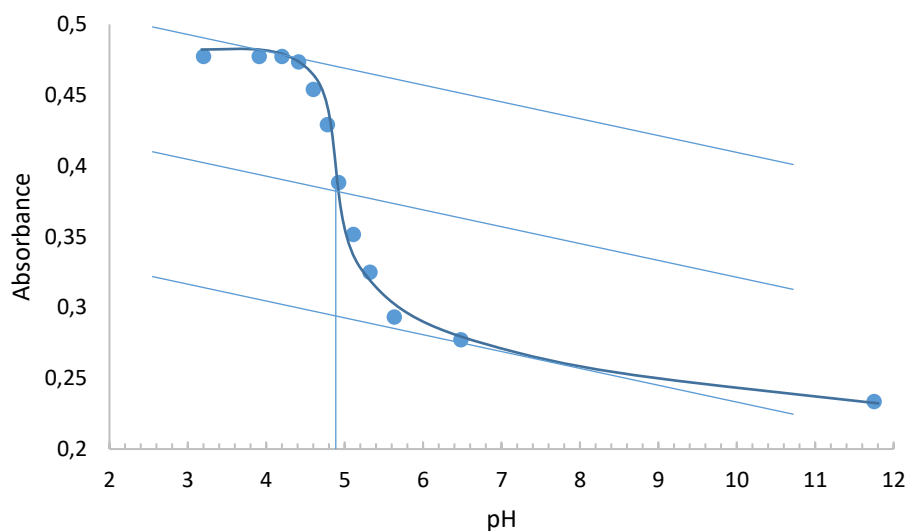


Figure S47. Absorbance in function of the pH of **III-11** at 410 nm

In a second experiment, the pKa of the compound **III-11** was also determined by fluorescence. To a 100  $\mu\text{M}$  solution of the iminosydnone **III-11** in AcOH (0.1 M) was progressively added NaOH (1M). The pH of the solution was measured after each addition and the fluorescence spectrum was recorded for each point (from pH 3.2 to pH 12.2) with an excitation of 410 nm.

The pKa of the compound **III-11** was determined by plotting the fluorescence characteristic of the protonated compound (excitation : 410 nm, emission : 510 nm) versus pH.

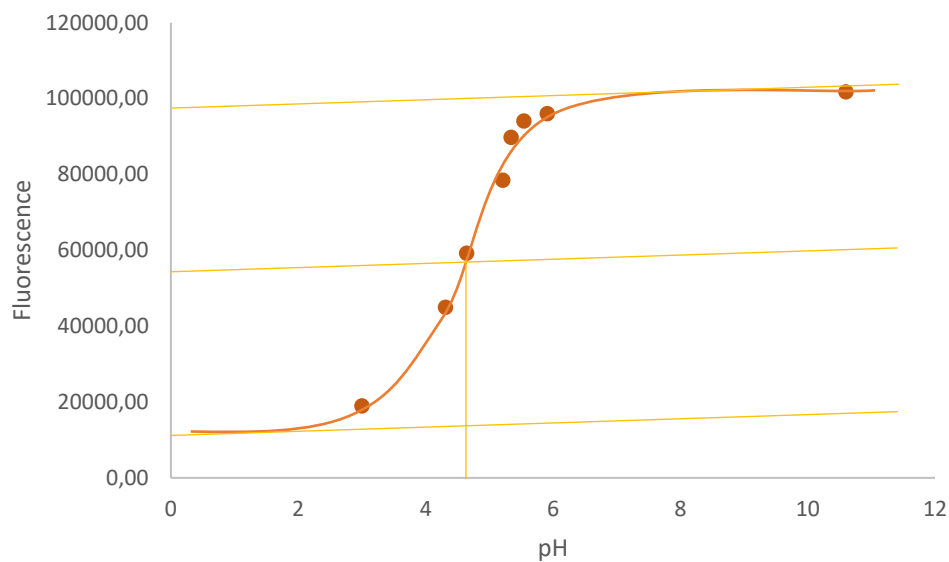


Figure S48. Fluorescence of the compound **III-11** in function of the pH,  $\lambda_{\text{ex}} = 404.4 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$

The pKa of **III-11** was found at  $4.8 \pm 0.1$ .

### Cristallography of III-32

The data collection for **III-32** was performed at 100(2) K on a Bruker D8 Quest diffractometer using an Incoatec Microfocus Source ( $I\mu\text{S}$  3.0 Mo) and a PHOTON III area detector, and operated with APEX3.<sup>122</sup> The data were processed with SAINT,<sup>123</sup> and an empirical absorption correction (multi-scan) was made with SADABS.<sup>124</sup> The structure was solved by intrinsic phasing with SHELXT,<sup>125</sup> and refined by full-matrix least-squares on  $F^2$  with SHELXL,<sup>126</sup> using the ShelXle interface.<sup>127</sup> Two-component twinning was detected with TwinRotMat in PLATON,<sup>128</sup> and the refined batch scale factor was 0.30. The hydrogen atoms were introduced at calculated positions and were treated as riding atoms with an isotropic displacement parameter equal to 1.2 times that of the parent atom. The drawing was made with ORTEP-3.<sup>129</sup>

Crystal data for IS4:  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{CaF}_9\text{N}_3\text{O}_8$ ,  $M = 611.40$ , monoclinic, space group  $P2_1/n$ ,  $a = 24.1213(14)$ ,  $b = 8.1633(4)$ ,  $c = 24.2668(17)$  Å,  $\beta = 98.981(2)^\circ$ ,  $V = 4719.8(5)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 8$ . Refinement of 704 parameters on 8929 independent reflections out of 76528 measured reflections ( $R_{\text{int}} = 0.077$ ) led to  $R1 = 0.083$ ,  $wR2 = 0.235$ ,  $S = 1.107$ ,  $\Delta\rho_{\text{min}} = -0.61$ ,  $\Delta\rho_{\text{max}} = 1.20$  e Å<sup>-3</sup>.

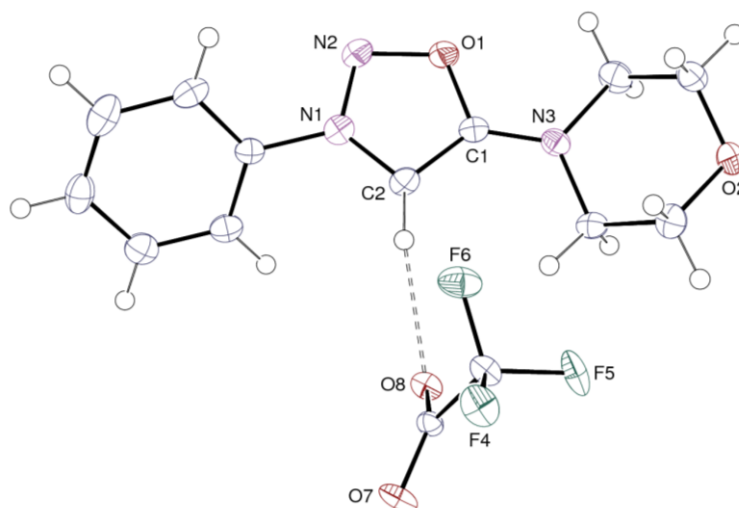


Figure S 49. (a) View of one of the two independent molecules in **III-32** with displacement ellipsoids shown at the 50% probability level. Only one  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  anion of the  $\text{Ca}(\text{CF}_3\text{COO})_3^-$  coordination polymer is shown. The hydrogen bond is shown as a dashed line.

## 2. Kinetic studies

### Protocol for kinetic study of coumarin release for Iminosydnone-coumarin **III-11** + DBCO acid

Reaction kinetics were monitored by measuring fluorescence signal at 510 nm with an excitation of 404 nm according the following protocol: In a vial was added 30  $\mu\text{L}$  of ImSyd-coum **III-11** (1 mM in

<sup>122</sup> APEX3, ver. 2019.1-0, Bruker AXS, Madison, WI, 2019.

<sup>123</sup> SAINT, ver. 8.40A, Bruker Nano, Madison, WI, 2019.

<sup>124</sup> (a) SADABS, ver. 2016/2, Bruker AXS, Madison, WI, 2016; (b) L. Krause, R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick and D. Stalke, *J. Appl. Crystallogr.*, 2015, 48, 3.

<sup>125</sup> G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, Sect. A, 2015, 71, 3.

<sup>126</sup> G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, Sect. C, 2015, 71, 3.

<sup>127</sup> C. B. Hübschle, G. M. Sheldrick and B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.*, 2011, 44, 1281.

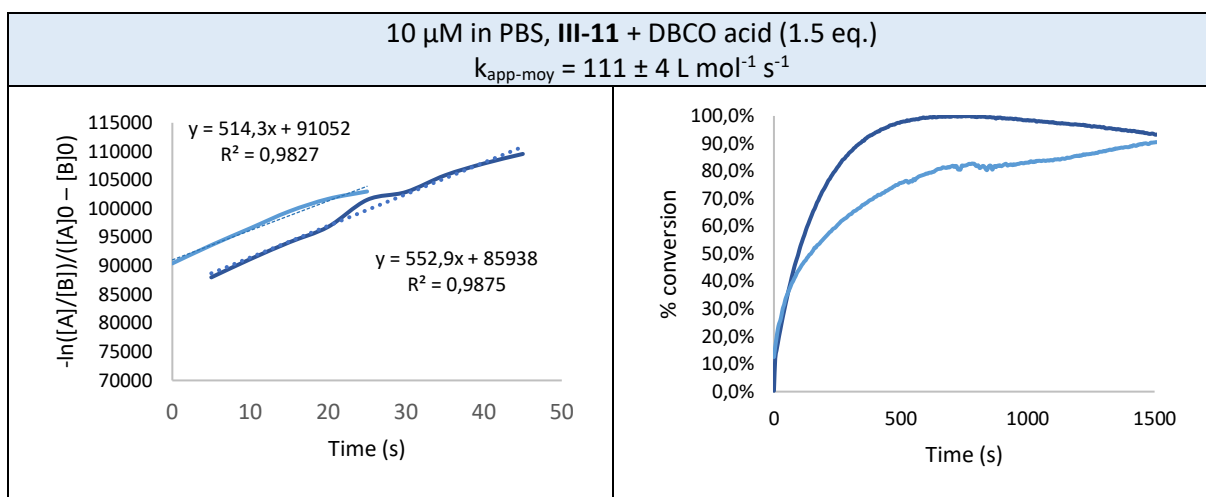
<sup>128</sup> A. L. Spek, *Acta Crystallogr.*, Sect. D, 2009, 65, 148.

<sup>129</sup> (a) M. N. Burnett and C. K. Johnson, ORTEP-III, Report ORNL-6895; Oak Ridge National Laboratory: TN, 1996; (b) L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 2012, 45, 849.

DMSO) in 2.925 mL of PBS, final concentration: 10  $\mu\text{M}$ . To the solution was added 45  $\mu\text{L}$  of DBCO solution (1.5 mM in DMSO, 1.5 eq.) The fluorescence measurement of the solution ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 404 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 510 nm) was made under stirring.

Second order reaction rate was determined by plotting  $-\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$  versus time and analyzing by linear regression (Equation S1). Second order rate constant corresponds to the determined slope.

Table S19. Conversion during the click and release reaction of Iminosydnone-coumarin III-11 and DBCO acid



A kinetic constant of  $k = 533 \pm 19 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  was found.



Protocol for kinetic study by NMR of Iminosydnone-morpholine **III-32** and DBCO acid

In a NMR tube was dissolved the compound **III-32** (5 mg, 14.5  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in DMSO- $d_6$  (500  $\mu\text{L}$ ) and dibromomethane (1.02  $\mu\text{L}$ , 14.5  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was added as an internal standard. A first NMR at  $t_0$  was obtained. Then, DBCO acid (4.8 mg, 14.5  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was added.

The conversion of the compound **III-32** was followed by integrating the pic characteristic of the C4 proton at 9.13 ppm. Kinetic constant for the conversion of the compound **III-32** was determined by plotting  $1/C-1/C_0$  versus time and analyzing by linear regression. Second order rate constant corresponds to the determined slope.

Table S20. Conversion during the click and release reaction between **III-32** and DBCO acid

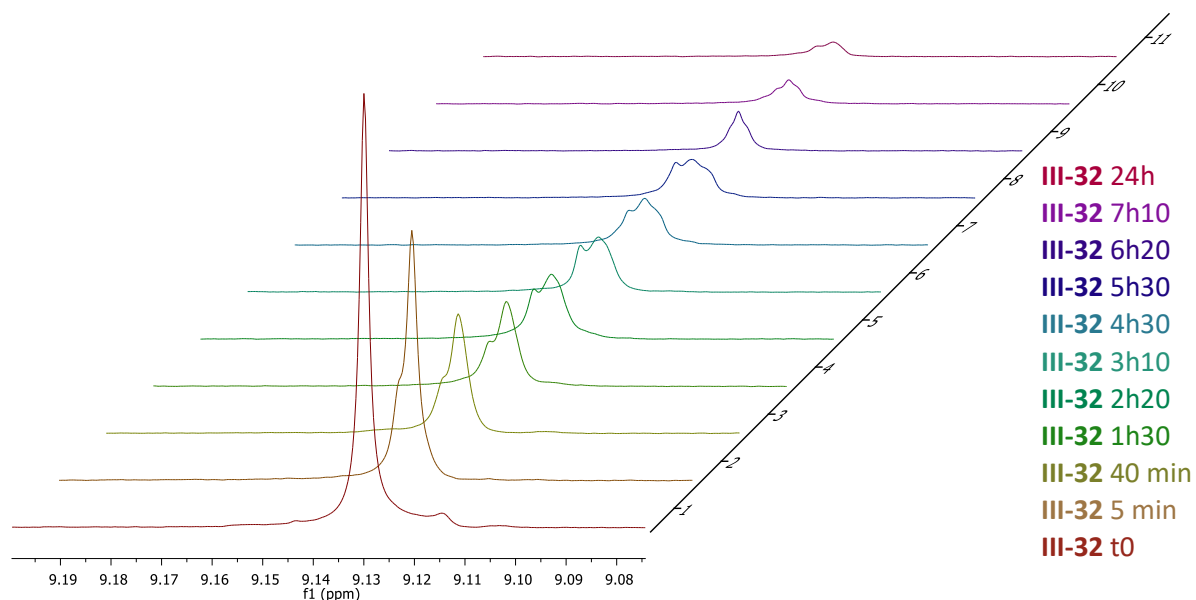
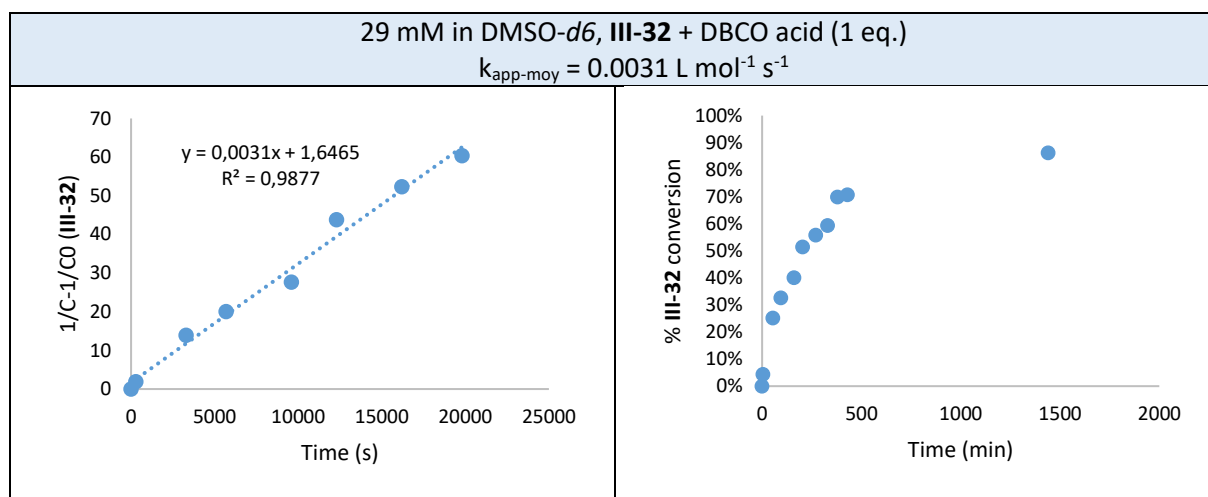


Figure S 50. NMR spectra of the compound **III-32** over time in reaction with DBCO acid

Characteristic pics of the pyrazole **III-27** were observed by NMR. The apparition of this compound was followed by integrating the pic of the singlet at 8.72 ppm. Concentration of this compound during the reaction was obtained by comparison of the integration with the internal standard, knowing the integration of 1H for t0. The concentration of this compound versus time was then plotted.

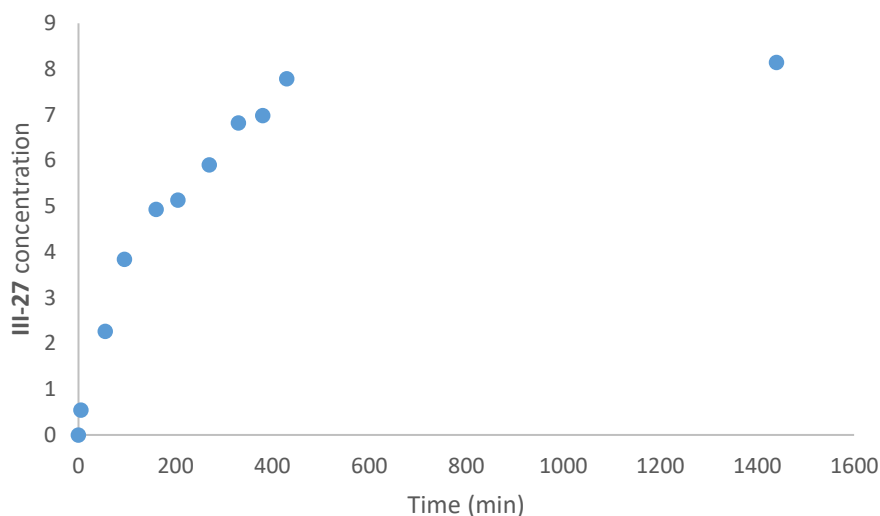


Figure S51. Concentration of **III-27** versus time, determined by NMR in DMSO-d6

A final concentration of 8.2 mM was obtained, corresponding to a conversion of 35% of the iminosydnone.

Pics from an unknown product were observed as well. These pics are associated with the product **III-34**. The apparition of this compound was followed by integrating the pic of the doublet at 7.03 ppm for 1H. The concentration of this compound versus time was then plotted.

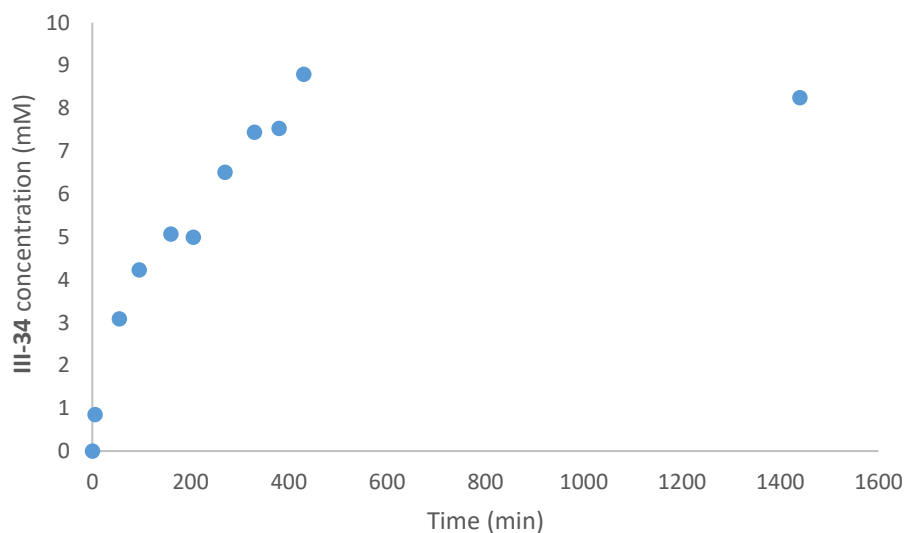


Figure S52. Concentration of **III-34** versus time, determined by NMR in DMSO-d6 NMR

A final concentration of 8.2 mM in **III-34** was obtained, corresponding to a conversion of 35% of the iminosydnone.

Protocol for LC-MS study of reaction between III-33 and DBCO acid in DMSO

In a vial was dissolved the compound **III-33** (0.18 mg, 300 nmol, 1 eq.) in DMSO and 2-fluoro-4-nitrophenol was added as an internal standard (0,047 mg, 300 nmol, 1 eq.). A first LC-MS spectrum was obtained at t<sub>0</sub>. Then DBCO acid (0.10 mg, 300 nmol, 1 eq.) was added and the reaction was stirred at room temperature and followed by LC-MS. The final concentration of the compound in solution in DMSO is 300 μM.

Release of the paroxetine was followed by mass spectrometry. A calibration curve was obtained for the ratio between paroxetine at different concentrations and 300 nmol of internal standard in mass spectrometry in DMSO.

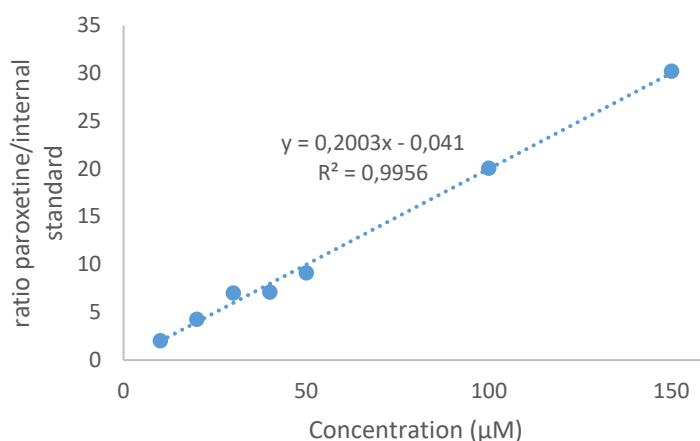


Figure S53. Calibration curve for paroxetine in mass spectrometry with 300 nmol of internal standard in DMSO

The concentration of paroxetine was determined and plotted versus time.

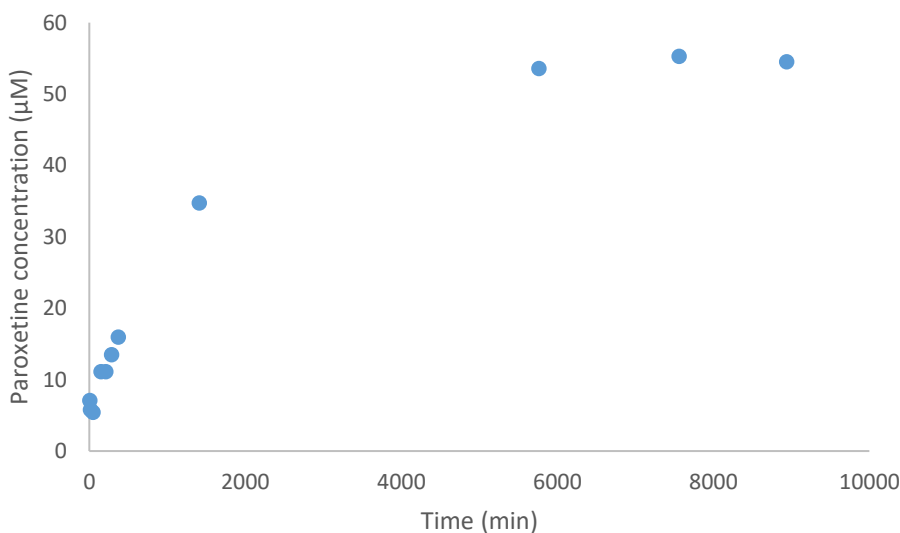


Figure S54. Concentration of paroxetine over time during the reaction between III-33 and DBCO, 300 μM in DMSO

A final concentration in paroxetine of 55 μM was obtained, corresponding to a conversion of 18% of iminosydnone. The half-time of this reaction is 840 minutes, giving a kinetic constant of  $k = 0,065 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Protocol for LC-MS study of reaction between III-33 and DBCO acid in PBS

In a vial was dissolved the compound **III-33** (0.12 mg, 200 nmol, 1 eq.) in PBS/DMSO (3:1) and 2-fluoro-4-nitrophenol was added as an internal standard (0,047 mg, 200 nmol, 1 eq.). A first LC-MS spectrum was obtained at t<sub>0</sub>. Then DBCO acid (0.10 mg, 300 nmol, 1 eq.) was added and the reaction was stirred at room temperature and followed by LC-MS. The final concentration of the compound in solution in PBS/DMSO (3:1) is 200 μM.

Release of the paroxetine was followed by mass spectrometry. A calibration curve was obtained for the ratio between paroxetine at different concentrations and 300 nmol of internal standard in mass spectrometry in PBS/DMSO (3:1).

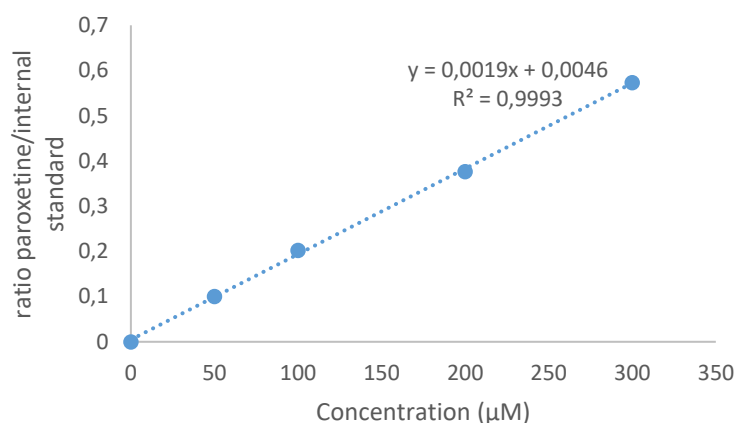


Figure S 55. Concentration of paroxetine over time during the reaction between **III-33** and DBCO, 300 μM in PBS/DMSO (3:1)

The concentration of paroxetine was determined and plotted versus time.

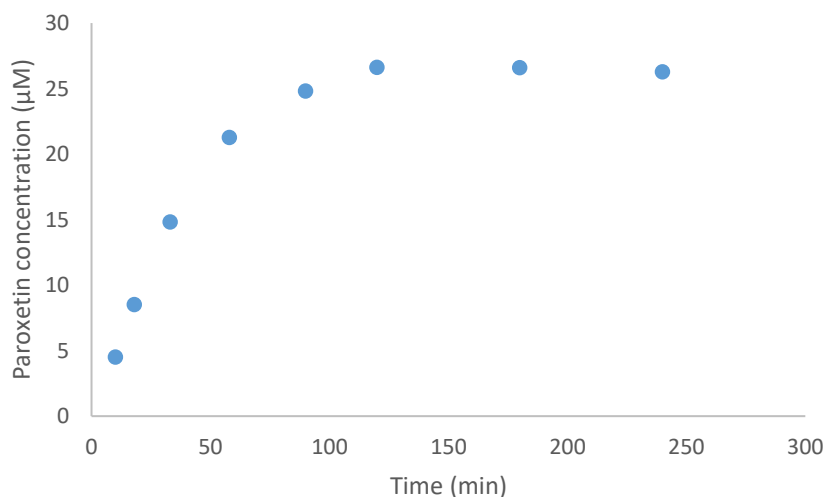


Figure S 56. Concentration of paroxetine over time during the reaction between **III-33** and DBCO, 200 μM in PBS

A final concentration in paroxetine of 27 μM was obtained, corresponding to a conversion of 14% of iminosydnone. The half-time of this reaction is 30 minutes, giving a kinetic constant of  $k = 2.77 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



---

# Bibliographie

---

1. H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 14846–15851
2. E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974–6998
3. P. Agarwala, J. van der Weijdena, E. M. Slettena, D. Rabuka and C. R. Bertozzi, *P.N.A.S.*, **2013**, 110, 46–51
4. H. Staudinger, J. Meyer, *J. Helv. Chem. Acta* **1919**, 2, 635
5. E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007
6. E. Saxon, J. I. Armstrong, and C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 14, 2141–2143
7. R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604–637
8. C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064
9. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599
10. B. T. Worrell, J. A. Malik, and V. V. Fokin, *Science*, **2013**, 340, 6131, 457–460
11. T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6, 17, 2853–2855
12. E. Haldón, M. C. Nicasio and P. J. Pérez, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 9528–9550
13. S. I. Presolski, V. Hong, S. Cho, and M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 41, 14570–14576
14. D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester and J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 17993–18001
15. E. C. Vatansever, J. Kang, A. Tuley, E. S. Ward, W. R. Liu, *Bioorg Med Chem.* **2020**, 28, 115808–115814
16. N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047
17. S. Bernard, R. A. Kumar, K. Porte, P. Thuéry, F. Taran and D. Audisio, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2000–2008
18. J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374, 16–36
19. G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 2493–2497
20. Y. Takayama, K. Kusamori and M. Nishikawa, *Molecules*, **2019**, 24, 172–192
21. H. Koo, S. Lee, J. H. Na, S. H. Kim, S. K. Hahn, K. Choi, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11836–11840
22. S. Palvai, C. T. Moody, S. Pandit, and Y. Brudno, *Mol. Pharmaceutics* **2021**, 18, 10, 3920–3925
23. B. C. Sanders, F. Friscourt., P. A. Ledin, N. E. Mbuja, S. Arumugam, J. Guo, T. J. Boltje, V. V. Popik, G. J. Boons., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 949–957
24. K. A. Andersen, M. R. Aronoff, N. A. McGrath, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 2412–2415
25. C. S. McKay, J. Moran, J. P. Pezacki, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 931–933
26. Y. Li and H. Fu, *Chemistry Open* **2020**, 9, 835–853
27. L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuypere, C. Créminon, D. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych and F. Taran, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 9376–9378
28. S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M. C. Nevers, C. Creminon, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056–12060
29. S. Wallace and J. W. Chin, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1742–1744

30. H. Liu, D. Audisio, L. Plougastel, E. Decuypere, D. Buisson, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, M. Elhabiri, A. Krzyczmonik, S. Forsback, O. Solin, V. Gouverneur and F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 12073–12077
31. M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518–13519
32. B. L. Oliveira, Z. Guo and G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 4895–4950
33. M. R. Karver, R. Weissleder and S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 2263–2270
34. J. Li and P. R. Chen, *Nature Chemical Biology* **2016**, 12, 129–137
35. C. Zhang, E. V. Vinogradova, A. M. Spokoyny, S. L. Buchwald, B. L. Pentelute, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58, 4810–4839
36. M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6511–6526
37. Y. Bai, J. Chen, S. C. Zimmerman, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 1811–1821
38. T. Volker, F. Dempwolff, P. L. Graumann, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10536–10540
39. X. Wang, Y. Liu, X. Fan, J. Wang, W. Shu Ching Ngai, H. Zhang, J. Li, G. Zhang, J. Lin and P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 17133–17141
40. G. S. Kumar and Q. Lin, *Chem. Rev.* **2021**, 121, 12, 6991–7031
41. P. Klan, T. Solomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov and J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 119–191
42. X. Tang, Y. Wu, R. Zhao, X. Kou, Z. Dong, W. Zhou, Z. Zhan, W. Tan, X. Fang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 18386–18389
43. Z. Huang, Z. Liu, X. Xie, R. Zeng, Z. Chen, L. Kong, X. Fan, and P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021** 143, 44, 18714–18720
44. M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, J. C. Florent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3147–3149
45. R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 14112–14116
46. J. C. T. Carlson, H. Mikula and R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 3603–3612
47. E. Jiménez-Moreno, Z. Guo, B. L. Oliveira, I. Albuquerque, A. Kitowski, A. Guerreiro, O. Boutureira, T. Rodrigues, G. Jiménez-Osés and G. J. L. Bernardes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 243–247
48. S. Eising, F. Lelivelt and K. M. Bongers, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 12243–12247
49. L. P. W. M. Lelieveldt, S. Eising, A. Wijen and K. M. Bongers, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 8816–8821
50. R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen and M. S. Robillard, *Bioconjugate Chem.*, **2016**, 27, 1697–1706
51. R. Rossin, R. M. Versteegen, J. Wu, A. Khasanov, H. J. Wessels, E. J. Steenbergen, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, A. H.A.M. van Onzen, P. J. Hudson & M. S. Robillard, *Nature Communications*, **2018**, 9, 1484
52. K. Wu, N. A. Yee, S. Srinivasan, A. Mahmoodi, M. Zakharian, J. M. Mejia Oneto, M. Royzen, *Chemical Science* **2021**, 12, 1259–1271
53. S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyan, M. Nguyet Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 15612–15616
54. M. Riomet, E. Decuypere, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, and F. Taran, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 535–8541

55. M. Riomet, K. Porte, L. Madegard, P. Thuéry, D. Audisio, and F. Taran, *Org. Lett.* **2020**, 22, 6, 2403–2408
56. M. Feng, L. Madegard, M. Riomet, M. Louis, P. A. Champagne, G. Pieters, D. Audisio and F. Taran., *Chem. Commun.* **2022**, 58, 8500–8503
57. M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jegou, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, 2019, 55, 10400–10403
58. K. Porte, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, B. Eddhif, P. Poinot, E. Gravel, E. Doris, A. Wijkhuisen, D. Audisio, S. Papot, F. Taran, *Angew.Chem.Int.Ed.* **2019**, 58, 6366–6370
59. J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738
60. K. Hoogsteen, *Acta Cryst.*, **1963**, 16, 907–916
61. P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500
62. M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, 365, 566–568
63. P. E. Nielsen, M. Egholm, *Current Issues Molec. Biol.* **1999**, 1, 2, 89–104
64. B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, 4, 1, 5–23
65. N. Hüsken, G. Gasser, S. D. Köster and N. Metzler-Nolte, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 8, 1578–1586
66. G. Gasser, N. Hüsken, S. D. Köster and N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.* **2008**, 3675–3677
67. S. Barluenga and N. Winssinger, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1319–1331
68. Z. L. Pianowski and N. Wissinger, *Chem. Commun.* **2007**, 3820–3822
69. D. J. Maly, F. Leonetti, B. J. Backes, D. S. Dauber, J. L. Harris, C. S. Craik, and J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3, 910–915
70. M. B. Soellner, B. L. Nilsson, and R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 27, 8820–8828
71. K. Gorska, A. Manicardi, S. Barluenga and N. Wissinger, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4364–4366
72. M. Röthlingshöfer, K. Gorska, and N. Winssinger, *Org. Lett.* **2012**, 14, 482–485
73. M. Anzola and N. Wissinger, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 334–342
74. D. Chang, E. Lindberg and N. Wissinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 1444–1447
75. Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten and N. Wissinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6492–6497
76. K. K. Sadhu and N. Wissinger, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 8182–8189
77. L. Holtzer, I. Oleinich, M. Anzola, E. Lindberg, K. K. Sadhu, M. Gonzalez-Gaitan, and N. Winssinger, *ACS Cent. Sci.* **2016**, 2, 394–400
78. J. Sayers, R. J. Payne and N. Wissinger, *Chem. Sci.* **2018**, 9, 896–903
79. M. Riomet, K. Porte, A. Wijkhuisen, D. Audisio and F. Taran., *Chem. Commun.* **2020**, 56, 7183 – 7186
80. M. Riomet, K. Porte, L. Madegard, P. Thuéry, D. Audisio, and F. Taran, *Org. Lett.* **2020**, 22, 6, 2403–2408
81. A. Leonidova, C. Foerster, K. Zarschler, M. Schubert, H. Pietzsch, J. Steinbach, R. Bergmann, N. Metzler-Nolte, H. Stephan and G. Gasser, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 5601–5616
82. K. Jensen, H. Orum, P. E. Nielsen and B. Nordén, *Biochemistry*, **1997**, 36, 16, 5072–5077
83. C. Spicer, B. Davis, *Nat Commun.* **2014**, 5, 4740
84. P. Khongorzul, C. Jia Ling; F. Ullah Khan; Awais Ullah Ihsan; Juan Zhang, *Mol Cancer Res.*, **2020**, 18, 1, 3–19
85. G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch and P. A. Trail, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 855–869



86. B. Wei, J. Gunzner-Toste, H. Yao, T. Wang, J. Wang, Z. Xu, J. Chen, J. Wai, J. Nonomiya, S. P. Tsai, J. Chuh, K. R. Kozak, Y. Liu, S-F Yu, J. Lau, G. Li, G. D. Phillips, D. Leipold, A. Kamath, D. Su, K. Xu, C. Eigenbrot, S. Steinbacher, R. Ohri, H. Raab, L. R. Staben, G. Zhao, J. A. Flygare, T. H. Pillow, V. Verma, L. A. Masterson, P. W. Howard, B. Safina, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 989–1000.
87. P. D. Senter & E. L. Sievers, *Nature Biotechnology*, **2012**, 30, 631–637
88. N. Jain, S. W. Smith, S. Ghone & Bruce Tomczuk, *Pharm Res*, **2015**, 32, 3526–3540
89. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 14, 2596–2599
90. C. Courderot-Masuyer, F. Dalloz, V. Maupoil, L. Rochette, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **1999**, 13, 535–540
91. D. Vodovar, J. Aboab, S. Silva, N. Tournier, *Méd. Intensive Réa.*, **2019**, 28, 4, 347–352
92. J. S. Fowler, T. Ido, *Seminars in Nuclear Medicine*, **2002**, 32, 1, 6–12
93. M. Patra, K. Zarschler, H-J. Pietzsch, H. Stephanb and G. Gasser, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 6415–6431
94. E. J. L. Stéen, P. E. Edem, K. Nørregaard, J. T. Jørgensen, V. Shalgunova, A. Kjaer, M. Herthab, *Biomaterials*, **2018**, 179, 209–245
95. H. Kobayashi, H. Sakahara, M. Hosono, Z-S. Yao, S. Toyama, K. Endo, J. Konishi, *Journal of Nuclear Medicine*, **1994**, 35, 10, 1677 – 1684
96. Anna Leonidova, Christian Foerster, Kristof Zarschler, M. Schubert, H-J. Pietzsch, J. Steinbach, R. Bergmann, N. Metzler-Nolte, H. Stephan and G. Gasser, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 5601–5616
97. B. Kuhnast, F. Dolle et B. Tavitian, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **2002**, 45, 1–11
98. L. Cai, S. He, X. Zheng, J. Li, H. Wang, Y. Liu, L. Zhang, *J Label Compd Radiopharm.*, **2021**, 64, 428–439
99. L. Cai, H. Wang, S. He, X. Zheng, Y. Liu and L. Zhang, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2022**, 331, 2895–2902
100. K. Porte, M. Ribéraud, R. Châtre, D. Audisio, S. Papotand F. Taran, *ChemBioChem* **2021**, 22, 100–113
101. D. J. Vugts, A. Vervoort, M. Stigter-van Walsum, G. W. M. Visser, M. S. Robillard, R. M. Versteegen, R. C. M. Vulders, J. D. M. Herscheid, and G. A. M. S. van Dongen, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 10, 2072–2081
102. R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R.C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, and Marc S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 3375–3378
103. J. Meyer, J. L. Houghton, P. Kozlowski, D. Abdel-Atti, T.s Reiner, N. Pillarsetty, W. W. Scholz, B. M. Zeglis and J.n S. Lewis, *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 298–301
104. J. L. Houghton, R. Membreno, D. Abdel-Atti, K. M. Cunanan, S. Carlin, W. W. Scholz, P. B. Zanzonico, J. S. Lewis and B. M. Zeglis, *Mol. Cancer Ther.*, **2017**, 16, 124–133
105. M. A. Shah, X. Zhang, R. Rossin, M. S. Robillard, D. R. Fisher, T. Buelmann, F. J. M. Hoeben, and T. P. Quinn, *Bioconjugate Chem.* **2017**, 28, 3007–3015
106. S. B. Lee, H. L. Kim, H-J. Jeong, S. T. Lim, M-H. Sohn, and D. W. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 10549–10552
107. M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jego, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403
108. L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuyper, C. Créminon, D. A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Chem. Commun.* **2014**, 50 (66), 9376–9378
109. M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jego, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403

110. M. Richard, F. Hinnen and B. Kuhnast, *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, **2022**, 7, 7
111. M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jegou, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403
112. M. Riomet, E. Decuyper, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, and F. Taran, *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24, 535–8541
113. M. Riomet, K. Porte, L. Madegard, P. Thuéry, D. Audisio, and F. Taran, *Org. Lett.* **2020**, 22, 6, 2403–2408
114. S. Araki, J. Mizuya et Y. Butsugan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1985**, 1, 2439–2441
115. S. Mummel, F. Lederle, E.G. Hübner, J.C. Namyslo, M. Nieger and A. Schmidt, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2021**, 60, 18882–18887
116. M. Riomet, K. Porte, A. Wijkhuisen, D. Audisio and F. Taran, *Chem. Commun.*, **2020**, 56, 7183
117. W. E. Brown, A Green, Thomas Cedel, and J. Cairns, *Environmental Health Perspectives*, **1987**, 72, 5–11
118. K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4603–4606.
119. L. Boder, S. Parente, F. Arrigoni, A. Klimpel, I. Neundorf, S. Gazzola, U. Piarulli, *Eur. J.O.C.*, **2021**, 17, 2383–2387
120. D. Niculescu-Duvaz, I. Niculescu-Duvaz, F. Friedlos, J. Martin, R. Spooner, L. Davies, R. Marais, and C. J. Springer, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 26, 5297–5309
121. M. Richard, C. Truillet, V. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jegou, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran and S. Specklin, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 10400–10403
122. APEX3, ver. 2019.1-0, Bruker AXS, Madison, WI, 2019.
123. SAINT, ver. 8.40A, Bruker Nano, Madison, WI, 2019.
124. (a) SADABS, ver. 2016/2, Bruker AXS, Madison, WI, 2016; (b) L. Krause, R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick and D. Stalke, *J. Appl. Crystallogr.*, 2015, 48, 3.
125. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, Sect. A, 2015, 71, 3.
126. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, Sect. C, 2015, 71, 3.
127. C. B. Hübschle, G. M. Sheldrick and B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.*, 2011, 44, 1281.
128. A. L. Spek, *Acta Crystallogr.*, Sect. D, 2009, 65, 148.
129. (a) M. N. Burnett and C. K. Johnson, ORTEP III, Report ORNL-6895; Oak Ridge National Laboratory: TN, 1996; (b) L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 2012, 45, 849.