



HAL
open science

Approches bio-orthogonales pour la production de radiopharmaceutiques.

Ludovic Le Saux

► **To cite this version:**

Ludovic Le Saux. Approches bio-orthogonales pour la production de radiopharmaceutiques.. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2024. Français. NNT : 2024NANU1006 . tel-04765406

HAL Id: tel-04765406

<https://theses.hal.science/tel-04765406v1>

Submitted on 4 Nov 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.

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Chimie organique - Radiochimie

Par

Ludovic LE SAUX

Approches bio-orthogonales pour la production de radiopharmaceutiques

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 14 juin 2024

Unité de recherche : CICI2NA, Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075

Rapporteurs avant soutenance :

Aurélie MAISONIAL-BESSET Maitre de conférences, UMR Inserm 1240, Université Clermont-Auvergne

Frédéric TARAN Directeur de recherche, CEA, INRAE, DMTS, SCBM, Université Paris Saclay

Composition du Jury :

Président : Guy BORMANS Professeur des universités, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KU Leuven

Examineurs : Karen PLE Chargé de recherche, UMR CNRS 7311, ICOA, Université d'Orléans
Guy BORMANS Professeur des universités, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KU Leuven

Dir. de thèse : Jean-François GESTIN Directeur de recherche, CICI2NA Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075

Co-encadrant : Romain EYCHENNE Ingénieur de recherche, GIP Arronax

Invité(s)

François GUERARD Chargé de recherche, CICI2NA Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075

Remerciements

À Madame la Docteure Aurélie MAISONIAL-BESSET et Monsieur le Docteur Frédéric TARAN, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour le temps et l'intérêt que vous avez consacrés à mon travail.

À Madame la Docteure Karen PLE et Monsieur le Professeur Guy BORMANS, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de juger le travail réalisé pendant ces trois années.

À Monsieur le Professeur Férid Haddad ainsi qu'au GIP Arronax, pour avoir initié et financé ce projet de recherche. Merci également à l'ensemble du personnel d'Arronax, qui a su être disponible dès que j'en avais besoin, me permettant ainsi de réaliser ma thèse dans d'excellentes conditions.

À Madame la Professeure Françoise KRAEBER-BODERE et à Monsieur le Professeur Michel CHEREL, directeurs de l'équipe oncologie nucléaire du CRCI2NA, au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse.

À Monsieur le Docteur Jean-François GESTIN, mon directeur de thèse. Tout d'abord, je te remercie de m'avoir motivé à réaliser cette thèse, car sans toi, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour ton soutien et ton écoute qui m'ont permis de tenir tout au long de ces années. Je te remercie également pour tes précieux conseils qui m'ont donné plus confiance en moi et, même si certains n'y croient pas, je garderai toujours en tête les trois S. Merci d'avoir cru en moi.

À Monsieur le Docteur Romain EYCHENNE, mon co-encadrant de thèse. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et ton aide qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Merci également pour les corrections pertinentes que tu as apportées à ce manuscrit, le rendant ainsi plus clair et détaillé.

À Monsieur le Docteur François GUERARD, merci pour ta bienveillance et pour tous les précieux conseils apportés durant cette thèse, que ce soit au niveau de l'orientation du projet, de la rédaction du manuscrit ou encore de la préparation de la soutenance. Tu m'as recruté en tant qu'assistant ingénieur, tu m'as fait confiance pour mener à bien ce projet, et j'ai énormément appris grâce à toi. Merci encore pour le temps (beaucoup de temps) que tu m'as accordé pour répondre à toutes mes questions et pour m'avoir accompagné tout au long de ces années. Tu as été un vrai pilier pour moi.

À Monsieur le Docteur Frederik CLEEREN et à l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Louvain, au sein duquel j'ai pu réaliser les marquages au fluor-18. Merci pour votre accueil et votre gentillesse à mon égard. J'ai hâte de vous rejoindre pour travailler à vos côtés.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué activement à ce projet. À Julie RENOULT, merci énormément pour le travail accompli sur la partie CuSAC. Même face à des résultats compliqués, tu n'as jamais abandonné et tu m'as été d'une grande aide pendant ton passage au laboratoire. Ce fut un réel plaisir de t'encadrer durant ces six mois.

À Mikaël CROYAL, pour les analyses par spectrométrie de masse réalisées entre tes propres projets. À Jérôme THIEPHAIN, pour les analyses RMN, et à la plateforme RMN du CEISAM, en particulier Aurélie BERNARD et Virginie SYLVESTRE, pour les analyses les plus récalcitrantes. Merci de m'avoir transmis un peu de votre expertise.

À l'ensemble de la Team SOAP, merci pour cette soirée moules, karaoké et paillettes, qui a fini en crêpes/galettes. Mathilde R, Clotilde et MK, je vous souhaite bon courage pour vos soutenances respectives. Bonne continuation à toi dans ta nouvelle équipe, MK « C'est pas la capitale (nan), c'est Marseille, bébé ».

À Patricia LE SAËC, alias madame Menthe Pastille, merci pour ta bonne humeur et ta bienveillance. Merci pour ton aide lorsque j'en avais besoin, tu es un véritable pilier dans cette équipe et je te souhaite le meilleur.

À Latifa RBAH-VIDAL, merci pour ton soutien tout au long de cette thèse. Tu as toujours été très objective, ce que j'ai beaucoup apprécié chez toi. Merci pour ta bonne humeur et toutes ces longues discussions au bureau 323, même si je ne venais pas que pour toi ! Supporter le FC Nantes a été difficile (tu me l'as souvent « gentiment » rappelé), mais je compte sur toi pour aller voir du rugby à la Rabine maintenant que la Bretagne est en Top 14 !

À Romain OGER, le capitaine, ce fut un honneur de jouer avec toi et de remporter le tournoi de foot de l'Inserm. À présent, tu as un an pour faire ton mercato et ramener une nouvelle fois la coupe à la maison ! Et désolé de t'avoir oublié pour le match Nantes-Rennes l'année dernière, mais tu sais, ce n'était peut-être pas une si mauvaise chose.

À Séverine MARIONNEAU-LAMBOT, merci pour ta gentillesse et ton soutien moral pendant cette thèse. Je te remercie également pour la tasse, elle est incroyable !

À Nina LAURENT, Charlotte JACQUET, Mylène SORIN et Mathilde ESNAULT, un grand merci à la Get7 ! Merci à toi Nina pour cette soirée de Noël et pour m'avoir fait découvrir certains endroits de Nantes parfois « étranges » que je ne connaissais pas, mention honorable au Chupitos ! Peu importe quand cela se terminera, je te souhaite le meilleur pour la fin de thèse. Charlotte « Angie

Jacket », merci pour ta folie et ton énergie (même si ce n'est pas normal d'en avoir autant). Je n'oublierai pas tes plats du midi pour 4 personnes que tu n'as aucun mal à manger tant que tu as du ketchup dans tes poches ! Mylène, la reine des chaussettes à motifs, merci de m'avoir écouté quand j'avais un petit coup de mou. Je n'oublierai pas ton talent pour « emprunter » des boutures à Atlantis ou encore les magnifiques verres du Berthom ! Enfin, merci également à toi Mathilde, « le S », t'embêter aura été l'une de mes activités préférées. J'espère que la suite de ta thèse se passera bien et que tu auras l'occasion de mettre en tête la chanson du capybara à d'autres personnes ! Même si je suis à plusieurs centaines de kilomètres, n'oublie pas le plus important, on est ensssssssemble !

À Benjamin LE CROM, Monsieur le professeur de physique-chimie, merci pour toutes ces discussions diverses et variées. C'est rare de voir quelqu'un d'aussi passionné par ce qu'il fait, et je trouve que c'est une excellente chose que tu aies décidé de transmettre cette passion à d'autres personnes. Je suis heureux d'avoir pu t'aider comme je le pouvais à atteindre ton objectif, et j'espère que durant toutes ces années, j'aurai suffisamment fait avancer la science. On se retrouve dans 1 an à Saint-Nolff.

À Romain FOUINETEAU « Mainmain », le chasseur d'orage, merci pour ton aide précieuse tout au long de cette thèse. Malgré les mauvais (très mauvais) résultats du FC Nantes ces dernières années, je retiendrai surtout la saison 2022/2023 passée avec toi. Que ce soit de Paris, à Turin, en passant par Fribourg, je suis très heureux d'avoir pu vivre ces moments avec toi ! Même si je ne suis plus là, j'espère que tu retourneras au stade pour te changer les idées et pour voir la grâce de « Paluche ». Enfin, je n'ai aucun doute sur le fait que tu y arriveras très bien, mais je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse. Kenavo ar wech all.

À Cassandra METIVIER « la gnégné », ma plus belle rencontre au laboratoire et la personne la plus importante pendant ma thèse, sans qui je n'aurais pas tenu. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ta gentillesse, tes conseils, et les séances de psy gratuites. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as accordé et nos discussions, qui s'éternisaient souvent, même si ce n'était pas toujours ma faute ! Tu avais parfois la « flemme » de passer me voir, mais tu as toujours répondu présente quand ça n'allait pas, et je t'en remercie du fond du cœur. Tu es une amie en or ! Nos chemins se séparent puisque tu restes encore quelque temps dans l'équipe, mais j'espère que nous garderons contact et que nous aurons l'occasion de nous revoir. En attendant, plein de bonnes choses et amuse-toi bien aux États-Unis, je suis sûr qu'ils vont t'adorer eux aussi. À très vite.

À l'ensemble de l'équipe « oncologie nucléaire », merci pour votre aide tout au long de ce projet et pour les moments passés ensemble lors des repas de Noël ou des traditionnels barbecues.

À Gurvan et Mélissa qui, en France ou même à l'autre bout du monde, n'ont pas cessé de m'encourager. J'espère que vous prévoirez un passage en Belgique un de ces quatre.

À Tristan et Marion, merci pour votre soutien sans faille. Je vous remercie de m'avoir permis de décompresser tous les étés, que ce soit par des activités (ma cuisse se souvient encore du paintball), des sessions de jeux de société et plein d'autres choses qui m'ont fait oublier les problèmes. Marion, tu es une personne incroyable, j'espère que tu trouveras un domaine où tu pourras t'épanouir pleinement !

À ma famille, merci de m'avoir permis d'atteindre cet objectif. À ma sœur et à mon beau-frère, qui, malgré nos différents, m'ont toujours poussé à aller jusqu'au bout. À Romane, merci pour tout l'amour que tu m'as donné toutes ces années. J'espère que tu es fière de Tonton Ludo. Enfin, je tiens à remercier infiniment mes parents, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci d'avoir été présents pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. Cette dernière année n'a pas été facile, mais j'ai réussi à aller jusqu'au bout et cette thèse est pour vous.

Table des matières

Liste des abréviations	- 1 -
Préambule	- 7 -
Introduction bibliographique	- 9 -
I- Chimie clic et Chimie bio-orthogonale	- 10 -
I-1. Définitions	- 10 -
I-2. Historique : Premières réactions bio-orthogonales	- 12 -
I-2.1. Ligation chimique native	- 12 -
I-2.2. Ligation de Staudinger	- 13 -
I-2.3. Condensation entre les carbonyles et les amines.....	- 15 -
I-3. Les réactions de cycloaddition	- 16 -
I-3.1. Cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire	- 16 -
I-3.2. Cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire catalysée au cuivre (I).....	- 16 -
I-3.3. Autres réactions métallo-catalysées.....	- 19 -
I-3.4. Les réactions sous contraintes stériques	- 20 -
I-3.4.a) La cycloaddition azoture/alcyne (SPAAC)	- 20 -
I-3.4.b) Les réactions de Diels-Alder alcènes/alcynes avec les tétrazines (IEDDA).....	- 23 -
I-4. Autres réactions bio-orthogonales.....	- 26 -
I-4.1. Réactions photo-induites.....	- 26 -
I-4.2. Réactions de cycloaddition [4+1] entre une tétrazine et un isonitrile.....	- 27 -
I-4.3. Réactions de cycloaddition [2+2+2] entre un quadricyclane et un électrophile π	- 27 -
I-4.4. Réactions de couplage azoïque.....	- 28 -
I-4.5. Réactions d'élimination rétro-Cope.....	- 28 -
I-5. Bilan des principales réactions bio-orthogonales	- 29 -
II- Apport de la chimie bio-orthogonale pour la production de radiopharmaceutiques.....	- 32 -
II-1. La médecine nucléaire	- 32 -
II-2. Méthodes classiques de radiomarquage des protéines.....	- 35 -
II-3. Limites de ces méthodes.....	- 38 -
II-4. Radiomarquage de vecteurs à l'aide de la chimie bio-orthogonale.....	- 39 -
II-4.1. CuAAC.....	- 40 -
II-4.2. SPAAC	- 45 -
II-4.3. IEDDA.....	- 49 -
II-5. Préciblage	- 51 -
III- Les sydnones	- 60 -

III-1.	Définitions et historique.....	- 60 -
III-2.	Voies d'accès aux sydnones	- 61 -
III-3.	Réactivité des sydnones et applications	- 62 -
III-3.1.	Les cycloadditions thermiques	- 63 -
III-3.2.	Les cycloadditions catalysées par le cuivre (CuSAC).....	- 66 -
III-3.2.a)	Au sulfate de cuivre (II) pentahydraté	- 66 -
III-3.2.b)	A l'acétate de cuivre (II) et au triflate de cuivre (II)	- 69 -
III-3.2.c)	Etude la réactivité des halogénosydnones.....	- 70 -
III-3.3.	Les cycloadditions sous contrainte stérique (SPSAC)	- 72 -
III-3.3.a)	Facteurs impactant la réaction SPSAC	- 72 -
III-3.3.b)	Réactivité des halogénosydnones	- 75 -
III-3.3.c)	Utilisation pour le développement de sondes fluorescentes	- 76 -
III-3.3.d)	Utilisation pour le développement de sondes pour l'imagerie nucléaire	- 79 -
III-4.	Conclusion	- 82 -

Objectifs des travaux de thèse - 85 -

I-	Introduction du sujet de recherche	- 86 -
I-1.	Présentation des travaux antérieurs	- 86 -
I-2.	Le choix des sydnones	- 88 -
I-3.	Choix du groupement partant pour la radiohalogénéation : les acides boroniques	- 89 -
I-4.	Objectifs des travaux de thèse	- 91 -
I-4.1.	Evaluation des sydnones comme groupement prosthétique pour le radiomarquage à l'iode-125	- 91 -
I-4.2.	Optimisation du groupement prosthétique azoture radioiodé	- 93 -

Résultats et discussions - 95 -

I-	L'intérêt des sydnones pour le radiomarquage à l'iode-125	- 96 -
I-1.	Préparation des précurseurs	- 96 -
I-1.1.	Préparation de l'azoture bifonctionnel.....	- 96 -
I-1.2.	Préparation de la sydnone bifonctionnelle.....	- 96 -
I-1.2.a)	Introduction de la fonction acide boronique par attaque électrophile	- 96 -
I-1.2.b)	Introduction de la fonction acide boronique par couplage d'un dérivé arylboronique.....	- 101 -
I-1.3.	Génération des peptides modèles cliquables – références iodées	- 103 -
I-2.	Etude comparative du système SPSAC avec le système SPAAC	- 105 -
I-2.1.	Etude cinétique en non-radioactif	- 105 -
I-2.1.a)	Mise au point de la méthode analytique	- 105 -
I-2.1.b)	Etude cinétique de la cycloaddition entre les sydnones et le peptide-DBCO	- 107 -

I-2.1.c)	Etude cinétique des sydnones avec le peptide-BCN	- 110 -
I-2.1.d)	Comparaison avec le système SPAAC	- 111 -
I-2.2.	Etude cinétique à l'iode-125	- 112 -
I-2.2.a)	Mise au point du radiomarquage des précurseurs sydnones	- 112 -
I-2.2.b)	Etude cinétique des sydnones radiomarquées avec le peptide-DBCO	- 113 -
I-2.2.c)	Etude cinétique des sydnones radiomarquées avec le peptide-BCN.....	- 115 -
I-2.2.d)	Comparaison avec le système SPAAC	- 115 -
I-2.3.	Bilan	- 117 -
I-3.	Evaluation du système CuSAC	- 119 -
I-4.	Radiomarquage d'un vecteur immunologique d'intérêt.....	- 123 -
I-4.1.	Modification chimique par des groupements DBCO ou BCN.....	- 123 -
I-4.2.	Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 par les systèmes SPSAC.....	- 124 -
I-4.3.	Modification du nombre d'équivalents de motifs	- 125 -
I-4.4.	Détermination du nombre de motifs par anticorps par analyses de spectrométrie de masse.....	- 126 -
I-5.	Conclusion	- 128 -
II-	Conception d'un précurseur azoture pour le radiomarquage avec les halogènes	- 129 -
II-1.	Préparation du précurseur	- 130 -
II-2.	Radiomarquage du précurseur azoture à l'iode-125	- 130 -
II-3.	Application pour le radiomarquage d'un peptide analogue de la somatostatine	- 131 -
II-3.1.	Mise au point de la réaction de couplage	- 131 -
II-3.2.	Etude cellulaire des peptides radiomarqués	- 132 -
II-3.3.	Allongement de la chaîne PEG.....	- 133 -
II-4.	Etude de l'impact des modifications structurales sur la réactivité de l'azoture	- 135 -
II-5.	Application au radiomarquage au fluor-18	- 138 -
II-6.	Conclusion	- 143 -
	Conclusion générale.....	- 145 -
	Experimental part.....	- 153 -
I-	General informations.....	- 154 -
II-	Synthesis of compounds	- 155 -
II-1.	Synthesis of sydnones building blocks	- 155 -
II-1.1.	Precursors.....	- 155 -
II-1.2.	Iodinated references	- 158 -
II-2.	Synthesis of azides building blocks.....	- 160 -
II-2.1.	Precursors.....	- 160 -
II-2.2.	Iodinated references	- 162 -

II-2.3.	Fluorinated references	- 164 -
II-3.	Synthesis of peptides building blocks.....	- 165 -
II-3.1.	Synthesis of iodinated reference peptides	- 166 -
III-	Kinetic studies with ¹²⁷I-compounds (non-radioactive)	- 171 -
III-1.	Stability of compounds.....	- 171 -
III-2.	Kinetics of the click reaction with model peptides	- 171 -
III-3.	Kinetics of the click reaction between sydnones and BCN-OH	- 173 -
IV-	Radiochemistry.....	- 175 -
IV-1.	General informations	- 175 -
IV-2.	General procedures for ¹²⁵ I-radiolabelling	- 175 -
IV-2.1.	Preparation of the ¹²⁵ I-azides:	- 175 -
IV-2.2.	Preparation of the ¹²⁵ I-sydnones:	- 176 -
IV-3.	Kinetics of the click reaction with model peptides	- 177 -
IV-4.	General procedures for ¹⁸ F-radiolabelling.....	- 178 -
IV-5.	Determination of partition coefficient	- 179 -
IV-6.	Protein radiolabelling	- 180 -
IV-6.1.	9E7.4-IgG modification	- 180 -
IV-6.2.	Average number of reactive groups per antibody	- 180 -
IV-6.3.	¹²⁵ I-iodination of modified antibody.....	- 180 -
IV-6.4.	Immunoreactivity assays	- 181 -
	Références bibliographiques	- 183 -

Liste des abréviations

AcOH : Acide acétique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BARAC : Biarylazacyclooctynone

BCN : Bicyclo[6.1.0]nonyne

BPDS : Bathophénanthroline disulfonate

Bq : Becquerel

BSA : Bovin Serum Albumine

BTAA : 2-(4-((Bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid

BTES : 3-(4-((Bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propane-1-sulfonic acid

CCO : *Cis*-cyclooctène

CuAAC : Copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition (en français : Cycloaddition alcyne-azoture cupro-catalysée)

CuSAC : Copper-catalysed sydnone-alkyne cycloaddition (en français : Cycloaddition alcyne-sydnone cupro-catalysée)

DCB : 1,4-Dichlorobenzène

DFO : Desferrioxamine

DFT : Density functional theory

DIBAC/DBCO : Dibenzoazacyclooctyne

DIBO : 4-Dibenzocyclooctynol

DIFO : Difluorocyclooctyne

DIMAC : Diméthoxyazacyclooctyne

DMA : *N,N*-Diméthylacétamide

DMF : *N,N*-Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique

Eq : Equivalent

EtOH : Ethanol

FDA : Food and Drug Administration

[¹⁸F]FDG : [¹⁸F]Fluorodésoxyglucose

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HOMO : Highest occupied molecular orbital (en français : Orbite moléculaire occupée la plus haute)

HPLC : High pressure liquid chromatography (en français : Chromatographie liquide haute performance)

HRMS : High-resolution mass spectrometry (en français : Spectrométrie de masse à haute résolution)

Hz : Hertz

IEDDA : Inverse electron demand Diels-Alder (en français : Diels-Alder à demande inverse d'électron)

IgG : Immunoglobuline G

ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel

k : Constante de vitesse

keV : Kiloélectronvolt

LUMO : Lowest unoccupied molecular orbital (en français : Orbitale moléculaire non occupée la plus basse)

m : Mètre (ou Milli)

μ : Micro

M : Molaire

MeCN : Acétonitrile

MeOH : Méthanol

MeV : Mégaélectronvolt

N₃ : Azoture

n : nombre d'expériences

NEDDA : Normal electron demand Diels-Alder (en français : Diels-Alder à demande normale d'électron)

NHS : *N*-Hydroxysuccinimide

NMM : *N*-Méthylmorpholine

NOTA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique

OCT : Cyclooctyne

PBS : Phosphate-buffered saline

PEG : Polyéthylène glycol

pH : Potentiel hydrogène

ppm : Partie par million

PRC : Pureté radiochimique

PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen (en français : Antigène membranaire spécifique de la prostate)

rDa : rétro Diels-Alder

R_f : Rapport frontal

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RRC : Rendement radiochimique

RuAAC : Ruthenium-catalyzed azide alkyne cycloaddition (en français : Cycloaddition catalysée au ruthénium entre un alcyne et un azoture)

s : Seconde

[²¹¹At]SAB : *N*-succinimidyl-3-astatobenzoate

SI : Standard interne

SIB : *N*-succinimidyl-3-iodobenzoate

SPAAC : Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (en français : Cycloaddition assistée par contrainte stérique entre un azoture et un alcyne tendu)

SPADC : Strain-promoted alkyne-diazoacetate cycloaddition (en français : Cycloaddition sous contrainte stérique entre un diazoalcane et un alcyne)

SPANC : Strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition (en français : Cycloaddition sous contrainte stérique entre une nitronne et un alcyne)

SPANOC : Strain-promoted alkyne-nitrone oxide cycloaddition (en français : Cycloaddition sous contrainte stérique entre un oxyde de nitrile et un alcyne)

TEMP : Single Photon Emission Computed Tomography

SPSAC : Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition (en français : Cycloaddition assistée par contrainte stérique entre une sydnone et un alcyne tendu)

TA : Température ambiante

t_{1/2} : Temps de demi-vie

TBTA : Tris((1-benzyl-4-triazolyl)méthyl)amine

tBuOH : *Tert*-Butanol

TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine

TCH : *Trans*-1-sila-4-cycloheptène

TCMC : 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic amide

TCO : *Trans*-cyclooctène

TEL : Transfert d'énergie linéique

TEMP : Tomographie par émission monophotonique

TEP : Tomographie par émission de positons

THF : Tétrahydrofurane

THPTA : Tris-hydroxypropyltriazolylméthylamine

TMTH : Thiacycloheptyne

TMTHSI : Thiacycloheptyne-sulfoximine

Tz : Tétrazine

UV : Ultraviolet

VHH : Variable heavy domain

Préambule

La médecine nucléaire est une spécialité médicale dont les applications sont à visées diagnostique ou thérapeutique et qui repose sur l'utilisation d'un radiopharmaceutique. La conception de ce type de médicaments radioactifs est basée sur l'association d'un radionucléide à un vecteur biologique. Ce travail consiste à employer des techniques de bioconjugaison traditionnelles, qui reposent majoritairement sur les groupes fonctionnels naturellement présents dans les vecteurs et issus des chaînes latérales des acides aminés. Toutefois, bien que largement utilisées, ces méthodes ont montré certaines limites et de par ses propriétés, la chimie clic apparaît comme un outil prometteur pour y répondre.

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont démontré que l'utilisation de cette chimie pouvait améliorer le développement de radiotraceurs. Dans la continuité de ce travail, l'étude présentée dans ce manuscrit a pour but d'approfondir l'étude de ces systèmes cliquables pour le marquage de vecteur d'intérêt avec des radiohalogènes lourds.

Pour commencer, une introduction bibliographique autour de la chimie clic et de la chimie bio-orthogonale sera présentée en donnant les grandes classes de réactions associées à ces concepts. Ensuite, afin de mettre en avant l'apport de cette chimie pour la production des radiopharmaceutiques, son utilisation pour le radiomarquage de vecteurs d'intérêt sera décrite. Enfin, une dernière section s'intéressera aux composés au cœur de ce sujet, à savoir les sydnones, en mettant en avant les applications de ces dernières années.

La seconde partie traite, quant à elle, du travail expérimental réalisé lors de ce projet et se divise en deux axes de travail. Le premier, qui concerne l'essentiel du projet, sera axé sur l'utilisation de nouveaux systèmes bio-orthogonaux basés sur les sydnones et leur intégration dans une étude comparative avec d'autres systèmes cliquables. Ceci afin d'identifier le ou les meilleurs pour une transposition au radiomarquage de molécules d'intérêt. Puis, un deuxième axe s'est concentré sur l'optimisation d'un de ces systèmes cliquables pour une application avec un autre type de vecteur ou de radionucléide, permettant ainsi d'élargir l'éventail d'application de la chimie clic à des fins théranostiques.

Introduction bibliographique

I- Chimie clic et Chimie bio-orthogonale

En seulement deux décennies, la chimie clic a su répondre à certaines limites liées à la synthèse de molécules d'intérêt, comme réduire le nombre d'étapes de synthèse, éviter la formation de sous-produits ou encore diminuer les coûts de préparation de ces molécules. La transposition de ce concept en milieu biologique, avec l'introduction de la chimie bio-orthogonale, a permis de propulser ces réactions dans une nouvelle dimension. La simplicité et l'efficacité de ces méthodes ont eu un tel impact dans le monde de la chimie que cela a valu à K. Barry Sharpless, Morten P. Meldal et Carolyn R. Bertozzi, de recevoir le prix Nobel de chimie en 2022.

I-1. Définitions

Inspiré de réactions présentes dans la nature, le concept de chimie clic est introduit pour la première fois en 2001 par K. B. Sharpless, H. C. Kolb et M. G. Finn.¹ Ce terme est utilisé pour décrire un ensemble de processus chimiques permettant d'associer rapidement et sélectivement deux molécules entre elles par la formation de liaisons hétéroatomiques (Figure 1). La chimie clic facilite l'accès à une plus large gamme de composés que la chimie conventionnelle, et grâce à ce concept, de nouvelles réactions chimiques ont émergé. De nombreux composés ont pu ainsi être développés dans des domaines très variés, comme la chimie thérapeutique avec des molécules d'intérêt à visée pharmaceutique ou encore en chimie des matériaux ou des polymères.^{2,3}

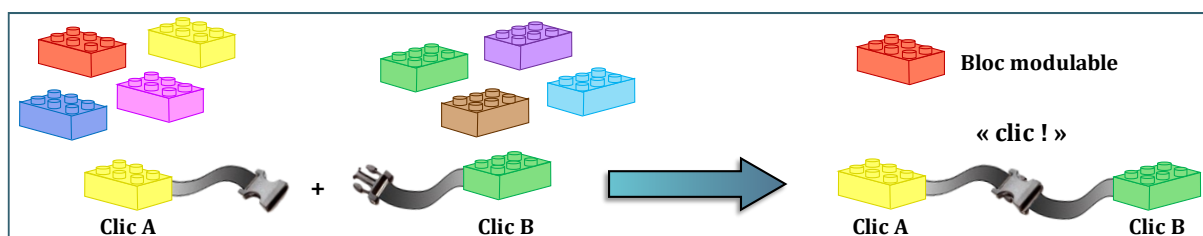


Figure 1. Représentation simplifiée du concept de la chimie clic permettant la conception de nouvelles molécules à partir de blocs modulables complémentaires.

Selon les critères définis par K. B. Sharpless et ses collaborateurs, les réactions de chimie clic doivent :

- être modulables et s'appliquer à une large gamme de molécules,
- avoir une cinétique de réaction rapide,
- avoir un rendement chimique élevé,
- ne générer que des sous-produits inoffensifs ne nécessitant pas de purification lourde comme une chromatographie,
- être stéréospécifiques, sans nécessairement être énantiosélectives.

Les réactifs doivent être peu onéreux, les conditions de réactions doivent être simples (idéalement insensibles à la présence d'eau et d'oxygène) comme l'utilisation de solvants autres

que l'eau pouvant facilement être évaporés. Enfin, les réactions de chimie clic doivent être thermodynamiquement favorables et conduire à la formation d'un produit facilement isolable. Peu de réactions répondent à l'ensemble de ces critères, mais parmi elles, on trouve les réactions de cycloadditions d'espèces insaturées (1,3-dipolaire, Diels-Alder), certaines substitutions nucléophiles (en particulier les ouvertures d'hétérocycles contraints) ou encore les additions de liaisons multiples carbone-carbone (époxydation, addition de Michael).¹

Basées sur le concept de chimie clic, de nouvelles réactions dites « bio-orthogonales » ont été développées afin de permettre l'étude de processus biologiques sans en perturber le fonctionnement. Introduite pour la première fois en 2003 par C. R. Bertozzi,⁴ cette approche regroupe un ensemble de réactions chimiques qui se divise en deux étapes successives : (i) incorporation d'une fonction bio-orthogonale sur la biomolécule ; (ii) couplage avec une molécule sonde modifiée par une fonction bio-orthogonale complémentaire. Très proche de la chimie clic, ces réactions doivent pouvoir se faire en conditions physiologiques (milieu aqueux, pH proche de 7 et une température autour de 37 °C), être non toxiques, former des produits stables et avoir des cinétiques de réactions rapides même à faible concentration. De plus, ces réactions doivent être chimiosélectives afin de limiter les interactions parasites avec les groupes endogènes. Ce dernier point est d'autant plus important car sans cette sélectivité la molécule sonde pourrait être détériorée, empêchant toute application ou interférant avec d'autres processus biologiques.⁵

Même si la taille des substrats de départ est un élément à prendre en compte, notamment lors d'applications avec des biomolécules, le paramètre le plus important reste la vitesse de réaction. Idéalement, une réaction bio-orthogonale doit avoir une cinétique supérieure à $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour réagir sur une échelle de temps allant de quelques secondes à quelques minutes, et pouvoir fonctionner à des concentrations de l'ordre du μM ou nM . Les réactions respectant ces caractéristiques peuvent rivaliser avec les processus cellulaires, notamment les réactions enzymatiques dont les constantes de vitesse sont estimées entre 10^3 et $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.⁶

Les réactions bio-orthogonales étant des réactions bimoléculaires, la cinétique de réaction est donc proportionnelle au produit de la concentration des deux réactifs, ce qui en fait des réactions du second ordre. Afin de mieux comprendre ce que cela représente et surtout de pouvoir comparer tous les systèmes bio-orthogonaux entre eux, une simulation de réactions d'ordre 2 a été réalisée (Figure 2). Les valeurs de cinétiques des différents systèmes sont rapportées de la littérature en supposant une concentration en réactifs de $100 \mu\text{M}$. Cette projection permet de mettre en évidence qu'au bout d'une heure, durée maximum pour réaliser une réaction en milieu biologique, seules les réactions ayant une cinétique supérieure à $10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ atteignent 80 % de conversion.⁷

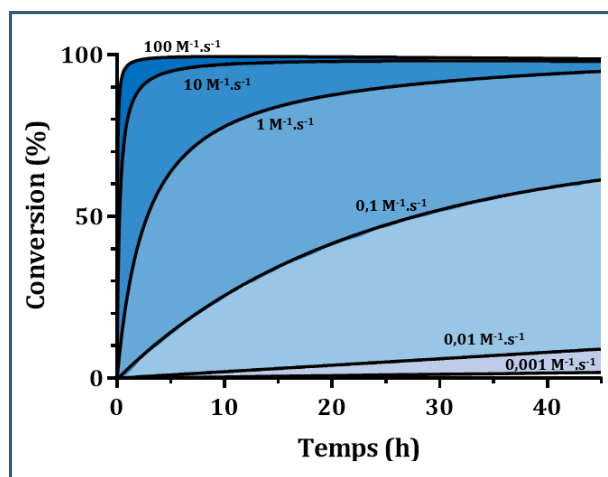


Figure 2. Simulation d'une réaction d'ordre 2 entre deux réactifs à une concentration de 100 μM .

De nombreuses réactions bio-orthogonales ont été décrites depuis l'introduction du concept par C. R. Bertozzi, nous nous limiterons dans cette introduction aux trois grandes catégories : les ligations chimiques, les réactions catalysées par des métaux de transition et les réactions de cycloaddition. La plupart des réactions qui seront discutées dans cette introduction seront bio-orthogonales, mais d'autres types de réactions non bio-orthogonales jugées pertinentes seront également présentées.

I-2. Historique : Premières réactions bio-orthogonales

I-2.1. Ligation chimique native

Le développement de la réaction de ligation chimique native par Kent et *al.*⁸ en 1994 a été une avancée remarquable pour la formation de protéines synthétiques ou semi-synthétiques. Ces réactions, inspirées des travaux de H. Lau,⁹ consistent à lier deux chaînes peptidiques entre elles en faisant réagir un thioester en position C-terminale avec une cystéine en position N-terminale (Schéma 1).

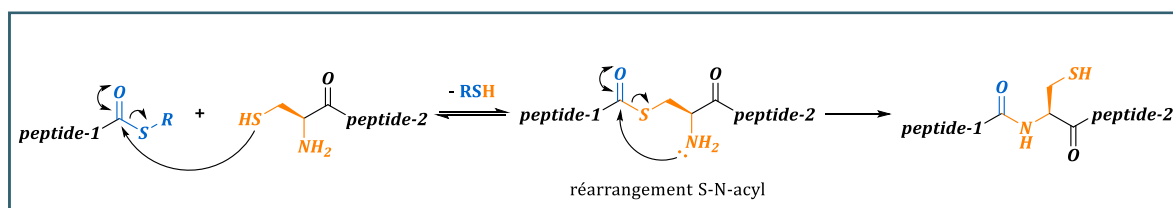


Schéma 1. Représentation générale de la ligation chimique native entre un thioester et un thiol.

En effet, après une première étape de *trans*-thioestérification réversible *via* une attaque nucléophile du thiol de la cystéine sur le thioester en position C-terminale, un réarrangement spontané par transfert électronique intramoléculaire S-N-acyl permet la formation d'une liaison amide entre les deux entités. Cette ligation, hautement chimiosélective, se fait majoritairement en conditions douces et aqueuses. Une très bonne sélectivité et des rendements supérieurs à 90 % peuvent être atteints.¹⁰ Cette réaction a également permis la synthèse de peptides hydrophobes

lorsque des solvants organiques aprotiques et polaires, tel que le *N,N*-diméthylformamide (DMF), sont utilisés.^{11,12}

La cinétique de cette réaction est régie par la vitesse de l'étape 1 et dépend de trois facteurs : (i) l'état d'ionisation du thiol en position N-terminale ; (ii) la nature de l'acide aminé qui porte le thioester ; (iii) le type de thioester (aryle ou alkyle).¹³ L'ajout d'un catalyseur nucléophile dérivé de l'azote (imidazole) ou du soufre (thiol) comme l'acide 4-mercaptophénylacétique permet d'accélérer la réaction, de minimiser l'agrégation des protéines ou encore d'éviter les réactions secondaires potentielles.¹⁴

Outre son utilisation pour la synthèse de peptides, la ligation chimique native est maintenant utilisée dans de nombreux domaines tels que la synthèse de polymères,¹² d'enzymes¹⁵ ou encore dans le développement de médicaments.¹⁶

Du fait de la faible abondance des résidus cystéines dans les séquences de protéines ou de la difficulté à générer les fragments thioesters, des alternatives pour répondre à ces limites ont été développées. Parmi ces méthodes, on retrouve notamment la réaction de condensation décarboxylante entre les *N*-hydroxylamines et les α -cétoacides ou encore plus récemment la ligation KAT (utilisation de l'acyltrifluoroborate de potassium), toutes les deux décrites par J. W. Bode. Ces réactions chimiosélectives permettent la formation de liaisons amide pour une large gamme de substrats dont des peptides entièrement déprotégés sans fonctions thiols ou thioesters.^{17,18}

I-2.2. Ligation de Staudinger

La ligation de Staudinger, également appelée Staudinger-Bertozzi, reste aujourd'hui l'une des réactions de chimie bio-orthogonale les plus reconnues. Cette réaction, décrite par C. R. Bertozzi en 2000,¹⁹ est inspirée de la réaction de Staudinger découverte en 1919.²⁰ Dans la réaction initiale, une triarylyphosphine réagit avec un groupement azoture pour former un intermédiaire iminophosphorane qui, après hydrolyse, donne un oxyde de phosphine ainsi qu'une amine primaire (Schéma 2 A). Cette réaction sélective, permet de convertir des azotures en amine primaire, mais se limite à la réaction entre deux groupements fonctionnels (azoture et phosphine) et à la formation de deux composés distincts. L'équipe de C. R. Bertozzi a décliné la réaction en incorporant un ester méthylique sur la diphenylphosphine, développant ainsi la ligation de Staudinger. L'introduction d'une fonction ester méthylique en position *ortho* du phosphore sur un noyau aromatique permet de générer un intermédiaire iminophosphorane dont l'hydrolyse conduit à la formation d'une liaison amide (Schéma 2 B).²¹

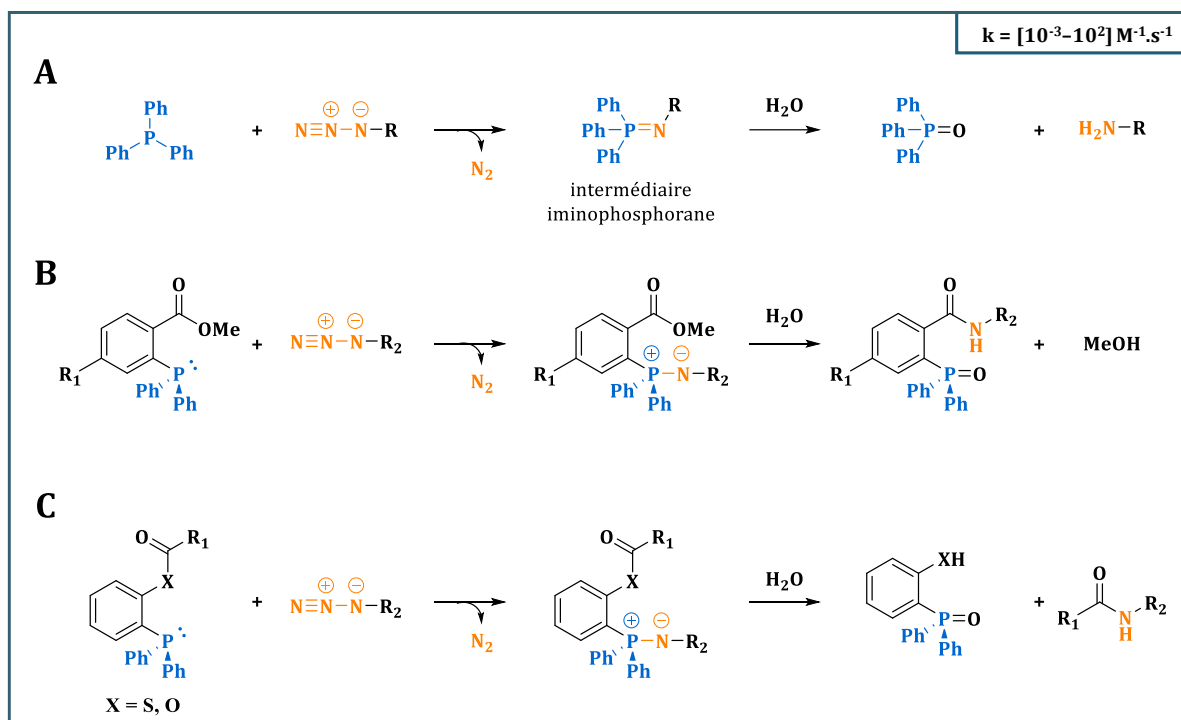


Schéma 2. (A) Réaction de Staudinger développée en 1919 ; (B) Ligation de Staudinger-Bertozzi ; (C) Ligation « Traceless Staudinger-Bertozzi ».

Par la suite, une nouvelle version de cette réaction, la ligation « Traceless Staudinger-Bertozzi », a été développée simultanément par C. R. Bertozzi et R. T. Raines.^{22,23} Contrairement à la méthode « non-traceless », les espèces électrophiles sont clivables et vont permettre le relargage du motif aryle phosphine oxydé sur le substrat final (Schéma 2 C). La polyvalence, la chimiosélectivité et les conditions douces requises font de cette méthode un moyen efficace de former un lien covalent entre deux entités, ce qui en fait une réaction parfaite pour des applications en bioconjugaison.²⁴ Au début des années 2000, le groupe de C. R. Bertozzi a d'ailleurs démontré qu'il était possible d'utiliser cette ligation pour marquer sélectivement une biotine sur des glycoprotéines à la surface des cellules *in vitro*¹⁹ et quelques années plus tard *in vivo*.²⁵

La ligation de Staudinger reste aujourd'hui une méthode très utilisée dans de nombreux domaines comme la synthèse de protéine,²⁶ de biopolymères²⁷ ou encore pour le radiomarquage.²⁸ Cependant, sa faible cinétique de couplage ($k \approx 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) fait d'elle l'une des réactions bio-orthogonales les plus lentes, ce qui limite son transfert vers des applications *in vivo*. Des efforts visant à augmenter la vitesse de réaction ont été effectués, c'est notamment le cas des travaux de E. Goun, en 2019, qui décrit une réaction de ligation entre des azotures d'aryles déficients en électron et une luciférine phosphine (Schéma 3). Cette approche permet la synthèse d'une sonde d'imagerie bioluminescente avec des cinétiques plus rapides que celles décrites auparavant ($k = 1,39 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).²⁹

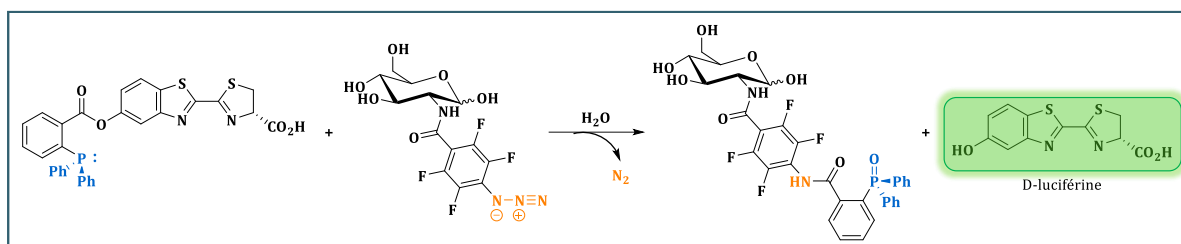


Schéma 3. Synthèse de la D-luciférine basée sur la ligation de Staudinger entre une luciférine phosphine et un azoture portant du glucose.

I-2.3. Condensation entre les carbonyles et les amines

La formation d'oximes et d'hydrazones découle de la condensation de carbonyles (aldéhydes et cétones) avec respectivement des alcoxyamines ou des hydrazines (Schéma 4). Ces réactions sont les premières à avoir été décrites et à remplir plusieurs critères de bio-orthogonalité, faisant d'elles des techniques de bioconjugaison populaires.³⁰ Ces réactions reposent sur l'utilisation d'amines possédant un hétéroatome donneur en α de l'azote sp^2 . La délocalisation électronique induite par les doublets libres de l'hétéroatome rend le carbone sp^2 moins électrophile. De plus, l'effet inductif attracteur de ce même hétéroatome réduit la basicité de l'atome d'azote, rendant les oximes moins sensibles à l'hydrolyse que les imines correspondantes. En effet, à $pH = 7$, l'hydrolyse de l'oxime est 600 fois plus lente que celle de l'hydrazone.³¹

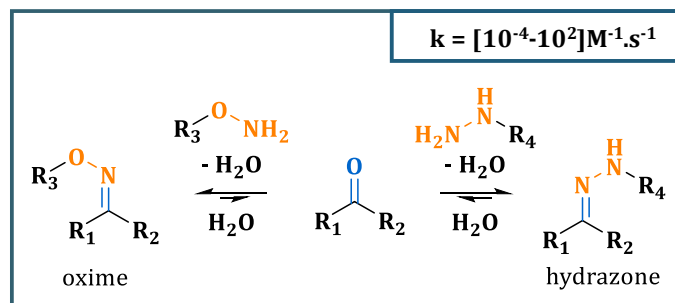


Schéma 4. Formation des liaisons oxime et hydrazone à partir de la condensation d'un carbonyle avec une amine.

Les cinétiques de ces réactions sont relativement lentes à pH neutre (environ $0,01 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)³² mais peuvent être améliorées en se plaçant à un pH légèrement acide (pH 5-6) et une concentration supérieure au mM . Il a également été montré que la présence d'un co-solvant ou d'un catalyseur nucléophile tel que l'aniline³³ ou plus récemment l'arginine permettait d'améliorer les cinétiques et d'empêcher l'agrégation des protéines.³⁰

Du fait de leur facilité de mise en œuvre, de leur forte chimiosélectivité dans l'eau et de leur petite taille n'entraînant pas de perturbations majeures sur les biomolécules, les oximes et les hydrazones sont utilisées pour diverses applications en bioconjugaison comme la modification de peptides,³⁴ de protéines³⁵ ou la préparation d'hydrogels.³⁶ Pour pallier ces problèmes

d'hydrolyse, l'équipe de C. R. Bertozzi a décrit la ligation de Pictet-Spengler, utilisée avec succès pour le marquage d'une variété de protéines, y compris une Immunoglobuline G (IgG) humaine.³⁷

I-3. Les réactions de cycloaddition

I-3.1. Cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire

Bien que la réactivité des azotures envers les fonctions alcynes soit connue depuis la fin du XIX^{ème} siècle,³⁸ il faut attendre 1963 pour que le concept de cycloaddition 1,3-dipolaire, ou réaction de Huisgen, apparaisse. Cette réaction entre un dipôlarophile (alcyne) et un dipôle 1,3 (azoture) permet l'obtention de 1,2,3-triazoles 1,4 et 1,5-disubstitués (Schéma 5).³⁹

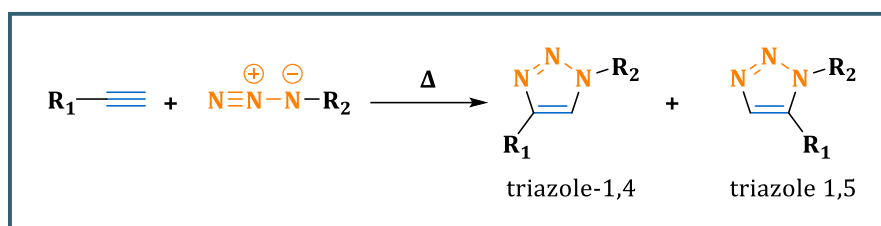


Schéma 5. Réaction de Huisgen entre un alcyne terminal et un azoture.

Même si cette réaction a su trouver sa place en synthèse organique, celle-ci n'a été que très peu utilisée pour des applications biologiques en raison de sa cinétique lente, de son manque de régiospécificité et des températures élevées nécessaires qui sont inadaptées à la plupart des systèmes biologiques.⁵

I-3.2. Cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire catalysée au cuivre (I)

En 2002, K. B. Sharpless⁴⁰ et M. Meldal⁴¹ décrivent chacun la possibilité d'améliorer considérablement la cinétique de réaction (jusqu'à 100 millions de fois) grâce à l'introduction d'un catalyseur au cuivre (I). Cette nouvelle réaction, communément connue sous l'acronyme CuAAC (Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition), permet d'obtenir exclusivement le triazole 1,4-disubstitué avec d'excellents rendements (>95 %) à température ambiante (Schéma 6). En plus d'être sélective et de générer peu de sous-produits, la CuAAC est également une méthode robuste sur une large gamme de pH (4 à 12) et peut se faire en solvant organique ou aqueux.⁴²

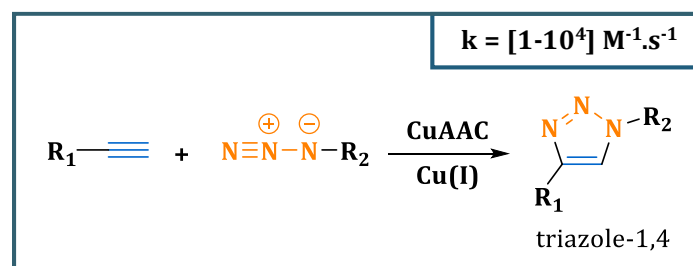


Schéma 6. Réaction de cycloaddition catalysée au cuivre entre un alcyne terminal et un azoture.

Sharpless et *al.* pensaient que cette réaction impliquait un intermédiaire Cu-acétylure mononucléaire.⁴³ Mais quelques années plus tard, des études cinétiques ont démontré que dans les conditions de catalyse au Cu(I) et avec des alcyne et des azotures saturés, la réaction était d'ordre 2 par rapport au cuivre, démontrant que deux centres métalliques étaient responsables de l'activation de l'alcyne et de l'azoture.⁴⁴ En 2013, V. V. Fokin confirme cette hypothèse en présentant un mécanisme en six étapes mettant en évidence l'intervention d'un intermédiaire de cuivre bi-nucléaire (Schéma 7).⁴⁵

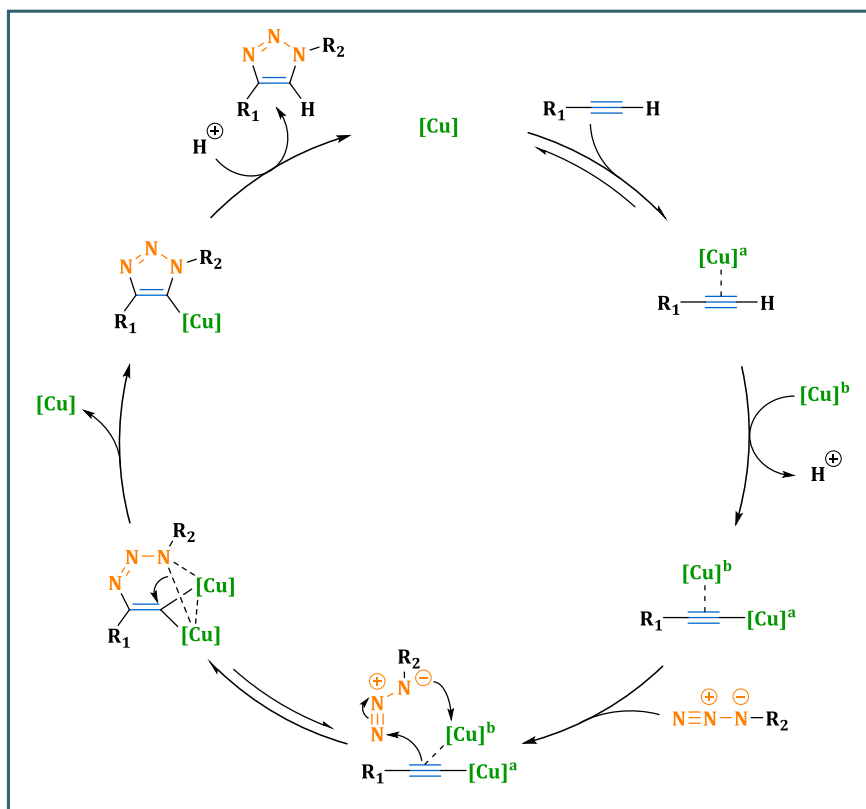


Schéma 7. Mécanisme de la CuAAC décrit par V. V. Fokin.⁴⁵

Cette réaction se fait en présence d'un catalyseur au cuivre à l'état d'oxydation +I. De nombreuses méthodes ont été développées pour générer l'ion cuivreux Cu(I), comme l'utilisation directe de sel de cuivre (I) avec l'iodure et le bromure de cuivre ou l'utilisation de cuivre(0) en utilisant des nanoparticules.⁴⁶ Toutefois, la méthode la plus utilisée reste la réduction *in situ* de sels de cuivre (II) tel que le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄·5H₂O) ou l'acétate de cuivre (Cu(OAc)₂) avec un réducteur, souvent de l'ascorbate de sodium (Na Asc), dans un mélange H₂O/tBuOH ou H₂O/EtOH.⁴⁷

Bien que cette réaction soit très utilisée, la présence de cuivre dans le milieu génère la formation d'espèces réactives de l'oxygène pouvant induire une toxicité cellulaire par stress oxydant, ce qui limite son utilisation dans des systèmes biologiques.^{5,48} Pour contourner ces problèmes de toxicité, des ligands capables de complexer le cuivre et d'être solubles en milieu

aqueux ont été développés (Figure 3). Un certain nombre de ligands mono/polydentés à base d'azote, de phosphore et de soufre ont été étudiés. Outre leur utilité pour accélérer la réaction (70% de conversion après 60 minutes de réaction avec la présence d'un ligand, contre moins de 5% sans), ces ligands permettent de stabiliser l'état d'oxydation du Cu(I) et de réduire la toxicité des ions cuivriques en minimisant ses réactions d'oxydo-réduction avec l'oxygène.^{5,42,49} Parmi les ligands les plus utilisés on retrouve les polytriazoles, des agents chélatants polydentates N-donneur. Le tris((1-benzyl-4-triazolyl)méthyl)amine (TBTA) est le premier à avoir montré son pouvoir stabilisateur des ions Cu(I) sous conditions aérobies, mais sa solubilité dans l'eau n'était pas suffisante.

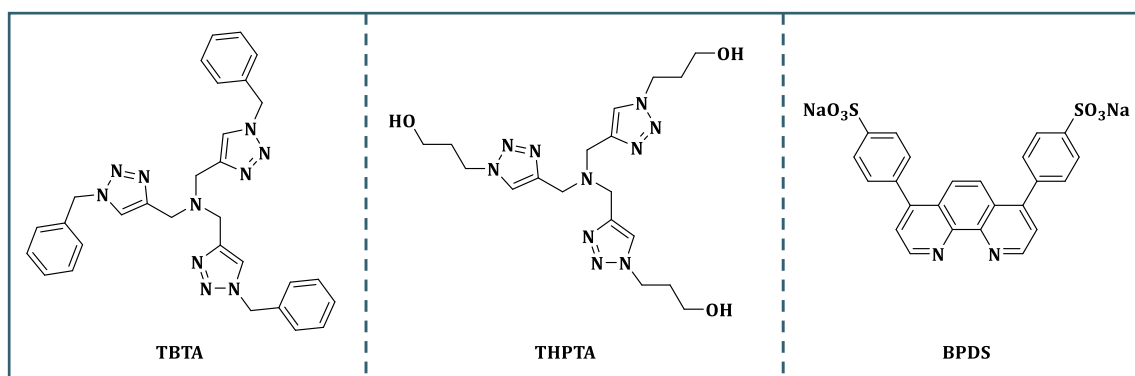


Figure 3. Exemples de ligands utilisés pour la CuAAC.

Pour pallier ce problème, une nouvelle génération de ligands portant des groupements hydrophiles non coordinants a été développée parmi lesquels on retrouve le tris-hydroxypropyltriazolylmethylamine (THPTA), le ligand le plus utilisé, l'acide 3-(4-((Bis((1-(*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)méthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propane-1-sulfonique (BTTES) ou encore l'acide 2-(4-((Bis((1-(*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)méthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acétique (BTAA). Des composés commerciaux à base de phénantroline, comme la bathophénanthroline disulfonate (BPDS), peuvent aussi être utilisés comme alternative, cependant, le système catalytique BPDS/Cu(I) nécessite un excès d'ascorbate de sodium comme réducteur.⁴⁷ Une étude rapportée en 2010 par Wu et *al.* a montré qu'en plus d'améliorer la réactivité, le système BTTES-Cu n'avait aucun effet de toxicité cellulaire, et qu'il pouvait être d'intérêt pour l'imagerie de l'embryogénèse chez le poisson zèbre.⁵⁰

La modularité des fonctions azoture et alcyne terminal leur permet d'être facilement incorporée sur des biomolécules, et leurs cinétiques de réaction rapides ($k = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) font qu'aujourd'hui cette réaction est couramment utilisée pour de nombreuses applications en bioconjugaison. La présence de cuivre permet de catalyser la réaction de cycloaddition, mais peut également engendrer une certaine toxicité cellulaire. En plus d'améliorer la réactivité, il a été montré que l'utilisation d'un ligand pouvait limiter cet effet cytotoxique. Bien qu'anecdotique, il est intéressant de mentionner que d'autres méthodes comme les réactions topochimiques⁵¹ ou

certaines réactions assistées par micro-ondes ont permis l'obtention de triazoles sans catalyseur ni ligand.⁵²

Même si les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant du cuivre, de nombreux autres métaux tels que l'argent, l'iridium, le nickel ou encore le ruthénium ont été testés. Grâce à sa polyvalence, le ruthénium s'est rapidement imposé comme un catalyseur de choix dans diverses réactions chimiques. Utilisé en chimie bio-orthogonale, notamment dans la métathèse croisée d'oléfines avec le catalyseur de Grubbs,⁵³ le potentiel de ce métal à catalyser des réactions entre un alcyne et un azoture a été étudié. En se basant sur des travaux montrant l'implication des complexes de ruthénium en tant que catalyseur dans des réactions avec les alcynes, V. V. Fokin décrit en 2005 une méthode permettant d'obtenir sélectivement le triazole 1,5-disubstitué en faisant intervenir des complexes de Ru(II) comme catalyseur (Schéma 8).⁵⁴

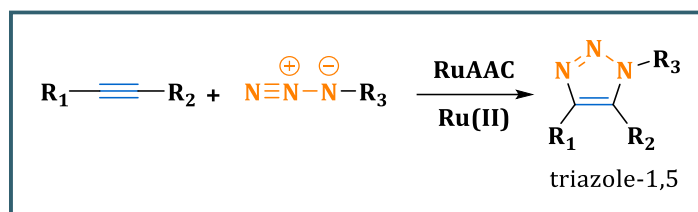


Schéma 8. Réaction de cycloaddition catalysée au ruthénium entre un alcyne et un azoture.

Contrairement à la CuAAC, les réactions catalysées au Ru(II) ne se limitent pas qu'aux alcynes terminaux et permettent la synthèse de triazole 1,4,5-trisubstitués. Cependant, l'utilisation de cette méthode n'est pas encore décrite en biologie à cause des solvants organiques qu'elle nécessite, et peu de groupes s'intéressent à son développement par rapport à sa version utilisant le cuivre.

I-3.3. Autres réactions métallo-catalysées

Même si elles ne sont pas classées dans la catégorie des réactions de cycloaddition, d'autres réactions métallo-catalysées ont été décrites ces dernières années. Le palladium est l'un des métaux de transitions les plus utilisés dans les réactions de couplage croisé, en particulier pour sa facilité d'échange d'états d'oxydo-réduction Pd(II)/Pd(0), qui est une condition primordiale pour compléter le cycle catalytique. A cause des mécanismes réactionnels complexes de ces couplages et de la quantité stœchiométrique de catalyseur, l'obtention de valeur pour les cinétiques de réaction est compliquée. Cependant, dans les cas où un catalyseur de palladium stable a été utilisé, des valeurs ont pu être calculées avec $1,1 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le couplage de Suzuki-Miyaura⁵⁵ et jusqu'à $1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le couplage de Sonogashira n'utilisant pas de cuivre.⁵⁶ Même si ces réactions de couplages sont retrouvées dans de nombreuses applications, le palladium reste malgré tout un métal abiotique. Il est donc nécessaire pour des applications

cellulaires, de surveiller la toxicité et la perméabilité cellulaire des complexes. Enfin, l'efficacité de la réaction peut être diminuée en cas de captation du catalyseur par les biomolécules.⁵⁷

I-3.4. Les réactions sous contraintes stériques

Face à certaines limites mises en évidence pour les réactions catalysées au cuivre, de nouvelles méthodes avec une meilleure biocompatibilité ont été proposées. L'utilisation de cycles sous contraintes stériques, c'est-à-dire ayant une forte tension de cycle, s'est montrée comme une méthode alternative intéressante en raison de sa meilleure réactivité.

I-3.4.a) La cycloaddition azoture/alcyne (SPAAC)

En 1961, G. Wittig et A. Krebs décrivent la première réaction entre un azoture et un cyclooctyne, le plus petit alcyne cyclique stable (Schéma 9). Contrairement aux alcynes classiques ayant un angle de 180°, l'angle de la liaison acétylène du cyclooctyne est de 163°, ce qui lui permet d'être réactif à température ambiante et sans catalyseur.⁵⁸ S'inspirant de ces résultats, l'équipe de C. R. Bertozzi popularise cette réaction en 2004 avec le premier exemple d'application en bioconjugaison. Dans cette étude, un cyclooctyne (OCT) biotinylé est utilisé pour visualiser des cellules possédant des sucres-azotures à leur surface. Malgré le manque de solubilité du cyclooctyne dans l'eau ($\log S = -5,49$),⁵⁹ la principale limite de cette réaction est sa vitesse, similaire à celle obtenue pour la ligation de Staudinger ($k = 1,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ vs $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).⁶⁰

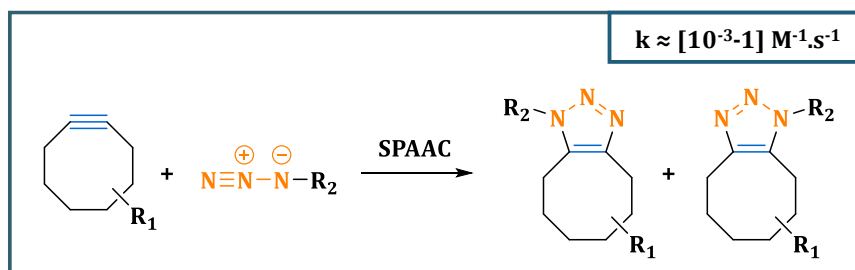


Schéma 9. Réaction de cycloaddition sous contrainte stérique entre un alcyne et un azoture.

En raison de son potentiel en bioconjugaison, de nombreuses études visant à optimiser la structure des cycloalcynes ont été réalisées (Figure 4). La première méthode utilisée reposait sur l'introduction de groupements électroattracteurs au niveau de l'alcyne pour réduire l'énergie de la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (LUMO), favorisant ainsi sa réactivité. Cette stratégie, décrite en 2007 par C. R. Bertozzi et son équipe pour la synthèse du difluorocyclooctyne (DIFO), montre que l'introduction de deux atomes de fluor en position propargylique permet de multiplier par soixante-trois la vitesse de réaction ($k = 0,076 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).⁶¹ Un an plus tard, une autre stratégie est décrite par G-J. Boons avec l'utilisation du 4-dibenzocyclooctynol (DIBO), montrant des constantes de vitesse deux fois plus importantes que le cyclooctyne initial ($k = 0,17 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).⁶² L'amélioration de la vitesse de réaction est liée à la présence de carbones sp^2 , de part et d'autre de l'alcyne, qui augmente la tension du cycle et donc la réactivité. La même année, C. R. Bertozzi

introduit le diméthoxyazacyclooctyne (DIMAC) avec des groupements méthoxy pour rendre le composé plus hydrophile. Malgré une excellente solubilité dans l'eau ($\log S = -3,35$),⁵⁹ ce composé présentait des problèmes de réactivité ($k = 3,0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).⁶³

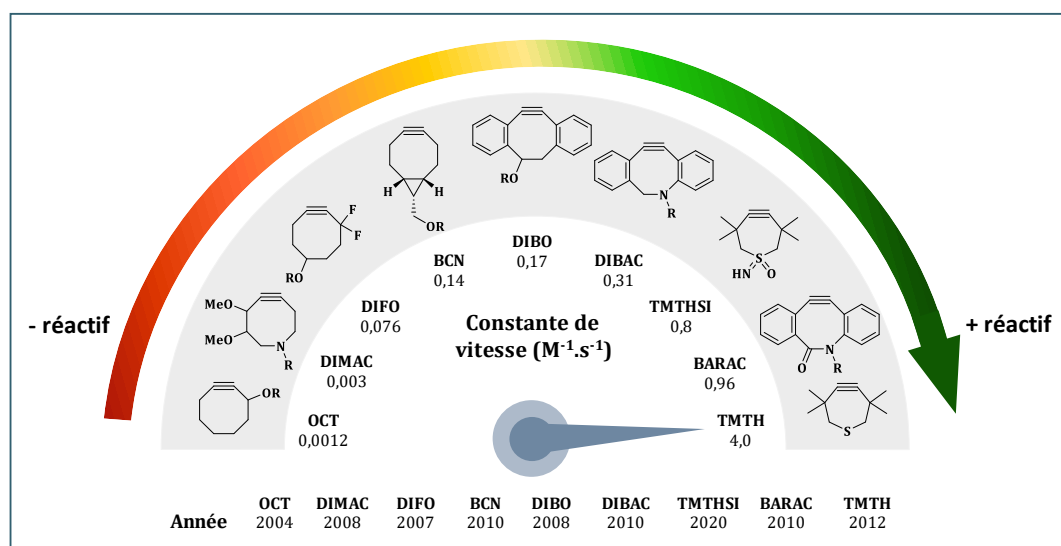


Figure 4. Exemples de cyclooctynes développés pour améliorer la cinétique des réactions SPAAC.

En 2010, F. L. Van Delft décrit la synthèse du dibenzoazacyclooctyne (DIBAC ou DBCO), un cyclooctyne portant au sein de son cycle un hétéroatome (l'azote), montrant une amélioration importante de la réactivité ($k = 0,31 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).⁶⁴ Au cours de cette même année, l'équipe de C. R. Bertozzi développe un analogue de cette molécule, le biarylazacyclooctynone (BARAC) ($k = 0,96 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). La réactivité, beaucoup plus importante que celle précédemment obtenue, est liée à la combinaison des paramètres de contraintes du DIBAC ainsi qu'à l'introduction d'un carbone hybridé sp^2 avec un carbonyle.⁶⁵ L'utilisation du thiacycloheptyne (TMTH), un cycle à 7 chaînons au lieu de 8, est rapportée par C. R. Bertozzi en 2012. Ce cycloalcyne a permis de mesurer la plus grande valeur de cinétique à ce jour en SPAAC ($k = 4,0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). En revanche, le fait d'augmenter la contrainte du cycle peut créer une instabilité du produit et une réaction non désirée avec les thiols.⁶⁶

Même si les cinétiques de réactions sont prometteuses, l'utilisation de groupes volumineux comme le DBCO ou le BARAC peut augmenter l'hydrophobie et la gêne stérique de la molécule, ce qui peut être gênant pour les réactions *in vivo*.⁶⁷ De plus, les cyclooctynes sont difficilement accessibles commercialement, ce qui nécessite leur préparation *via* des voies de synthèse généralement longues (5 à 11 étapes).⁶⁸ C'est pourquoi des recherches se sont focalisées sur des groupements plus petits et faciles à synthétiser, comme le bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN). Développé en 2010 par F. L. Van Delft, ce motif est composé d'un cyclopropane opposé à l'alcyne. Malgré une cinétique plus faible ($k = 0,14 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) comparé au DIBAC, ce cyclooctyne ne nécessite que 4 étapes de synthèse avec un rendement global de 46 %.⁶⁹ Pour répondre aux limites liées à

l'augmentation de la lipophilie par les cyclooctynes, Liskamp et *al.* se sont intéressés au développement d'un analogue du TMTH, le thiacycloheptyne-sulfoximine (TMTHSI). Une cinétique de réaction similaire à celle du BARAC a pu être obtenue ($k = 0,8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) mais ce composé s'est avéré nettement moins hydrophobe ($\log P = 0,72$ vs $3,5$).⁶⁷

Dès sa découverte en 2004, l'utilisation de la SPAAC pour des applications de bioconjugaison dans des systèmes biologiques s'est rapidement développée jusqu'à devenir l'un des systèmes les plus utilisés actuellement. De nombreux efforts ont été réalisés sur l'optimisation du cyclooctyne afin d'en améliorer la réactivité, mais très peu de travaux se sont concentrés sur l'étude du motif azoture. Une première étude, publiée en 2014 par F. L. Van Delft, a eu pour but de comparer la cinétique de réaction entre plusieurs azotures et le BCN ou le DIBAC. Alors que pour le DIBAC la structure de l'azoture n'avait pas réellement d'influence, il a été découvert que l'utilisation d'azotures aromatiques, en particulier ceux avec des substituants électroattracteurs, était bénéfique pour la réactivité avec des cinétiques de réactions atteignant $2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.⁷⁰ Plus récemment, de nouvelles études ont permis de montrer que l'azoture pouvait être remplacé par d'autres dipôles tels que les nitrones, les oxydes de nitriles ou encore les diazoalcanes.

Les réactions de cycloaddition sous contrainte stérique entre les nitrones et les alcynes (SPANC) formant des isoxazolines ont montré des vitesses de réaction allant jusqu'à $59 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, soit 60 fois plus rapides que pour les réactions SPAAC correspondantes (Schéma 10). Ces cinétiques de réactions rapides ont même permis l'utilisation de ce système en bioconjugaison, notamment pour la modification en position N-terminale d'une protéine (chimiokine Interleukine-8) ou encore pour l'imagerie de cellules vivantes. En revanche, en milieu acide ou basique, les nitrones acycliques sont beaucoup plus sensibles à l'hydrolyse que leurs homologues endocycliques.⁷¹ Un réarrangement thermique des isoxazolines portant des groupements *N*-phényles peut être observé,⁷² mais cela peut être limité si des groupements donneurs d'électrons sont utilisés. Malgré tout, les nitrones cycliques présentent une grande stabilité face à l'hydrolyse et les cinétiques sont meilleures que leurs homologues acycliques ($0,13$ vs $1,5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).⁷³

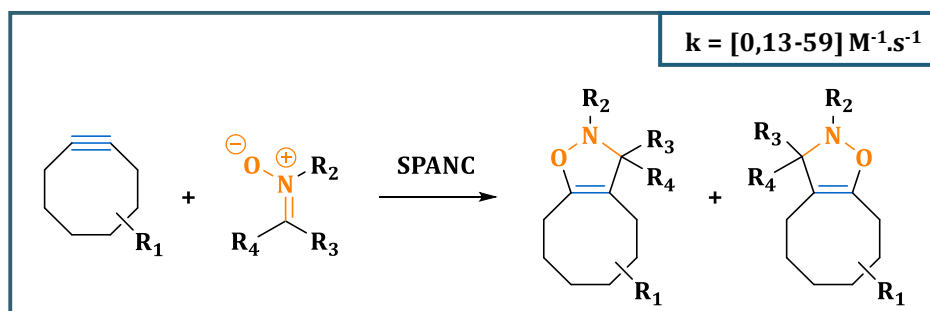


Schéma 10. Réaction de cycloaddition sous contrainte stérique entre un alcyne et une nitronne.

Les oxydes de nitriles ont également été explorés comme dipôles dans des réactions de cycloadditions sous contrainte stérique (SPANOC) pour produire des isoxazoles (Schéma 11). Avec un motif BCN, ce système s'est montré 10 fois plus rapide que lorsqu'un azoture était utilisé et des cinétiques de réaction de $8,47 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ont pu être atteintes. Son utilisation pour des applications en bioconjugaison a également été décrite avec la modification de glycoprotéines ou d'ADN.^{74,75} Malgré des cinétiques intéressantes et des adduits formés stables, l'utilisation d'oxyde de nitrile présente certaines limites. En raison de leur nature plus réactive, ces dipôles doivent être générés *in situ* et de par leur électrophilie, des réactions parasites avec des nucléophiles peuvent avoir lieu.

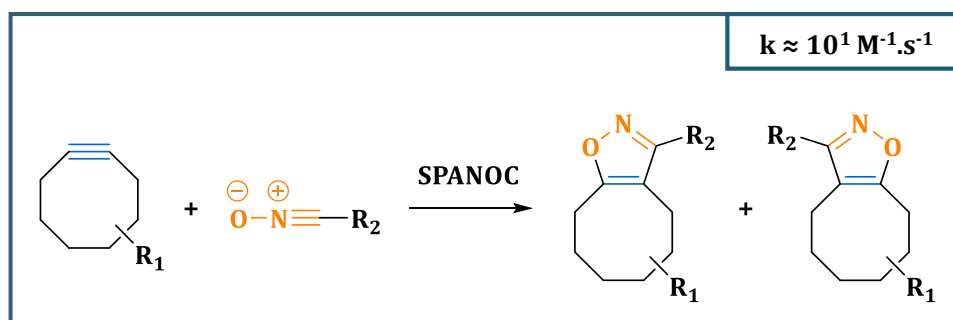


Schéma 11. Réaction de cycloaddition sous contrainte stérique entre un alcyne et un oxyde de nitrile.

Enfin, les diazoalcanes (SPADC) ont montré leur utilité comme réaction bio-orthogonale avec le marquage de protéines et de glycanes à la surface de cellules (Schéma 12). Grâce à cette étude, il a été montré que les diazoacétates étaient compatibles avec tous les groupes présents dans les protéines et qu'ils peuvent être incorporés métaboliquement. Cependant, malgré une réactivité du même ordre de grandeur que pour l'azoture ($k \approx 0,05 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), cette méthode reste plus lente que la SPAAC et des optimisations sont nécessaires.

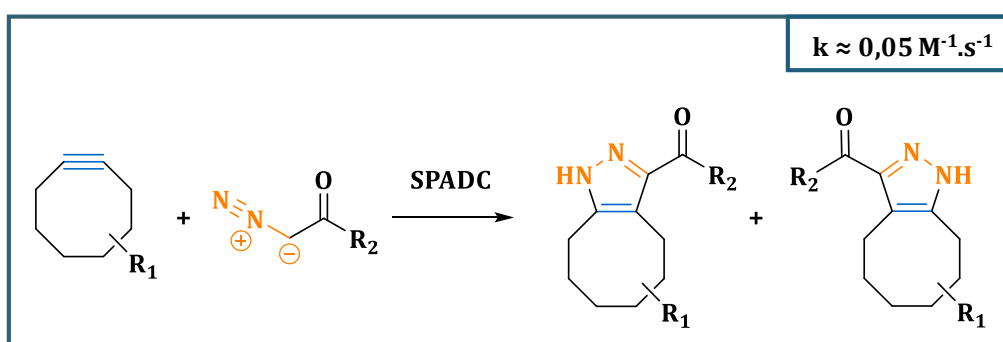


Schéma 12. Réaction de cycloaddition sous contrainte stérique entre un alcyne et un diazoacétate.

I-3.4.b) Les réactions de Diels-Alder alcènes/alcynes avec les tétrazines (IEDDA)

En 1929, O. Diels et K. Alder décrivent pour la première fois la réaction entre un diénoophile (alcène, alcyne) et un diène conjugué (système à 4 électrons π délocalisés sur quatre atomes) pour

former un cycle à 6 chaînons.⁷⁶ Cette réaction, l'une des plus utilisées en chimie organique, à même valeur à O. Diels et K. Alder le prix Nobel de chimie en 1950.

Contrairement à la réaction de Diels-Alder à demande normale d'électron (NEDDA) où un diène riche en électron réagit avec un diénophile pauvre en électron, dans la réaction IEDDA, le diène appauvri électroniquement réagit avec le diénophile enrichi électroniquement (Figure 5). D'après la théorie des orbitales moléculaires frontières, la cinétique des réactions IEDDA est liée à la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO de chacun des réactifs. Par conséquent, plus le diène est pauvre en électrons et le diénophile riche électroniquement, plus l'écart énergétique est faible, ce qui améliorera la cinétique de réaction.⁷⁷

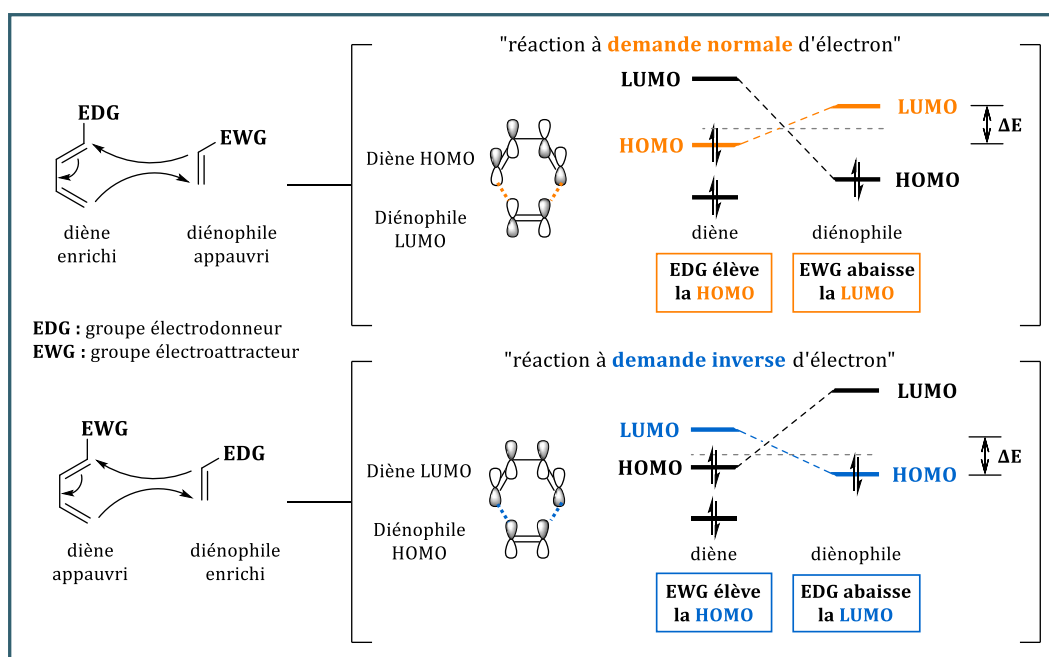


Figure 5. Théorie des orbitales moléculaires frontières pour les réactions de Diels-Alder à demande normale et inverse.

Basé sur les premiers travaux de Lindsey et *al.* en 1959,⁷⁸ J. Schuster rapporte en 1998 les premières études de réaction IEDDA entre une tétrazine (Tz) et plusieurs alcynes ou alcènes contraints (Schéma 13).⁷⁹ Néanmoins, c'est en 2008 que J. M. Fox et S. A. Hilderbrand décrivent pour la première fois cette réaction comme bio-orthogonale en faisant réagir une tétrazine sur une protéine modifiée par un *trans*-cyclooctène (TCO)⁸⁰ ou un norbornène.⁸¹ Les cinétiques mesurées lors de ces premières études, en particulier celle de J. M. Fox, ont très rapidement propulsé ce système parmi les plus intéressants pour des applications en bioconjugaison. En effet, alors qu'en solvant organique la vitesse de réaction était de $400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en tétrahydrofurane (THF) ou $1\,140 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en méthanol (MeOH), cette valeur a pu monter jusqu'à $2\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ lorsque 10 % d'eau était ajouté au milieu.

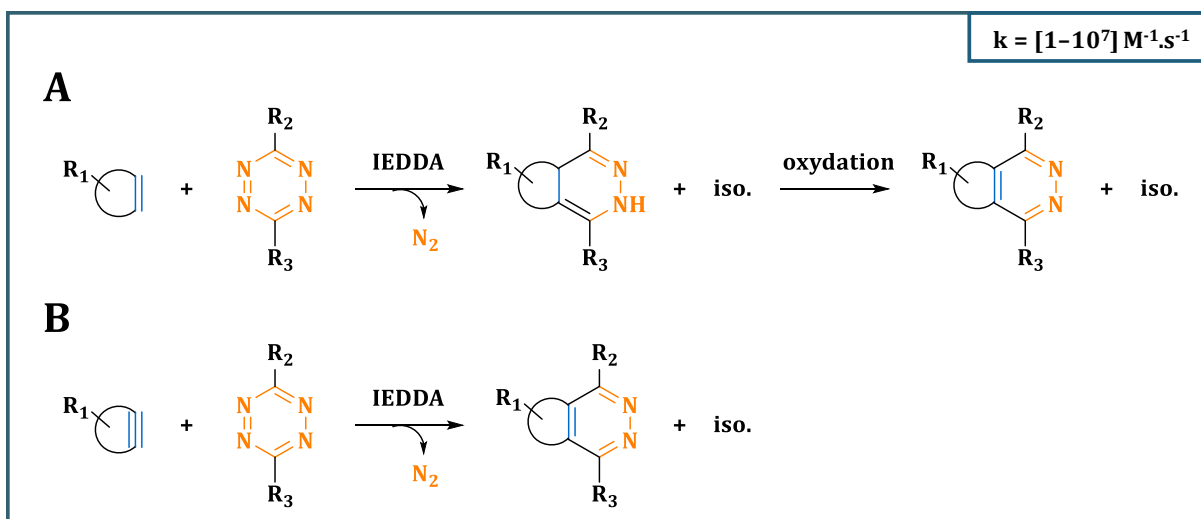


Schéma 13. Réaction de cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse d'électron : (A) entre une tétrazine et un alcène ; (B) entre une tétrazine et un alcyne.

Comme pour le système SPAAC, de nombreuses études ont été menées afin d'optimiser les structures des réactifs pour en améliorer la réactivité (Figure 6). En 2011, J. M. Fox et son équipe optimisent la structure du TCO en fusionnant le cyclooctène avec un *cis*-cyclopropane afin d'augmenter la contrainte stérique au niveau de l'alcène.⁸² Ce nouveau composé, appelé *s*-TCO, a permis d'atteindre des cinétiques jusqu'à 19 fois plus rapides qu'avec le TCO. Quelques années plus tard, cet alcène a été modifié avec l'introduction d'une chaîne polyéthylène glycol (PEG) ($n = 10$) dont la mesure de sa cinétique de réaction avec une dipyridyl-tétrazine a permis d'obtenir une valeur de $3,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,⁸³ qui n'a été dépassée que récemment par la réaction de cette même tétrazine avec un dérivé *trans*-1-sila-4-cycloheptène (TCH) ($k = 1,14 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), faisant d'elle la réaction décrite la plus rapide à ce jour.⁸⁴

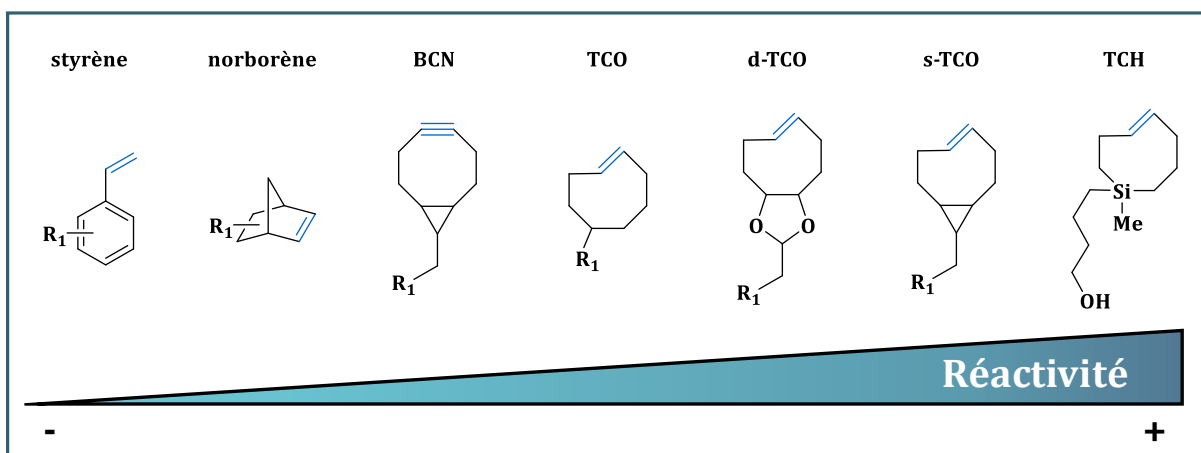


Figure 6. Ordre relatif de réactivité de différents diénophiles avec les tétrazines.

La grande réactivité des différents dérivés du TCO n'est pas sans conséquence sur leur stabilité. En effet, il a été démontré que ces types d'alcènes contraints n'étaient pas suffisamment stables pour être stockés sur de longues périodes,⁸⁵ ce type de structure étant tellement réactif

que l'isomérisation en *cis*-cyclooctène (CCO) peut survenir en seulement quelques heures.⁸⁶ Pour pallier ces problèmes de stabilité, l'équipe de J. M. Fox a développé le *d*-TCO en remplaçant le cyclopropane par un dioxalane. Malgré une légère diminution de la cinétique de réaction dans l'eau ($k = 3,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ce cyclooctène n'a montré aucune isomérisation après 24 heures ou de dégradation après 4 jours dans du sérum humain.⁸³

De nombreuses études se sont concentrées sur l'optimisation du diénophile, mais la structure de la tétrazine est également un paramètre important dans les cinétiques de réaction IEDDA. Dans une étude de 2011 réalisée par S. A. Hilderbrand, plusieurs tétrazines substituées ont été comparées entre elles pour étudier l'impact des effets électroniques sur leur réactivité. Les résultats montrent que des substituants électroattracteurs entraînent une diminution de l'orbitale LUMO de la tétrazine, ce qui augmente leur réactivité. Néanmoins, de la même façon que pour les motifs TCO, cette augmentation de la réactivité s'accompagne d'une diminution de la stabilité de la tétrazine dans le temps.⁸⁷

I-4. Autres réactions bio-orthogonales

La plupart des réactions bio-orthogonales rapportées dans la littérature sont basées soit sur des réactions de cycloaddition, soit sur des réactions catalysées par des métaux de transition. Parmi toutes les réactions découvertes, quelques exemples issus de la littérature ont été sélectionnés afin de mettre en avant ces nouvelles stratégies et exposer leurs limites potentielles.

I-4.1. Réactions photo-induites

S'inspirant des travaux de R. Huisgen en 1967 sur la cycloaddition 1,3-dipolaire entre le 2,5-diphényltétrazole et le crotonate de méthyle,⁸⁸ l'équipe de Q. Lin rapporte en 2008 une nouvelle réaction bio-orthogonale, les réactions photo-induites (Schéma 14).⁸⁹ Dans cette réaction, le tétrazole est activé grâce aux rayonnements UV conduisant à la libération de diazote (N_2) et à la formation d'un nitrilimine. Cet intermédiaire, très réactif, réagit ensuite avec un alcène pour former une pyrazoline.

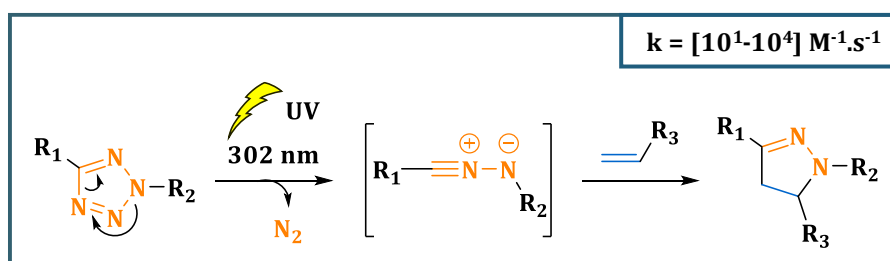


Schéma 14. Mécanisme réactionnel d'une réaction photo-induite entre un tétrazole et un alcène.

Son potentiel de réaction bio-orthogonale a été démontré très rapidement, avec la fonctionnalisation d'un alcène codé génétiquement dans une protéine à l'intérieur de cellules *Escherichia coli*.⁹⁰ L'avantage principal de ce système est la possibilité de contrôler spatialement

et temporellement le marquage dans les systèmes vivants. Cependant, malgré des optimisations réalisées conduisant à des vitesses de réaction de $k = 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$,⁹¹ les longueurs d'ondes utilisées sont très énergétiques et une exposition prolongée à ces rayonnements peut causer des dommages sur les cellules.

I-4.2. Réactions de cycloaddition [4+1] entre une tétrazine et un isonitrile

En 2011, F. J. Leeper montre que les isonitriles peuvent participer à des réactions clic avec des tétrazines en milieu aqueux (Schéma 15).⁹² Après une première étape de cycloaddition [4+1] conduisant à la formation d'un intermédiaire norbornadiénimine, celui-ci subit spontanément une cycloréversion [4+2] pour former un dérivé iminopyrazole avec une libération de N_2 .

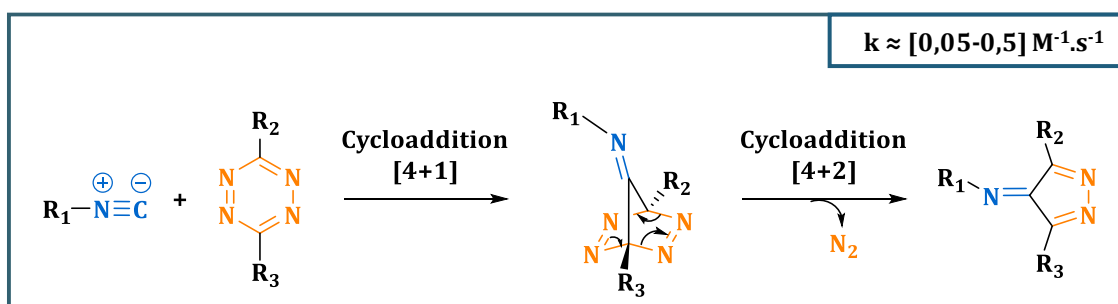


Schéma 15. Réaction de cycloaddition [4+1] entre un isonitrile et une tétrazine. Mécanisme valable seulement si R_1 est un carbone tertiaire. Dans le cas où l'isonitrile est primaire ou secondaire, l'iminopyrazole se tautomérise puis s'hydrolyse pour former un aminopyrazole.

Des vitesses de réaction allant de $0,052$ à $0,575 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ont pu être mesurées en fonction des isonitriles utilisés et des conditions de réaction. Dans cette même étude, les auteurs ont prouvé que cette réaction était biocompatible en l'utilisant pour conjuguer un fluorophore à une protéine modifiée par un isonitrile.⁹² Deux ans plus tard, le même groupe utilise à nouveau ce système pour marquer des glycanes à la surface de cellules par incorporation de sucre modifié par des isonitriles.⁹³

I-4.3. Réactions de cycloaddition [2+2+2] entre un quadricyclane et un électrophile π

En 2011, la réaction de cycloaddition [2+2+2] entre un quadricyclane, un hydrocarbure très tendu, et un bis(dithiolène) de nickel est rapportée par C. R. Bertozzi (Schéma 16). Bien que ce type de cycloaddition soit généralement catalysée par un métal pour passer la barrière entropique, dans ce cas, le quadricyclane est tellement contraint qu'il subit directement une cycloaddition avec des systèmes π spécifiques. Une constante de vitesse du second ordre de $0,25 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ a pu être déterminée dans un mélange PBS/EtOH (1:1). Bien que le potentiel de cette réaction ait été montré pour le marquage de protéine, des optimisations sont encore nécessaires pour des applications cellulaires.⁹⁴

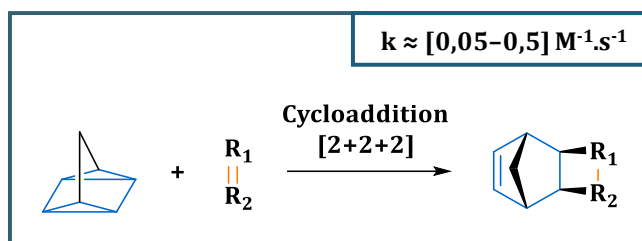


Schéma 16. Réaction de cycloaddition [2+2+2] entre un quadricyclane et un électrophile π .

I-4.4. Réactions de couplage azoïque

La modification de protéine à l'aide d'un couplage azoïque entre un sel de diazonium aromatique et une tyrosine a déjà été démontrée. Cependant, en raison de l'abondance des résidus tyrosine à la surface des protéines, cette méthode n'est pas spécifique, ce qui limite son utilisation en bioconjugaison.⁹⁵ Basé sur ces travaux, Chatterjee et coll. rapportent en 2017 une version améliorée de cette réaction en utilisant le 5-hydroxyindole à la place de la tyrosine (Schéma 17). Grâce à son cycle riche en électron, la réactivité avec les ions diazoniums aromatiques a été très largement augmentée, atteignant des vitesses de presque 4 500 fois plus rapide qu'avec la tyrosine ($k = 6,3 \times 10^4$ vs $14,2 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Grâce à son excellente vitesse de réaction, cette stratégie a pu être utilisée pour marquer des protéines recombinantes et comme linker pour l'ajout d'un fluorophore sur un fragment d'anticorps anti-HER2.⁹⁶

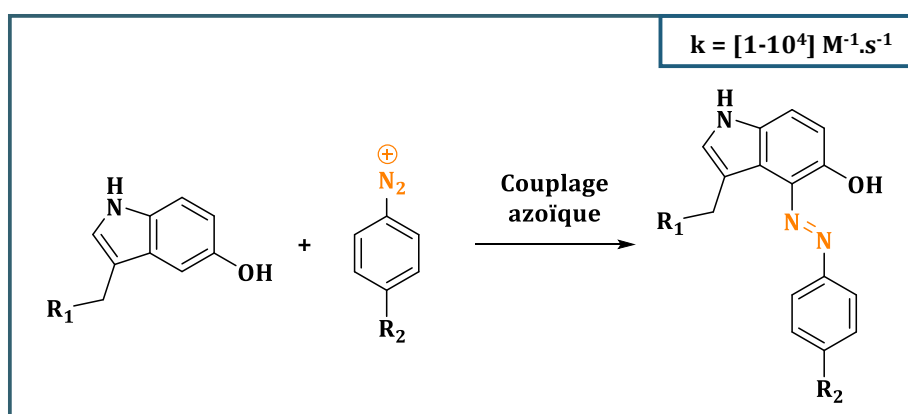


Schéma 17. Réaction de couplage azoïque entre un 5-hydroxyindole et un sel de diazonium.

I-4.5. Réactions d'élimination rétro-Cope

En 2021, D. Kang et J. Kim rapportent une nouvelle réaction bio-orthogonale entre les N,N -dialkylhydroxylamines et des alcynes contraints (Schéma 18). Dans ces travaux, la réactivité de divers cyclooctynes avec une hydroxylamine a été étudiée et comparée à celle obtenue par l'OCT. Comme pour les autres réactions de cycloaddition avec des alcynes contraints, une amélioration de la vitesse de réaction (jusqu'à 120 fois) a été observée lorsque la tension du cycle était augmentée. Malgré ces résultats intéressants, cette réaction d'hydroamination s'est montrée beaucoup plus sensible aux effets inductifs des substituants en position propargylique. Lorsque le

cyclooctyne est substitué par deux atomes de fluor, une cinétique de $84 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ peut être mesurée.⁹⁷

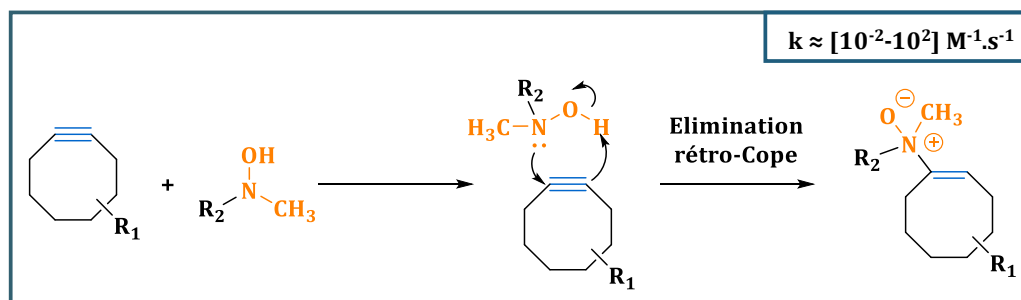


Schéma 18. Réaction d'élimination rétro-Cope entre un alcyne contraint et une N,N-dialkylhydroxylamine.

I-5. Bilan des principales réactions bio-orthogonales

Depuis l'introduction de la chimie bio-orthogonale au début du XX^{ème} siècle, le nombre de publications décrivant des réactions biocompatibles pour différentes applications ne cesse d'augmenter (Figure 7). Historiquement, les premières réactions bio-orthogonales à avoir été développées et appliquées sont les ligations chimiques natives, la ligation de Staudinger et la condensation entre les carbonyles et les amines. Même si dans un premier temps les ligations chimiques étaient limitées à des réactions incluant des résidus cystéines et des dérivés thioester, des alternatives ont permis d'élargir leur domaine d'application jusqu'à obtenir des vitesses de réaction relativement intéressantes ($10^{-1} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Bien que hautement sélective, la ligation de Staudinger a montré certaines limites pour des applications *in vivo*, d'abord de par la faible stabilité de la phosphine vis-à-vis de l'hydrolyse, mais aussi et surtout par de faibles cinétiques de couplage ($k = 10^{-3} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Enfin, les condensations carbonyles/cétones ont également montré des cinétiques de l'ordre de $10^{-3}\text{-}10^{-1} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, mais les conditions de réaction nécessaires (pH acide, concentration en réactifs) ne sont pas toujours adaptées à une utilisation en milieu biologique.

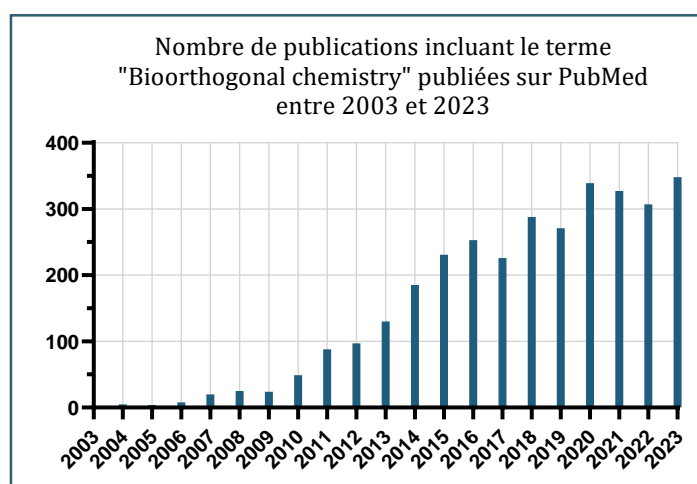


Figure 7. Évolution du nombre de publications incluant le terme « Bioorthogonal chemistry » entre 2003 et 2023 (recherche effectuée sur PubMed le 04/03/2024).

C'est dans ce contexte d'amélioration de la réactivité qu'ont émergé les réactions de cycloaddition et plus particulièrement celles catalysées par des métaux de transitions, et notamment le cuivre. La CuAAC a rapidement été utilisée pour des réactions de bioconjugaison permettant le marquage de systèmes biologiques. Cette réaction repose sur l'utilisation d'un catalyseur au cuivre qui permet d'accélérer les réactions jusqu'à un million de fois pour atteindre des cinétiques allant de 1 à $10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, rendant possible la réaction à température ambiante. Cependant, la présence de cuivre dans le milieu peut être considérée comme une limite à cause de son effet cytotoxique, et même si cette toxicité peut être modérée par l'utilisation d'un ligand, le développement de méthodes sans catalyseur a été privilégié.

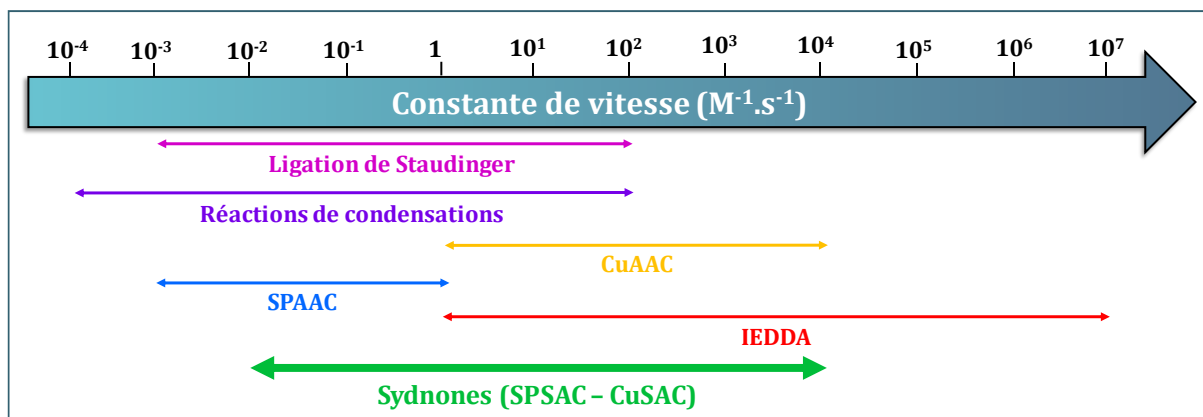
C'est dans cette optique que la SPAAC a été développée, en remplaçant l'utilisation d'alcyne terminaux par des alcyne contraints. À la différence de la CuAAC, cette réaction n'est pas régiospécifique et conduit à la formation de deux isomères, ce qui peut altérer la fixation sur la cible. Néanmoins, cette hétérogénéité ne s'est pas montrée limitante pour des applications cellulaires voire *in vivo*. Dans un premier temps, ce type de réaction pouvant se dérouler en conditions physiologiques montrait une cinétique de réaction relativement lente ($k = 1,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Un travail d'optimisation de la structure des réactifs, que ce soit au niveau du cyclooctyne ou de l'azote, a permis d'atteindre des valeurs de cinétique de réaction allant jusqu'à $4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

Même si les azotures restent les 1,3-dipôles les plus utilisés, d'autres alternatives basées sur l'utilisation de dérivés nitrones, oxydes nitriles ou encore diazoacétates ont été développées pour des réactions de cycloadditions avec les alcyne contraints. Parmi elles, la SPANC s'est distinguée par une meilleure réactivité avec les cyclooctynes (jusqu'à $59 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) et a été utilisée en bioconjugaison pour la modification de protéines.

Enfin, la plus grande avancée dans le domaine de la chimie bio-orthogonale est la découverte de la réaction IEDDA entre les tétrazines et les diénophiles contraints. Ce système, l'un des plus étudiés, a permis d'obtenir la cinétique de réaction la plus rapide dans ce domaine avec une valeur de $1,14 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Grâce à ces cinétiques extrêmement rapides, ces réactions peuvent se faire sur de faibles concentrations, similaires à celles des protéines intracellulaires. Cependant, leur haute réactivité est associée à certains problèmes de stabilité des précurseurs, en particulier pour le TCO qui peut s'isomériser en CCO, ce qui peut être limitant pour certaines applications *in vivo*.

Les réactions de cycloaddition entre une sydnone et un alcyne vrai catalysées au cuivre (CuSAC) ou sous contrainte stérique (SPSAC) sont également des systèmes très étudiés. Leurs vitesses de réactions s'étendent sur une large gamme ($10^{-2} - 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) et dans certains cas permettent même de rivaliser avec les valeurs atteintes par le système IEDDA (Figure 8). Ces

systèmes seront au cœur de l'étude qui suivra dans ce manuscrit et feront l'objet d'une partie dédiée (Partie III- Les sydnones).



II- Apport de la chimie bio-orthogonale pour la production des radiopharmaceutiques

II-1. La médecine nucléaire

La médecine nucléaire est une spécialité médicale basée sur l'utilisation de médicaments radioactifs, appelés radiopharmaceutiques, et employés pour deux applications distinctes : i) l'imagerie, afin de visualiser la distribution d'un radionucléide dans l'organisme ; ii) la thérapie, axée sur l'irradiation des cellules ciblées pour les détruire. Bien que certains radionucléides puissent être utilisés directement comme les radioisotopes de l'iode, qui présentent une affinité naturelle pour la thyroïde, la majorité d'entre eux est liée à une molécule vectrice et séparée par un espaceur (Figure 9). Le vecteur choisi doit être capable de cibler spécifiquement l'organe ou les cellules d'intérêt afin de transporter le radionucléide qui, grâce à ses rayonnements, va permettre leur localisation ou leur destruction.⁹⁸

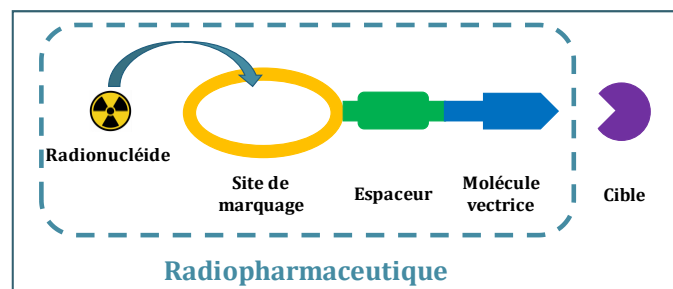


Figure 9. Représentation simplifiée d'un radiopharmaceutique.

Cette approche médicale s'appuie sur les caractéristiques des radionucléides, des isotopes instables en raison d'un excès de protons et/ou de neutrons. Pour retrouver leur état stable, ces radioisotopes vont subir une désintégration en émettant différentes particules (ou rayonnements) aux caractéristiques variées et pouvant être utilisées pour l'imagerie diagnostique ou la radiothérapie interne vectorisée (Figure 10).⁹⁹

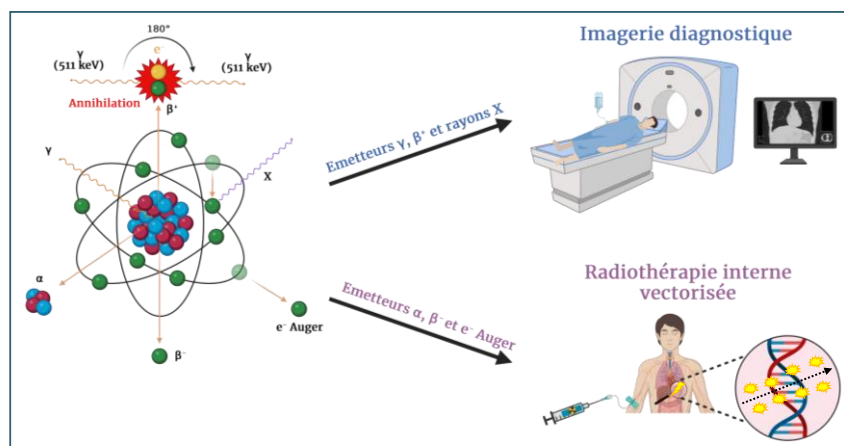


Figure 10. Différents types d'émissions possibles pour des applications en médecine nucléaire. Créée avec BioRender.com

Le radionucléide :

Pour être considéré en médecine nucléaire, un radionucléide doit répondre à plusieurs critères : i) sa demi-vie doit être suffisamment longue pour la préparation et l'acheminement du radiopharmaceutique, mais assez courte pour éviter l'irradiation prolongée des tissus sains ; ii) sa désintégration doit idéalement conduire à un noyau stable, afin d'assurer une meilleure radioprotection, mais également d'éviter des signaux parasites en imagerie ou une forte toxicité en fonction de l'émission du noyau fils ; iii) sa demi-vie doit être compatible avec celle du vecteur pour une meilleure efficacité ; iv) le radionucléide doit être facilement accessible pour être utilisé en routine. Si tous ces critères sont respectés, son application dépendra alors des rayonnements qu'il émet.

En imagerie, les radionucléides qui émettent des particules peu énergétiques mais fortement pénétrantes sont privilégiés afin de pouvoir être détectés par des caméras en dehors de l'organisme. La tomographie par émission de positons (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP) sont les deux techniques d'imagerie utilisées en médecine nucléaire. La TEP se base sur l'utilisation d'isotopes radioactifs émettant des rayonnements bêta plus (β^+) (Tableau 1). En se désintégrant l'isotope émet un positon qui, une fois annihilé avec un électron présent dans le milieu, produit deux photons gamma (γ) de 511 kiloélectronvolts (keV) émis à 180° l'un de l'autre. Ces deux photons sont détectés en coïncidence et un traitement informatique permet de reconstruire les images. Le radioisotope le plus utilisé en TEP est le fluor-18 avec notamment le radiotraceur [^{18}F]Fluorodésoxyglucose ([^{18}F]FDG).¹⁰⁰

Radionucléide	$T_{1/2}$	Type d'émission	E_{max} (keV)	Application
^{11}C	20,4 min	β^+	960	TEP
^{18}F	109,8 min	β^+	634	TEP
^{68}Ga	67,8 min	β^+	1 899	TEP
^{89}Zr	78,4 h	β^+	909	TEP
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,0 h	γ	141	TEMP
^{111}In	67,2 h	γ	245	TEMP
^{123}I	13,2 h	γ	159	TEMP

Tableau 1. Exemples de radionucléides les plus utilisés en imagerie.

Les émetteurs de rayonnements γ possèdent une énergie variable entre quelques keV et plusieurs mégaélectronvolts (MeV) mais seuls les rayonnements peu énergétiques, généralement entre 100 et 400 keV, sont utilisés en imagerie TEMP (Tableau 1). Cette technique de scintigraphie repose sur l'utilisation de gamma-caméras effectuant une rotation autour du patient pour permettre la reconstruction 3D. Actuellement, le radioisotope le plus utilisé en routine est le technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), dans le cadre de scintigraphie osseuse par exemple.¹⁰¹

La radiothérapie interne vectorisée privilégie quant à elle les radioisotopes qui émettent des particules fortement ionisantes mais avec une faible distance de pénétration, ce qui permet de détruire les cellules traversées sans irradier les tissus sains autour de la tumeur. On retrouve dans cette catégorie trois types d'émissions : les particules β^- , alpha (α) et les électrons Auger (Tableau 2). Les particules β^- , qui sont les plus pénétrantes (2 à 10 mm), possèdent des énergies allant de 0,5 à 2,3 MeV et sont les plus adaptées pour les tumeurs solides de petite ou moyenne taille. Les particules α , correspondant à un noyau d'hélium (${}^4_2\text{He}$), sont beaucoup moins pénétrantes (10-100 μm) mais beaucoup plus énergétiques (4 à 8,5 MeV). En raison de ces caractéristiques et de leur transfert d'énergie linéique (TEL) bien plus important (0,2 à 2 keV/ μm pour les β^- vs 50 à 230 keV/ μm pour les α), les émetteurs α sont idéaux pour l'irradiation sélective de tumeurs de petite taille comme les micrométastases, les cellules isolées, dans le cas de cancers hématopoïétiques ou pour détruire les cellules résiduelles après une chirurgie. Concernant les électrons Auger, générés lorsqu'un atome instable capte un électron présent à sa périphérie ou lors de l'expulsion d'un des électrons du noyau suite à un transfert interne d'énergie, ils possèdent l'énergie d'ionisation la plus faible (0,001 à 1 keV). Cependant leur faible parcours dans la matière (<1 μm) conduit à un TEL élevé (4 à 26 keV/ μm).^{102,103}

Radionucléide	T _{1/2}	Type d'émission	E _{max} (keV)
⁹⁰ Y	64,8 h	β^-	2 284
¹³¹ I	8,0 j	β^-	606
¹⁷⁷ Lu	6,71 j	β^-	497
²¹¹ At	7,2 h	α	5 900 - 7 500
²¹³ Bi	45,6 min	α	5 870 - 8 377
²²⁵ Ac	10,0 j	α	5 829 - 8 377
¹²⁵ I	59,9 j	e ⁻ Auger	31

Tableau 2. Exemples de radionucléides les plus utilisés en radiothérapie interne.

Le vecteur :

Pour être utilisé en médecine nucléaire, un vecteur doit répondre à différents critères : i) il doit posséder une bonne affinité et spécificité pour sa cible, pour permettre une accumulation du radiopharmaceutique ; ii) sa pharmacocinétique doit être adaptée à la demi-vie du radionucléide, afin que l'irradiation se produise majoritairement sur la cible ; iii) sa clairance sanguine dans les tissus sains doit être suffisamment rapide pour éviter une toxicité du radionucléide ou des problèmes de contraste en imagerie.

Les anticorps, en particulier les IgG, représentent une classe de vecteur d'intérêt. Grâce à leur pharmacocinétique lente, ils sont parfaitement adaptés pour des radionucléides à longue demi-vie. Pour les radionucléides à courte demi-vie, il est nécessaire d'avoir des cinétiques de biodistribution plus rapides, qui sont généralement obtenues grâce à l'utilisation de fragments

d'anticorps (Figure 11 A)¹⁰⁴, de dérivés peptidiques (Figure 11 B)¹⁰⁵ ou même de petites molécules (Figure 11 C).¹⁰⁶ En revanche, plus la taille du vecteur est limitée et plus il convient d'être attentif lors de l'étape de radiomarquage, car une modification structurale trop importante pourrait entraîner une perte de reconnaissance pour la cible visée.

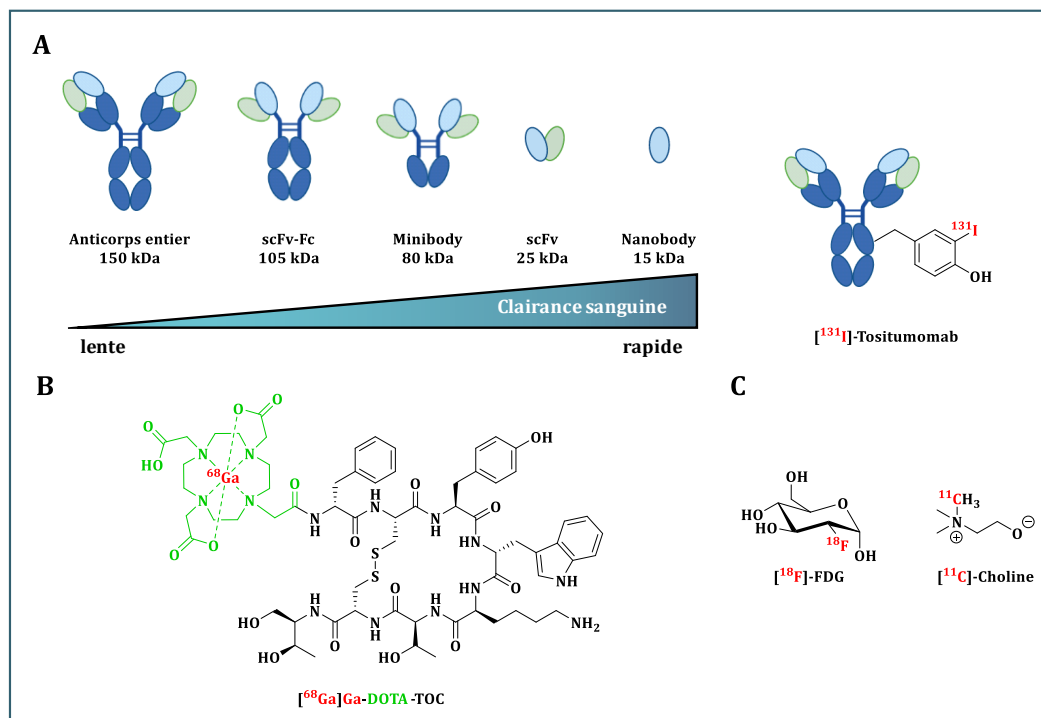


Figure 11. Exemples de radiopharmaceutiques ayant été approuvés par la FDA pour des applications en médecine nucléaire. (A) Les anticorps et leurs dérivés ; (B) les peptides ; (C) les petites molécules.

II-2. Méthodes classiques de radiomarquage des protéines

L'introduction du radionucléide sur le vecteur est une étape clé de la production d'un radiopharmaceutique. Par exemple, les isotopes de l'iode peuvent être directement fixés sur une protéine *via* une réaction de substitution électrophile aromatique, à condition que des résidus tyrosines soient présents sur la biomolécule. Cette stratégie, notamment utilisée pour la production du ¹³¹I-Tositumomab (Bexxar®),¹⁰⁷ un radiopharmaceutique utilisé dans le traitement des lymphomes non-hodgkiniens, repose sur l'utilisation d'iode électrophile (I⁺) généré *in situ* grâce à des agents oxydants comme la chloramine T, l'Iodogen® ou le *N*-chlorosuccinimide (Figure 12).¹⁰⁸

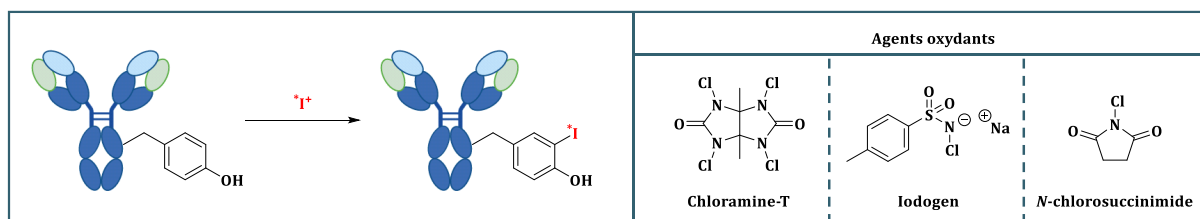


Figure 12. Exemple de radiomarquage direct d'un anticorps au niveau des résidus tyrosines.

Ces méthodes n'étant pas adaptées aux autres halogènes et aux radiométaux, l'incorporation d'un radionucléide sur une protéine est généralement réalisée par : i) une approche de pré-marquage, dans laquelle une molécule est radiomarquée, puis conjuguée à une biomolécule (Figure 13 A) ; ii) une approche de post-marquage, pour laquelle le radiomarquage a lieu après la fonctionnalisation de la protéine (Figure 13 B). Indépendamment de la méthode choisie, la réaction de bioconjugaison doit être chimiospécifique pour réagir avec un seul type de groupement fonctionnel, et se faire sur un nombre de positions limité pour réduire le risque de modifications au niveau du site de reconnaissance de la protéine. Ce paramètre est d'autant plus important lorsque la taille de la macrobiomolécule se réduit. La majorité des stratégies de fonctionnalisation repose sur l'utilisation des résidus lysines, réagissant avec des groupes carboxyles activés comme les *N*-hydroxysuccinimides (NHS) ou isothiocyanates, et des résidus cystéines avec des maléimides.¹⁰⁹

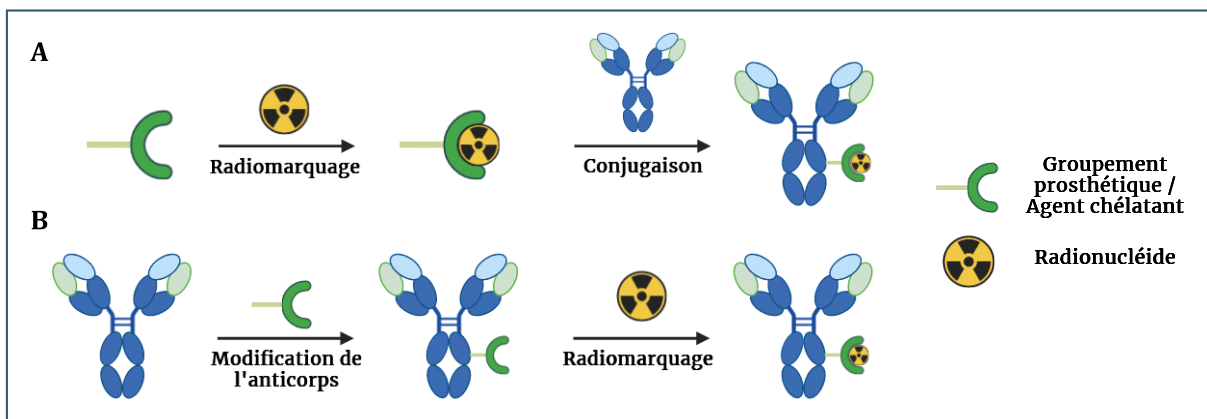


Figure 13. Approches utilisées pour le radiomarquage d'anticorps. (A) Pré-marquage ; (B) Post-marquage.

Lorsque les conditions de marquage sont susceptibles d'altérer la structure de l'anticorps (température élevée, pH ou solvant organique), la stratégie de pré-marquage est utilisée. Un des premiers exemples développés utilisant cette approche est le réactif de Bolton Hunter.¹¹⁰ Cette méthode permet la radioiodation de protéines n'ayant pas de tyrosines accessibles, en utilisant un ester activé pour se coupler à une lysine (Schéma 19 A). Cependant, en raison de problèmes de stabilité du marquage propre au groupement iodotyrosine,¹¹¹ cette approche a évolué vers une méthode utilisant le groupement *N*-succinimidyl-3-iodobenzoate (SIB) présentant une meilleure stabilité et ayant été appliqué depuis au fluor-18 et à l'astate-211 (Schéma 19 B).¹¹²

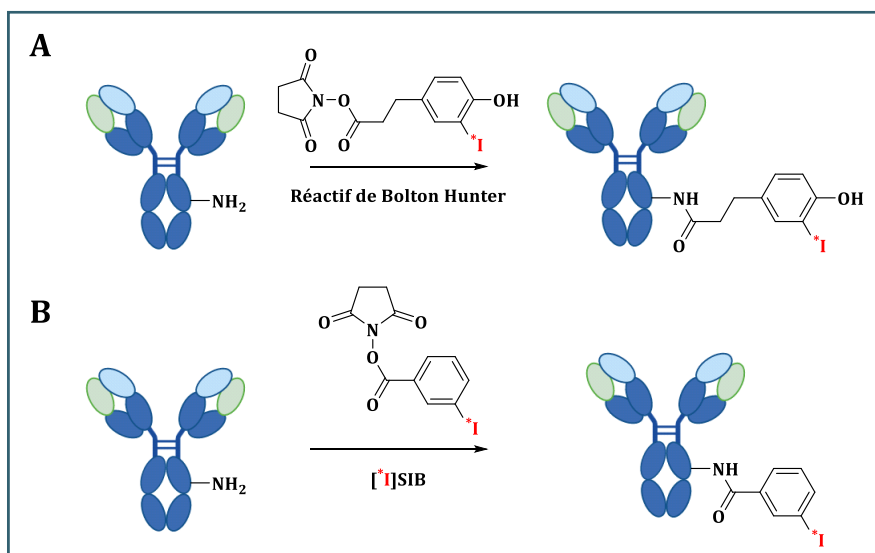


Schéma 19. Méthodes de radiomarquage d'un anticorps à l'iode. (A) A l'aide du réactif de Bolton-Hunter ; Par la méthode du SIB (B).

Lorsque les conditions de marquage ne risquent pas d'altérer la structure de l'anticorps, la stratégie de post-marquage est utilisée. Bien que les premiers agents chélatants développés étaient acycliques, les agents chélatants macrocycliques sont aujourd'hui les plus utilisés en règle générale. A titre d'exemple, pour des applications en imagerie nucléaire on retrouve la desferrioxamine (DFO), un agent acyclique pour la complexation du zirconium-89,¹¹³ l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA) ou l'acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique (NOTA), des macrocycles utilisés pour les marquages au cuivre-64 ou au gallium-68 (Figure 14 A).¹¹⁴

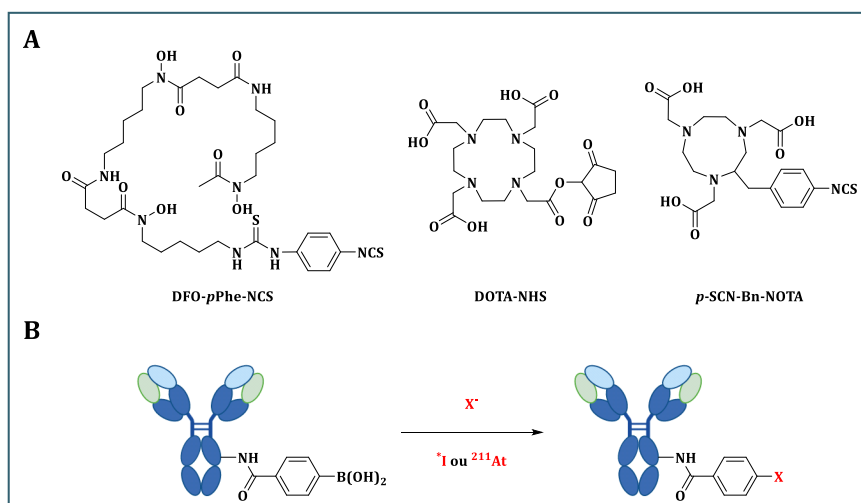


Figure 14. (A) Exemples d'agents chélatants bifonctionnels utilisés pour la complexation de radiométaux (zirconium-89, cuivre-64, gallium-68) ; (B) Radiohalogénéation d'un anticorps à l'aide de la méthode des acides boroniques.

En ce qui concerne plus spécifiquement la radiohalogénéation, une approche indirecte a récemment été développée au laboratoire pour le radiomarquage d'un anticorps préalablement modifié par une fonction acide boronique, à l'iode-125 et à l'astate-211 (Figure 14 B).¹¹⁵

II-3. Limites de ces méthodes

En raison de leur faible présence à la surface des protéines, les thiols issus des résidus cystéines sont un choix judicieux pour la modification chimiosélective de protéines mais peuvent être difficiles à cibler en raison de leur facilité à former des ponts disulfures.¹¹⁶ De plus, des problèmes de rétro-Michael *in vivo* peuvent être observés lorsqu'un maléimide est utilisé pour la bioconjugaison. Bien qu'utilisés pour le radiomarquage direct de protéine à l'iode, les résidus tyrosines sont relativement peu réactifs et peu utilisés en bioconjugaison. De par leur nucléophilie et leur grande accessibilité, les amines provenant des résidus lysines sont utilisés comme site préférentiel pour l'introduction d'un radionucléide (environ 90% des cas).

Néanmoins, bien qu'elles soient présentes en grand nombre à la surface des protéines, l'utilisation des lysines comme site de conjugaison conduit à un manque de spécificité (Schéma 20). En effet, il est impossible de contrôler le nombre de radionucléides fixés sur la biomolécule, conduisant à l'obtention d'une solution hétérogène de protéines radiomarquées. Si certaines recevront un, deux ou plusieurs radionucléides, d'autres n'en posséderont aucun. Un autre problème de cette conjugaison aléatoire est la potentielle modification du site de reconnaissance de la protéine, pouvant modifier considérablement ses performances *in vivo* (pharmacocinétique, sélectivité, affinité et stabilité du produit final).¹¹⁷

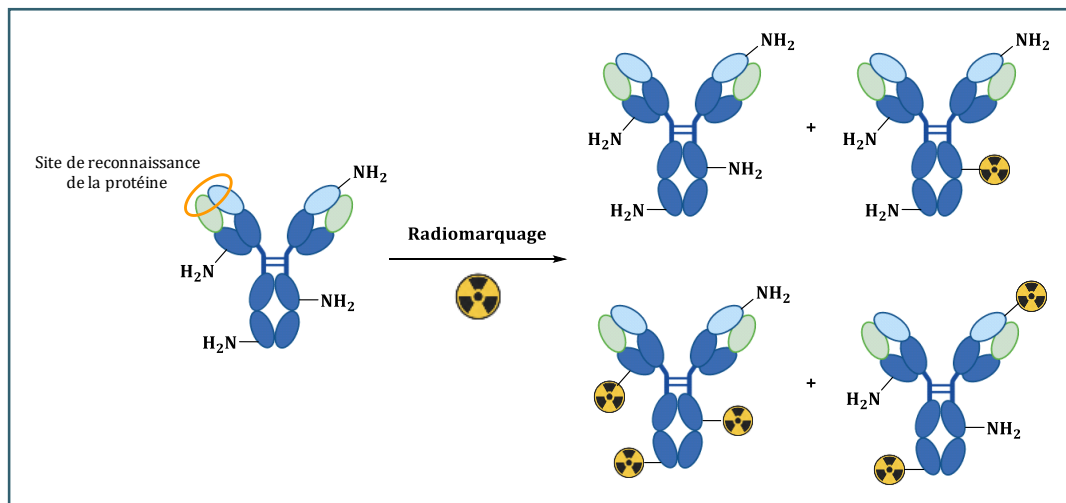


Schéma 20. Exemple d'un marquage aléatoire d'une macrobiomolécule en utilisant les résidus lysines.

Les réactions de couplage entre un ester activé et une lysine, permettant la formation de fonctions amides, sont initiées par une attaque nucléophile de l'amine sur le carbonyle de l'ester activé. Si pour que l'amine soit suffisamment réactive, des conditions légèrement basiques (pH \approx 8-9) sont nécessaires, des problèmes d'hydrolyse de la fonction ester activé peuvent être observés avec les ions hydroxydes générés. Ces réactions parasites ont pour conséquence de diminuer les rendements de couplage, jusqu'à 50 % dans certains cas (Schéma 21).¹¹⁸ Si ces pertes peuvent être légèrement diminuées en ayant une concentration de protéine suffisamment élevée (≥ 5 mg/mL),

des problèmes d'agrégation ou de précipitation peuvent alors être observés. De plus, l'augmentation de la concentration en protéine peut également entraîner une diminution de l'activité molaire finale.

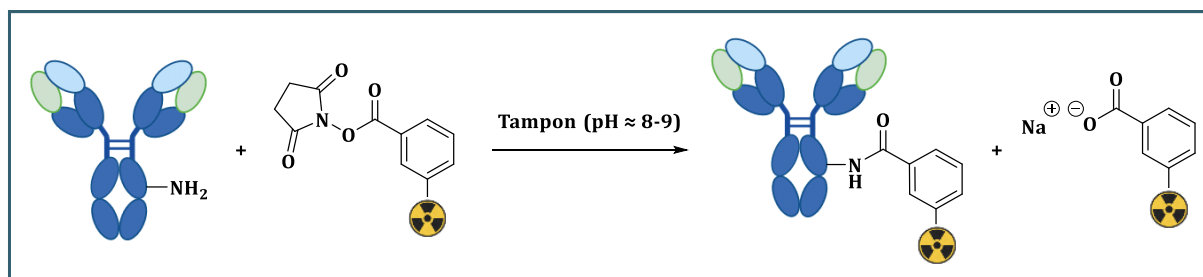


Schéma 21. Exemple de réaction d'hydrolyse observée lors du marquage d'un anticorps.

Du fait des concentrations très faibles de molécule radiomarquée (μM à nM) dans le milieu réactionnel lors du radiomarquage, les protéines sont toujours présentes en excès. En raison de propriétés chimiques similaires, il peut être difficile de séparer les protéines radiomarquées de celles non radiomarquées. Le problème est qu'une fois injectées, si les deux protéines sont toujours présentes, les sites de liaison de la cible d'intérêt peuvent être occupés par une protéine non radiomarquée réduisant ainsi l'efficacité du radiopharmaceutique. C'est pourquoi il est primordial d'utiliser le minimum de précurseur possible.¹¹⁷

Les problèmes d'activité molaire ou l'absence de régiospécificité rendent ces méthodes peu reproductibles et peuvent freiner leur transfert vers le milieu clinique. De plus, dans la majorité des cas, comme les conditions de réactions doivent être adaptées aux différents types de vecteurs ou radionucléides, le développement de radiopharmaceutiques pouvant être utilisé à la fois en imagerie et en thérapie (théranostique) est plus difficile. Par conséquent, de nombreux efforts ont été réalisés pour développer de nouvelles stratégies visant à générer des radiotraceurs de façon plus fiable, parmi lesquelles figure la chimie clic.

II-4. Radiomarquage de vecteurs à l'aide de la chimie bio-orthogonale

Si la chimie bio-orthogonale a eu un impact considérable sur presque toutes les branches de la chimie, en allant du développement de médicaments, aux nanosciences en passant par la chimie des polymères, elle s'est également révélée intéressante pour des applications en radiochimie. En effet, les réactions clics présentent plusieurs avantages comparées à certaines méthodes classiques : i) des cinétiques de réaction rapides, ce qui permet l'utilisation de radionucléides à demi-vie courte ou de travailler à faible concentration afin d'améliorer l'activité molaire ; ii) des conditions de réactions douces, permettant le radiomarquage de molécules sensibles ; iii) des réactions biocompatibles, intéressantes lorsqu'il est nécessaire de travailler en conditions aqueuses pour les biomolécules ; iv) des réactions chimio- et régiosélectives, limitant

la formation de sous-produits. Dans cette première partie, nous nous intéresserons à diverses applications de la chimie bio-orthogonale dans la production des radiopharmaceutiques en se concentrant sur les trois réactions les plus utilisées à savoir la CuAAC, la SPAAC et la IEDDA.

II-4.1. CuAAC

Click-to-chelate :

La première publication rapportant l'utilisation de la chimie clic pour la production des radiopharmaceutiques date de 2006. Il a été constaté que les triazoles 1,4-disubstitués partageaient des caractéristiques structurales et électroniques similaires aux imidazoles 1,4-disubstitués des dérivées *N*-histidines. Ces motifs se sont révélés être d'excellents chélatants pour les noyaux organométalliques comme le ^{99m}Tc ,¹¹⁹ et le groupe de R. Schibli s'est intéressé à l'utilisation de la CuAAC afin de créer l'approche « click-to-chelate ». En fonction de la structure de l'alcyne et de l'azoture, deux types de triazoles 1,4-disubstitués peuvent être générés. Dans un cas, l'atome d'azote N₃ du triazole sera impliqué dans la chélation du radiométal (regular click) et dans l'autre, ce sera l'atome d'azote N₂ (inverse click) (Schéma 22). Contrairement aux nombreuses étapes nécessaires pour la synthèse de dérivés *N*-histidines, l'utilisation de la chimie clic permet l'obtention des triazoles en seulement une étape et avec des rendements supérieurs à 95 %. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* menées sur la bombésine, un peptide à affinité tumorale, ont montré une excellente stabilité et un profil pharmacologique quasiment identique à celui obtenu avec son analogue histidine.¹²⁰ Plus récemment, au vu de ces avantages, cette stratégie a pu être utilisée pour la visualisation des récepteurs 5HT1A de la sérotonine dans le cerveau¹²¹ ou encore pour synthétiser de nouvelles sondes radiomarquées au ^{99m}Tc .¹²²

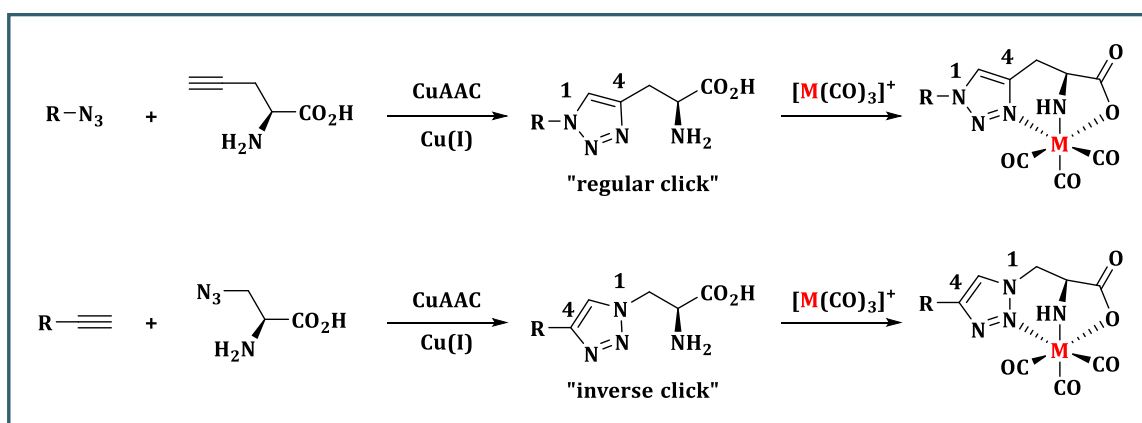


Schéma 22. Utilisation de l'approche "click-to-chelate" pour la complexation de biomolécules avec fac-[M(CO)₃] (M = ^{99m}Tc , Re).

Si cette méthode est principalement décrite pour le marquage de biomolécules au ^{99m}Tc , une étude récente de C. Orvig a permis de montrer que cette approche pouvait être étendue à d'autres radiométaux comme l'actinium-225 et l'indium-111. Après avoir synthétisé le ligand H₄picoopa-triazole-Bn-NH₂ grâce à une réaction CuAAC, des études de radiomarquage ont été

réalisées sur ce composé avec les ions $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{3+}$ et $[^{111}\text{In}]\text{In}^{3+}$, puis comparées aux résultats obtenus avec du DOTA. Cette approche de « click-to-chelate » a présenté un net avantage puisqu'elle a permis d'obtenir un ligand avec une affinité plus élevée pour les deux ions, conduisant à des conversions radiochimiques supérieures à 95 % en seulement 10 minutes à température ambiante et à des concentrations faibles de ligand (10^{-6} M), conditions bien plus favorables que le DOTA (85°C , 30 min, 10^{-3} M).¹²³ Ces observations ont pu être confortées par ce même groupe quelques mois plus tard avec l'utilisation d'un autre ligand, le H₃TPAN, démontrant une méthode robuste pour la préparation de sondes d'intérêts basées sur la paire théranostique $^{225}\text{Ac}/^{111}\text{In}$ (Figure 15).¹²⁴

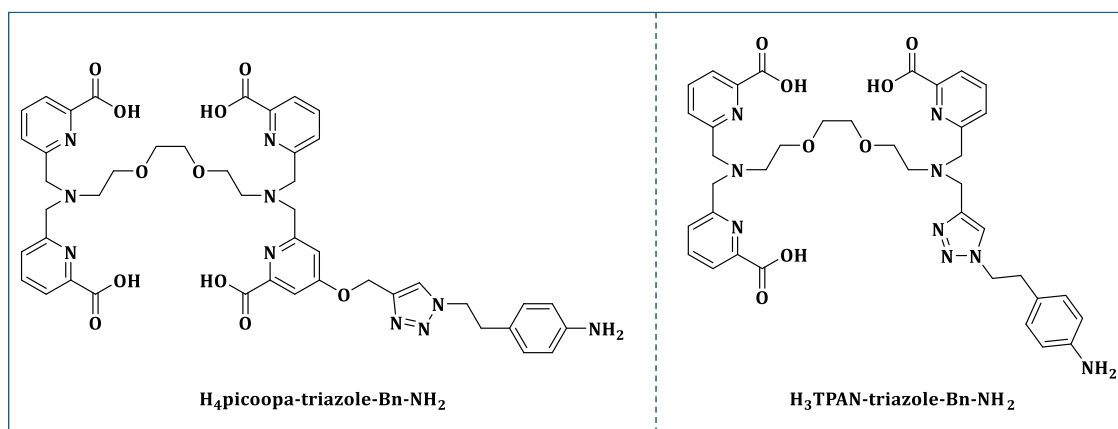


Figure 15. Structure chimique des ligands discutés dans ces deux études pour le radiomarquage à ^{225}Ac et ^{111}In .

Amélioration de l'activité molaire :

En médecine nucléaire, l'activité molaire d'un radiopharmaceutique se doit d'être la plus élevée possible pour éviter une mauvaise absorption du traceur et un faible rapport signal/bruit dans les tissus ciblés. Les méthodes classiques visant à l'améliorer consistent généralement à réduire la quantité de précurseur lors du radiomarquage ou à effectuer une purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Cependant, ces méthodes peuvent impacter les rendements radiochimiques (RRC) et allonger le temps de radiosynthèse. En s'appuyant sur la CuAAC, Millward et *coll.* rapportent en 2017 une méthode innovante permettant d'augmenter l'activité molaire sans impacter les conditions de radiomarquage. Cette approche repose sur l'utilisation d'une résine fonctionnalisée par des azotures ayant pour but de piéger les alcynes en excès n'ayant pas réagi lors de la réaction de marquage du 2- $[^{18}\text{F}]$ fluoroéthylazoture (Schéma 23). Testée sur différents composés radiomarqués avec des poids moléculaires différents (288,1 à 1 762,8 g.mol⁻¹), la résine a permis d'éliminer plus de 98 % des alcynes en excès en seulement 20 minutes à température ambiante. Tous les radiotraceurs ont pu être isolés avec des puretés radiochimiques (PRC) supérieures à 99 % et une amélioration de l'activité molaire jusqu'à 200 fois supérieure à celle qui pouvait être obtenu sans cette méthode.¹²⁵

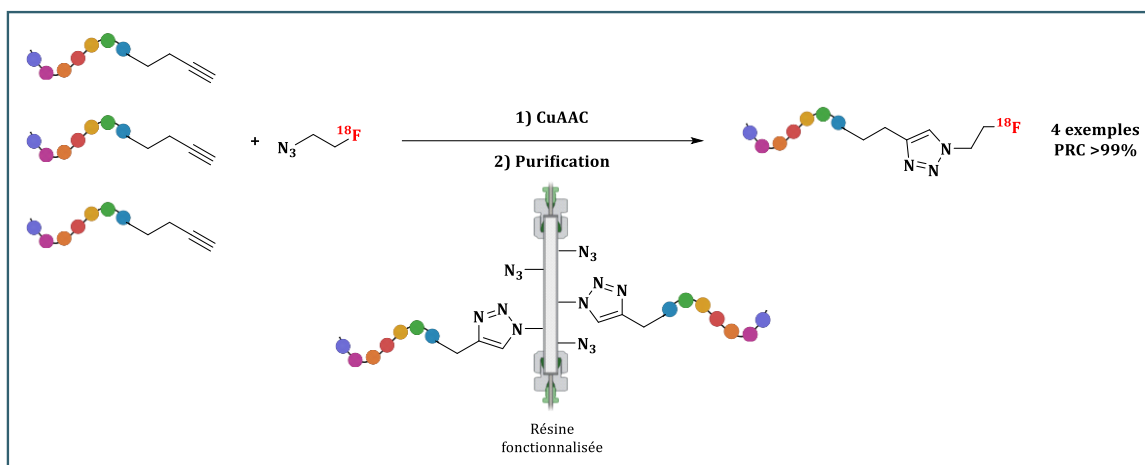


Schéma 23. Amélioration de l'activité molaire de peptides radiomarqués par CuAAC grâce à une résine fonctionnalisée.

Faciliter la radiohalogénéation en deux étapes :

Les radionucléides sont généralement introduits lors de la dernière étape de production d'un radiopharmaceutique *via* l'utilisation de groupements prosthétiques. Cependant, cette méthode n'est pas toujours la plus adéquate et nécessite parfois de radiomarquer la molécule portant l'azoture ou l'alcyne avant de la coupler au vecteur. Des travaux rapportés par D. M. Perrin ont permis de présenter les avantages et les inconvénients d'une approche de fluoration en deux étapes utilisant la CuAAC, comparé à une méthode en une étape (Schéma 24). Cette étude s'est basée sur le radiomarquage au fluor-18 du LLP2A, un peptidomimétique spécifique de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$. Dans le premier cas, un précurseur ester arylboronique a été directement radiomarqué alors que dans le deuxième, un groupement prosthétique contenant un alcyne a été radiomarqué avant la réaction clic avec le LLP2A modifié par un azoture. Si le rendement radiochimique était meilleur pour la méthode en deux étapes ($\approx 30\%$ vs $\approx 15\%$), des activités molaires relativement faibles sont rapportées quelle que soit la méthode ($1,31 \text{ mCi}/\mu\text{mol}$).¹²⁶

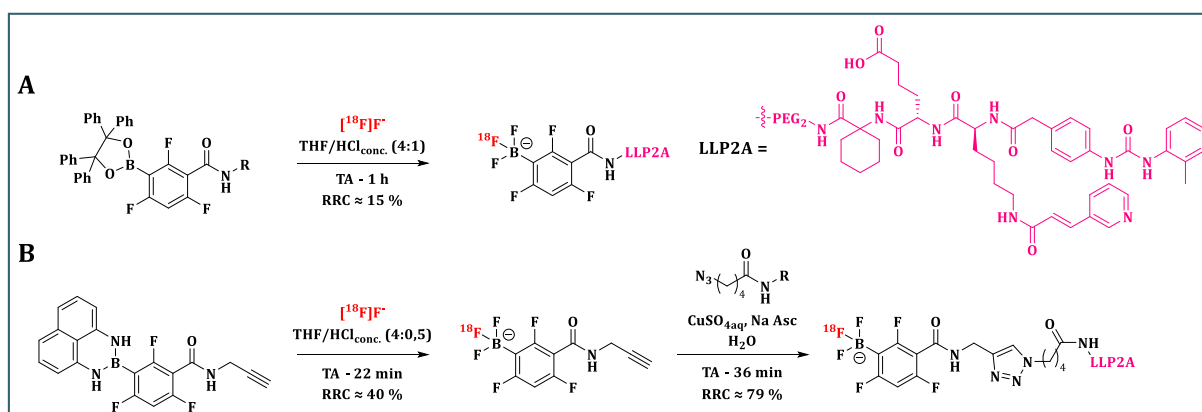


Schéma 24. Radiohalogénéation du peptidomimétique LLP2A. (A) En 1 étape ; (B) En 2 étapes.

Si cette approche en deux temps permet le radiomarquage de molécules plus sensibles, elle peut également être employée dans le développement de protocoles entièrement automatisés. Alors que dans certains cas, les radiomarquages sont effectués par un automate et la

réaction de cycloaddition est effectuée manuellement, d'autres groupes utilisent des automates pour effectuer les deux étapes. C'est le cas notamment de P. Ferraboschi, qui rapporte en 2022 une méthode entièrement automatisée de radiofluoruration d'un analogue du PSMA-617. Alors que le RRC moyen de la radiofluoruration était de 25 à 36 %, celui de la réaction clic était de 92 % en seulement 20 minutes.¹²⁷ Cette approche en deux étapes entièrement automatisée est donc très intéressante en vue d'une transposition en clinique.

Implication dans la radiohalogénéation :

En 2013, Årstad et *coll.* démontrent la possibilité d'obtenir des 5-[¹²⁵I]iodo-1,2,3-triazoles à l'aide d'une réaction « one-pot » médiée par le cuivre (II) entre un alcyne, un azoture et de l'iode-125 (Schéma 25 A).¹²⁸ Basée sur cette étude pionnière, l'équipe de H. Mikula décide de transposer cette réaction à l'astate-211, un radiohalogène émetteur de particules α , pour synthétiser une large gamme de 5-[²¹¹At]astato-1,2,3-triazoles avec des RRC supérieurs à 70 % en seulement 10 minutes (Schéma 25 B).

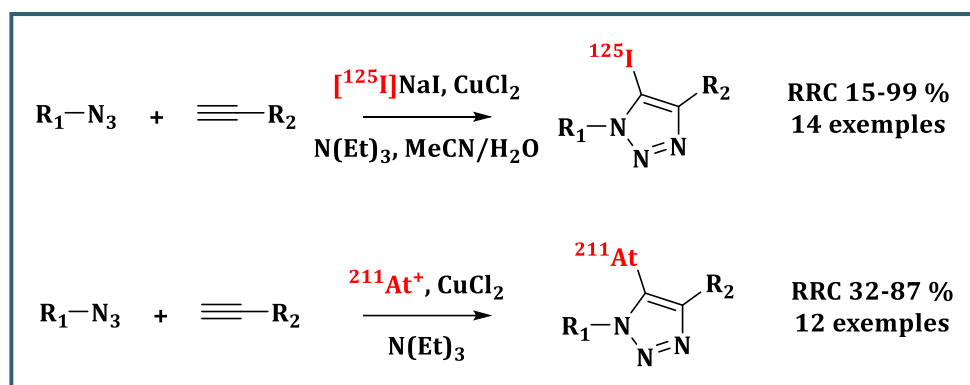


Schéma 25. Synthèse de 5-[¹²⁵I]iodo¹²⁸ et 5-[²¹¹At]astato-1,2,3-triazoles¹²⁹ à l'aide de la réaction CuAAC.

Lors de cette étude, les auteurs émettent l'hypothèse que l'espèce ²¹¹At⁺ est formée par oxydation du cuivre (II) et réagit par substitution électrophile avec un complexe cuivre(I)-triazolylole dinucléaire pour fournir le produit attendu. En revanche, bien que cette stratégie permette la synthèse rapide de sondes radiohalogénées, ces composés présentent des problèmes de stabilité.¹²⁹

Radioméallation :

L'un des exemples de CuAAC les plus parlants de ces dernières années dans ce domaine est son application pour le développement du [⁶⁸Ga]Ga-Trivehexin, un radiotraceur utilisé lors d'une étude clinique comme agent d'imagerie TEP de l'adénocarcinome pancréatique et du cancer de la tête et du cou. Lors de cette étude, un chélateur triazacyclononane-triphosphinate portant des azotures a été couplé *via* la CuAAC à trois nonapeptides cycliques puis radiomarké au gallium-68 (Figure 16). Le radiomarkage a été effectué selon une procédure automatisée dans

une zone stérile permettant d'obtenir une solution saline finale de 450 ± 45 MBq (en partant de 600 MBq) et une PRC mesurée par HPLC supérieure à 95 %. Après avoir administré aux patients le traceur par voie intraveineuse, aucun effet pharmacologique indésirable ou cliniquement détectable n'a été observé. De plus, les analyses d'imagerie TEP ont permis de montrer que 120 minutes après l'injection, le gallium-68 était toujours lié à son vecteur.¹³⁰

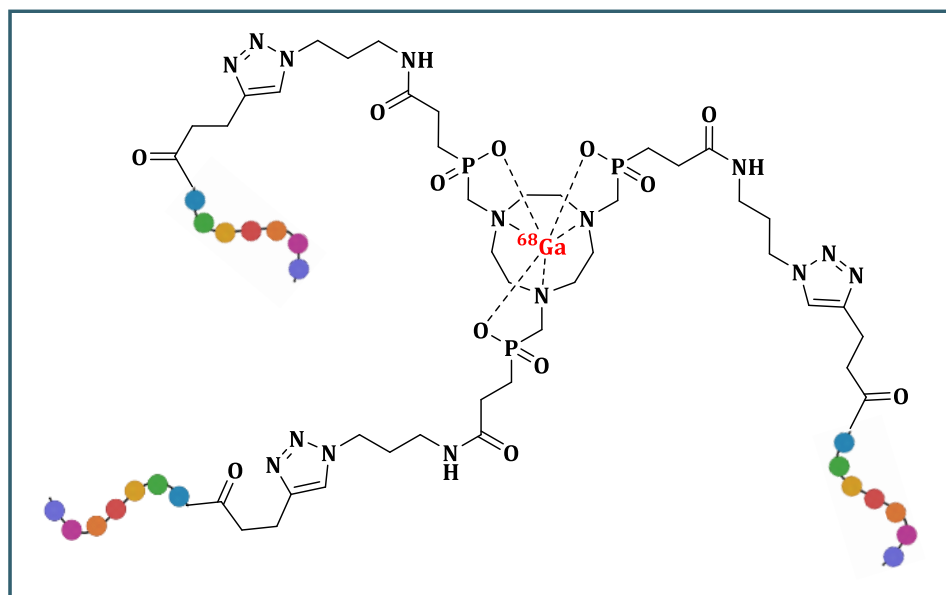


Figure 16. Structure du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Trivehexin.

Malgré les résultats encourageants de l'utilisation de la CuAAC pour la radioméallation, il est nécessaire de faire attention à ce qu'il n'y ait plus de traces de catalyseur étant donné la toxicité du cuivre vis-à-vis des cellules, mais aussi pour éviter une compétition avec le radiométal ou une transméallation. En effet, au vu de la quantité de catalyseur très élevée par rapport au radiométal, dans certains cas, le chélatant peut coordonner le catalyseur au cuivre plutôt que le radiométal. Pour limiter ces problèmes, diverses méthodes ont été développées au cours des dernières années comme par exemple l'utilisation de sulfure de sodium pour faire précipiter le catalyseur permettant son élimination par filtration,¹³¹ ou encore l'utilisation de chélatants protégés, permettant la purification du cuivre (I) avant l'étape de déprotection et de radiomarquage.¹³²

Impact sur les caractéristiques du radiopharmaceutique :

Alors que la CuAAC a su se montrer utile dans la production des radiopharmaceutiques, il est intéressant de noter que le 1,2,3-triazole synthétisé peut également avoir un impact sur ses propriétés. Certaines études ont montré que la présence de ce motif permettait d'augmenter la stabilité métabolique,¹³³ l'affinité de liaison des radiopharmaceutiques¹³⁴ ou encore de réduire la défluorination¹³⁵. Cependant, des travaux réalisés par l'équipe de F. Benard ont montré que la présence d'un triazole n'était pas toujours avantageuse, avec une absorption rénale plus

importante pour la molécule obtenue par cycloaddition comparée à la version sans le triazole (7,6 ± 1,0 % ID/g vs 2,2 ± 0,5 % ID/g).¹³⁶

II-4.2. SPAAC

Radiohalogénéation :

En 2011, L. S. Campbell-Verduyn et son équipe rapportent le premier exemple de SPAAC appliqué au radiomarquage au fluor-18 d'un analogue de la bombésine, souvent utilisée pour l'imagerie tumorale. Après modification du peptide par un DIBAC, cette méthode a permis la synthèse de trois radiotraceurs avec des RRC de 19, 31 et 37 % en seulement 15 minutes, tout en conservant l'affinité de la bombésine pour sa cible (Schéma 26).¹³⁷

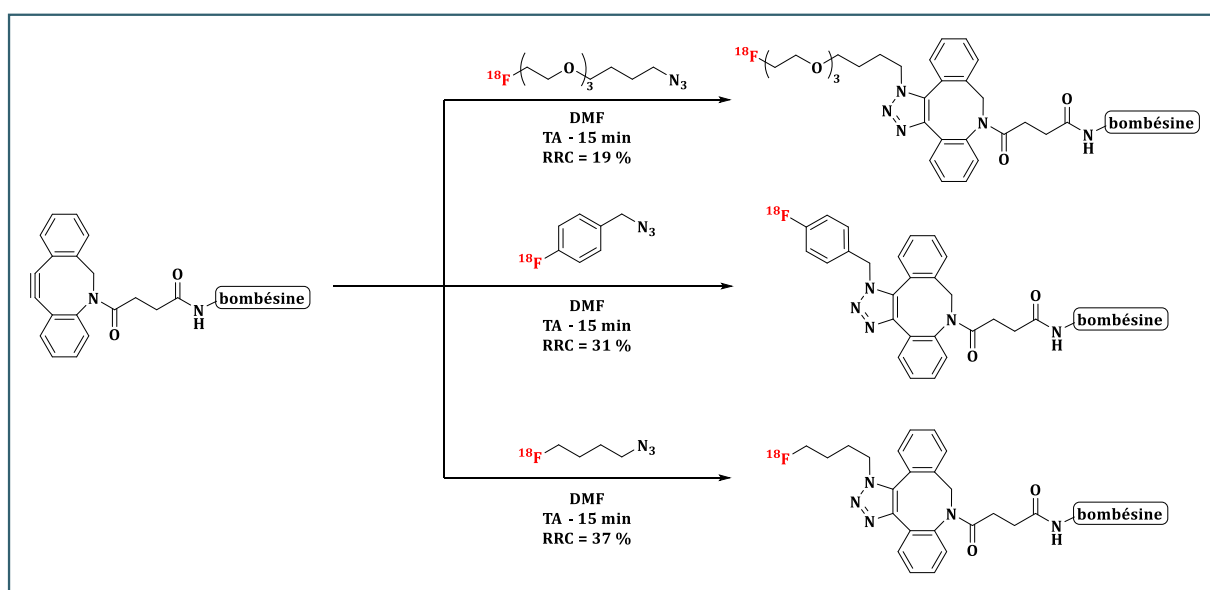


Schéma 26. Marquage au fluor-18 d'un analogue de la bombésine.

Basée sur une première étude de 2016 utilisant la CuAAC pour radiomarquer au fluor-18 un nanobody 2Rs15d spécifique du récepteur HER2, exprimé dans les cancers du sein, des ovaires ou colorectal,¹³⁸ l'équipe de M. R. Zalutsky décrit deux ans plus tard une étude utilisant l'approche SPAAC pour tenter d'améliorer l'efficacité de la réaction et diminuer le temps de la radiosynthèse (Schéma 27). Dans cette étude, le même nanobody a été pré-modifié par une fonction azoture pour réaction avec un DBCO marqué au fluor-18. Bien que cette réaction se présentait comme plus rapide que la CuAAC (2 vs 3 heures), le rendement global était similaire à cause du rendement de conjugaison beaucoup plus faible (23,9 ± 6,9 % vs 40,8 ± 9,1 %). Cependant, le nanobody modifié par SPAAC a montré une excellente affinité et immunoréactivité pour HER2 ainsi qu'une absorption tumorale à deux heures similaire à celle obtenue pour le même nanobody modifié par un *N*-succinimidyl-4-guanidinométhyl-3-iodobenzoate (6,42 ± 1,70 % ID/g vs 4,78 ± 1,39 % ID/g).¹³⁹

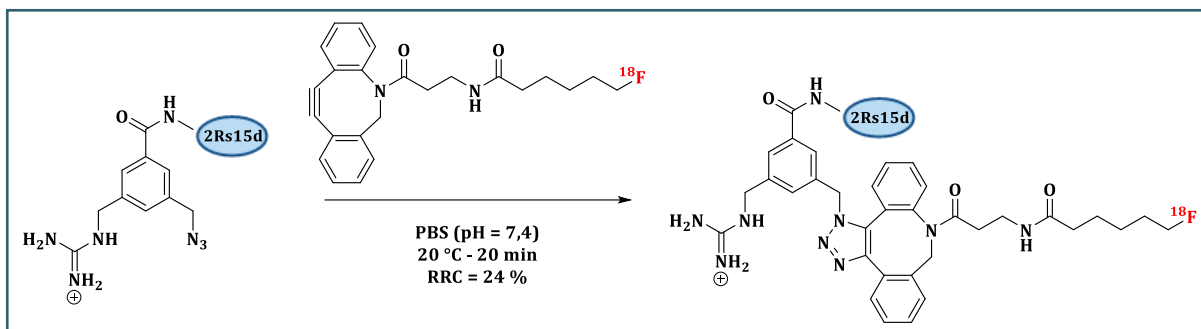


Schéma 27. Marquage du nanobody 2Rs15d au fluor-18 en utilisant la réaction SPAAC.

Click-then-chelate :

Au vu des potentiels problèmes liés à l'utilisation de la CuAAC pour la conjugaison de chélatants, il n'est pas étonnant que la version sans cuivre se soit présentée comme une méthode alternative populaire pour la radioméallation. La méthode la plus utilisée pour y parvenir est celle du « click-then-chelate ». Cette stratégie a, par exemple, été utilisée en 2014, par C. J. Anderson et son équipe, pour le marquage au cuivre-64 du cétuximab. Après avoir modifié l'anticorps en y couplant des fonctions azotures, le macrocycle DBCO-CB-TE1A1P a été greffé par SPAAC et radiomarké par du cuivre-64 avec un RRC supérieur à 90 % en 60 minutes à 40 °C. Alors qu'en utilisant un ester activé, seulement 1,5 chélatants par anticorps étaient mesurés, l'approche clic a permis l'introduction de 9 chélateurs par anticorps sans impacter l'affinité de l'anticorps (Schéma 28). Ces très bons résultats ont même pu être validés sur un autre agent chélatant, le DBCO-PEG₄-CB-TE1K1P, avec la encore 9 chélateurs par anticorps.¹⁴⁰

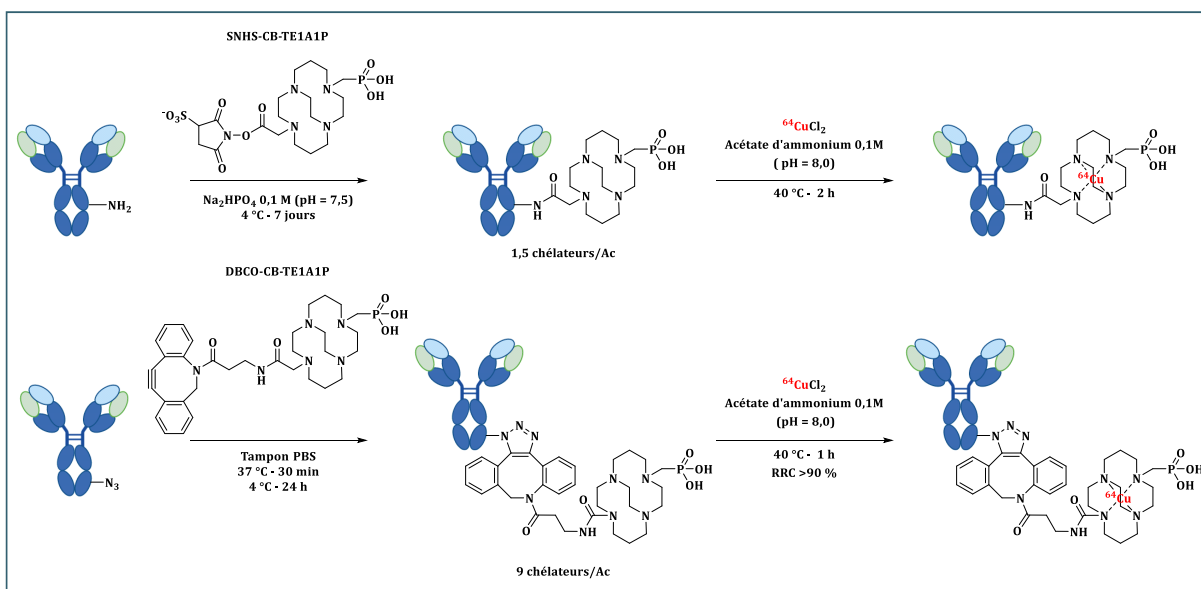


Schéma 28. Comparaison de la stratégie « click-then-chelate » avec l'approche conventionnelle pour le radiomarquage d'un anticorps au cuivre-64.

Chelate-then-click :

En 2019, la stratégie inverse de « chelate-then-click » est utilisée pour développer un nouvel agent d'imagerie du pool sanguin en radiomarquant une albumine de sérum bovin (BSA) au ^{99m}Tc . En raison d'une étape de complexation à 100 °C, non compatible avec la protéine, Kang et *al.* proposent une approche avec d'abord l'étape de radiomarquage, puis la réaction de cycloaddition. Pour y parvenir, la 2,2'-dipicolylamine, un chélatant fonctionnalisé par un azoture a été utilisé pour complexer l'intermédiaire $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, avant de le faire réagir avec la BSA modifiée par un DBCO. Après une première étape de marquage réalisée à 100 °C pendant 30 minutes conduisant à des RRC supérieurs à 98 %, la réaction clic à 37 °C pendant 30 minutes permet d'obtenir des rendements de couplage allant de 76 à 99 %, en fonction du nombre de fragments DBCO liés à la protéine (Schéma 29).¹⁴¹

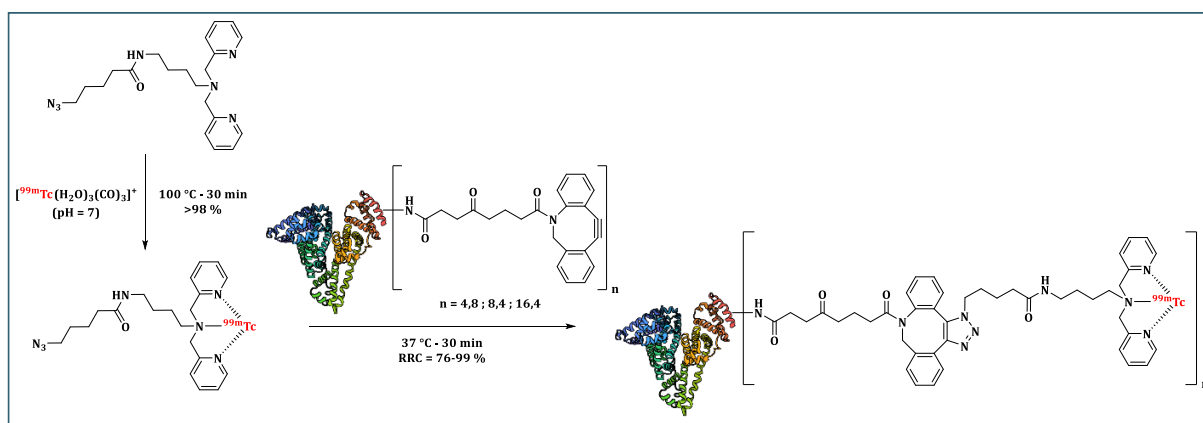


Schéma 29. Utilisation de la stratégie « chelate-then-click » pour le marquage d'une BSA au technétium-99m.

Bioconjugaison site-spécifique :

La fixation aléatoire de chélateurs au niveau des résidus lysines de la biomolécule, représente la stratégie la plus utilisée pour la production des radiopharmaceutiques. Cependant, comme discuté précédemment, cette méthode entraîne l'obtention d'une solution hétérogène de radiotracer pouvant être problématique une fois leur utilisation *in vitro* ou *in vivo*. Pour pallier ces problèmes, il est possible de modifier la biomolécule de façon « site-spécifique ». La grande majorité de ces techniques utilisent les azotures plutôt que les alcynes contraints pour modifier spécifiquement une biomolécule car ils sont souvent mieux tolérés biologiquement.

En 2020 par exemple, Boros et *coll.* utilisent cette approche pour le radiomarquage à l'indium-111 et au zirconium-89 d'un anticorps anti-HER2. Cette méthode est rendue « site-spécifique » avec la modification au préalable de l'anticorps par des *p*-azidométhylphénylalanines, des résidus non naturels possédant dans leur structure des azotures. Après avoir modifié les anticorps par quatre azotures et couplés *via* SPAAC les composés DBCO-PEG₄-DFO et DBCO-PEG₄-DO3A, ceux-ci ont été radiomarqués au ^{89}Zr et ^{111}In avec des rendements de 62 à 84 % et 45 %, respectivement.

respectivement. Comparativement aux conjugués glycosylés conventionnels, un meilleur profil de biodistribution a été observé pour les deux radioimmunoconjugués étudiés.¹⁴²

Contrairement aux méthodes classiques, cette stratégie permet l'obtention de radioimmunoconjugués de façon fiable et reproductible, à tel point qu'un essai clinique chez l'homme pour des patients atteints de cancer du sein, de l'estomac et de la vessie a été initié avec le [⁸⁹Zr]Zr-DFO-pertuzumab (NCT04692831).

Utilisation en glyco-ingénierie :

Depuis les études de marquage de cellules métaboliques réalisées par C. R. Bertozzi sur les poissons zèbres, plusieurs travaux se sont portés sur la SPAAC pour faire de la glyco-ingénierie. Parmi ces travaux, on retrouve ceux de Z. Liu en 2020, qui utilise cette réaction pour suivre en temps réel des bactéries intestinales par imagerie TEP (Figure 17). Des bactéries ont été modifiées afin d'exprimer à leur surface des sucres fonctionnalisés par des azotures. Grâce à la SPAAC, ces bactéries ont été radiomarquées par un [⁶⁴Cu]Cu-NOTA-DBCO, permettant l'étude *in vivo* de leur trajet et la compréhension de leurs apports dans le système immunitaire.¹⁴³

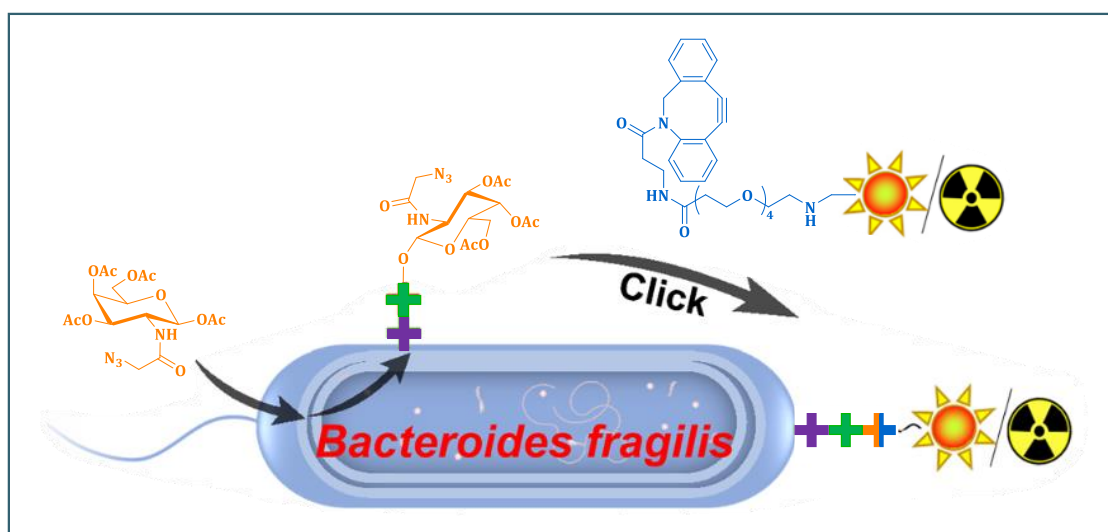


Figure 17. Marquage métabolique de *bacteroides fragilis* au cuivre-64 par SPAAC. Cette image a été reproduite avec la permission de la référence (¹⁴³).

Malgré toutes ces applications, il est important de noter que les réactions SPAAC présentent certains désavantages. Comme pour les autres réactions de cycloaddition [3+2], deux régioisomères ayant des propriétés biochimiques et biophysiques potentiellement différentes peuvent être obtenus. La pharmacocinétique de la sonde, en particulier dans le cas des petites molécules, peut également être modifiée par l'empreinte polycyclique et hydrophobe des cyclooctynes. Ce problème a, par exemple, été mis en évidence par T. L. Ross et son équipe en 2018, lors d'une comparaison entre deux radiotraceurs obtenus par SPAAC ou par CuAAC.

L'absorption tumorale plus faible pour la SPAAC ($0,5 \pm 0,1$ vs $1,7 \pm 0,1$ %ID/g) a été attribuée à l'hydrophobie plus importante de la molécule.¹⁴⁴

II-4.3. IEDDA

Radiohalogénéation :

En 2010, Fox et *coll.* rapportent le premier exemple de radiomarquage au fluor-18 basé sur la réaction entre une 3,6-di(2-pyridyl)-s-tétrazine et un TCO (Schéma 30). Après l'optimisation des conditions, le TCO marqué au fluor-18 a été obtenu avec un RRC de 71 % à partir d'un précurseur tosylé. La réaction de couplage avec la tétrazine a conduit au composé attendu en seulement 10 secondes et avec un RRC de 98 %. Enfin, alors que dans un milieu MeCN/H₂O (1:1), une dégradation de la molécule finale à hauteur de 11 % pouvait être observée après 4 heures d'incubation et plus de 95 % après 48 heures, aucune dégradation n'a été observée en PBS.¹⁴⁵

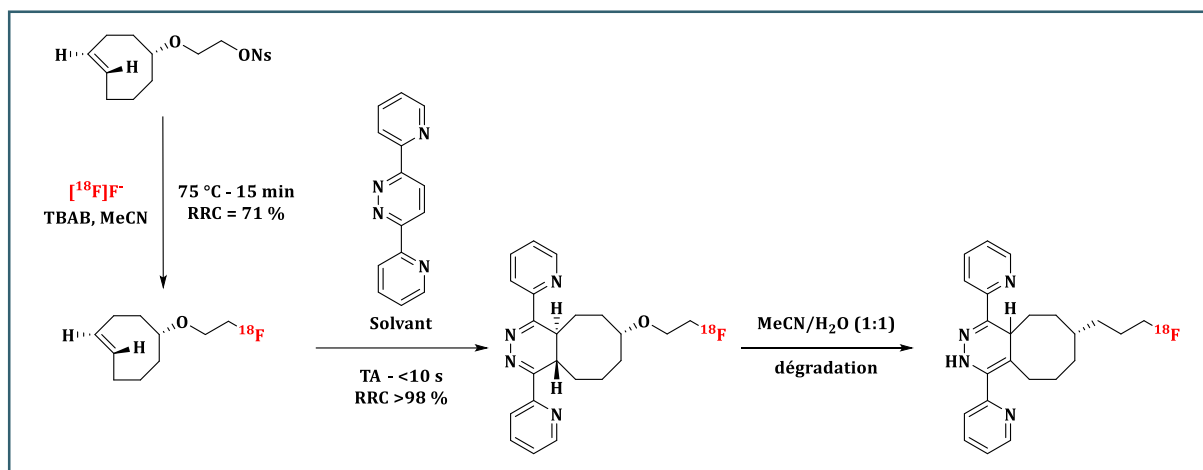


Schéma 30. Marquage d'un TCO au fluor-18 par IEDDA.

En 2016, l'équipe de J. F. Valliant étend cette méthode en la transposant à un autre radiohalogène, l'iode-125. Lors de cette étude, une tétrazine portant l'iode radioactif a été couplée à un anticorps anti-VEGFR2 pré-modifié par un TCO, puis les résultats ont été comparés à la méthode d'iodation directe. Alors qu'avec la méthode directe un RRC de seulement 25 % a été obtenu, la réaction clic a permis de multiplier quasiment par trois cette valeur, avec un RRC de 69%. De plus, aucune perte de spécificité pour le récepteur n'a été observée.¹⁴⁶

Radioméallation :

Comme pour les autres systèmes, d'autres recherches se sont portées sur le développement de radiotraceurs marqués par des radiométaux. Les premiers travaux dans ce sens ont été rapportés par Lewis et *al.* en 2011 (Schéma 31). Ici, l'anticorps trastuzumab spécifique du ciblage du récepteur HER2 est couplé aux deux radionucléides les plus utilisés en

TEP, à savoir le cuivre-64 et le zirconium-89. Pour cela, un norbornène est fixé sur l'anticorps et celui-ci est couplé à une tétrazine possédant soit un DOTA, soit un DFO qui sont les agents chélatants les plus utilisés pour ces métaux. Alors que des temps d'incubation importants sont nécessaires pour modifier des anticorps par du DOTA ou du DFO avec les méthodes classiques, l'approche utilisant la chimie clic est beaucoup plus rapide. De plus, il est intéressant de noter que cette méthode est très robuste puisque les RRC sont similaires, que la réaction soit effectuée le jour même de la modification de l'anticorps par le norbornène ou 4 semaines plus tard, voir plus (à conditions qu'il soit stocké à 4 °C).¹⁴⁷

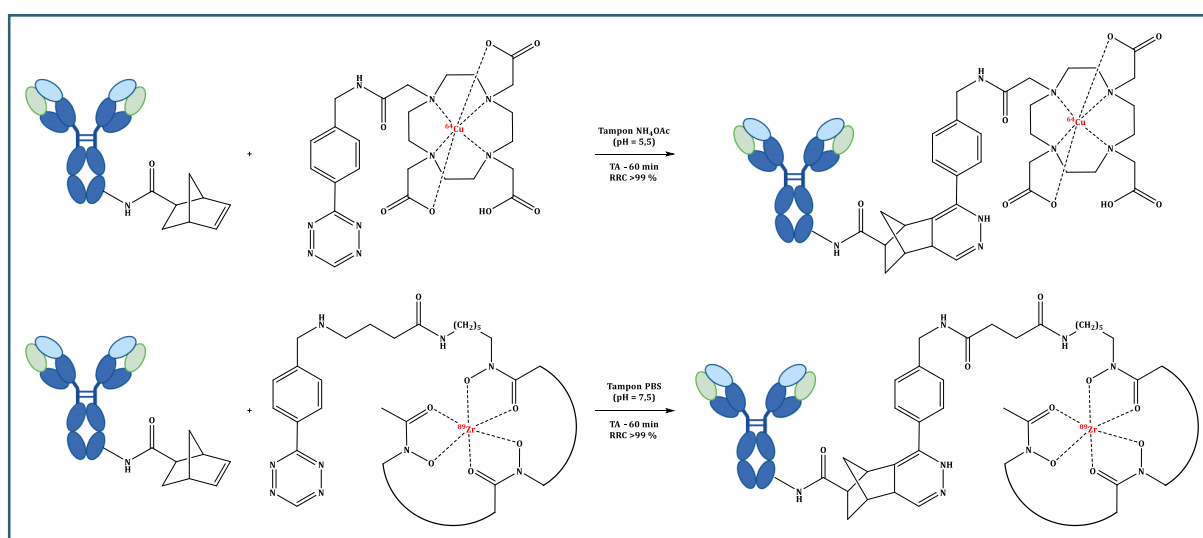


Schéma 31. Utilisation de la IEDDA pour le marquage au cuivre-64 et au zirconium-89 du trastuzumab.

En 2018, ce même groupe applique ce système au marquage d'un anticorps à l'actinium-225 afin de le comparer à l'approche en deux étapes déjà utilisée en clinique (Schéma 32). Pour y parvenir, un DOTA-PEG₇-Tz est tout d'abord marqué à l'actinium-225 pendant une heure à 37 °C afin d'obtenir le groupement prosthétique radiomarqué avec des RRC allant de 66 à 96 %, en fonction de l'activité de départ utilisée. Ensuite, la réaction clic est réalisée avec le 5B1-TCO et le huA33-TCO, deux anticorps pré-modifiés, en seulement 5 minutes et avec une PRC supérieure à 98 % dans les deux cas. La conclusion de cette étude est que cette stratégie de marquage permet d'obtenir des RRC largement supérieurs à la méthode classique (≈ 10 %). Une bonne stabilité *in vitro* est constatée, avec une PRC de plus de 70 % même après 10 jours. Enfin, pour l'anticorps 5B1 une activité massique similaire à la méthode utilisée en clinique a été obtenue (2,8 à 4,6 MBq/mg vs 3,0 à 4,4 MBq/mg).¹⁴⁸

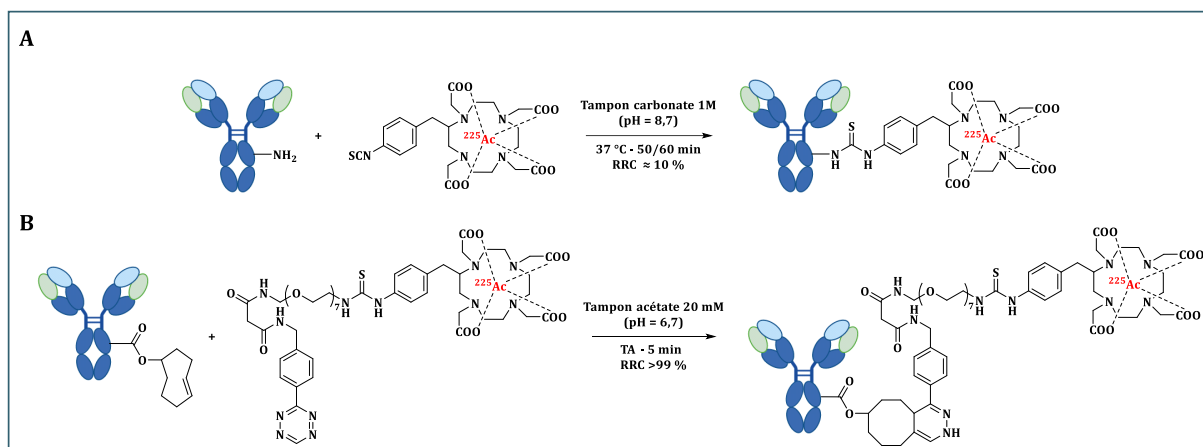


Schéma 32. Marquage d'un anticorps à l'actinium-225. (A) Méthode actuellement utilisée pour la production clinique d'immunoconjugué marqué au ^{225}Ac ; (B) Stratégie de radiomarquage proposée utilisant le système IEDDA.

Bioconjugaison site-spécifique :

Comme pour la SPAAC, il est également possible d'utiliser la réaction IEDDA pour radiomarquer des biomolécules de façon site spécifique. On peut par exemple citer les travaux de l'équipe de G. Vaidyanathan qui, en 2021, modifie un VHH (Variable Heavy domain) au niveau d'un résidu thiol en position C-terminale *via* l'utilisation d'un maléimide portant une tétrazine (Schéma 33). Une fois fixée, la biomolécule est marquée au fluor-18 à l'aide d'un groupement TCO contenant un linker clivable avec un RRC global de 9 %. Le radiotracer ^{18}F]F-5F7GGC a ensuite été injecté à des souris porteuses de tumeurs exprimant HER2, et l'imagerie TEP/CT a montré un rapport tumeur/rein plus élevé qu'une sonde sans linker.¹⁴⁹

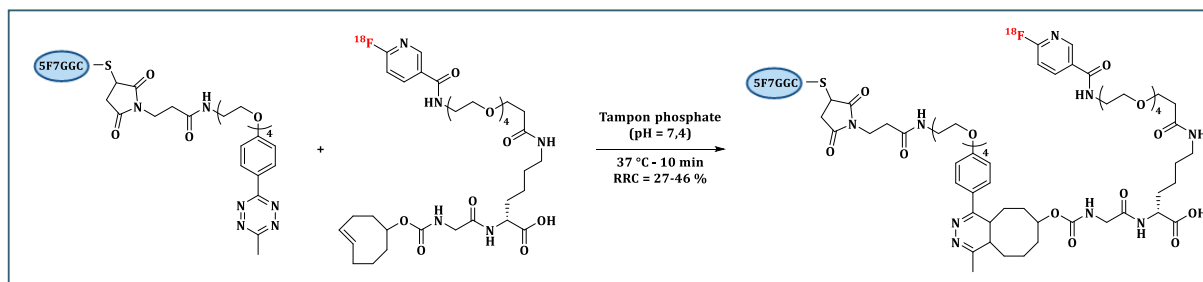


Schéma 33. Marquage site-spécifique d'un VHH au fluor-18 par chimie clic.

II-5. Préciblage

De par leur capacité à cibler des antigènes spécifiques exprimés à la surface des cellules tumorales, les anticorps sont utilisés depuis de nombreuses années en tant que vecteur pour l'administration de radionucléides permettant d'imager ou de traiter les cancers. Leur longue demi-vie biologique (10 à 21 jours pour les IgG)¹⁵⁰ représente un avantage pour le ciblage des antigènes. La biodistribution optimale de ces vecteurs peut nécessiter plusieurs jours voire semaines, ce qui n'est pas forcément adapté à des radionucléides de courte demi-vie. Si certains radionucléides à demi-vie suffisamment longue comme le ^{177}Lu (6,71 jours) ou le ^{89}Zr (3,3 jours) sont utilisés, la circulation prolongée des radioimmunoconjugués résultants peut entraîner

plusieurs complications : i) une exposition inutile des tissus sains aux rayonnements ionisants, en particulier la moelle osseuse¹⁵¹ ; ii) un rapport optimal tumeur/sang long à obtenir ; iii) un indice thérapeutique non-optimal.¹⁵² C'est pourquoi, pour pallier ces problèmes tout en conservant les propriétés de ciblage des anticorps, des approches de ciblage en deux temps, également appelées préciblage, ont été imaginées (Figure 18).

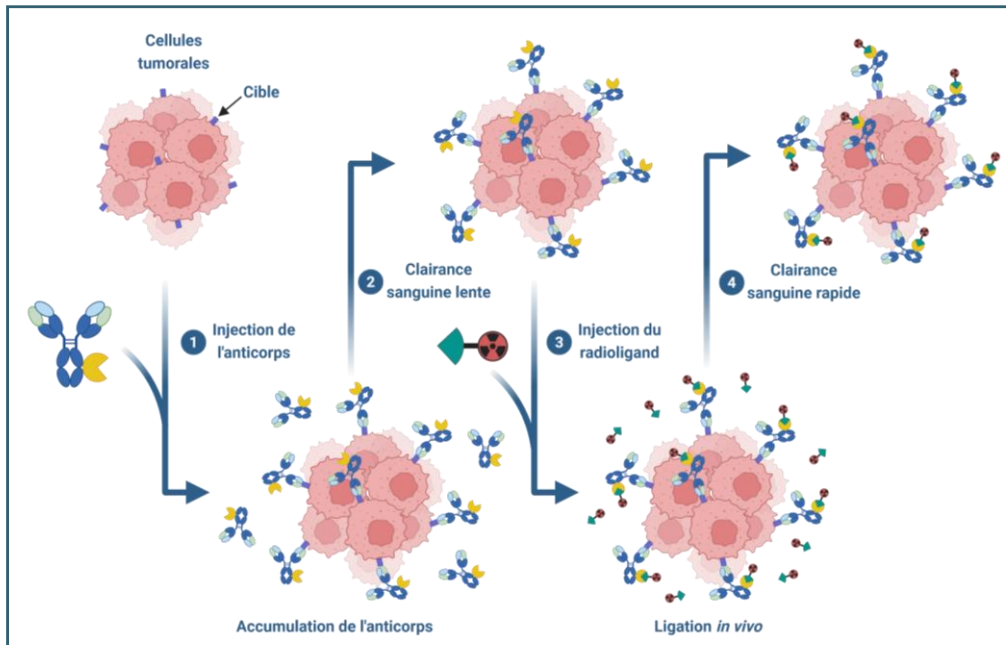


Figure 18. Représentation de la stratégie de préciblage *in vivo*. Cette image a été reproduite à partir de la référence (152).

Introduite dans les années 1980 par D. T. Reardan et D. Goodwin,^{153,154} ces méthodes consistent à administrer un anticorps modifié non-radiomarqué puis, après que celui-ci ait eu le temps de s'accumuler au niveau du site tumoral et de s'éliminer de la circulation sanguine, à injecter une petite molécule radiomarquée capable de venir se fixer sur le vecteur. Afin d'éviter les effets radiocytotoxiques au niveau des tissus sains, la pharmacocinétique de la petite molécule doit être la plus rapide possible tout en ayant le temps de se fixer rapidement à l'anticorps. Par conséquent, cette méthode diminue le temps de circulation de la radioactivité dans le corps, limitant considérablement l'irradiation des tissus sains, et facilite l'utilisation de radionucléide de plus faible demi-vie qui sont incompatibles avec les méthodes de ciblage classiques ou encore limite le signal non spécifique lors de l'examen diagnostique par imagerie TEP ou TEMP, améliorant les images.¹⁵²

En raison de son utilisation *in vivo*, les stratégies de préciblage doivent absolument impliquer des réactifs extrêmement sélectifs entre eux afin d'éviter des réactions indésirables avec la myriade de fonctions chimiques présentes dans le milieu biologique. Au cours des 40 dernières années, quatre grandes approches ont émergé (Figure 19) : i) le système (strept)avidine/biotine ; ii) le

système anticorps bispécifique/haptène ; iii) l'hybridation d'oligonucléotides complémentaires ; iv) la chimie clic.

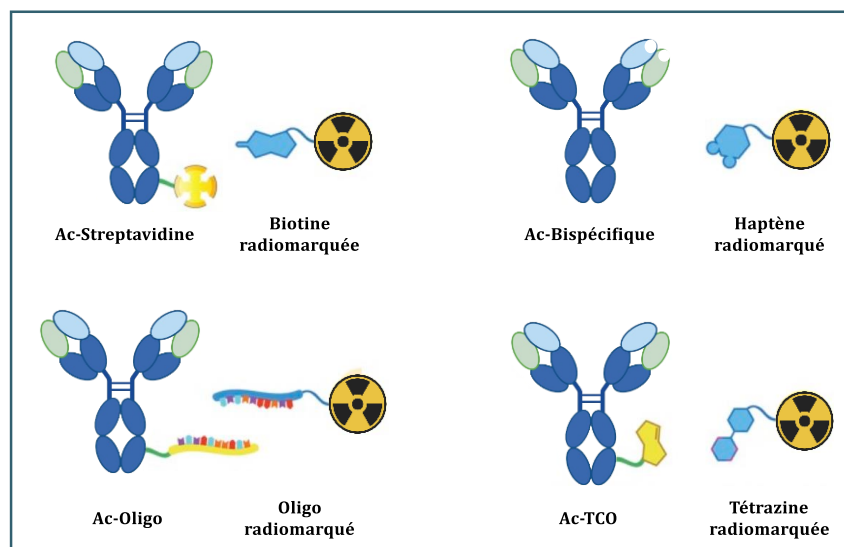


Figure 19. Représentation des 4 plus grandes approches de préciblage. Cette image a été reproduite à partir de la référence (152).

Grâce à leur constante d'affinité (de 10^{13} à $10^{15} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), faisant partie des interactions non covalentes les plus fortes, les approches de préciblage basées sur le système (strept)avidine/biotine ont été explorées.¹⁵⁵ Ces systèmes, en particulier ceux utilisant une streptavidine, ont même pu être utilisés dans plusieurs essais cliniques de phase I et II, montrant une résistance à des doses plus élevées d'yttrium-90 pour des patients ayant un lymphome non-hodgkinien traités par préciblage comparé à ceux traités par radioimmunothérapie classique¹⁵⁶ ou encore une amélioration de la médiane de survie chez des patients atteints d'un gliome de haut grade.¹⁵⁷ Cependant, toutes ces études ont révélé un taux accru d'anticorps humain anti-streptavidine pour les patients recevant un immunoconjugué modifié par une streptavidine. A des taux suffisamment élevés, des réactions allergiques liées aux traitements peuvent être observées augmentant les risques de décès.

Une deuxième approche de préciblage utilisée *in vivo* se base sur des anticorps bispécifiques permettant à la fois de se fixer à l'antigène présent sur la tumeur et à un haptène radiomarqué.¹⁵⁸ Cette stratégie peut être effectuée de trois manières différentes : i) l'immunoconjugué est constitué d'un domaine de liaison spécifique à un antigène et d'un autre domaine spécifique à un haptène ; ii) l'immunoconjugué est constitué de deux fragments différents mais le radioligand utilisé est bivalent ; iii) les anticorps bispécifiques portent deux fragments spécifiques à l'antigène et un fragment supplémentaire pour se lier à un haptène d'histamine-succinyl-glycine. Cependant, même si cette méthode de préciblage a pu être utilisée en clinique, la difficulté et les coûts de production importants des anticorps bispécifiques freinent le développement de ces méthodes.¹⁵²

L'hybridation d'oligonucléotides complémentaires peut également être utilisée en préciblage.¹⁵⁹ Pour pallier les problèmes de vulnérabilité des fragments d'ADN et d'ARN natifs face aux nucléases, des analogues synthétiques plus résistants comme les oligomères morpholino phosphorodiamidates ou des acides peptidiques nucléiques ont été développés. En 2011, Hnatowich et *coll.* rapportent une étude de préciblage utilisant ce type d'oligomères pour le marquage à l'yttrium-90 d'un anticorps CC49, conduisant à des concentrations d'activité tumorale de $7,2 \pm 2,2$ % ID/g et un rapport tumeur/sang supérieur à 25.¹⁶⁰ Concernant les acides peptidiques nucléiques, la preuve de concept pour de l'imagerie TEMP au ^{99m}Tc a été réalisée en 2015. Lors de cette étude, réalisée sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées, la visualisation de la tumeur était possible 1 heure après l'injection du traceur.¹⁶¹ Cependant, malgré ces recherches précliniques, aucun essai clinique utilisant cette approche n'a encore été réalisé.

Au vu de tous les avantages présentés précédemment concernant la chimie clic et les réactions bio-orthogonales (rapidité, spécificité, ...), il n'est pas étonnant que cette chimie suscite un grand intérêt pour le préciblage *in vivo*. En 2011, Van Dongen et *al.* rapportent la première étude basée sur la ligation de Staudinger comme stratégie de préciblage en utilisant un anticorps modifié par des azotures, combinés à plusieurs phosphines radiomarquées au ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr, ¹⁷⁷Lu ou encore ¹²³I (Schéma 34). Bien que les modifications effectuées sur l'anticorps n'aient montrées aucun changement significatif sur leur immunoréactivité, leur pharmacocinétique ou leur absorption tumorale chez la souris, aucune ligation n'a été observée. Cette étude a conduit à la conclusion que cette réaction n'est pas applicable dans un système vivant en l'état, notamment en raison de l'instabilité des phosphines en milieu oxydant et des cinétiques de réactions lentes ($k \approx 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).¹⁶²

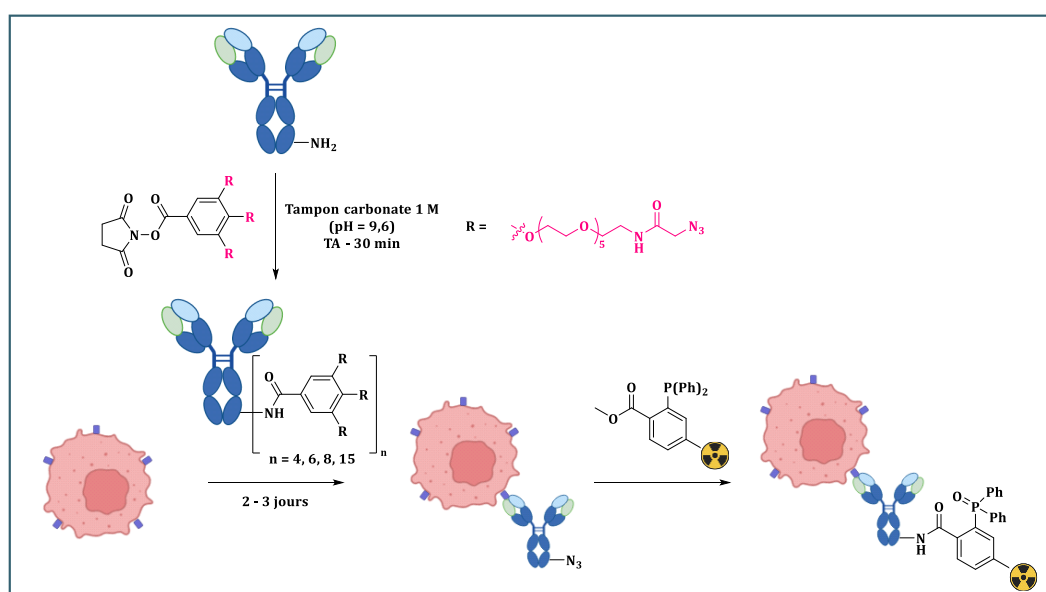


Schéma 34. Représentation de la stratégie de préciblage utilisant la ligation de Staudinger.

Face à ces différents inconvénients, les recherches se sont tournées vers d'autres réactions de chimie clic plus rapides, comme les cycloadditions entre les azotures et les alcynes. En raison des problèmes présentés précédemment concernant la CuAAC, son application dans des systèmes vivants est à l'heure actuelle encore difficile. En revanche, avec le développement des nouvelles générations de cyclooctynes permettant d'améliorer les cinétiques de réactions avec les azotures, d'autres groupes se sont intéressés à la SPAAC comme méthode de préciblage.

Les premiers travaux, publiés en 2013 par l'équipe de M. S. Robillard, se sont basés sur l'utilisation d'un anticorps rituximab fonctionnalisé par des azotures trivalents et différents cyclooctynes portant un DOTA pour le marquage au lutécium-177. En raison de leurs réactivités similaires ($k = 4,2$ à $12 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) mais de leurs différences de fragments lipophiles (0, 1 ou 2 cycles phényles), deux DIFO ainsi qu'un DIBO ont été sélectionnés pour cette étude (Schéma 35).

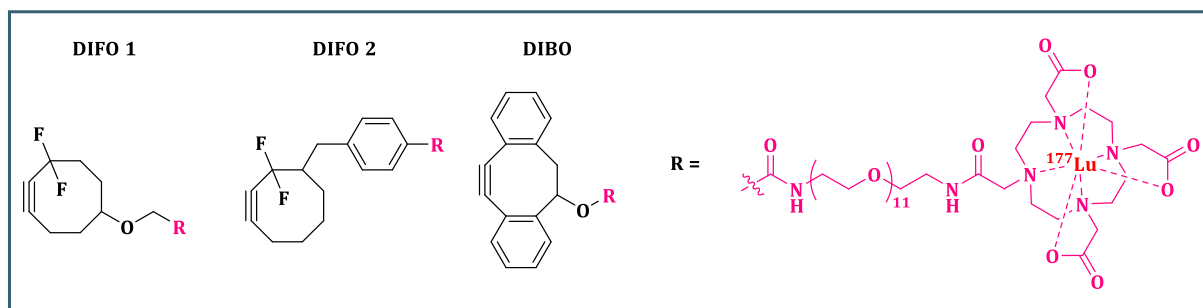


Schéma 35. Structure des trois sondes marquées au ^{177}Lu utilisées par M. S. Robillard.¹⁶³

Après une étape de radiomarquage des trois cyclooctynes au ^{177}Lu réalisée à 45°C pendant 15 minutes, conduisant toutes à des réactions quantitatives et une PRC supérieure à 95 %, des tests de stabilité ont été réalisés. Alors qu'en PBS, aucun signe d'hydrolyse ou de démétallation n'a été observé pour les trois sondes après 20 heures d'incubation (plus de 93 % de sonde intacte), ces valeurs ont considérablement chuté dans un milieu contenant 50 % de sérum murin (jusqu'à 84 % de dégradation). Une fois ces tests effectués, les sondes ont été incubées avec du rituximab fonctionnalisé par 20 azotures pour voir l'efficacité de la SPAAC. Malgré des rendements de 75 à 85 % après 20 heures en PBS, les auteurs ont conclu que la réactivité des cyclooctynes étudiés était trop faible pour être transposée à du préciblage *in vivo*. De plus, en raison de la présence de fragments hydrophobes et de groupes hydrophiles chargés négativement liés au DOTA, ces sondes semblaient réagir avec l'albumine lorsque la réaction était réalisée en présence d'albumine sérique de souris.¹⁶³

Bien que plus récemment An et coll. ont rapporté une étude d'imagerie TEP préciblée utilisant le radiotracer $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-L-NETA-DBCO}$ couplé à des liposomes porteurs d'azotures, montrant une absorption tumorale plus importante qu'un groupe témoin à 2 heures post-injection ($0,87 \pm 0,05 \text{ \% ID/g}$ vs $0,31 \pm 0,03 \text{ \% ID/g}$),¹⁶⁴ les résultats les plus intéressants concernent les travaux de S. I. Park en 2018. Dans cette étude la SPAAC est utilisée dans une stratégie de

nanoradioimmunothérapie préciblée pour le traitement du lymphome non-hodgkinien. Après avoir injecté du rituximab, un anti-CD20 fonctionnalisé par des DBCO, les souris ont reçu 24 heures plus tard un dendrimère marqué à l'yttrium-90 et contenant 29 azotures. Une étude thérapeutique réalisée avec cette stratégie ainsi que sur une cohorte témoin recevant seulement l'anticorps modifié et une autre l'approche d'immunothérapie préciblée sans radioactivité, ont permis de montrer l'impact de la SPAAC en préciblage (Figure 20). Alors que la médiane de survie était de seulement 42 jours pour la cohorte témoin, cette valeur a quasiment doublé (80 jours) lorsque le dendrimère non-radioactif marqué à l'yttrium-89 était injecté 24 heures après l'administration de l'anticorps. Néanmoins, les résultats les plus impressionnants ont été obtenus lorsque 0,28 GBq/kg de polymère marqué à l'yttrium-90 ont été injectés, avec une survie de toutes les souris jusqu'à 150 jours, soit la fin de l'étude.¹⁶⁵

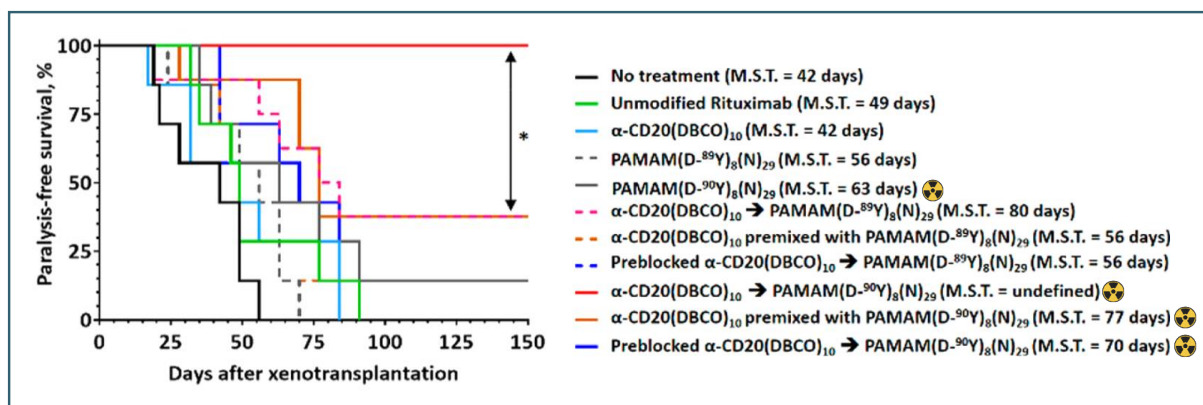


Figure 20. Courbes de survie de Kaplan – Meier de souris porteuses de tumeurs xéno greffées Raji (sans tumeur supérieure à 1 000 mm³) après avoir reçu différents traitements (n = 6 par groupe ; * indique p < 0,05 ; MST indique le temps de survie médian). Cette image a été reproduite avec la permission de la référence (¹⁶⁵).

Si la réaction IEDDA a fait l'objet de nombreuses études pour différentes applications depuis son introduction au domaine des radiopharmaceutiques, c'est dans le préciblage que le couple TCO/Tz a démontré le plus grand intérêt. En 2010, l'équipe de M. S. Robillard rapporte la première utilisation d'une réaction bio-orthogonale chez des animaux vivants pour faire de l'imagerie, en couplant un dérivé tétrazine marqué à l'indium-111 avec l'anticorps CC49 fonctionnalisé au niveau de ses résidus lysines par 7,4 fragments PEG₁₂-TCO. Malgré une dégradation assez importante de [¹¹¹In]In-Tz-PEG₁₂-DOTA dans le sang (jusqu'à 90 % au bout de 20 heures), des études cinétiques réalisées en PBS, sérum et sang ont permis de montrer que la tétrazine devrait malgré tout être assez stable pendant toute la durée de sa présence dans l'organisme de la souris. Concernant l'étude de préciblage, des souris porteuses de xéno greffes de cancer colorectal ont reçu du [¹¹¹In]In-Tz-PEG₁₂-DOTA 24 heures après l'anticorps modifié. Les analyses d'imagerie TEMP/CT ont révélé une localisation prononcée de la radioactivité au niveau de la tumeur 3 heures post-injection. De plus, la sonde a rapidement été éliminée par les voies

urinaires et quasiment aucune trace de radioactivité n'a été retrouvée dans le sang ou les organes non ciblés.¹⁶⁶

Sur la base des résultats obtenus lors de leur première étude d'imagerie TEP préciblée du cancer du pancréas entre un $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-Tz-PEG}_7\text{-NOTA}$ et l'anticorps 5B1-TCO,¹⁶⁷ l'équipe de B. M. Zeglis décrit en 2017 la première application de la radioimmunothérapie préciblée basée sur le couple TCO/Tz. Dans cette étude, l'anticorps 5B1-TCO a été administré à des souris porteuses de tumeurs pancréatiques sous-cutanées avant de recevoir 72 heures plus tard du $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-PEG}_7\text{-Tz}$ (Figure 21 A) avec des doses de 14,8 MBq, 29,6 MBq et 44,4 MBq. Après 31 jours, un retard de croissance tumorale chez les souris traitées a été observé avec un effet dose-dépendant. De plus, après 51 jours de traitement, 75 % des souris traitées avec 44,4 MBq présentaient un volume tumoral plus faible qu'au jour 1 (Figure 21 B).¹⁶⁸ Suite à ces excellents résultats, cette même équipe a rapporté l'année suivante des résultats similaires sur un modèle de cancer colorectal en utilisant l'anticorps huA33-TCO avec le ligand $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-PEG}_7\text{-Tz}$ injecté 24 h, 48 h ou 72 h après, conduisant à une survie de tous les individus jusqu'à la fin de l'étude peu importe l'activité injectée (18,7 à 55,5 MBq) (Figure 21 C).¹⁶⁹

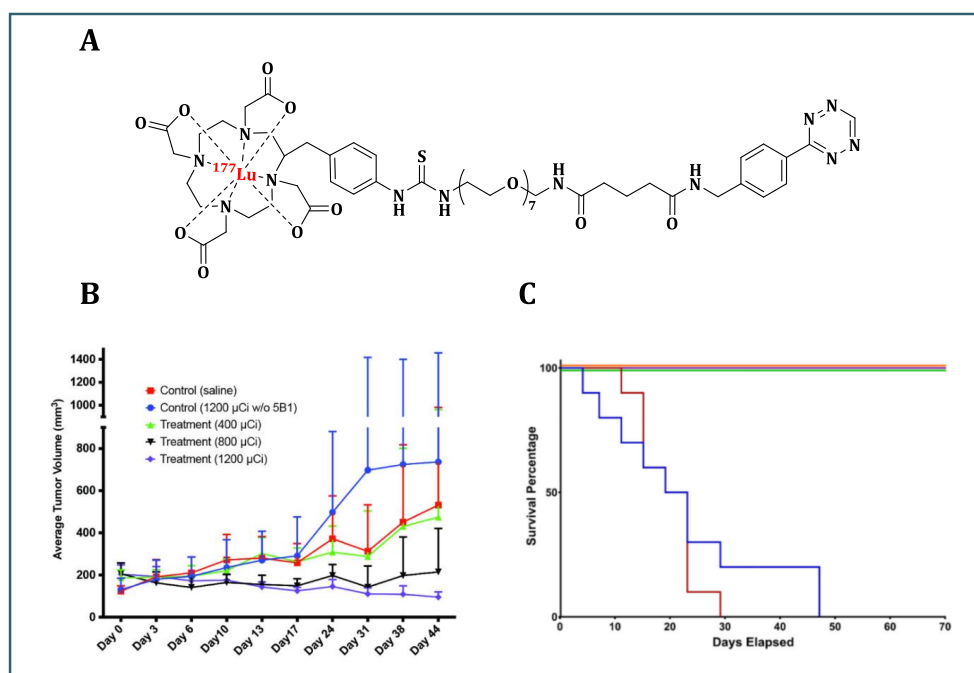


Figure 21. (A) Structure de la sonde $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-PEG}_7\text{-Tz}$; (B) Evolution du volume tumoral moyen; (C) Courbe de survie de Kaplan – Meier des souris portant un modèle de tumeur de cancer colorectal, traitées par la sonde $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-PEG}_7\text{-Tz}$. Les groupes témoins ont reçu soit le radioligand seul (–) soit l'immunoconjugué seul (–). Les trois groupes de traitement ont reçu huA33-TCO suivi 24 heures plus tard de 18,7 MBq (–), 37,0 MBq (–) ou 55,5 MBq (–). (Cette image a été reproduite avec la permission des références (^{168,169})).

En 2017, Quinn et coll. décrivent les premiers travaux de radioimmunothérapie préciblée utilisant les émetteurs alpha. Dans cette étude, deux chélatants différents portés par une tétrazine ont dans un premier temps été évalués et comparés pour leur efficacité de marquage au plomb-

212 : i) le DOTA, qui est aujourd’hui l’agent chélatant le plus utilisé en clinique pour la plupart des radiométaux ; ii) le TCMC, un chélateur déjà utilisé avec succès pour un essai clinique de phase 1 avec le trastuzumab grâce à une bonne stabilité *in vivo* ainsi qu’une bonne cinétique de marquage. En plus d’avoir complexé plus de 95 % du ^{212}Pb et montré une stabilité similaire, ces deux agents ont montré une clairance sanguine rapide, puisqu’à 3 heures post-injection, environ 95 % de la dose injectée était éliminée (Figure 22 A et B). En revanche, malgré une meilleure absorption tumorale du ^{212}Pb -TCMC-Tz après 3 heures, cette valeur était plus faible que celle de son équivalent DOTA à 24 heures (0,50 vs 0,66 %ID/g). De plus, l’absorption hépatique et rénale du ^{212}Pb -TCMC-Tz a été, pour chaque temps, plus importante et c’est pourquoi la sonde ^{212}Pb -DOTA-Tz a été sélectionnée pour l’étude de thérapie (Figure 22 C et D). Cette étude, réalisée avec deux anticorps différents, a montré que les souris traitées présentaient une réduction de la taille de la tumeur et une amélioration de la médiane de survie par rapport au groupe témoin.¹⁷⁰

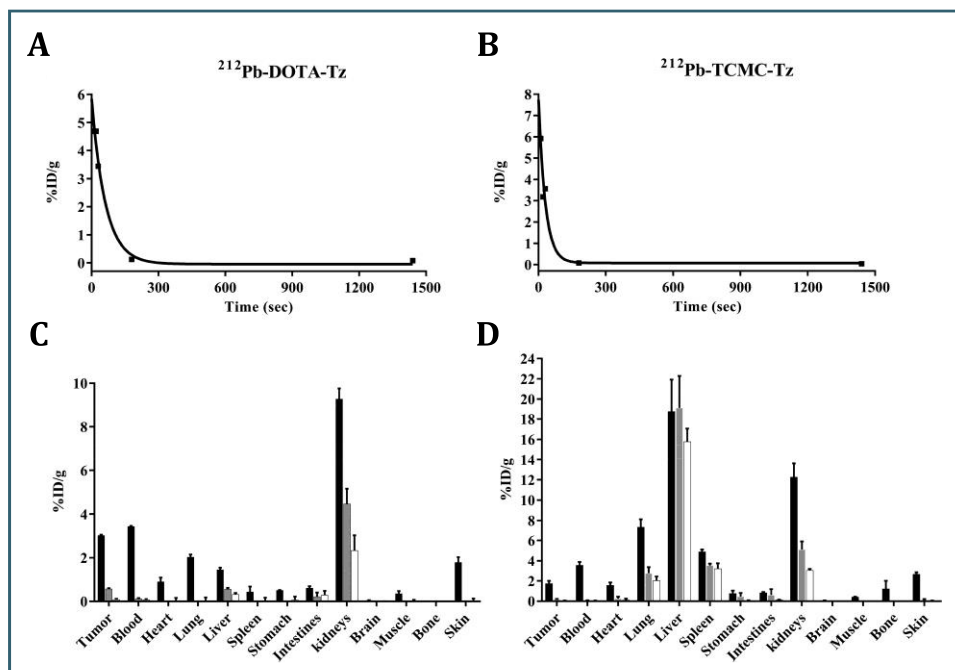


Figure 22. Pharmacocinétique des tétrazines marquées au ^{212}Pb chez des souris portant des xénogreffes de carcinome colorectal humain LS174T. (A) Clairance sanguine de la sonde ^{212}Pb -DOTA-Tz ; (B) Clairance sanguine de la sonde ^{212}Pb -TCMC-Tz ; (C) Biodistribution chez la souris de la sonde ^{212}Pb -DOTA-Tz ; (D) Biodistribution chez la souris de la sonde ^{212}Pb -TCMC-Tz. Cette image a été reproduite avec la permission de la référence (170).

En 2019, Lewis et coll. utilisent le préciblage pour développer une approche théranostique basée sur la paire $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ dans un modèle murin de cancer colorectal. Contrairement aux approches de préciblage classiques, cette méthode n’est pas suivie par l’injection d’un radioligand mais de deux (Figure 23). Après avoir été injectées par un immunoconjugué huA33 modifié par 5,2 TCO, les souris ont reçu 72 heures après du ^{64}Cu Cu-MeCOSar-Tz afin de réaliser des imageries TEP. A la suite de cela, la même sonde radiomarquée au cuivre-67 a été injectée 24 heures plus tard pour faire de la thérapie. Etant donné que seul le

radionucléide change entre les ligands, leur comportement *in vivo* est attendu comme identique. Cela a bien été vérifié puisque les résultats ont montré que l'absorption tumorale obtenue par imagerie TEP permettait de prédire la réponse thérapeutique. De plus, élément très important, il n'y eut aucun impact de la première sonde sur la biodistribution ou l'absorption tumorale de la deuxième.¹⁷¹

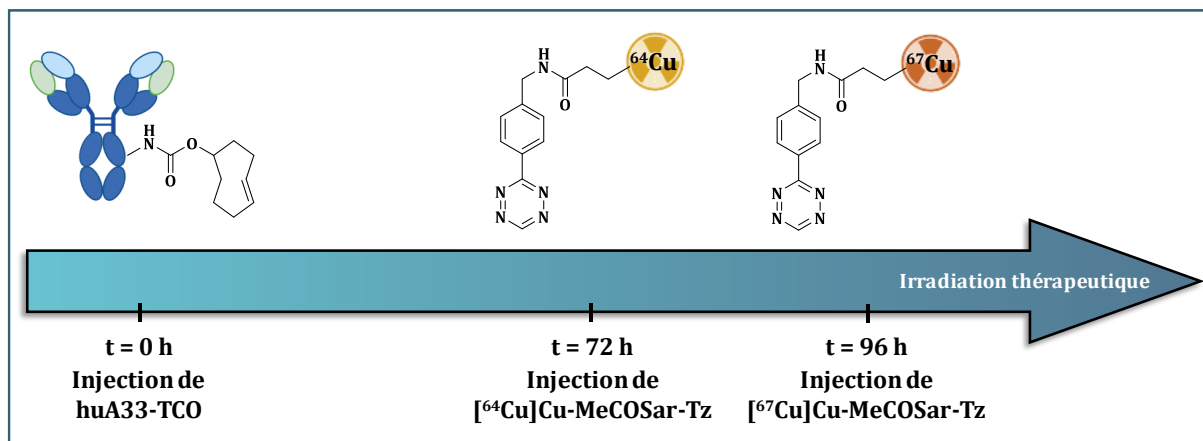


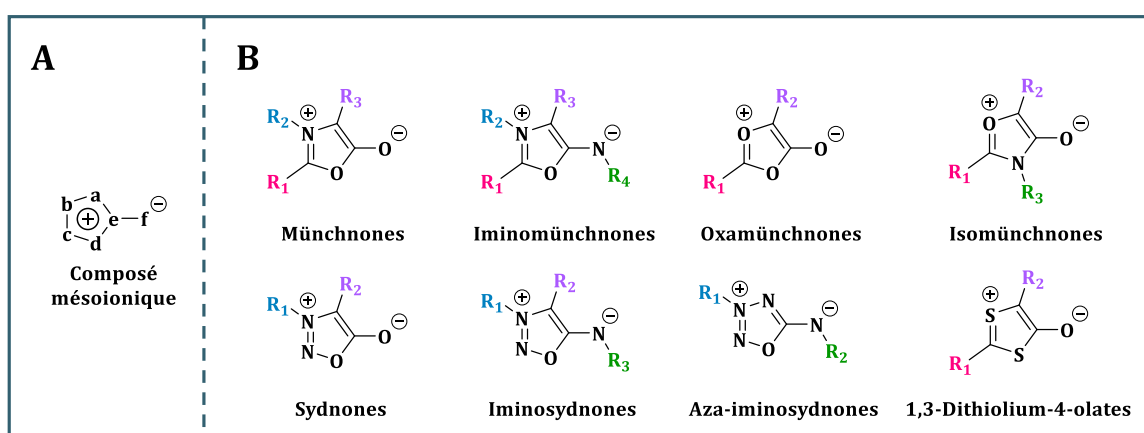
Figure 23. Schéma temporel de l'administration séquentielle des deux radiotraceurs après l'injection de l'anticorps huA33-TCO.

Malgré les nombreux intérêts portés sur le système TCO/Tz pour le préciblage et les résultats très intéressants, le transfert de ces méthodes vers des applications cliniques reste encore très limité. Des premiers résultats encourageants ont été décrits par le groupe de B. M. Zeglis en 2022, qui grâce à l'imagerie TEP, montre l'efficacité du préciblage chez des grands chiens de compagnie atteints d'ostéosarcome.¹⁷² Néanmoins, les résultats les plus attendus sont probablement ceux de l'étude clinique commencée au Memorial Sloan Kettering Cancer Center aux Etats-Unis à la fin de l'année 2023, utilisant un anticorps 5B1-TCO et du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SarAr-Tz}$ pour faire de l'imagerie TEP chez des patients atteints d'un cancer du pancréas (NCT05737615).

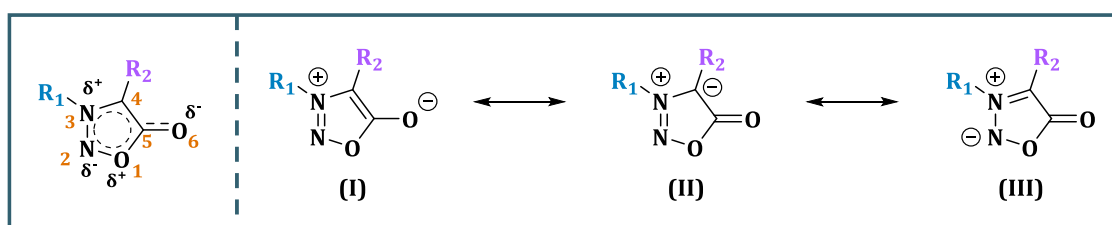
III- Les sydnones

III-1. Définitions et historique

Le terme mésoionique (à l'origine méso-ionique), issu de la contraction des termes « mésomérique » et « ionique », décrit un ensemble d'hétérocycles à 5 chaînons possédant deux charges opposées au sein de sa structure (Figure 24 A). Introduite pour la première fois en 1949 par W. Baker, W. D. Ollis et V. D. Poole,¹⁷³ cette famille de composés a la particularité de pouvoir être représentée de multiples façons en raison de la délocalisation de ses six électrons π et donc des charges positives et négatives.¹⁷⁴ Depuis les travaux pionniers de W. Baker, de nombreux composés mésoioniques ont été décrits dans la littérature (Figure 24 B).



En raison de leur facilité de synthèse, leur très bonne stabilité chimique et le fait qu'elles puissent être isolées et stockées facilement, les sydnones représentent la classe de composés mésoioniques la plus décrite dans la littérature, en particulier la *N*-phénylsydnone.¹⁷⁵ Découvertes à l'université de Sydney en 1935 par J. C. Earl et A. W. Mackney,¹⁷⁶ les sydnones (SYDNey + lactONES) sont des 1,2,3-oxadiazolium-5-olates possédant huit formes de résonance dipolaire. Parmi elles, celle où la charge positive se trouve sur l'atome d'azote substitué N_3 et la charge négative sur l'atome d'oxygène exocyclique O_6 , représente la structure la plus fréquemment rencontrée dans la littérature (Schéma 36, I).



Néanmoins, une étude assez récente de P. A. Champagne et K. N. Houk basée sur des études théoriques a mis en évidence que la liaison exocyclique C-O montrait plutôt un caractère de double

liaison, soulignant que les formes de résonance (II) et (III) représentaient mieux la structure électronique de ces composés.¹⁷⁷ C'est pour cette raison que la forme (III) sera privilégiée pour la représentation des structures des dérivés sydnones dans ce manuscrit.

III-2. Voies d'accès aux sydnones

Malgré les progrès notables dans le domaine de la chimie organique, les méthodes de synthèse permettant de générer les sydnones n'ont pas beaucoup évolué de la procédure originale en deux étapes décrite en 1935. Cela débute par une étape de nitrosylation d'un dérivé d'acide aminé en utilisant du nitrite de sodium en conditions aqueuses et acides, et se poursuit par une cyclodéshydratation en présence d'anhydride acétique (Schéma 37).¹⁷⁶ Quelques années après ces premiers travaux, Poole et *coll.* ont montré que l'utilisation d'anhydride trifluoroacétique permettait d'accélérer considérablement les conditions de réaction, passant de quelques heures à reflux à quelques minutes à température ambiante.¹⁷⁸

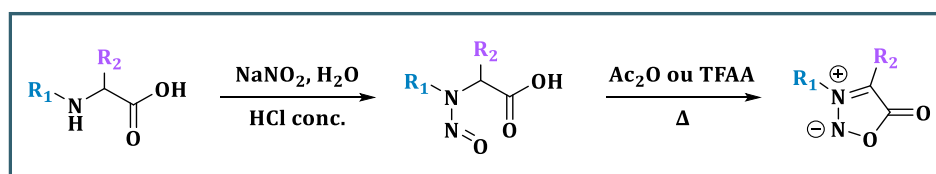


Schéma 37. Voie de synthèse générale des sydnones.

A partir de cette synthèse de base, des efforts ont été faits dans le but d'optimiser chacune des étapes de la préparation des sydnones. J. Applegate et K. Turnbull ont décrit la possibilité de faire l'étape de nitrosylation dans des conditions plus douces à partir du nitrite d'isoamyle, et avec un traitement de la réaction se limitant à une étape d'évaporation.¹⁷⁹ Bien que plus anecdotique, il a été démontré que l'utilisation du chlorure de 2-chloro-1,3-diméthylimidazolium pour l'étape de cyclodéshydratation pouvait favoriser la formation de sydnone avec d'excellents rendements chimiques (93 à 100 %).¹⁸⁰ La toxicité de l'intermédiaire *N*-nitrosamine généré lors de la première étape de nitrosylation a orienté les travaux de préparation des sydnones vers le développement de nouvelles méthodes et notamment de procédures en une étape.¹⁸¹⁻¹⁸³ Parmi les stratégies les plus récentes à avoir été décrites, on retrouve celle développée en 2014 par Taran et *coll.*, à partir de diverses arylglycines. Dans cette voie de synthèse, le nitrite de sodium utilisé habituellement a été remplacé par du nitrite de *tert*-butyle, un réactif plus encombré et offrant de meilleurs rendements (76 à 99 %). De plus, il a été montré que l'étape de cyclodéshydratation pouvait être optimisée avec l'utilisation de 1,1'-Carbonyldiimidazole comme agent de cyclisation par rapport à l'anhydride trifluoroacétique (92 % vs 84 %).¹⁸⁴ Dernièrement, une nouvelle méthode « one-pot » a été proposée avec l'utilisation en quantité catalytique de DMF et du chlorure d'oxalyle. Cette voie de synthèse permet l'accès à des sydnones substituées en position 3 ou en positions 3 et 4, à température ambiante sous argon, et avec des temps de réaction autour de 1,5 heure.¹⁸⁵ Il

est également intéressant de mentionner qu'une approche basée sur de la mécano-chimie a également été rapportée en 2019 par le groupe de F. Lamaty. Cette chimie, en pleine expansion, consiste à utiliser l'énergie fournie par un procédé mécanique telles que les vibrations pour que la réaction se fasse. En plus de ne nécessiter aucun solvant, ce travail sur la mécanosynthèse a montré qu'il était possible de préparer une large gamme de *N*-arylsydnonnes, avec des rendements allant de 34 à 95% suivant la nature électronique du groupement substituant présent sur le cycle aromatique (rendements plus faibles pour les groupements électroattracteurs).¹⁸⁶

III-3. Réactivité des sydnones et applications

Le caractère mésoionique des sydnones traduit un certain équilibre entre la charge positive et la charge négative du cycle, ce qui le rend réactif vis-à-vis des espèces électrophiles. Ces propriétés chimiques particulières se sont révélées intéressantes lors d'interactions avec des biomolécules, conduisant à de nombreux composés montrant des propriétés pharmacologiques. Ce sont ces aspects qui ont été rapportés dans les premières investigations avec les sydnones, avec des molécules ayant des activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques ou même cytotoxiques.¹⁷⁵

Par la suite, c'est la réactivité des sydnones qui a été mise en avant, notamment en tant que précurseurs de motifs pyrazoles par réaction de cycloaddition avec des dérivés alcynes. Les pyrazoles polysubstitués représentent un motif de choix pour la préparation de composés biologiquement actifs. En effet, cet hétérocycle ayant montré un fort potentiel en chimie médicinale, plusieurs de ces dérivés comme le célécoxib (anti-inflammatoire), le rimonabant (anorexigène) ou l'apixaban (anticoagulant) ont même obtenu des autorisations de mises sur le marché (Figure 25).¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

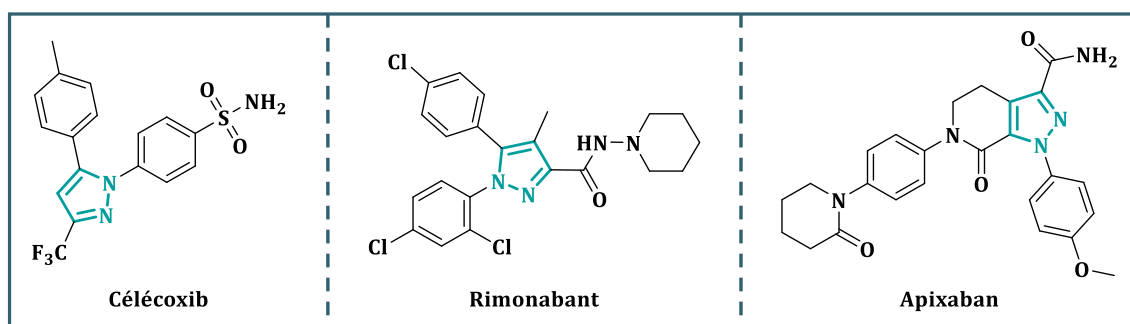


Figure 25. Exemples de dérivés pyrazoles ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché ; Célécoxib (CELEBREX®), Rimonabant (ACOMPLIA®), Apixaban (ELIQUIS®).

Les sydnones sont également étudiées dans de nombreuses réactions comme les réactions photoinduites,¹⁹⁰ les réactions de cycloadditions avec des arynes,¹⁹¹ des cyclohexynes¹⁹² ou encore des cyclopentynes.¹⁹³ Dans cette partie bibliographique sur les sydnones, seulement les trois grandes classes de cycloadditions utilisées en synthèse organique seront considérées, à savoir, les

cycloadditions thermiques, les cycloadditions catalysées au cuivre (CuSAC) et les cycloadditions sous-contraintes stériques (SPSAC).

III-3.1. Les cycloadditions thermiques

En 1962, R. Huisgen rapporte le premier exemple de cycloaddition thermique 1,3-dipolaire entre les sydnones en tant que dipôle et les alcynes en tant que dipôlarophile. Cette réaction en deux étapes, débute par une cycloaddition [3+2] conduisant à la formation d'un intermédiaire bicyclique, suivie d'une réaction rétro Diels-Alder (rDA) permettant l'obtention du pyrazole correspondant *via* une libération de CO₂ (Schéma 38).¹⁹⁴ Le développement de ce type de cycloaddition a cependant longtemps été limité à cause de conditions de réactions assez dures (temps de réactions assez longs, températures autour de 180 °C) et du manque de régiosélectivité, notamment avec les alcynes asymétriques conduisant à la formation de deux pyrazoles. D'après une étude théorique menée en 1973 par Houk et *al.*,¹⁹⁵ le manque de régiosélectivité de cette réaction peut s'expliquer par une diminution de l'énergie de l'orbitale LUMO de la sydnone (dû au caractère électroattracteur de la fonction carbonyle), qui ne favorise pas cette réaction de cycloaddition.

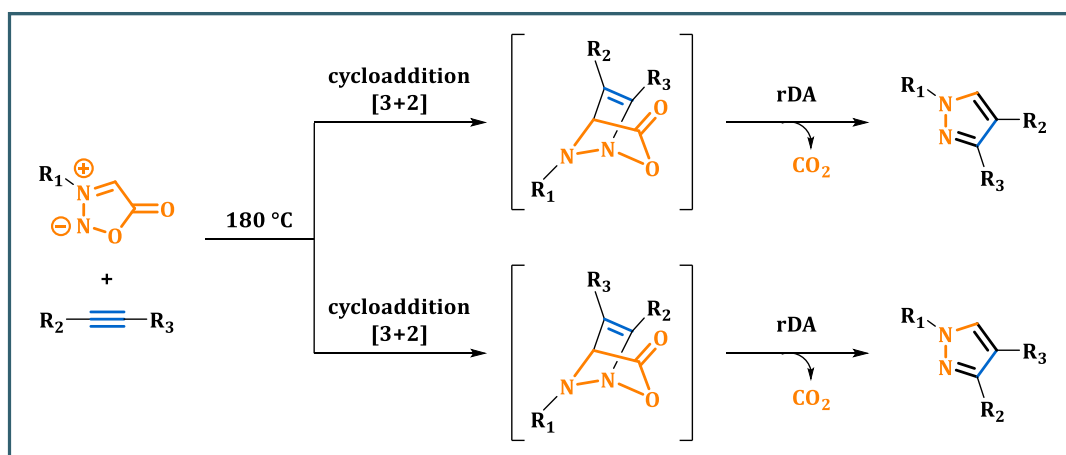


Schéma 38. Cycloaddition thermique entre les sydnones et les alcynes.

Par la suite, de nombreux travaux ont visé à optimiser cette étape de cycloaddition, que ce soit pour le développement de conditions de réactions plus douces, mais aussi et surtout pour en améliorer la régiosélectivité. Des premières études basées sur l'utilisation d'alcynes polarisés comme les esters de propiolate, et visant à diminuer légèrement les températures de réaction (110-140 °C), n'ont montré aucune amélioration de la régiosélectivité de la réaction.¹⁹⁶ En revanche, de meilleurs résultats ont pu être observés avec l'utilisation d'alcynes fortement encombrés comme le propiolate de diphénylméthyle. Ainsi, à partir de la 3-aryl-4-cyanosydnone, un contrôle total de la régiosélectivité en faveur du pyrazole 1,3,5-trisubstitué a été obtenu, conduisant à un composé utilisé dans la synthèse d'un inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase (Schéma 39 A).¹⁹⁷ D'autres stratégies reposant sur des dérivés sulfones

alcynyles phényles activés,¹⁹⁸ alcynylsilanes^{199,200} ou encore alcynylstannanes²⁰¹ ont également démontré une régiosélectivité très intéressante (Schéma 39 B et C).

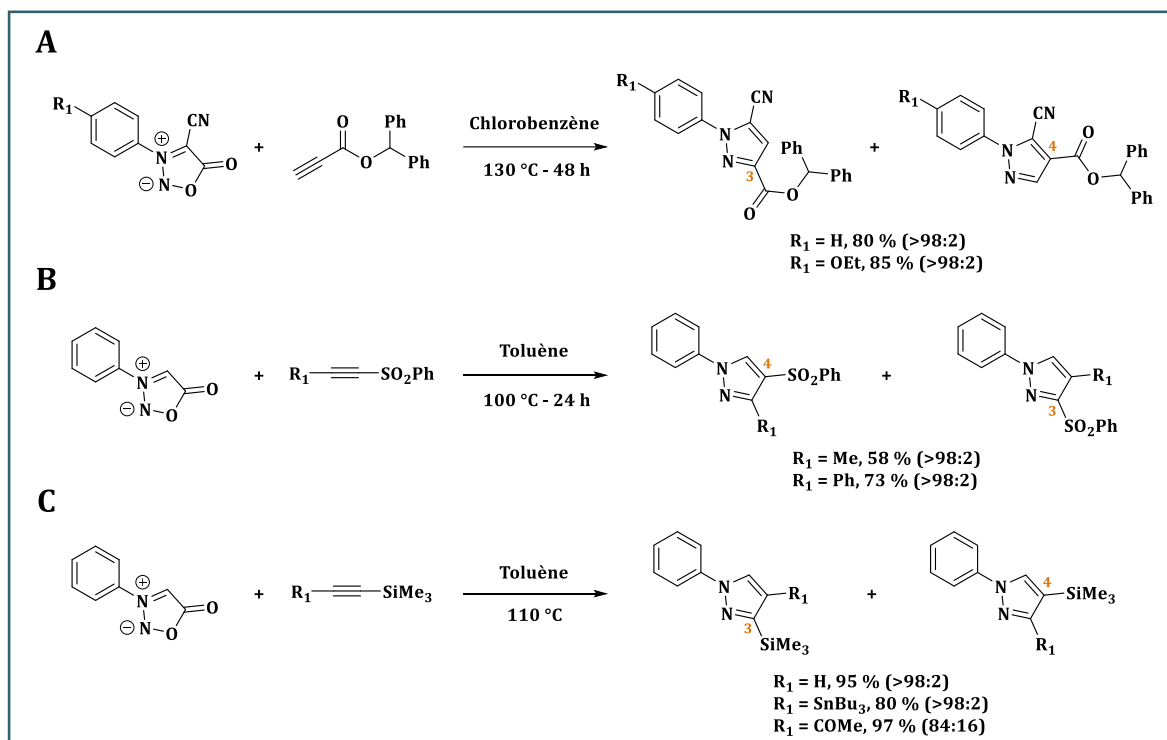


Schéma 39. Alcynes permettant de contrôler la régiosélectivité de la réaction de cycloaddition. (A) Propiolate de diphénylméthyle ; (B) Dérivés sulphones alcynyles phényles activés ; (C) Alcynylsilanes.

L'étude de la régiosélectivité de cette réaction de cycloaddition des sydnones s'est poursuivie avec le travail rapporté par le groupe de J. Harrity et l'utilisation de dérivés alcynylboronates. La réaction entre une sydnone non-substituée en position C₄ et un alcyne terminal a montré un bon contrôle de la régiosélectivité avec la formation du pyrazole 3-substitué (3-boronate). En revanche, dès lors que l'alcynylboronate était substitué, une régiosélectivité partielle voir totale en faveur de la formation du pyrazole 4-substitué a été observée. L'utilisation de sydnones substituées a conduit à des résultats similaires montrant que la substitution soit de l'alcynylboronate, soit de la sydnone, pouvait moduler la régiosélectivité (Schéma 40).²⁰²

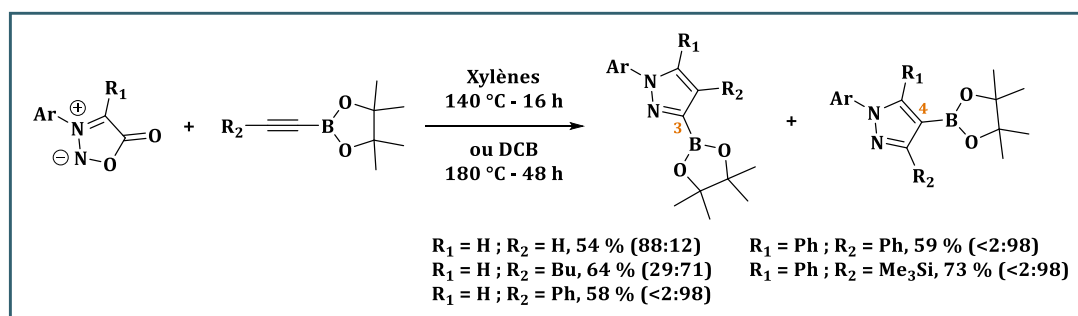


Schéma 40. Impact de la structure des sydnones et des dérivés alcynylboronates sur la régiosélectivité de la réaction de cycloaddition thermique.

L'origine de l'orientation de la régiosélectivité observée expérimentalement peut s'expliquer par des facteurs stériques. En effet, des calculs DFT ont montré que l'incorporation de substituants aux positions C₄ de la sydnone et du C_β de l'alcyne entraîne des interactions stériques favorisant l'isomère 4-boronate. Lorsque des alcynes terminaux sont utilisés, l'encombrement stérique de l'ester boronique conduit à la formation préférentielle de l'isomère 3-boronate. Par la suite, l'obtention de pyrazoles substitués par des groupements esters boroniques s'est révélée intéressante en vue d'une fonctionnalisation *via* des réactions catalysées par des métaux, comme le couplage de Suzuki.²⁰³

Des études complémentaires de cette réaction de cycloaddition thermique ont permis d'aboutir au développement de composés d'intérêt pour des applications médicales. En effet, la possibilité de contrôler la régiosélectivité de cette réaction a conduit à la synthèse de pyrazoles 1,5-disubstitués, 4,5-disubstitués et 3,4-disubstitués (Schéma 41). Malgré des températures de réaction élevées (160 à 180 °C) et des temps de réaction longs (24 à 48 heures), les pyrazoles souhaités ont pu être obtenus de façon régiosélective (>90:10) et avec des rendements de 58 à 79%, en fonction de la méthode de préparation choisie. Cette stratégie a permis la synthèse de 12 analogues de la combretastatine A4, une classe d'agents inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales par action sur la vascularisation des tumeurs, dont certains ont démontré des propriétés *in vitro* et *in vivo* intéressantes.²⁰⁰

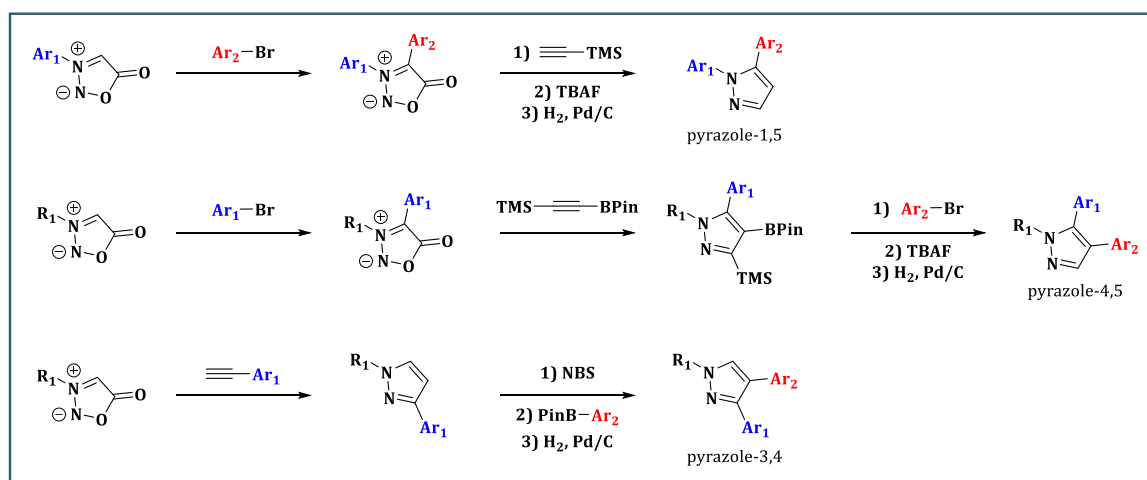


Schéma 41. Voies de synthèse permettant la préparation de pyrazoles 1,5-disubstitués, 4,5-disubstitués et 3,4-disubstitués.

Plus récemment, un premier exemple de cycloaddition réalisé à température ambiante en présence d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) a été rapporté. Cette réaction entre une 4-pyridylsydnone et un trifluoroborate d'alcyne, permet la formation quantitative d'un pyrazole borane substitué en seulement 2 heures, avec un contrôle total sur la régiosélectivité (Schéma 42). Le champ d'application de cette stratégie a ensuite été étudié, en modifiant les substituants au niveau de l'azote en position 3 de la sydnone, ainsi que les effets du groupe directeur en position C₄. A

quelques exceptions près, la plupart des produits pyrazole borane attendus ont pu être obtenus avec des rendements variables allant de faibles (20 %) à excellents (99 %).²⁰⁴

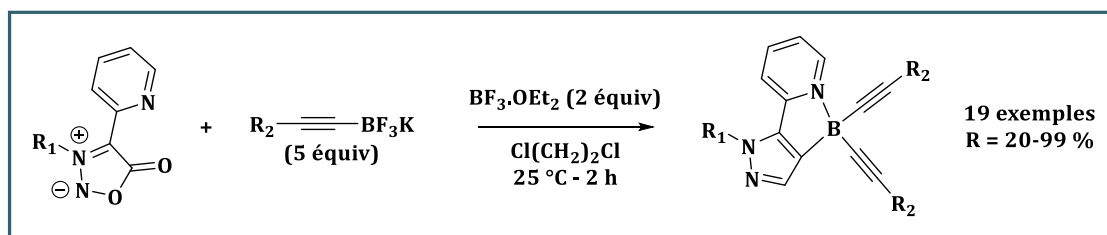


Schéma 42. Préparation de pyrazole boranes à partir d'une réaction de cycloaddition à température ambiante.

III-3.2. Les cycloadditions catalysées par le cuivre (CuSAC)

III-3.2.a) Au sulfate de cuivre (II) pentahydraté

Malgré certaines optimisations, les réactions de cycloadditions thermiques entre les sydnones et les alcynes requièrent généralement des températures élevées, des temps de réaction longs, et souffrent parfois d'un manque de régiosélectivité. L'équipe de F. Taran rapporte en 2013 une version plus douce de cette réaction, identifiée suite à une étude de criblage ayant pour objectif de découvrir de nouvelles cycloadditions [3+2] biocompatibles et chimiosélectives (Schéma 43 A). Cette approche appelée CuSAC, par analogie à la CuAAC, repose sur l'utilisation d'un catalyseur au cuivre (I) permettant un contrôle total de la régiosélectivité en faveur du pyrazole 1,4-disubstitué à température ambiante ou en chauffant modérément (≤ 60 °C) (Schéma 43 B).²⁰⁵

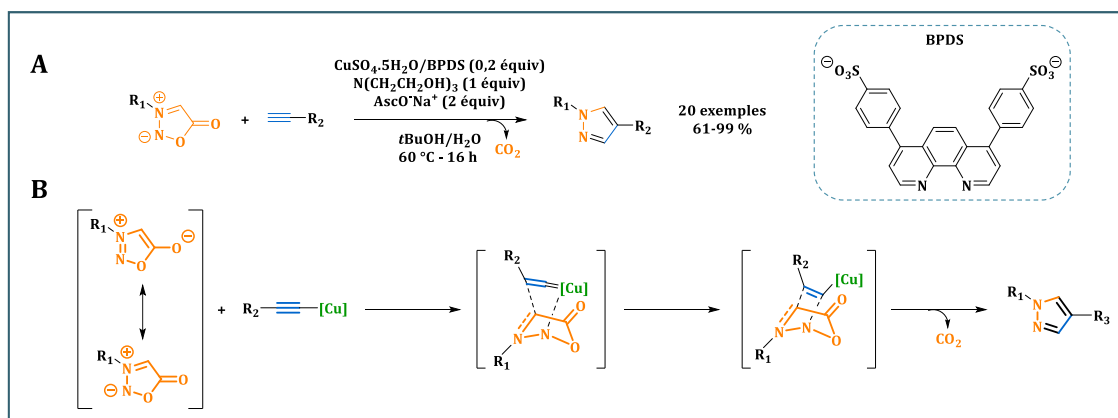


Schéma 43. Réaction de cycloaddition catalysée au cuivre entre une sydnone et un alcyne terminal. (A) Portée de la réaction ; (B) Mécanisme de la CuSAC proposé par F. Taran.²⁰⁵

Les conditions de réaction requises sont similaires à celles de la CuAAC, il est néanmoins nécessaire d'utiliser une quantité plus importante de catalyseur au cuivre (20 % vs 1-10 % molaire)²⁰⁶ et un ligand de type phénantroline, afin que la réaction puisse avoir lieu. Une approche « one-pot » allant de la préparation de la sydnone (2 étapes) jusqu'à la réaction de CuSAC a même été rapportée, démontrant tout l'intérêt de cette méthode pour la préparation de pyrazoles, hétérocycles d'intérêt pour des applications pharmaceutiques.¹⁸⁴ Même si ces conditions de

réaction de cycloaddition n'ont pas pu être appliquées aux *N*-alkylsydrones, la réactivité avec une gamme assez large de motifs sydnones ou d'alcynes fonctionnalisés a été démontrée. De plus, cette réaction de cycloaddition est possible dans de nombreux solvants (H₂O, *t*BuOH/H₂O, DMSO, DMF) et même en milieu biologique (par exemple le plasma sanguin humain à 37 °C). Au vu des avantages de cette réaction, cette approche a également été utilisée en bioconjugaison pour le marquage d'un conjugué BSA-sydnone par un motif dansyle (fluorophore organique) fonctionnalisé par un groupement alcyne (Schéma 44). Des analyses par spectrométrie de masse et d'électrophorèse ont confirmé l'obtention de la protéine marquée avec 75 % des sydnones converties en pyrazoles.

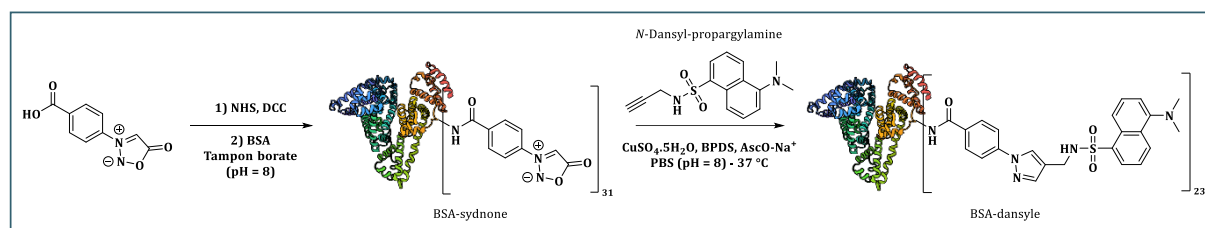


Schéma 44. Application de la CuSAC pour le marquage d'une BSA.

Cette réaction de cycloaddition catalysée par les sels de cuivre (I) s'est aussi révélée intéressante pour la réactivité des ynamides avec les sydnones, permettant ainsi l'accès à des dérivés de type 4-aminopyrazoles. Après avoir travaillé sur les conditions de réaction (évaluation de différents catalyseurs au cuivre, température, temps, conditions anhydres), seulement des traces de pyrazole et la formation d'un sous-produit (sulfonylamide) ont pu être observées. Seules les conditions décrites initialement pour la CuSAC (CuSO₄·5H₂O, ascorbate de sodium, BPDS, base), se sont révélées intéressantes pour obtenir une conversion complète de l'ynamide, avec la formation sélective du 4-aminopyrazole tout en limitant l'apparition du sulfonylamide (ratio 2:1). Ces conditions de réactions ont été transposées avec succès à d'autres sydnones modifiées en position N₃, élargissant la portée de cette réaction (Schéma 45). Il est important de noter que cette réaction est limitée aux sydnones non-substituées en position C₄ ainsi qu'aux ynamides terminales.²⁰⁷

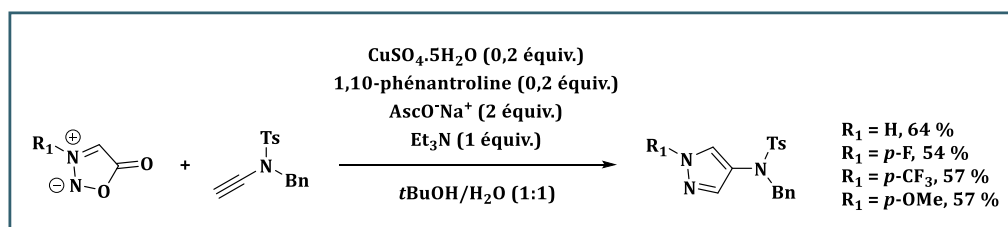


Schéma 45. Utilisation de la CuSAC pour la préparation de dérivés 4-aminopyrazoles.

En plus d'une utilisation possible en chimie de bioconjugaison, le système CuSAC a également été rapporté pour le développement de sondes fluorescentes. Pour cela, 12 unités sydnones-coumarines ont été préparées et leur réactivité vis-à-vis de 7 alcynes terminaux a été

étudiée par une approche de chimie combinatoire (Schéma 46 A). Au final, les propriétés fluorescentes d'une centaine de systèmes pyrazole-coumarine ont été testées, dont environ une vingtaine se sont révélés être intéressants. Cela a permis de mettre en avant que les dérivés 3-sydnone-coumarine substitués en position 7 par un groupement électrodonneur étaient les plus prometteurs (Schéma 46 B). Malheureusement, la transposition de ce type de système pour le marquage d'une protéine modifiée (Myoglobine-alcyne) ne s'est pas montrée biocompatible puisque lors de la réaction, une forte dégradation de la protéine a été observée, probablement en raison de la présence du catalyseur au cuivre dont la proportion est plus élevée que pour une réaction de CuAAC.²⁰⁸

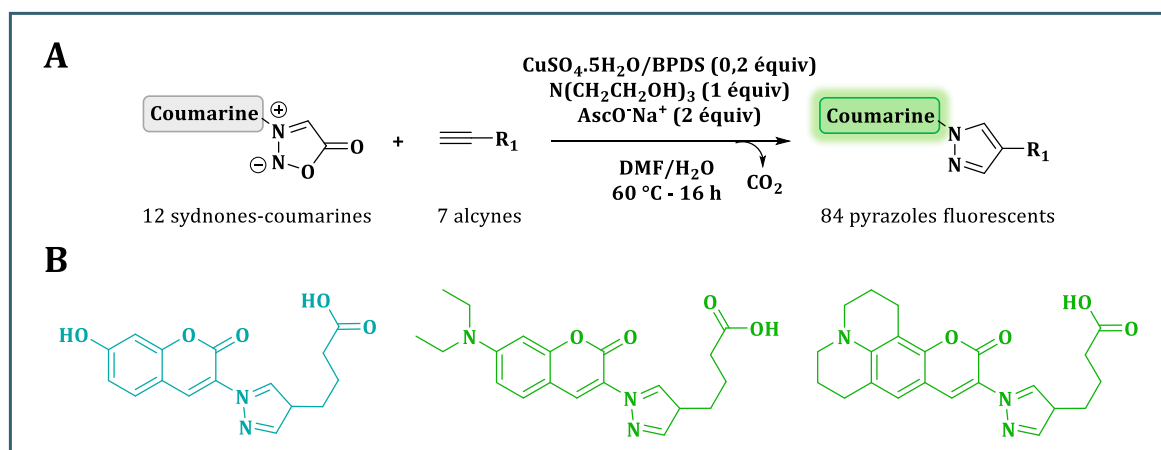


Schéma 46. Développement de sondes fluorescentes à base de sydnone-coumarine. (A) Réaction CuSAC entre divers sydnones et alcynes terminaux ; (B) Structures des produits issus des meilleures combinaisons sydnones/alcynes.

Dernièrement, un travail visant à optimiser les conditions de réactions de la CuSAC pour améliorer son efficacité et sa reproductibilité a été réalisé. Par l'emploi d'une méthode d'expérimentation à haut débit, de nombreux paramètres comme le type de ligand, d'agent réducteur, de base ou encore la température ou le solvant de réaction ont pu être testés en parallèle. Cette étude a permis d'identifier un nouveau ligand biimidazole permettant la synthèse d'une large gamme de pyrazoles, de façon plus reproductible et robuste qu'avec le ligand BPDS de référence (Schéma 47). En plus de la possibilité de diminuer la quantité de cuivre engagée dans la catalyse de cette cycloaddition, il s'est avéré que l'ajout de TPGS-750-M, un tensioactif, à des substrats hydrophobes pouvait permettre d'améliorer la réaction en milieu aqueux.²⁰⁹

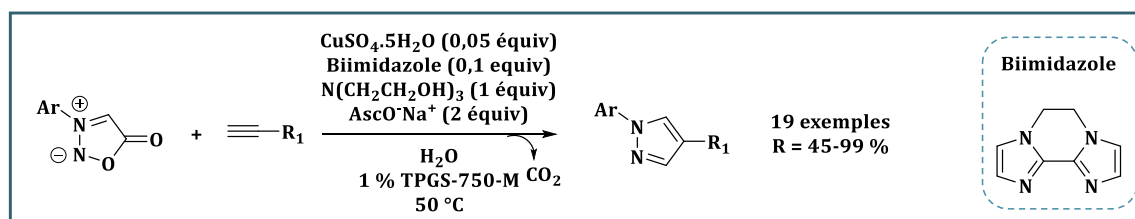


Schéma 47. Optimisation des conditions de réaction CuSAC permettant la préparation d'une large gamme de pyrazoles.

III-3.2.b) A l'acétate de cuivre (II) et au triflate de cuivre (II)

Alors que la majorité des réactions catalysées par le cuivre s'effectue avec des sels de cuivre (I), d'autres groupes de recherche se sont intéressés à l'utilisation de sels de cuivre (II). Harrity et *al.* ont suggéré que l'utilisation d'un acide de Lewis pouvait permettre une meilleure activation du motif sydnone, favorisant ainsi la réaction avec les alcynes terminaux.²¹⁰ Une étude comparative sur la réaction de cycloaddition entre la *N*-phénylsydnone et le phénylacétylène a montré que les sels de cuivre (II) pouvaient permettre d'en améliorer la vitesse et ainsi de diminuer le temps de réaction (>12 h vs <2 h). En plus d'une meilleure réactivité, une influence sur la régiosélectivité a également été observée avec la formation du pyrazole 1,3-disubstitué avec l'utilisation de trifluorométhanesulfonate de cuivre (Cu(OTf)₂) et l'obtention du régioisomère 1,4-disubstitué en utilisant le Cu(OAc)₂ (Schéma 48). Des calculs DFT ont bien confirmé l'effet du Cu(OTf)₂ sur l'activation du dipôle sydnone, diminuant les énergies d'activations des états de transition de la réaction de cycloaddition et expliquant cette meilleure réactivité. En ce qui concerne l'utilisation du Cu(OAc)₂, l'observation du produit issu de l'homocouplage oxydant du phénylacétylène (réaction de Glaser) a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle le Cu(II) était réduit *in situ* en Cu(I) et justifiant ainsi la régiosélectivité similaire à celle de la réaction CuSAC.

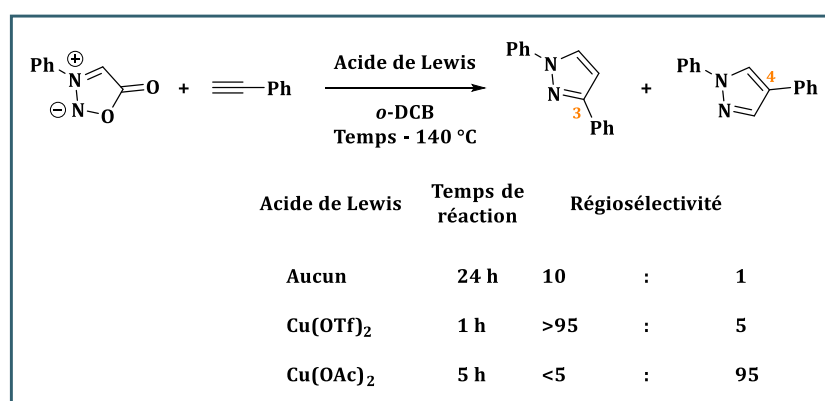


Schéma 48. Impact de l'utilisation d'un acide de Lewis sur la réactivité et la régiosélectivité sur la réaction de cycloaddition entre la phénylsydnone et le phénylacétylène.

Toutefois, l'utilisation d'une quantité stœchiométrique d'acétate de cuivre (II) ainsi que de deux équivalents d'alcyne pour pouvoir mener cette réaction reste problématique. Si l'excès d'alcyne sert à initier la réduction du Cu(II) en Cu(I), cela génère des acétylures de cuivre connu pour être extrêmement insolubles et former des agrégats.²¹¹ Afin de limiter la quantité de cuivre utilisée et optimiser cette réaction de cycloaddition, une stratégie de synthèse en flux continu a été développée. L'adsorption du catalyseur sur un support solide (silice) permet de faciliter son utilisation, mais cette méthode a surtout montré qu'il était possible d'en réduire la quantité de 25 à 30 %, tout en gardant des conversions complètes.²¹²

Plus récemment, Weng *et al.* ont également fait émerger le $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ comme un catalyseur d'intérêt pour la réaction de cycloaddition entre le 3,3,3-trifluoropropyne et différentes *N*-arylsydnonnes, permettant l'accès à des composés de type 4-trifluorométhylpyrazole (Schéma 49).²¹³ L'utilisation d'une quantité catalytique de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ associée à la présence du ligand 1,10-phenanthroline, a conduit à l'obtention du produit attendu dans des conditions douces (35 °C pendant 4 heures), un contrôle total de la sélectivité et des rendements pouvant être supérieurs à 90 %. Même si dans les deux cas la régiosélectivité a pu être conservée, les *N*-arylsydnonnes portant un groupement électrodonneur se sont révélées plus réactives que celles substituées par des groupements électroattracteurs.

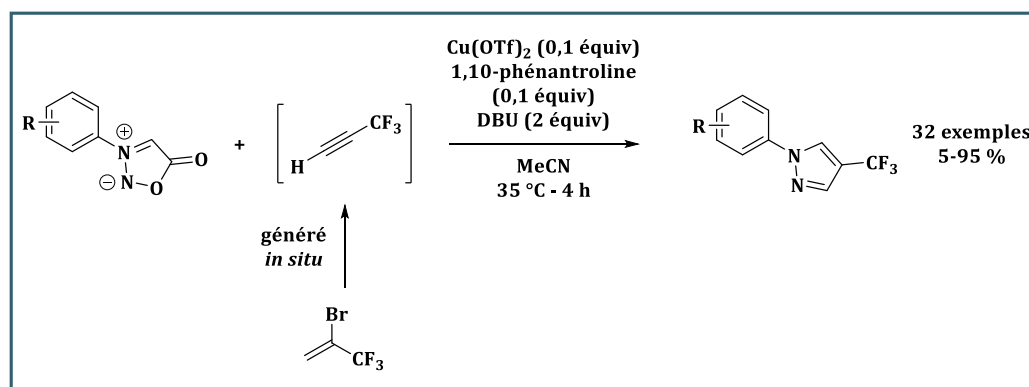


Schéma 49. Réaction CuSAC entre différentes *N*-arylsydnonnes et le 3,3,3-trifluoropropyne.

III-3.2.c) Etude la réactivité des halogénosydnonnes

Le caractère acide ($\text{pK}_a \approx 18-20$) et nucléophile du carbone en position C_4 du noyau sydnone offre la possibilité à de nombreuses fonctionnalisations.²¹⁴ Parmi ces méthodes on retrouve principalement l'halogénéation, généralement réalisée en présence de *N*-halosuccinimides,²¹⁵ ou encore l'arylation directe.²¹⁶ L'avantage de ces méthodes est la possibilité de réaliser par la suite des réactions de couplage croisé comme celui de Suzuki-Miyaura.²¹⁷

Afin de pouvoir étendre le champ d'application de la CuSAC et ne pas se limiter à l'obtention d'un pyrazole 1,4-disubstitué, l'influence de la substitution en position C_4 de la sydnone sur la réactivité et la sélectivité a été étudiée. La substitution par des groupements portant un carbone hybridé sp^2 ou sp^3 s'est avérée préjudiciable pour la réaction, alors que la présence d'halogènes comme le chlore ou le brome (excepté l'iode car un phénomène de déiodation a été observé) permettait l'accès aux pyrazoles 1,4,5-trisubstitués correspondants. Il est intéressant de noter que dans ces cas précis, la régiosélectivité n'était que modérée puisque la formation minoritaire de l'isomère 1,3,5-trisubstitué (4 à 17 %) a été constatée. Une étude visant à optimiser les conditions de réactions a permis de mettre en évidence les diimidazoquinoxalines comme ligand permettant un contrôle total de la régiosélectivité en faveur du pyrazole 1,4,5-trisubstitués. L'obtention sélective du dérivé bromé en position C_4 du pyrazole s'est révélée

particulièrement intéressante de par la possibilité d'envisager des couplages de Suzuki avec des précurseurs acides boroniques en présence d'un catalyseur au palladium (Schéma 50).²¹⁸

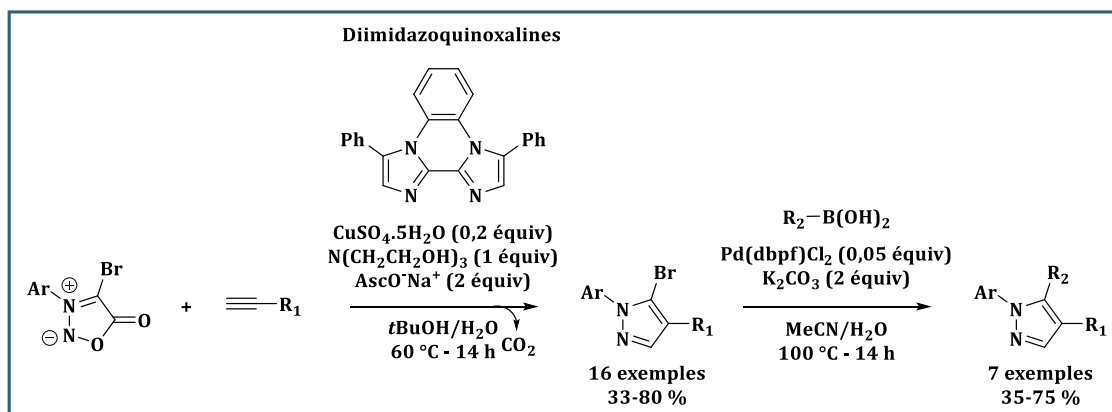


Schéma 50. Synthèse de pyrazole 1,4,5-trisubstitués à partir de 4-bromosydnone suivie d'un couplage de Suzuki.

Bien que la synthèse et l'utilisation des 4-halogénosydnone aient fait l'objet de nombreuses études, aucune ne décrivait la préparation de 4-fluorosydnone, cela pouvant s'expliquer par le fait que les méthodes de fluoration électrophile classiques ne se sont pas révélées efficaces. Basée sur des travaux antérieurs de Ritter et *coll.*,²¹⁹ l'équipe de F. Taran rapporte en 2016 une procédure spécifique permettant la synthèse de 4-fluorosydnone (Schéma 51).²²⁰ A partir de la 4-bromo et 4-iodosydnone, l'obtention de complexes intermédiaires sydnone-Pd^{II} permet une fluoration électrophile avec du Selectfluor conduisant à la 4-fluorosydnone correspondante. L'utilisation d'un ligand de type bipyridine substituée par des groupements méthoxy en position *para* s'est révélée être le meilleur substrat en termes de rendements (jusqu'à 87 %) et de sélectivité en favorisant la formation de la liaison C-F par rapport à la liaison C-I.

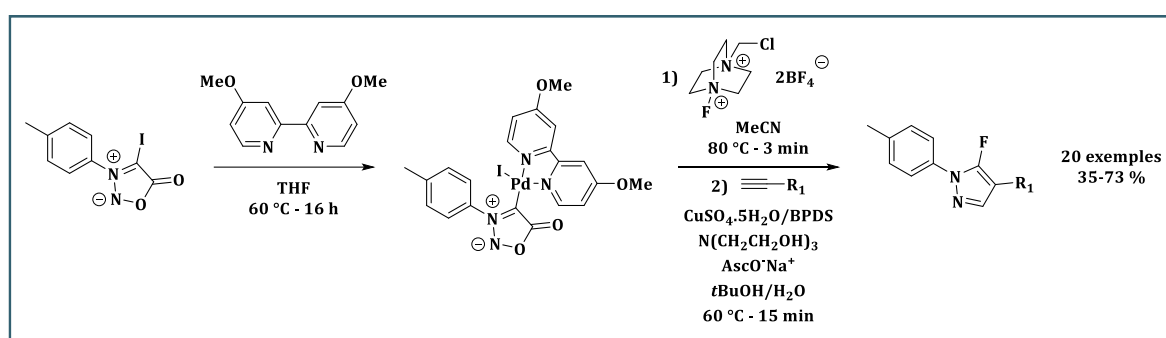


Schéma 51. Synthèse de 5-fluoro-1,4-pyrazoles grâce à la réaction catalysée au cuivre entre une 4-fluorosydnone et un alcyne.

Malgré une séparation difficile de la 4-iodosydnone et de la 4-fluorosydnone, la réaction CuSAC directement réalisée sur le produit brut, a conduit à la formation de 5-fluoro-1,4-pyrazole en seulement 15 minutes, avec des rendements compris entre 35 et 73 %, et surtout sans aucune trace de son analogue iodé. Cette méthode, testée sur une large gamme de sydnones (riches et pauvres en électrons), a montré une certaine fiabilité vis-à-vis de ces fonctionnalisations

permettant ainsi de répondre aux limites de la synthèse classique de 5-fluoro-1,4-pyrazoles, comme des rendements faibles ou encore un manque de régiosélectivité.²²¹

III-3.3. Les cycloadditions sous contrainte de tension de cycle (SPSAC)

Les réactions de cycloadditions 1,3-dipolaire entre une sydnone et un alcyne exigent soit l'utilisation de températures élevées, soit l'ajout d'un catalyseur au cuivre. L'activation de l'alcyne par une contrainte stérique a donné lieu à l'émergence de la SPAAC comme décrit par G. Wittig et A. Krebs,⁵⁸ puis par C. R. Bertozzi.⁶⁰ C'est dans la continuité de ce travail que l'étude de la réactivité des sydnones avec des motifs contraints (BCN ou DBCO) a conduit au développement de ce que l'on appelle la SPSAC.

III-3.3.a) Facteurs impactant la réaction SPSAC

En 2014, S. Wallace et J. W. Chin rapportent le premier exemple de SPSAC entre une *N*-phénylsydnone et un cyclooctyne BCN (Schéma 52).²²² Cette réaction s'est montrée beaucoup plus rapide que la version par catalyse au cuivre puisqu'en seulement 30 minutes à température ambiante, avec une quantité équimolaire de réactifs et à température ambiante, le pyrazole correspondant a été obtenu avec un rendement de 99 % (contre 16 heures à 60 °C pour la CuSAC).

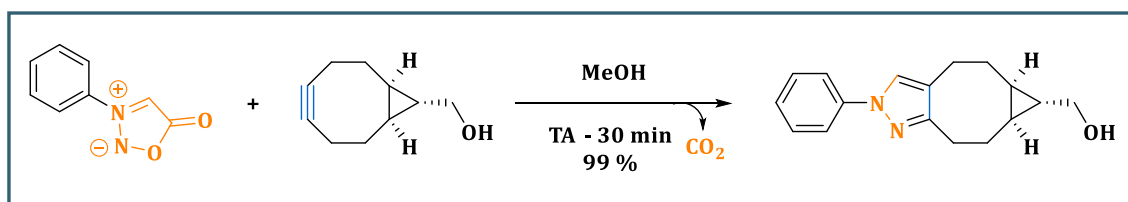


Schéma 52. Premier exemple de réaction de cycloaddition sous contrainte stérique entre une sydnone et un cyclooctyne.

Lors de cette étude, un mécanisme réactionnel en deux étapes a été proposé : i) une cycloaddition [3+2] suprafaciale d'un tautomère de la sydnone ; ii) une cycloréversion de l'intermédiaire formé avec libération de CO₂ et formation du pyrazole correspondant. Des calculs DFT, réalisés par Murphy et coll.²²³ quelques années plus tard, ont permis de valider cette suggestion et d'obtenir des données plus approfondies (Schéma 53). La cycloaddition [3+2] qui se produit *via* l'état de transition TS1 nécessite une énergie libre d'activation de 22,2 kcal.mol⁻¹ dans l'eau, et la formation de l'intermédiaire est exergonique de 22,6 kcal.mol⁻¹. L'état de transition TS2 correspondant à la conversion de l'intermédiaire en pyrazole et la libération de CO₂ ne présente quasiment aucune barrière, ce qui suggère que la vitesse de la réaction dépend seulement de l'étape de cycloaddition [3+2].

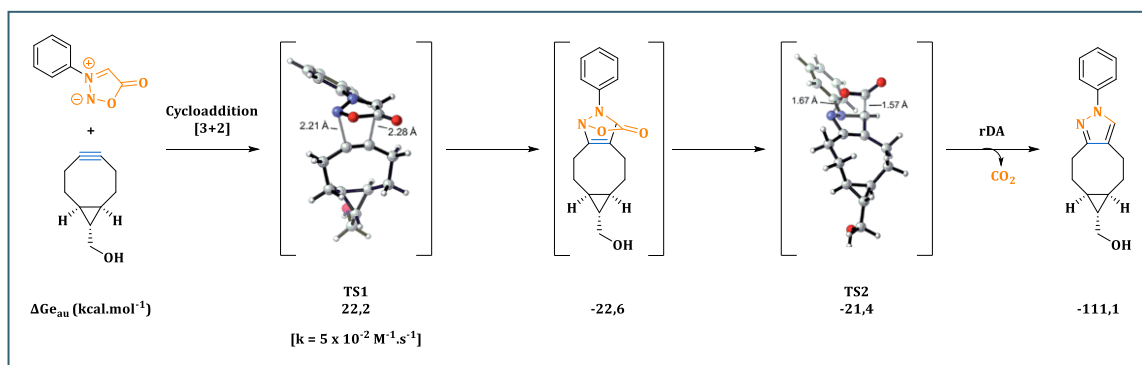


Schéma 53. Mécanisme de la SPSAC selon les calculs DFT réalisés par Murphy et coll.²²³

La biocompatibilité de cette réaction a même pu être démontrée suite au marquage quantitatif d'une protéine fluorescente verte recombinante fonctionnalisée par un BCN, et couplée avec un conjugué fluorescent sydnone-BODIPY en milieu aqueux à 37°C.²²² Bien que la constante de vitesse mesurée pour cette cycloaddition ($k = 0,054 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ en MeOH/H₂O 55:45) soit du même ordre de grandeur que pour la SPAAC ($k = 0,14 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ avec le BCN),⁶⁹ cette valeur est loin d'être suffisante pour transposer ce système à de potentielles applications biologiques. En parallèle de ce travail, l'équipe de F. Taran a publié la même année une étude visant à explorer l'influence des substitutions de la sydnone, en position C₄ ou en position N₃, sur la cinétique de réaction.²²⁴ Alors que les *N*-alkylsydnones ne se sont pas montrées réactives vis-à-vis du motif BCN dans les conditions utilisées (1,5 eq. BCN, tampon PBS/DMSO 9:1, pH = 7,4), les *N*-arylsydnones se sont révélées plus intéressantes, en particulier lorsqu'elles portaient un groupement électroattracteur en position *para* du cycle benzénique (Figure 26).

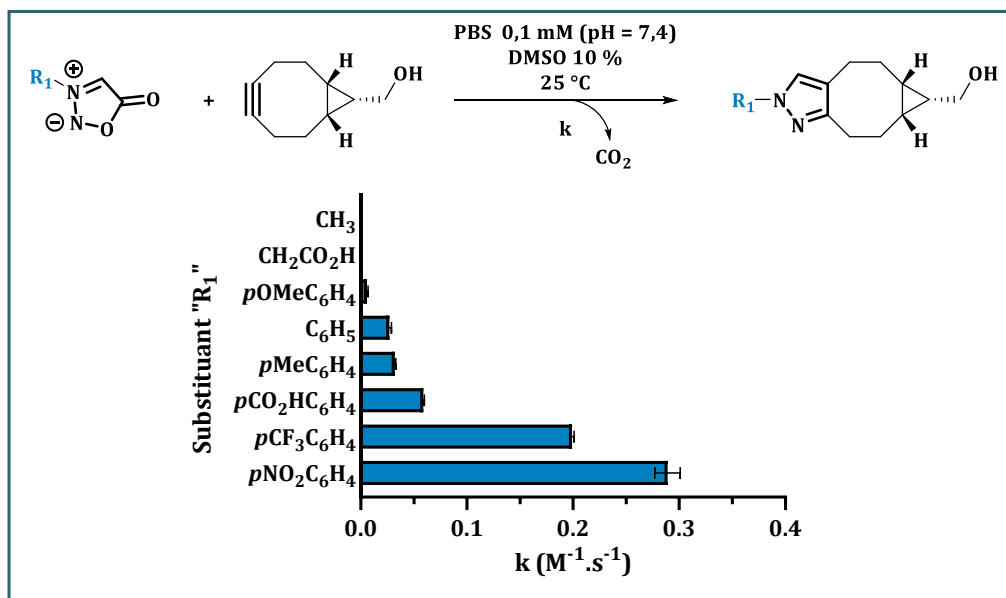


Figure 26. Influence des substitutions (*R*₁) en position N₃ de la sydnone sur la réactivité vis-à-vis du motif BCN.²²⁴

En revanche, une substitution en position C₄ de la sydnone s'est avérée avoir un effet négatif sur la cinétique de réaction, excepté lorsqu'il s'agissait d'un halogène (Partie III-3.3.b). La réactivité de la *N*-phénylsydnone avec divers cycloalcynes et cycloalcènes contraints a également

été étudiée par le groupe de K. N. Houk et J. M. Murphy.²²³ Grâce aux énergies libres d'activation pour l'étape de cycloaddition [3+2] obtenues par calculs DFT et à la cinétique expérimentale mesurée de la réaction SPSAC entre la *N*-phénylsydnone et le BCN, les constantes de vitesse de chaque couple ont pu être calculées (Figure 27). Ces résultats ont pu mettre en évidence que le DIBAC et le BARAC, deux dérivés du dibenzocyclooctyne, étaient particulièrement intéressants avec respectivement des cinétiques de réaction théoriques de 1 et 10 M⁻¹.s⁻¹. La validité de ces calculs a été vérifiée par la mesure expérimentale des constantes de cinétiques, des valeurs de 0,902 M⁻¹.s⁻¹ pour le DIBAC (MeOH/H₂O 55:45) et 1,46 M⁻¹.s⁻¹ pour le BARAC (MeCN/H₂O 1:1) ont été obtenues, respectivement.²²³ L'angle de liaison alcyne étant plus petit pour les dibenzocyclooctynes que pour les alcynes classiques (environ 153° contre 180°), cela les rend plus contraints, ce qui signifie qu'ils nécessitent des énergies d'activation moins élevées pour atteindre leur état de transition et donc que leur réactivité est améliorée. Cette propriété a pu être confirmée par la suite lors d'une étude sur la réactivité des mésoioniques vis-à-vis de divers cycloalcyne.²²⁵

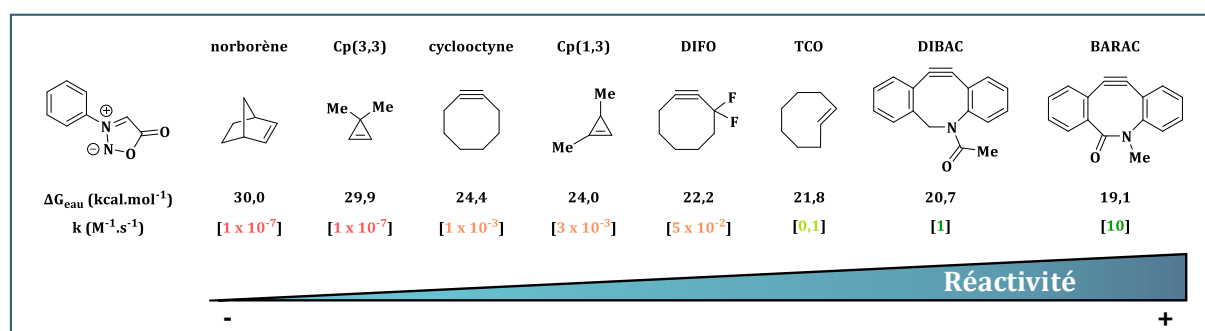


Figure 27. Energies libres d'activation pour l'étape de cycloaddition [3+2], obtenus par calculs DFT entre une sydnone et huit alcynes et alcyne contraints, ainsi que les constantes de vitesses prédites dans l'eau à 25 °C.²²³

En 2019, A. Varnek rapporte une étude plus approfondie des différents facteurs qui ont un impact sur les vitesses de réactions de la SPSAC, confirmant les données théoriques observées.²²⁶ Les calculs DFT réalisés lors de ces travaux ont permis de confirmer que la réaction entre une sydnone et un alcyne contraint s'effectue bien en deux étapes et qu'étant donné la faible barrière d'activation de la réaction rétro Diels-Alder (environ 1 kcal.mol⁻¹), l'étape limitante est la cycloaddition [3+2]. De façon similaire à la SPAAC, l'analyse des symétries orbitales montre que les électrons HOMO de l'alcyne sont transférés à la LUMO de la sydnone. Par conséquent, la réactivité peut être améliorée : i) en augmentant la contrainte de l'alcyne, afin d'élever son énergie HOMO ; ii) en diminuant l'énergie LUMO de la sydnone à l'aide de groupements accepteurs d'électrons en position N₃ ; iii) avec un accepteur d'électron peu volumineux en position C₄ afin d'éviter un encombrement stérique avec les hydrogènes de l'alcyne.

III-3.3.b) Réactivité des halogénosydnone

Lors de l'étude de la réactivité des sydnones suivant leur substitution, il se trouve que les résultats de cinétiques de réaction les plus intéressants ont été obtenus lorsque le motif sydnone était fonctionnalisé par un halogène en position C₄ (Figure 28). En effet, il a été montré que l'amélioration de la cinétique de réaction était proportionnelle à la valeur de l'électronégativité de l'halogène, pouvant conduire à des valeurs allant jusqu'à $k = 1,59 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. La présence d'un atome d'iode en position C₄ permet d'augmenter la constante de vitesse de la SPSAC d'un facteur 11 par rapport à la version hydrogénée (*N*-phénylsydnone), d'un facteur 22 lorsque c'est un atome de brome et jusqu'à 30 pour la chlorosydnone.²²⁴ Dans la logique de ces résultats, la réactivité de la 4-fluorosydnone a conduit à une constante de vitesse de $42 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, soit 1 000 fois plus rapide que la *N*-phénylsydnone.²²⁰

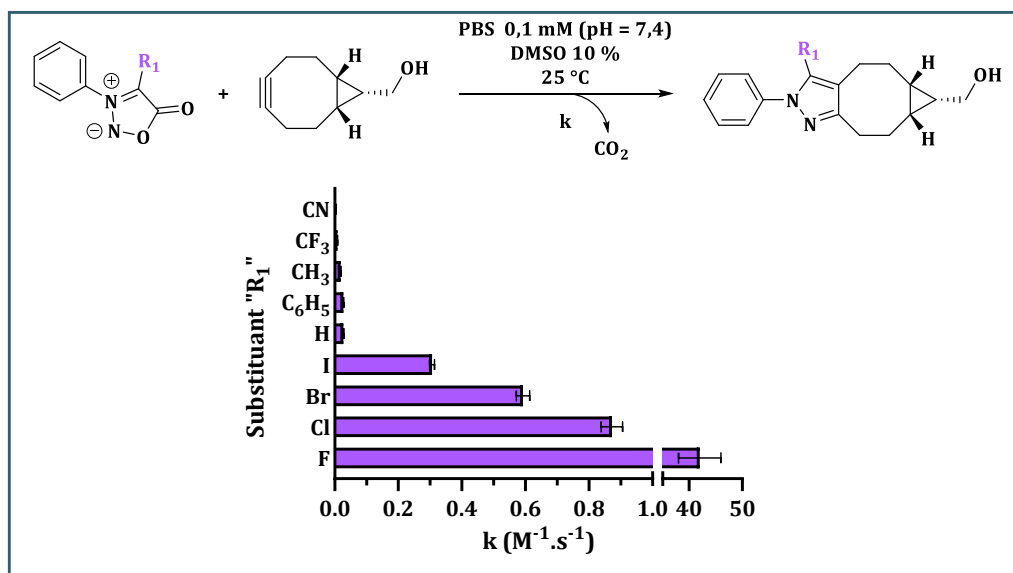


Figure 28. Influence de la substitution (R₁) en position C₄ de la sydnone sur la réactivité vis-à-vis du motif BCN.²²⁴

Pour mieux comprendre l'origine des effets des halogènes et plus particulièrement du fluor sur la réaction SPSAC, des études théoriques basées sur un modèle de distorsion/interaction ont été réalisées par K. N. Houk et Y. Liang.²²⁷ Ces résultats ont montré que la présence d'un atome de fluor en position C₄ de la sydnone facilitait sa distorsion pour atteindre sa géométrie de structure à l'état de transition et diminuait son énergie LUMO (0,99 à 0,81 eV), réduisant drastiquement la barrière d'activation pour l'étape de cycloaddition.

Lors de l'étude sur les fluorosydnone, l'impact de la contrainte du cyclooctyne sur les constantes de vitesse a également pu être étudié.²²⁰ Comme pour le système SPAAC, l'utilisation d'alcynes plus contraints comme le DIBAC ou le TMTM a permis d'améliorer considérablement la vitesse de la cycloaddition [3+2] avec des constantes de $900 \pm 300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et $1\,500 \pm 300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivement. Enfin, comme il avait été observé lors d'une précédente étude,²²⁴ l'introduction de groupements électroattracteurs en position *para* du phényle a permis de favoriser la réaction

avec des constantes atteignant les $1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Néanmoins, la grande réactivité des 4-fluorosydnone rend leur isolation très délicate et conduit également à des problèmes de stabilité en milieu organique ou biologique, ce qui est un frein à leur potentielle utilisation.²²⁰ C'est pourquoi, de nombreuses études se sont plutôt intéressées aux 4-chlorosydnone, décrites comme étant plus stables, et pouvant porter différents groupements électroattracteurs en position N₃ ce qui peut faciliter le développement de nouvelles sondes pour des applications biologiques. En effet, quel que soit le milieu utilisé (sérum ou solution de glutathion 10 mM), la présence d'un atome de chlore n'a montré aucun impact, ni sur la stabilité de la sydnone, ni sur la réaction SPSAC avec un motif BCN.²²⁴

III-3.3.c) Utilisation pour le développement de sondes fluorescentes

Dans un premier temps, la réactivité des chlorosydnone a été appliquée pour le marquage fluorescent de la BSA comme protéine modèle (Schéma 54). Après avoir fonctionnalisé la BSA par réaction de couplage peptidique sur les résidus lysines, conduisant à 28 chlorosydnone/BSA, la protéine modifiée a été engagée dans une réaction de cycloaddition avec le BCN-TAMRA, un agent fluorescent modifié par un motif BCN. Les analyses par électrophorèse et spectrométrie de masse ont montré qu'en seulement 5 minutes en tampon PBS, 85 % des sydnones étaient transformées en pyrazoles contre 45 % avec la sydnone hydrogénée.²²⁴

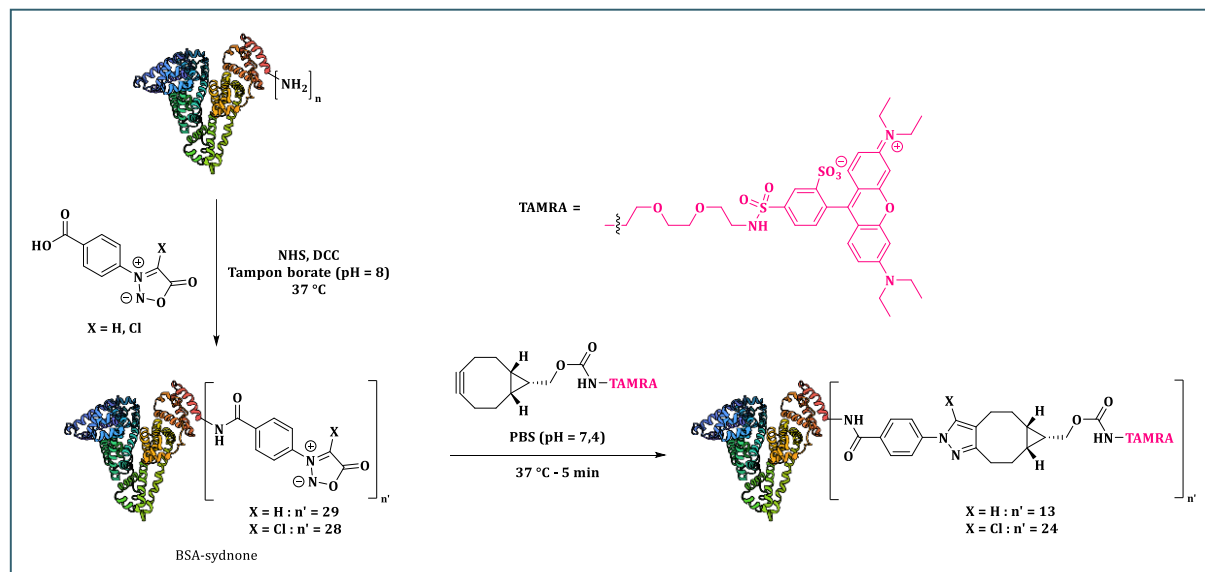


Schéma 54. Utilisation des chlorosydnone pour le marquage fluorescent de protéine.

En 2019, F. Friscourt démontre l'utilisation des chlorosydnone pour l'ingénierie métabolique d'oligosaccharides de cellules vivantes (Figure 29 A).²²⁸ Lors de cette étude, deux acides neuraminiques modifiés par une chlorosydnone en position 5 (Neu5NSydCl) et 9 (Neu9NSydCl) ont été synthétisés puis utilisés pour le marquage de glycane à la surface de cellules U2OS vivantes. Les cellules marquées ont ensuite été couplées à un conjugué BCN-biotine pendant 1 heure et colorées avec de la streptavidine-AlexaFluor568 permettant des analyses par

microscopie confocale à fluorescence (Figure 29 B). Si une coloration a été observée avec Neu9NSydCl signifiant un marquage robuste de la surface cellulaire, aucune coloration n'a été observée pour Neu5NSydCl, ce qui indique que le positionnement de la chlorosydnone sur le dérivé d'acide sialique est très important.

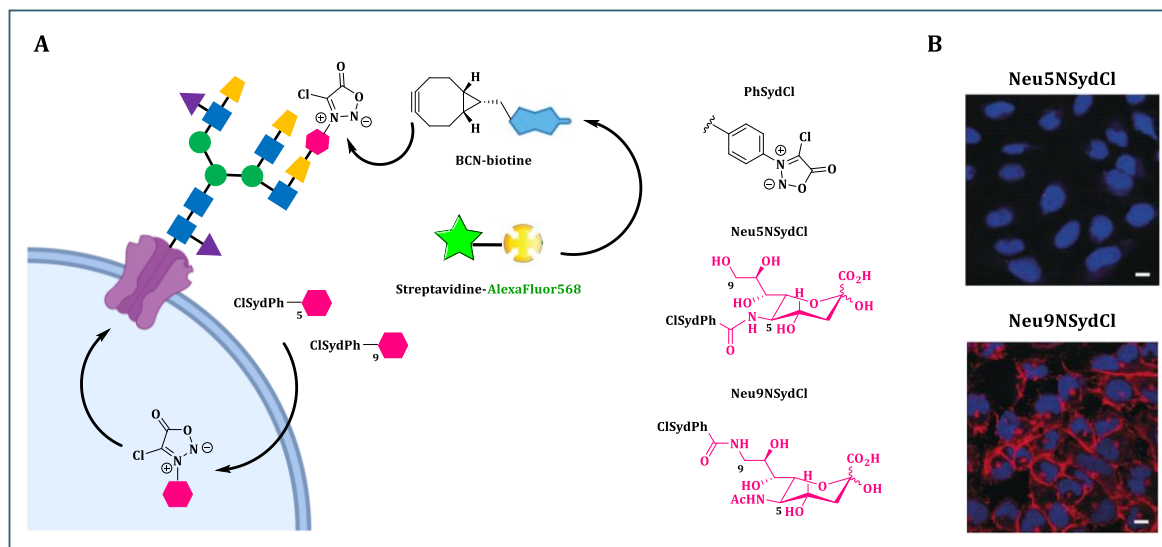


Figure 29. Utilisation des chlorosydones pour l'ingénierie métabolique d'oligosaccharides de cellules vivantes. (A) Marquage de glycanes à la surface de cellules U2OS vivantes ; (B) Images de microscopie à fluorescence des cellules U2OS cultivées avec de la Neu5NSydCl et de la Neu9NSydCl. Ces images ont été reproduites avec la permission de la référence ⁽²²⁸⁾.

Lors de travaux visant à étudier la réactivité de la *N*-phénylsydnone avec divers alcènes ou alcynes, K. N. Houk et J. M. Murphy ont démontré que la SPSAC était « orthogonale » vis-à-vis d'autres réactions de chimie clic comme la IEDDA (Schéma 55).²²³

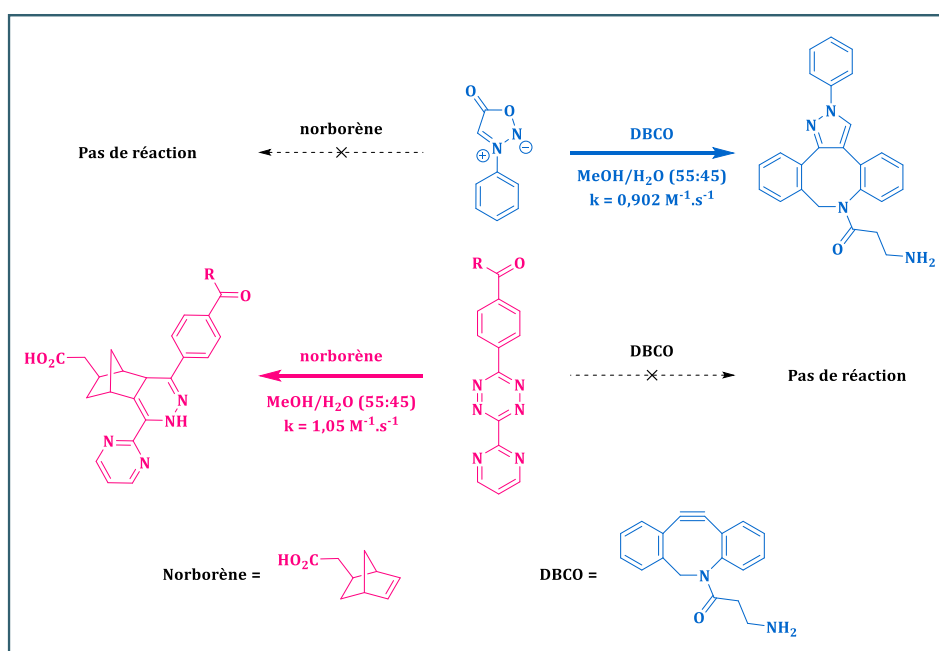


Schéma 55. Orthogonalité de la SPSAC par rapport au système IEDDA avec le couple tétrazine/norbornène.

de fluorescence est augmentée d'un facteur pouvant être supérieur à 300 par rapport à la sydnone de départ. L'efficacité de l'activation fluorogénique de cette sonde a même été démontrée pour l'imagerie de glycoprotéines modifiées par un DIBAC.²³⁰

D'autres motifs de types styryl-sydnone ont également été décrits pour pouvoir être détectés à des longueurs d'ondes plus élevées (jusqu'à 650 nm). Ces sondes, basées sur un cycle pyridinium séparé du motif sydnone par une (ou plusieurs) doubles liaisons, ont toutes montré une amélioration de la fluorescence et des réactivités élevées envers les cyclooctynes ($k = 10$ à $100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) qui les rendent particulièrement adaptées à l'imagerie de protéines cellulaires. Une de ces sondes a pu être utilisée pour le marquage fluorescent d'une myoglobuline pré-modifiée par un DIBAC et cette réaction de cycloaddition s'est même avérée possible à l'intérieur de cellules vivantes de carcinome hépatocytaire Huh-7.²³¹

Enfin, plus récemment des sondes polyaromatiques ont également été développées afin d'évaluer l'impact de la rigidité du noyau sydnone sur les propriétés de fluorescence. Alors que l'activation par formation du pyrazole était plutôt intéressante et que des longueurs d'émissions entre 370 et 441 nm ont été mesurées, le caractère hydrophobe de ce type de composés risque de limiter leur utilisation en milieux biologiques.²³²

III-3.3.d) Utilisation pour le développement de sondes pour l'imagerie nucléaire

Les réactions de chimie clic, possédant des constantes de vitesses élevées, offrent souvent la possibilité de travailler à des concentrations très faibles, ce qui est un avantage majeur pour la préparation de produits d'intérêt et notamment le développement de sondes pour l'imagerie nucléaire. L'utilisation de la SPSAC a permis de générer des radiotraceurs marqués au fluor-18 pour l'imagerie TEP, dont la préparation doit être rapide en raison de la demi-vie relativement courte du radionucléide. L'excellente réactivité des 4-fluorosydnone a pu être utilisée lors d'une preuve de concept pour la mise au point de la préparation d'un radiotraceur marqué au fluor-18 (Schéma 56).

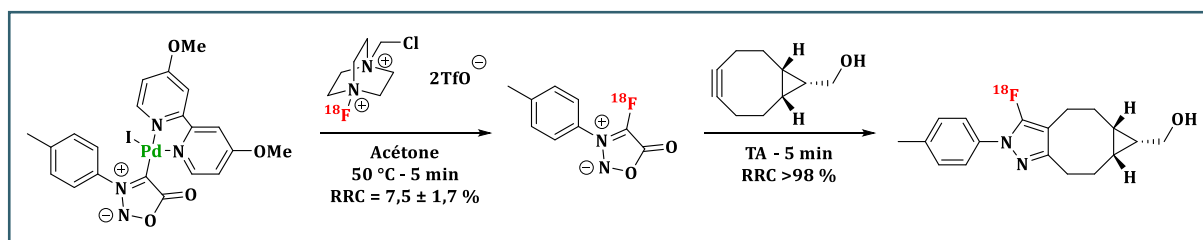


Schéma 56. Utilisation de la SPSAC pour la préparation d'un radiotraceur « modèle » marqué au fluor-18 pour l'imagerie TEP.

Dans un premier temps, le complexe sydnone-Pd(II) a été radiomarké par fluoruration directe avec du [¹⁸F]-Selectfluor bis(triflate), conduisant à la formation de la 4-[¹⁸F]fluorosydnone

avec un RRC de $7,5 \pm 1,7$ %. Le brut réactionnel a ensuite été ajouté au BCN pour former le 4- ^{18}F fluoropyrazole correspondant avec un RRC quantitatif en seulement 5 minutes à température ambiante.²²⁰

D'autres méthodes de radiofluoration, moins directes car utilisant un groupement prosthétique cliquable, ont été développées. En 2017, le groupe de K. N. Houk et J. M. Murphy rapporte la première approche basée sur une fluoration nucléophile au fluor-18, avec la particularité d'utiliser le motif sydnone comme groupement partant. Malgré les conditions de marquages assez dures (température de 150 °C), une large gamme de *N*-arylsydnones dérivées de l'aniline ont pu être ainsi radiomarquées, et la préparation du précurseur phényl bis-sydnone a même permis l'accès à la 4- ^{18}F fluorophénylsydnone. A partir de ce groupement prosthétique, la radiofluoration d'un peptide pré-modifié a pu être réalisée avec un RRC >97 % après 15 minutes à 40 °C (Schéma 57).²³³

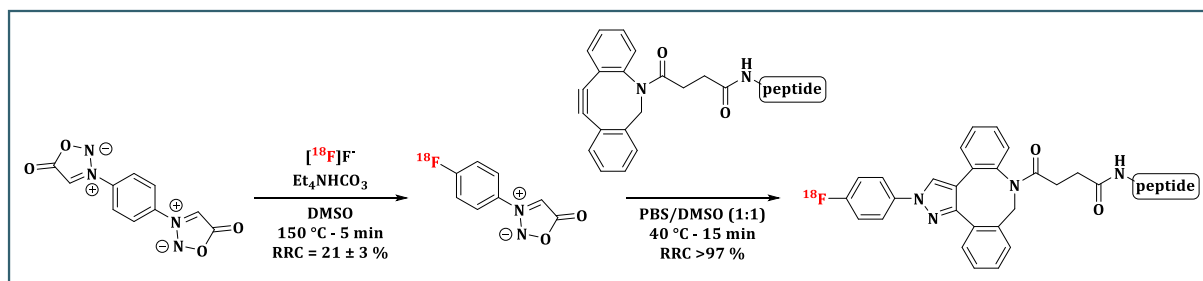


Schéma 57. Préparation de la 4- ^{18}F fluorophénylsydnone pour le marquage au fluor-18 d'un peptide [D-Ala², D-Leu⁵]-Enképhaline modifié par un DBCO.

Dans la continuité de ce travail, une nouvelle stratégie basée sur une réaction de désoxyfluoration d'un précurseur de l'uronium avec du ^{18}F fluorure de tétraéthylammonium a conduit à la 4- ^{18}F fluorophénylsydnone. Après optimisation des conditions de réaction, cette radiosynthèse a été entièrement automatisée permettant l'accès à la sydnone radiofluorée avec un RRC isolé de 37 % et des activités comprises en 10 et 18 mCi (370 et 666 MBq). Par la suite, la 4- ^{18}F fluorophénylsydnone a été utilisée pour le marquage d'un peptide-PEG₃ modifié par un DIBAC dans le but de comparer l'efficacité de marquage avec une approche plus conventionnelle utilisant le *p*- ^{18}F F-fluorobenzaldéhyde. En raison de la stabilité de la sydnone radiomarquée, de sa non volatilité et des conditions douces requises (28 minutes à 40 °C vs 20 min à 80 °C), la SPSAC s'est révélée plus intéressante et a conduit à un RRC quatre fois plus élevé qu'avec la méthode reposant sur un lien oxime (12 % vs 3 %). Des études d'imagerie TEP/CT sur souris saines ont montré une forte accumulation hépatique du radiotracer basé sur le peptide DBCO-PEG₃ par rapport à celui aminooxy-PEG₃, traduisant un caractère plus lipophile. L'introduction d'un espaceur plus polaire de type histidine/acide glutamique (HEHE) à la place du motif PEG₃ a permis de mieux contrebalancer l'impact du motif DBCO en diminuant la lipophilie globale du radiotracer (logP calculé de -9,75 vs -3,25) (Schéma 58). Cette tendance s'est confirmée avec

l'obtention d'un profil pharmacocinétique plus favorable et une élimination 7 fois plus rapide pour le groupement HEHE que pour son analogue PEG₃.²³⁴

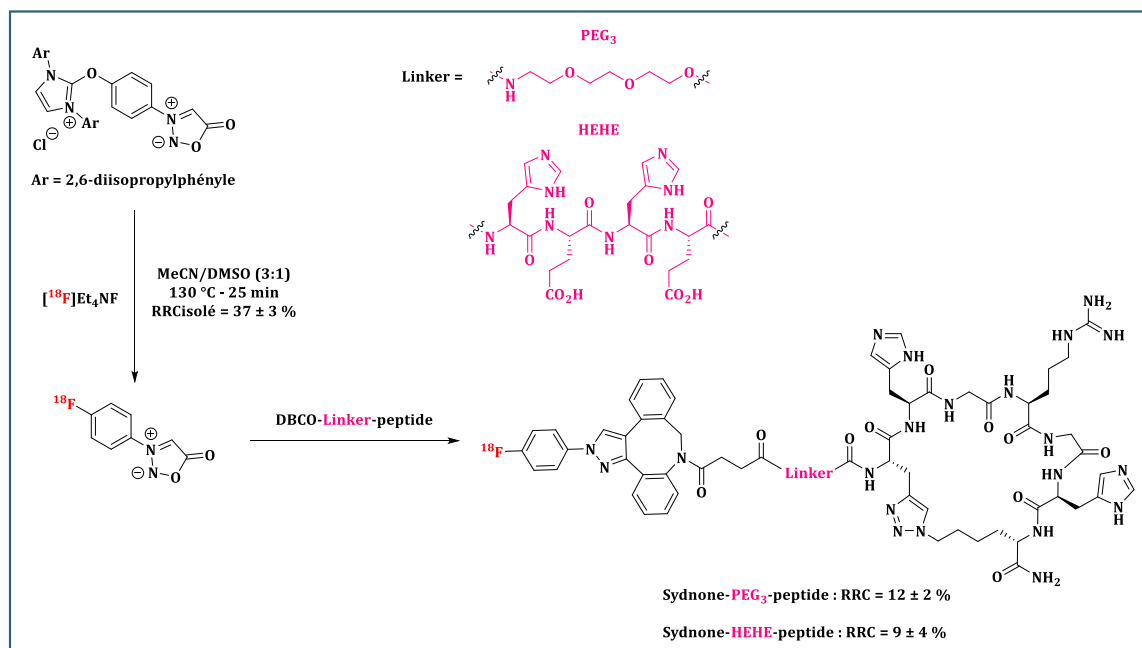


Schéma 58. Stratégie de radiomarquage au fluor-18 d'un peptide à l'aide de la SPSAC.

Dernièrement, la SPSAC a pu être utilisée dans une étude de preuve de concept de pré-ciblage pour l'imagerie TEP avec le système 4-chlorosydnone/DIBAC ($k = 343 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le plasma sanguin).²³⁵ Un motif DBCO-PEG₂ a été choisi pour le radiomarquage au fluor-18, et une chaîne PEG₄ a été ajoutée en position *para* du motif phénylchlorosydnone afin de maximiser l'accessibilité de la sydnone pour la réaction de cycloaddition. L'anticorps cétuximab a ensuite été modifié avec ce fragment PEG₄-chlorosydnone, par réaction au niveau de ses résidus lysines, conduisant à une estimation moyenne de 8 chlorosydnone/anticorps. En ce qui concerne le radiomarquage, la radiofluoruration du DBCO-PEG₂ a été totalement automatisée et a même mené à l'obtention de 4,13 GBq de [¹⁸F]-fluoroDIBAC avec un RRC corrigé de la décroissance de 17 % et une PRC supérieure à 95 % (Schéma 59). Dans un premier temps, l'immunoconjugué cétuximab-chlorosydnone a été injecté par intra-veineuse à des souris nudes greffées afin de maximiser son accumulation à la tumeur, suivi d'une injection 3 jours plus tard de [¹⁸F]-fluoroDIBAC. Les analyses d'imagerie TEP ont révélé un marquage tumoral spécifique et que la majorité de l'activité résiduelle était retrouvée dans la rate et l'intestin, suggérant une élimination hépato-biliaire.

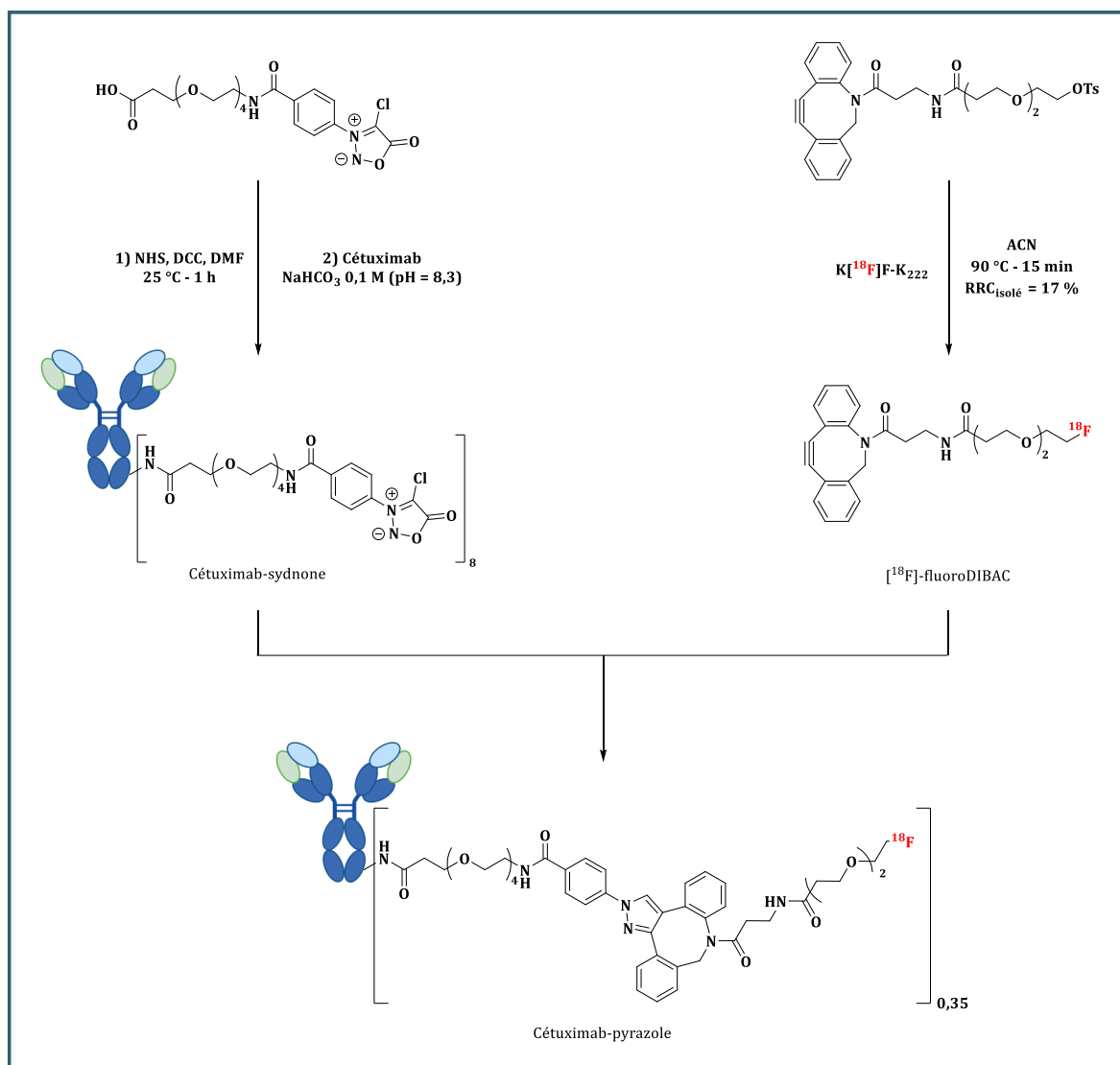


Schéma 59. Préparation d'un immunoconjugué cétuximab-sydnone pour une application en pré-ciblage.

III-4. Conclusion

Décrit pour la première fois en 1935 par J. C. Earl et A. W. Mackney, l'intérêt pour les sydnones n'a cessé d'augmenter, en faisant aujourd'hui la classe de composé mésoionique la plus décrite dans la littérature. Malgré des efforts visant à améliorer la préparation des sydnones, les méthodes de synthèse de ces précurseurs n'ont pas beaucoup évolué comparée à la procédure originale en deux étapes.

Connu pour leurs propriétés biologiques (anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques), il faut attendre les travaux de R. Huisgen en 1962 pour voir le premier exemple de cycloaddition thermique 1,3-dipolaire entre les sydnones et les alcynes. Néanmoins, le développement de ce type de cycloaddition a longtemps été limité à cause de conditions de réactions assez dures (temps de réactions assez longs, températures autour de 180°C) et du manque de régiosélectivité, notamment avec les alcynes asymétriques conduisant à la formation de deux pyrazoles.

Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont visé à optimiser cette étape de cycloaddition, que ce soit pour le développement de conditions de réactions plus douces, mais aussi et surtout pour en améliorer la régiosélectivité. Alors que l'utilisation d'alcyne particulier tel que les alcynylsilanes ou les alcynylboronates ont permis d'améliorer la régiosélectivité, d'autres comme le trifluoroborate d'alcyne ont facilité le développement de cette réaction à température ambiante.

La découverte de la CuSAC par l'équipe de F. Taran lors d'une étude de criblage en 2013 constitue la deuxième avancée majeure dans l'utilisation des sydnones pour des réactions de cycloaddition. En effet, l'ajout d'un catalyseur au cuivre (I) permet un contrôle total de la régiosélectivité en faveur des pyrazoles 1,4-disubstitués et une réduction considérable des températures de chauffage (≤ 60 °C). De plus, cette réaction de cycloaddition a également montré qu'elle pouvait être réalisée dans de nombreux solvants (H_2O , $tBuOH-H_2O$, DMSO, DMF) et même en milieu biologique (plasma sanguin humain à 37 °C) offrant la possibilité d'envisager pour la première fois les sydnones pour des applications en bioconjugaison. Utilisé aujourd'hui en synthèse organique ou encore pour le développement de sondes fluorescentes, le développement de ce type de cycloaddition reste encore limité en raison des quantités nécessaire de catalyseur au cuivre dont la proportion est plus élevée que pour une réaction de CuAAC. Néanmoins, suite aux travaux récents de Taran et *al.* montrant la possibilité de diminuer la quantité de cuivre engagée dans la réaction, il est envisageable que cette limite puisse être levée.

Enfin, la découverte de la réaction SPSAC entre les sydnones et les alcynes contraints représente sûrement la plus grande des avancées, en établissant que ces composés mésoioniques puissent être utilisés pour la chimie bio-orthogonale. Si dans un premier temps une cinétique de réaction relativement lente a été rapportée ($k = 5,4 \times 10^{-2} M^{-1}.s^{-1}$), un travail d'optimisation de la structure des réactifs, notamment au niveau de la sydnone, a permis d'améliorer considérablement les valeurs de cinétiques, allant même jusqu'à rivaliser avec les valeurs atteintes par le système IEDDA avec des valeurs de cinétique de réaction allant jusqu'à $1,2 \times 10^4 M^{-1}.s^{-1}$. En plus de retrouver ce type de réaction dans le développement de sondes fluorescentes ou en glyco-ingénierie, les vitesses de réaction extrêmement rapides de la SPSAC ont même pu être appliquées au domaine de la radiochimie et utilisées pour des applications *in vivo*.

Objectifs des travaux de thèse

I- Introduction du sujet de recherche

I-1. Présentation des travaux antérieurs

Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de Navarro *et al.*, précédemment réalisés dans notre équipe, comparant 5 systèmes bio-orthogonaux (CuAAC : Alk-N₃ ; IEDDA : TCO-Tz / BCN-Tz ; SPAAC : DBCO-N₃ / BCN-N₃) en fonction de leur cinétique de réaction.²³⁶ Pour cela, quatre peptides modèles cliquables (Gly-Lys-Gly) munis de fonctions bio-orthogonales ont été synthétisés, puis radiomarqués à l'iode-125 ou à l'astate-211 à partir de groupements prosthétiques portant des fonctions azotures ou tétrazines (Schéma 60).

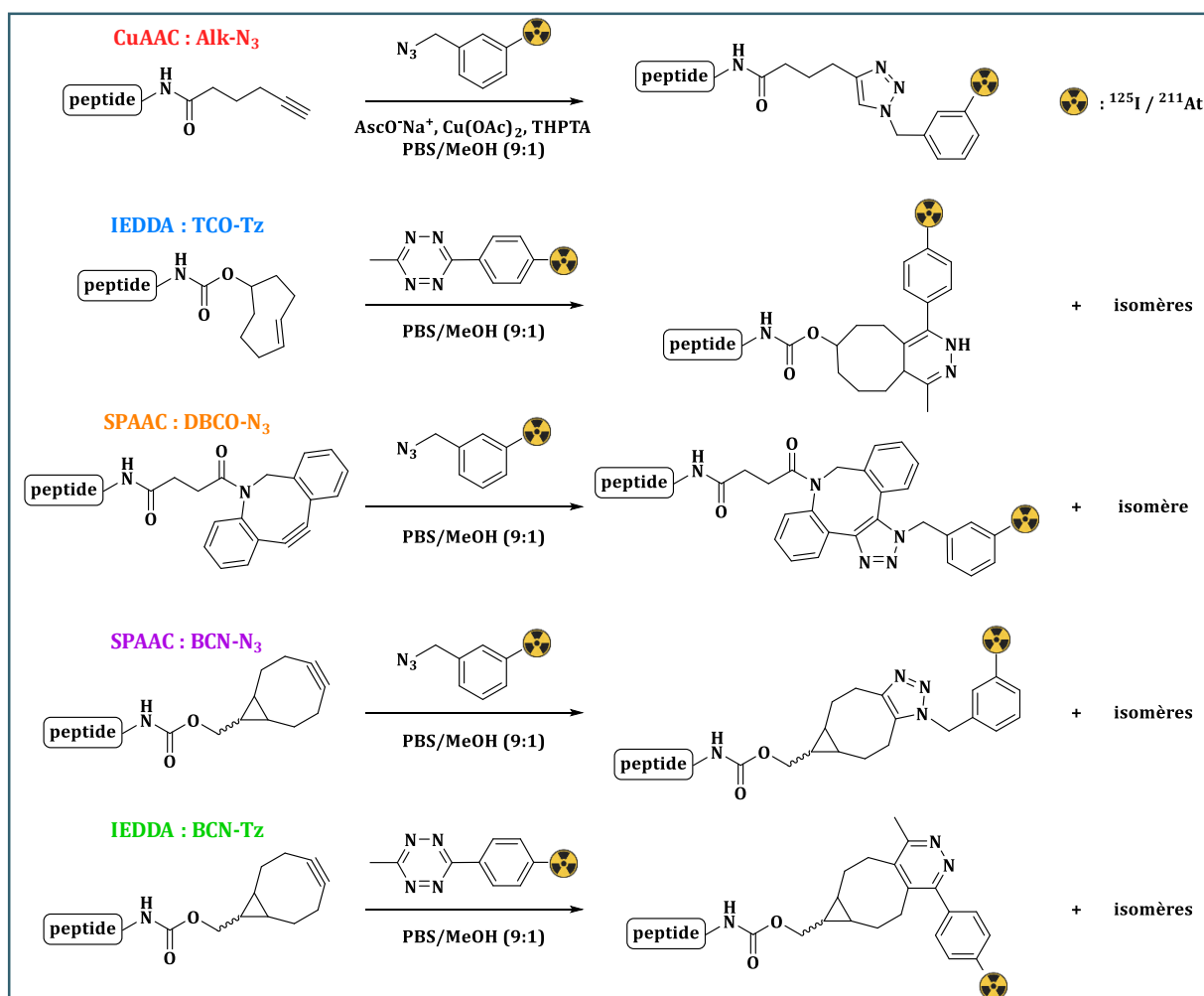


Schéma 60. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 de peptides modèles cliquables à l'aide de réactions bio-orthogonales étudiés précédemment par Navarro *et al.*²³⁶

Comme attendu, la réaction entre le TCO et la tétrazine s'est montrée la plus rapide avec un RRC supérieur à 99 % en seulement une minute. Après optimisation, la réaction catalysée au cuivre a été le deuxième système le plus rapide (5-10 minutes), suivi de la réaction entre le BCN et la tétrazine (15 minutes) et des deux systèmes SPAAC (DBCO-N₃/BCN-N₃), présentant des

cinétiques plus lentes allant de 45-60 minutes à plusieurs heures pour atteindre une réaction complète (Figure 31).

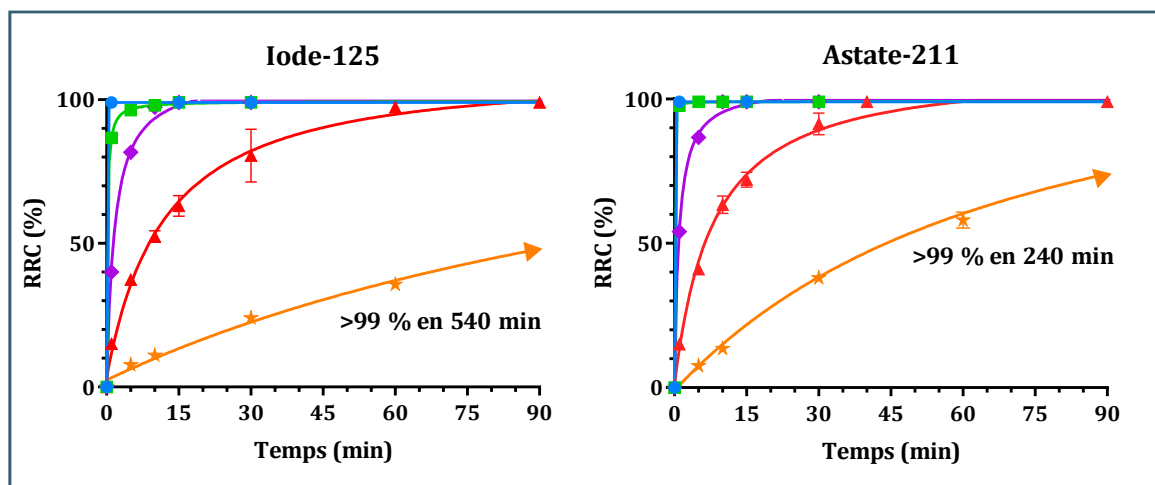


Figure 31. Cinétiques des couplages bio-orthogonaux entre les peptides cliquables et les groupements prosthétiques radiohalogénés : TCO-Tz (●) ; CuAAC (■) ; BCN-Tz (◆) ; DBCO-N₃ (▲) ; BCN-N₃ (★). RRC basés sur l'analyse HPLC du produit brut (n = 3).

Ces travaux ont été approfondis puisque deux de ces systèmes (TCO-Tz et DBCO-N₃) ont été sélectionnés afin d'être utilisés pour le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211, de l'anticorps 9E7.4 ciblant le CD138 murin. Après modification par des fonctions TCO ou DBCO au niveau des résidus lysines, les anticorps ont été radiomarqués à l'aide de la chimie clic, conduisant à des RRC supérieurs à 90 % en seulement 5 minutes pour le système TCO-Tz et 40 minutes pour le système DBCO-N₃ (Schéma 61).

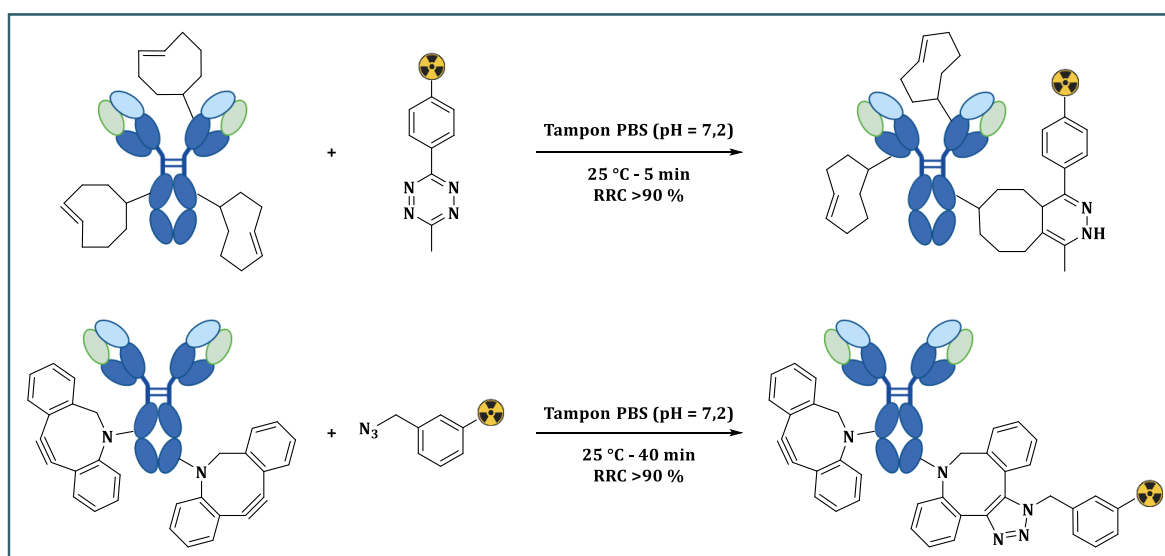


Schéma 61. Radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 d'un anticorps ciblant le CD138 à l'aide d'un groupement prosthétique Tz ou N₃.

A titre de comparaison, les radiomarquages de cet anticorps grâce aux méthodes de bioconjugaison conventionnelles (SIB/[²¹¹At]SAB) sont effectués en 30 minutes et conduisent à

des RRC entre 60 et 75 %. Enfin, des tests de stabilité sérique et d'immunoréactivité ont également été effectués et ont montré que même après modification par chimie clic, les propriétés biologiques de l'anticorps ne sont pas modifiées.

Cependant, malgré des résultats intéressants, les systèmes sélectionnés ne sont pas parfaits et présentent certaines limites. En effet, la grande réactivité du TCO n'est pas sans conséquence sur sa stabilité. En raison d'une isomérisation progressive en CCO, beaucoup moins réactif, ce type d'alcène contraint ne peut pas être stocké sur de longues périodes.⁸⁵ Concernant le deuxième système, l'utilisation d'un motif aussi volumineux que le DBCO peut entraîner la formation de zones hydrophobes et modifier la biodistribution naturelle du vecteur. L'objectif de ce projet consiste à approfondir l'exploration du potentiel de la chimie clic pour la radiohalogénéation de protéines, et ainsi étendre le catalogue de systèmes cliquables pour la vectorisation des isotopes d'intérêt en médecine nucléaire.

I-2. Le choix des sydnones

Depuis l'introduction du concept par C. R. Bertozzi en 2003, de nombreuses réactions dites bio-orthogonales ont été recensées (Figure 32).

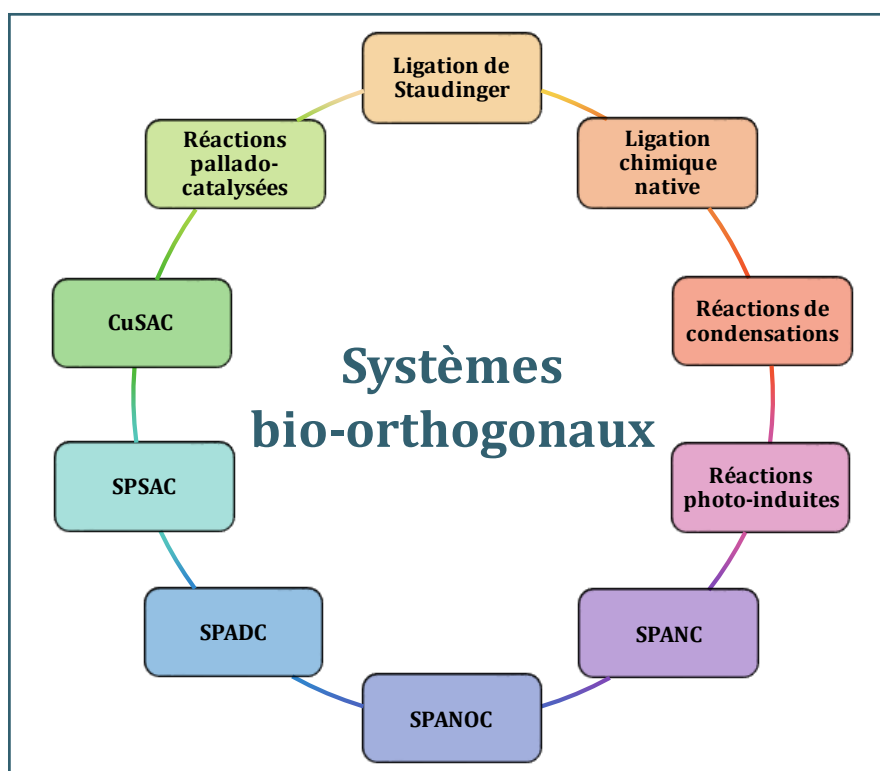


Figure 32. Exemples de systèmes bio-orthogonaux rapportés dans la littérature pouvant être intégrés à l'étude comparative.

Parmi les différents systèmes décrits dans la littérature, notre choix s'est porté sur deux nouveaux systèmes impliquant les sydnones, la SPSAC et la CuSAC (Schéma 62). Ces composés mésoioniques, les plus étudiés pour des réactions de cycloaddition, se distinguent par leur facilité

de synthèse (seulement deux étapes), leur stabilité chimique et surtout leur très bonne réactivité (10^{-2} - 10^4 $M^{-1}\cdot s^{-1}$) pouvant dans certains cas rivaliser avec les valeurs atteintes par le système IEDDA ($1\cdot 10^7$ $M^{-1}\cdot s^{-1}$). En raison de leurs deux positions fonctionnalisables (en N₃ et C₄ du motif sydnone), ces composés ouvrent la voie à la possibilité d'y introduire de nombreux groupements d'intérêt. Enfin, de par leur similarité avec les azotures, ces deux nouveaux systèmes pourront être comparés avec ceux déjà étudiés lors des travaux précédents (SPAAC/CuAAC).

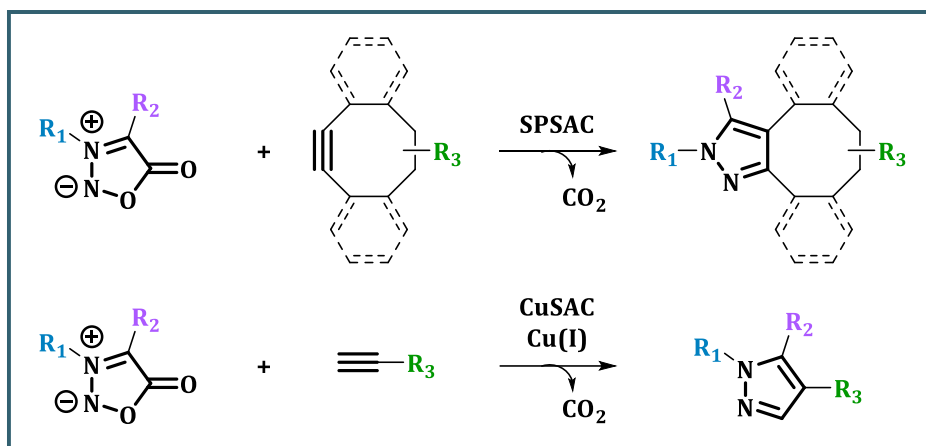


Schéma 62. Représentation des deux systèmes sélectionnés impliquant les sydnones.

I-3. Choix du groupement partant pour la radiohalogénéation : les acides boroniques

Afin d'introduire ces deux nouveaux systèmes à l'étude cinétique précédemment décrite, l'ajout d'une fonction permettant la radiohalogénéation de la sydnone est nécessaire. Dans le cadre de ce projet, les radiomarquages ont été effectués à l'iode-125 (demi-vie de 59,4 jours) disponible commercialement sous forme d'iodure de sodium ($[^{125}I]NaI$). L'iode possédant un isotope stable (^{127}I), cela a permis de synthétiser des références non-radioactives afin de confirmer l'obtention des produits souhaités lors des radiomarquages. De plus, l'astate-211 étant également un halogène, le groupement partant choisi pourra être transposé lorsque des marquages avec ce radionucléide seront envisagés.

De nombreuses méthodes permettant le radiomarquage à l'iode de composés d'intérêt sont décrites dans la littérature.¹¹⁸ Celles-ci reposent sur l'utilisation d'iode sous forme nucléophile ou électrophile pour former généralement une liaison aryl-iode stable *in vivo* (Figure 33). Si l'échange isotopique fait partie des méthodes les plus simples pour la radioiodation de composés organiques,²³⁷ l'utilisation d'un précurseur non-radioactif en large excès est néanmoins problématique. L'activité molaire du produit radiomarqué se trouve donc limitée par la présence du précurseur (impossible à séparer de la version radiomarquée) avec l'inconvénient principal, dans notre cas, d'une possible compétition lors de l'étape de réaction clic.

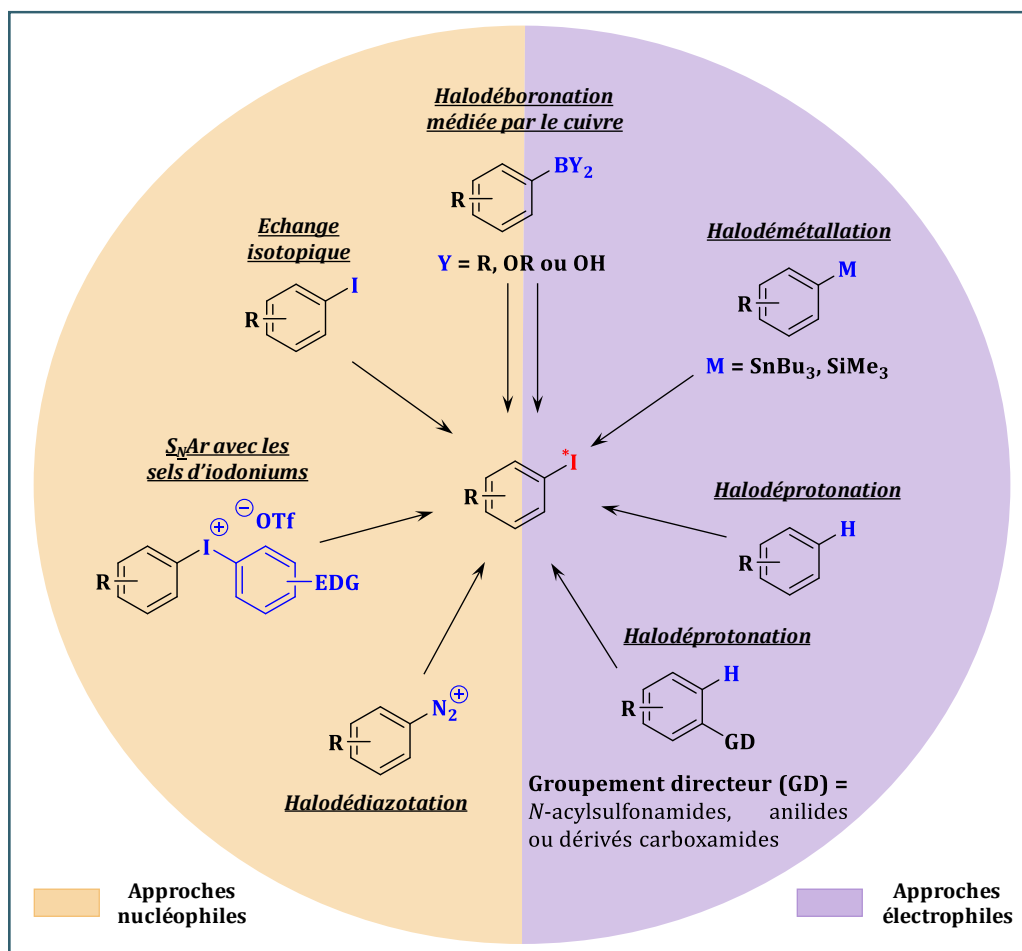


Figure 33. Principales approches pour la préparation de composés iodoaryles radiomarqués.¹¹⁸

Les sels d'aryldiazoniums sont également connus pour l'introduction d'iode sous sa forme nucléophile. En revanche, en raison d'une stabilité limitée, ces précurseurs doivent être générés *in situ* à partir de l'aniline correspondante. Malgré des efforts récents visant à simplifier les conditions de réactions,²³⁸ cette stratégie reste très peu utilisée pour la production des radiopharmaceutiques.

Bien que le potentiel de l'iode hypervalent ait été également investigué ces dernières années avec notamment l'utilisation des sels d'aryliodoniums, utilisés par notre équipe lors de la précédente étude,²³⁶ ces méthodes ne sont pas idéales. L'inconvénient principal de cette stratégie est la formation d'un produit secondaire lors de l'étape de radiomarquage. De plus, la présence de l'analogie iodé non-radioactif, issu de la dégradation du précurseur pendant le marquage, peut provoquer les mêmes problèmes de compétition que l'échange isotopique.

Depuis quelques années, la voie des acides/esters boroniques connaît un intérêt grandissant. Décrite pour la première fois en 2016 par V. Gouverneur,²³⁹ cette méthode repose sur l'utilisation d'un catalyseur au cuivre (II) et permet de réaliser les réactions en conditions douces (température ambiante), d'obtenir d'excellents RRC et de limiter les risques de formations de sous-produits radiomarqués.²⁴⁰ Même si la préparation de précurseurs acides/ester

boroniques peut s'avérer délicate de par les difficultés de purification liée à leur polarité, le précurseur en principe facilement séparable du produit radioiodé, permet d'atteindre des activités spécifiques plus importantes pour une réaction clic plus efficace. De plus, l'absence d'analogues iodés non-radioactifs permet d'éviter une possible compétition lors de l'étape de réaction clic. C'est pour ces différentes raisons que les acides boroniques ont été choisis comme groupement partant pour la radiohalogénéation dans le cadre de ce projet.

En raison des quantités très faibles de produits formés lors des radiomarquages ($\approx 10^{-10}$ mol), la caractérisation de ces composés par les techniques d'analyses classiques telle que la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectrométrie de masse n'est pas possible. De ce fait, les références iodées non-radioactives correspondantes ont été synthétisées et permettront de suivre par HPLC la formation des produits issus des couplages bio-orthogonaux lors des études cinétiques. Étant donné que les structures des molécules sont similaires, puisque seul l'isotope change (iode-127 ou iode-125), des temps de rétention identiques sont attendus.

II- Objectifs des travaux de thèse

Ce projet de recherche a été divisé en deux parties :

La première partie a consisté à explorer davantage le potentiel de la chimie clic pour la radiohalogénéation en évaluant les couples sydnones/alcyne comme substrats potentiels, puis de comparer ces systèmes à ceux précédemment décrits.

La deuxième partie a porté sur l'optimisation de ce type de système pour une application sur de nouveaux vecteurs (dérivés peptidiques) ou d'autres radionucléides (fluor-18).

II-1. Évaluation des sydnones comme groupement prosthétique pour le radiomarquage à l'iode-125

L'iode et l'astate présentent plusieurs radioisotopes d'intérêt pour la médecine nucléaire, que ce soit pour l'imagerie avec l' ^{123}I (γ , 13,2 h), l' ^{124}I (β^+ , 4,18 j), ou la thérapie avec l' ^{125}I (e^- Auger, 59,9 j), l' ^{131}I (β^- , 8 j) et l' ^{211}At (α , 7,2 h), l'un des émetteurs alpha les plus prometteurs pour la radiothérapie interne vectorisée.

Les méthodes de bioconjugaison conventionnelles permettant l'association d'un radionucléide à une protéine vectrice consistent, dans la majorité des cas, à utiliser les fonctions chimiques naturellement présentes sur les vecteurs (lysine, tyrosine, cystéine). Néanmoins, ces méthodes présentent certaines limites : des rendements de couplage non-optimaux, des cinétiques de réactions parfois lentes ou encore une absence de régiospécificité pouvant entraîner une perte de reconnaissance du vecteur pour sa cible.

Parmi les différents outils à notre disposition et pour pallier ces différents problèmes, il est possible d'utiliser une chimie plus polyvalente : la chimie bio-orthogonale. Celle-ci apparaît comme une alternative intéressante en raison de sa compatibilité avec les systèmes biologiques et du fait qu'elle n'interfère pas avec les processus biochimiques naturels. Les travaux précédemment publiés par notre équipe ont démontré que l'utilisation de systèmes bio-orthogonaux basés sur des réactions telles que la CuAAC, la SPAAC ou la IEDDA pouvait améliorer significativement le radiomarquage de protéines à l'iode-125 et à l'astate-211.²³⁶

Les sydnones ayant connu un fort intérêt ces dernières années en raison de leur réactivité avec des alcynes terminaux (CuSAC) ou contraints (SPSAC), la première partie de ce projet s'est portée sur l'utilisation de ces systèmes bio-orthogonaux pour une transposition au marquage de vecteurs d'intérêt avec des radiohalogènes lourds.

Pour y parvenir, cette partie s'est divisée en plusieurs étapes. Tout d'abord un travail de synthèse a été nécessaire pour la préparation d'une sydnone munie d'une fonction acide boronique pour l'étape de radiomarquage à l'iode-125 (Figure 34 A). En raison de l'impact de la structure de la sydnone sur la cinétique de réaction,²²⁴ des optimisations du motif ont également été effectuées. En parallèle, un azoture fonctionnalisé lui aussi par une fonction acide boronique a également été préparé (Figure 34 B). Ce précurseur a servi de molécule référence lors des études comparatives des systèmes SPSAC/SPAAC et CuSAC/CuAAC. Des peptides modèles munis des fonctions cliquables complémentaires ont également été préparés afin de réaliser, à l'aide des analogues iodés non-radioactifs, une étude préliminaire sans radioactivité permettant de déterminer les constantes de vitesses de ces réactions (Figure 34 C). Après optimisation des conditions de radiomarquage des sydnones, cette même étude a été réalisée à l'iode-125 dans le but d'identifier le ou les systèmes bio-orthogonaux les plus intéressants en termes d'efficacité de radiomarquage et de cinétique de réaction pour une transposition au marquage d'un vecteur d'intérêt (Figure 34 D).

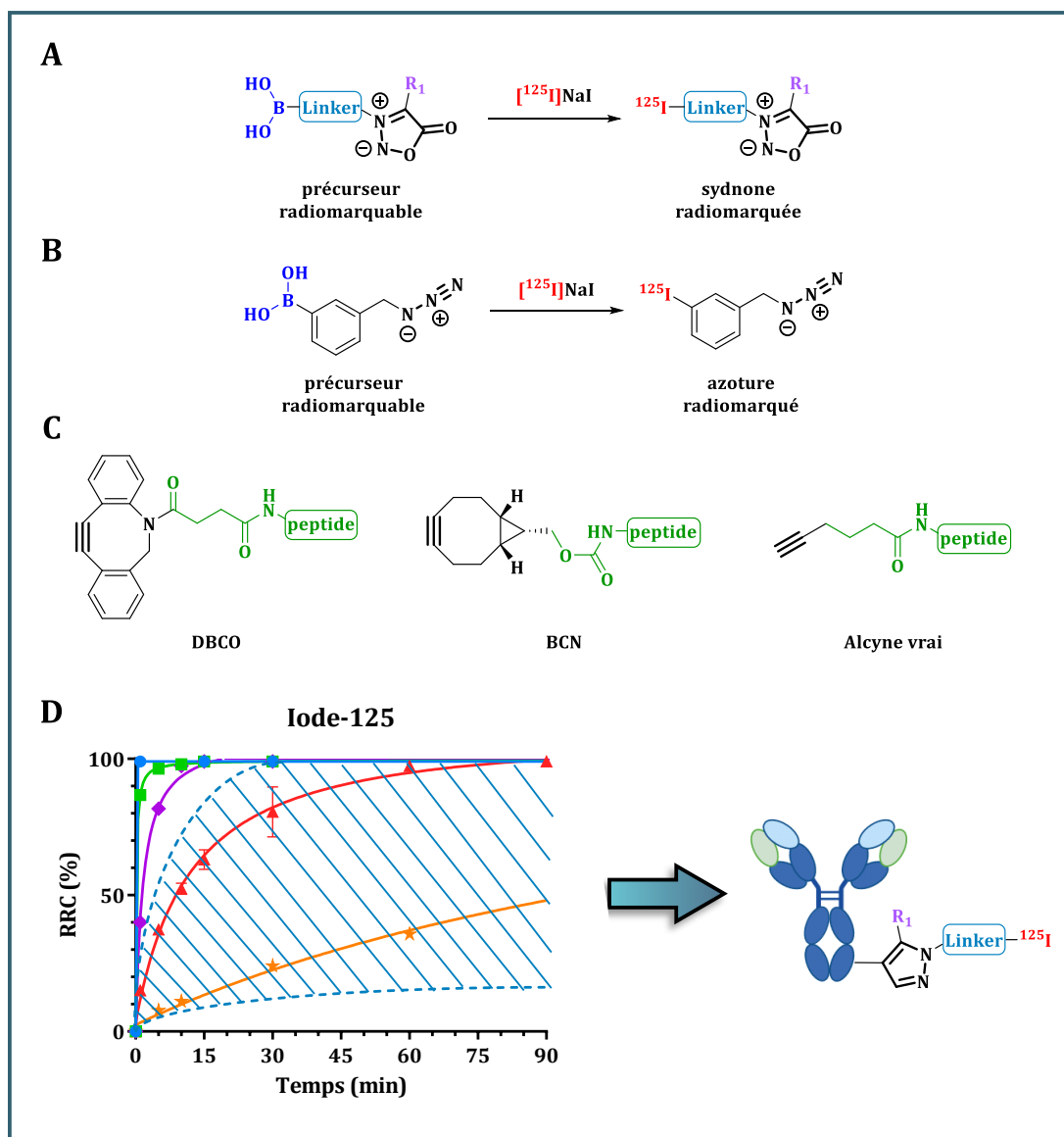


Figure 34. Représentation des différentes étapes pour radiomarquer un vecteur d'intérêt à l'iode-125. (A) Synthèse des sydnones ; (B) Synthèse d'un azoture de référence ; (C) Structures des peptides modèles cliquables envisagés dans ce travail ; (D) Etudes comparatives des systèmes SPSAC/SPAAC et CuSAC/CuAAC puis radiomarquage d'un vecteur immunologique.

II-2. Optimisation du groupement prosthétique azoture radioiodé

La seconde partie se concentre sur la transposition de ces systèmes à d'autres biomolécules et/ou radionucléides. Lors de la précédente étude, l'utilisation de sels d'aryliodoniums comme précurseur d'un radioiodoaryle fonctionnalisé par un groupement azoture a pu montrer certaines limites : la formation d'un sous-produit radiomarqué, la présence d'analogue iodé non-radioactif et une perte d'activité non-négligeable pendant les phases d'évaporation due à la volatilité du produit radiomarqué (Schéma 63).²³⁶

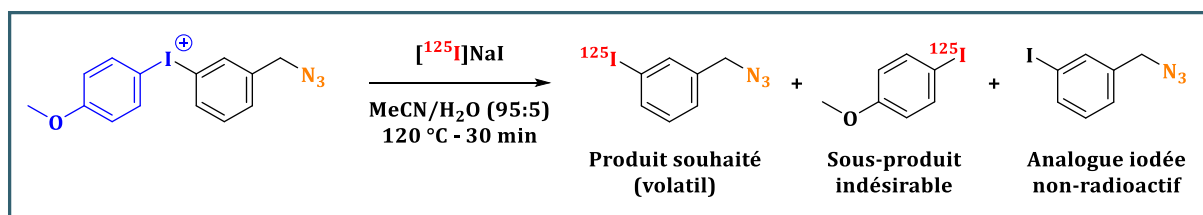


Schéma 63. Limites mises en évidence lors du marquage à l'iode-125 d'un précurseur sel d'aryliodonium.²³⁶

Ces limites se sont illustrées lors de l'utilisation d'un de ces systèmes (SPAAC entre un azoture et un DBCO) pour la préparation du peptide [Tyr³, Lys⁵] octréotate acétate (analogue de la somatostatine) radiomarqué à l'iode-125, entraînant un impact sur les rendements de marquage ou sur l'activité molaire. De plus, les modifications structurales engendrées par l'ajout de ce système ont conduit à une modification des caractéristiques générales du peptide radiomarqué et notamment à une augmentation de sa lipophilie.

Pour tenter de pallier ces problèmes, une modification de la structure du précurseur a été envisagée avec l'introduction d'un acide boronique comme fonction de radiomarquage (au lieu des sels d'iodoniums) pour limiter la formation de sous-produit, et l'ajout d'une chaîne polyéthylène glycol (n = 3) pour contrebalancer la lipophilie du DBCO mais également pour limiter la volatilité du produit radiomarqué (Schéma 64).

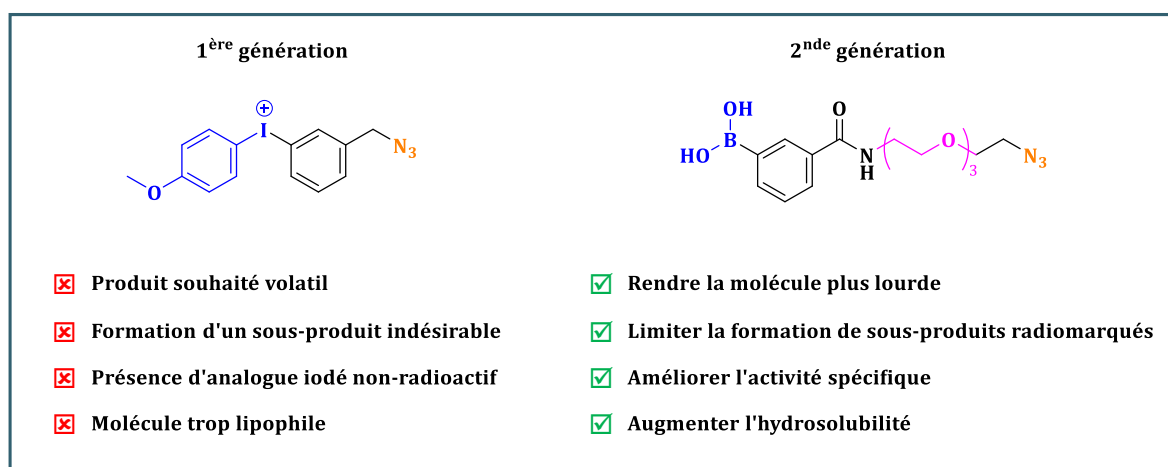


Schéma 64. Structure de l'azoture bifonctionnel envisagé.

Dans un premier temps, le précurseur a été synthétisé puis radiomarqué à l'iode-125. La réaction de cycloaddition avec le peptide [Tyr³, Lys⁵] octréotate acétate a ensuite été réalisée et la lipophilie du produit formé a été mesurée pour comparaison avec le précédent motif étudié. L'impact de la modification de la structure sur la réactivité du précurseur a également été étudié *via* une étude cinétique sans radioactivité et à l'iode-125 sur des peptides modèles. Enfin, afin d'élargir le champ d'application de ce type de système, ce motif a également pu être radiomarqué au fluor-18.

Résultats et discussions

I- L'intérêt des sydnones pour le radiomarquage à l'iode-125

I-1. Préparation des précurseurs

I-1.1. Préparation de l'azoture bifonctionnel

Afin de pouvoir évaluer les différents systèmes bio-orthogonaux impliquant les sydnones par rapport à ceux déjà étudiés, un système de référence a été sélectionné pour pouvoir établir cette comparaison. Les azotures étant également impliqués dans des réactions de cycloaddition sous contrainte stérique (SPAAC) et catalysées au cuivre (CuAAC), ce choix s'est donc orienté vers les systèmes DBCO-N₃ et Alk-N₃.

Pour l'obtention du précurseur azoture **1**, l'idée a été de reprendre une structure équivalente à celle de la précédente étude mais en introduisant une fonction acide boronique pour le radiomarquage. Cela afin d'éviter la présence d'analogue iodée non-radioactif obtenu par la méthode des sels d'aryliodoniums et faciliter la comparaison avec les sydnones qui seront également fonctionnalisées par des acides boroniques. Le précurseur **1** a été obtenu par substitution nucléophile entre l'acide 3-(bromométhyl)phénylboronique et l'azoture de sodium, selon le protocole décrit par Healy et *al.*,²⁴¹ avec un rendement moyen de 42 %. La référence iodée non-radioactive **2** a quant à elle été préparée à partir du bromure de 3-iodobenzyle, selon le protocole précédemment décrit par notre équipe, avec un rendement de 63 % (Schéma 65).²³⁶

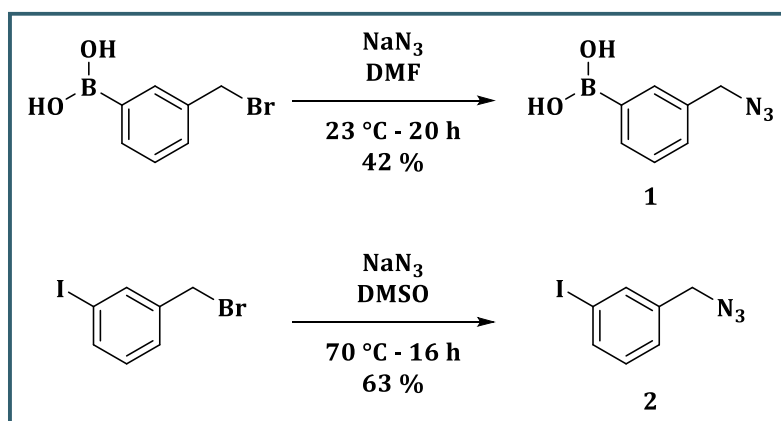


Schéma 65. Préparation du précurseur **1** et de la référence iodée **2**.

I-1.2. Préparation de la sydnone bifonctionnelle

I-1.2.a) Introduction de la fonction acide boronique par attaque électrophile

Pour l'obtention du motif sydnone, l'idée de départ a été de développer un précurseur de type *N*-arylsydnone simple et d'y introduire la fonction acide boronique en position *para* (Schéma 66). Cette position a été choisie car il est rapporté dans la littérature que l'ajout d'un groupement électroattracteur (effet -I de l'iode) en position *para* améliore la réactivité des *N*-arylsydnones.²²⁴

De plus, cette position est très largement utilisée pour l'ajout de substituants et un exemple de radiomarquage au fluor-18 a même été décrit.²³³

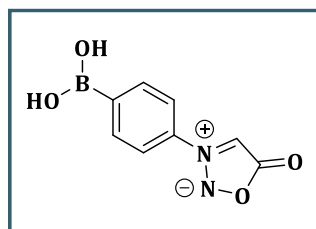


Schéma 66. Structure du précurseur bifonctionnel envisagé.

Pour générer ce précurseur, le dérivé iodé **4** a été utilisé. Celui-ci a été synthétisé selon le protocole en deux étapes décrit par Taran et coll.²²⁴ (Schéma 67). Le dérivé aminoacide **3** est obtenu par amination réductrice de la *p*-iodoaniline puis une nitrosylation suivi d'une cyclodéshydratation « one-pot » permet l'obtention de la sydnone iodée **4** avec un rendement global de 65 %.

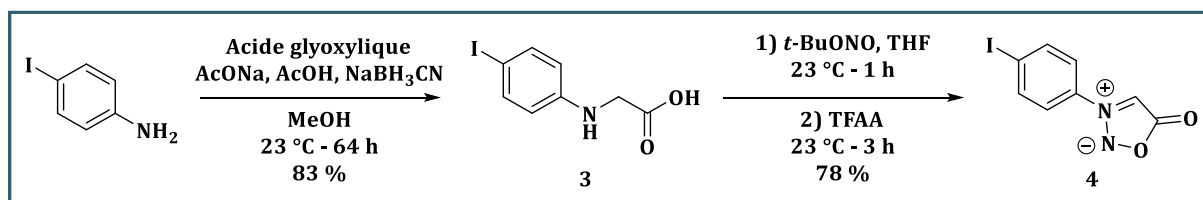


Schéma 67. Synthèse en deux étapes du dérivé iodé **4**.

Dans un premier temps, l'insertion de la fonction acide boronique a été envisagée par métallation *via* un échange halogène/lithium avec le *n*-buthyllithium (*n*-BuLi), suivi d'une attaque électrophile du borate de triméthyle (B(OMe)₃). Lors d'une étude de A. Schmidt visant à évaluer la déprotonation de diverses *N*-phénylsydnone substituées en position *para*, les auteurs ont remarqué qu'en présence de 1,4 équivalents de *n*-BuLi, la liaison carbone-lithium prioritairement formée se situait au niveau du carbone en position C₄ de la sydnone et non sur le groupement phényle.²⁴² Malgré une augmentation de la quantité de *n*-BuLi (2 à 6 équivalents), afin de favoriser la formation de la liaison carbone-lithium souhaitée, aucun des tests réalisés n'a permis de synthétiser le précurseur bifonctionnel **5**, ni même la sydnone fonctionnalisée en position C₄ (Schéma 68). Suite à ces résultats, deux hypothèses ont alors été émises : i) l'intermédiaire organolithien **4a** s'hydrolyse avant l'ajout de B(OMe)₃; ii) l'électrophile utilisé n'est pas suffisamment réactif. Des analyses par HPLC et spectrométrie de masse du milieu réactionnel, après l'ajout de l'électrophile, ont permis de montrer que la réaction conduisait à un mélange de sydnone de départ **4** et d'un produit hydrolysé correspondant à la *N*-phénylsydnone, ce qui laisse supposer que la formation de la liaison carbone-lithium souhaitée a bien eu lieu (Schéma 68).

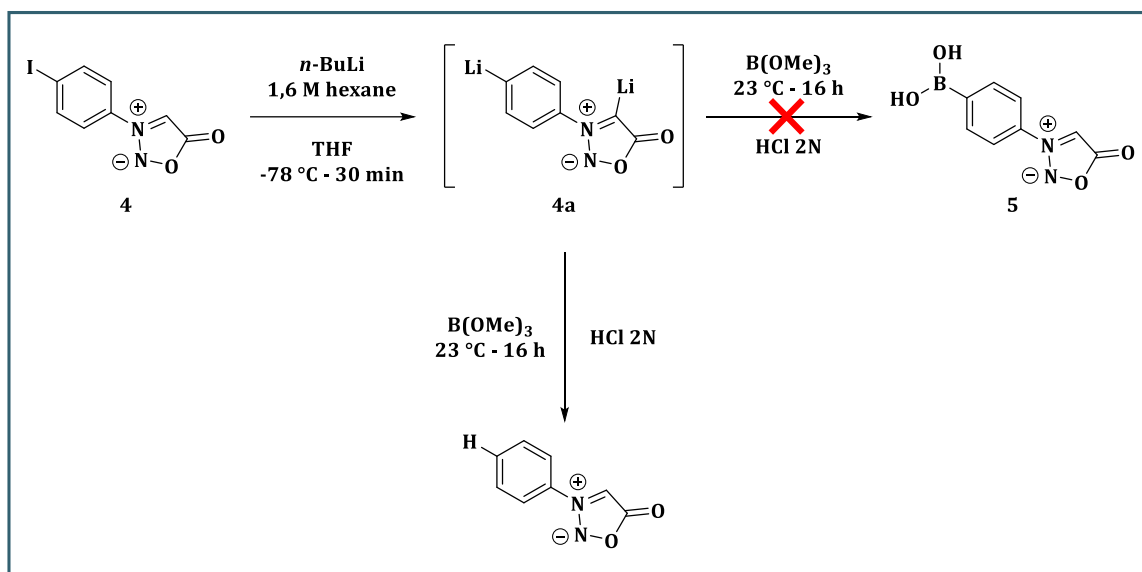


Schéma 68. Voie d'accès au précurseur bifonctionnel 5 envisagée.

Etant donné les précautions prises pour maintenir une atmosphère inerte et un milieu anhydre, cela laisse plutôt supposer un problème de réactivité avec le B(OMe)₃. Afin de synthétiser ce précurseur, il serait intéressant d'utiliser d'autres électrophiles tel que le borate de triéthyle²⁴³ ou de triisopropyle,²⁴⁴ qui sont également employés pour l'introduction d'une fonction acide boronique.

L'utilisation d'un intermédiaire organolithien pour la formation de la sydnone bifonctionnelle 5 n'ayant pas fonctionné, une autre voie de synthèse a été explorée en introduisant une fonction ester boronique (Schéma 69). Cependant, malgré une consommation de la sydnone iodée 4, aucun des produits formés ne correspondaient au précurseur souhaité et les analyses par spectrométrie de masse et RMN n'ont pas permis de les identifier.

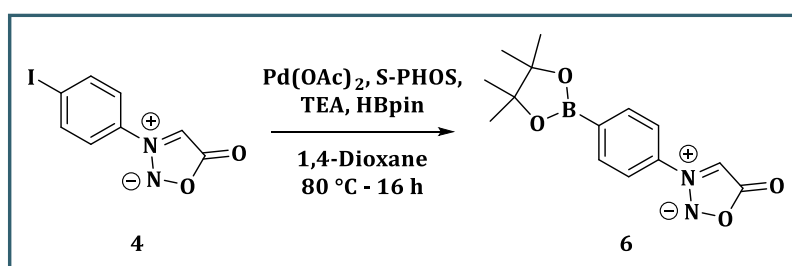


Schéma 69. Voie d'accès alternative testée pour la préparation d'un précurseur sydnone bifonctionnel fonctionnalisé par un ester boronique.

En raison des difficultés de synthèse du précurseur bifonctionnel, une nouvelle structure a été envisagée pour le précurseur sydnone. Toutefois, l'accès à la molécule 6 pourra être réévalué en employant une méthode rapportée au cours de ce projet par le groupe de F. Taran, consistant à former l'ester boronique 6 à partir de l'iodoaryle 4.²⁴⁵ En plus de conduire à un mélange avec l'acide boronique 5 envisagé, cette stratégie a également été utilisée pour une fonctionnalisation en *mé*ta de la sydnone, démontrant l'efficacité de ce procédé. Alors que de l'acétate de palladium

(II) avait été utilisé lors des tests, les auteurs rapportent l'utilisation d'un autre catalyseur, le bis(acétonitrile)dichloropalladium (II). De plus, cette réaction a été effectuée à l'abri de la lumière, ce qui n'était pas le cas lors des tests précédents. Les composés iodoaryles pouvant être sensibles à la lumière, cela peut expliquer pourquoi la synthèse de la sydnone **6** n'a pas fonctionné.

Basé sur les travaux de Lyssenko et *coll.*²⁴⁶ montrant la possibilité de fonctionnaliser spécifiquement la position *ortho* du groupement phényle, une approche alternative a été choisie en remplaçant la fonction acide boronique sur cette position sans avoir besoin de passer par un dérivé iodé. Les mêmes étapes de synthèse précédemment utilisées ont été reconduites à partir de l'aniline avec un rendement global pour les deux premières étapes de 46 %. Contrairement à la première stratégie, l'insertion de la fonction acide boronique a cette fois été possible et la *N*-arylsydnone **9** a pu être obtenue malgré un faible rendement de 23 % (Schéma 70). Les risques d'hydrolyse lors de la formation de l'intermédiaire organolithien ainsi que la fonctionnalisation potentielle du carbone en position C₄ de la sydnone peuvent expliquer ce rendement. En parallèle, la référence iodée non-radioactive a également été préparée *via* l'intermédiaire lithié selon le protocole décrit par l'équipe de K. Turnbull,²⁴⁷ utilisant du diiode comme électrophile, avec également un faible rendement de 14 % (Schéma 70).

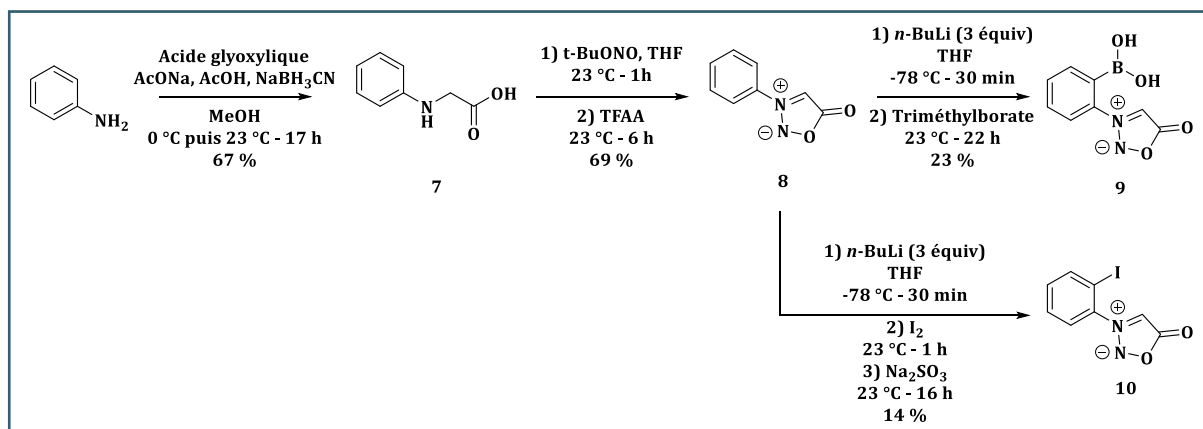


Schéma 70. Préparation du précurseur **9** et de la référence iodée **10**.

Un test préliminaire de radiomarquage à l'iode-125 sur le précurseur **9** a ensuite été réalisé selon les conditions développées par Berdal et *coll.*¹¹⁵ La réaction a été effectuée dans un mélange MeOH/H₂O (9:1) en utilisant une solution aqueuse de [¹²⁵I]NaI (1 MBq) en présence de Cu(OTf)₂(pyr)₄ (Figure 35 A). Après 30 minutes à 25 °C, la sydnone radiomarquée a été obtenue avec un RRC brut de seulement 29%. Ce faible rendement s'explique par la présence de plusieurs sous-produits radiomarqués, dont un majoritaire à 39 %, probablement liés à des réactions parasites (Figure 35 B).

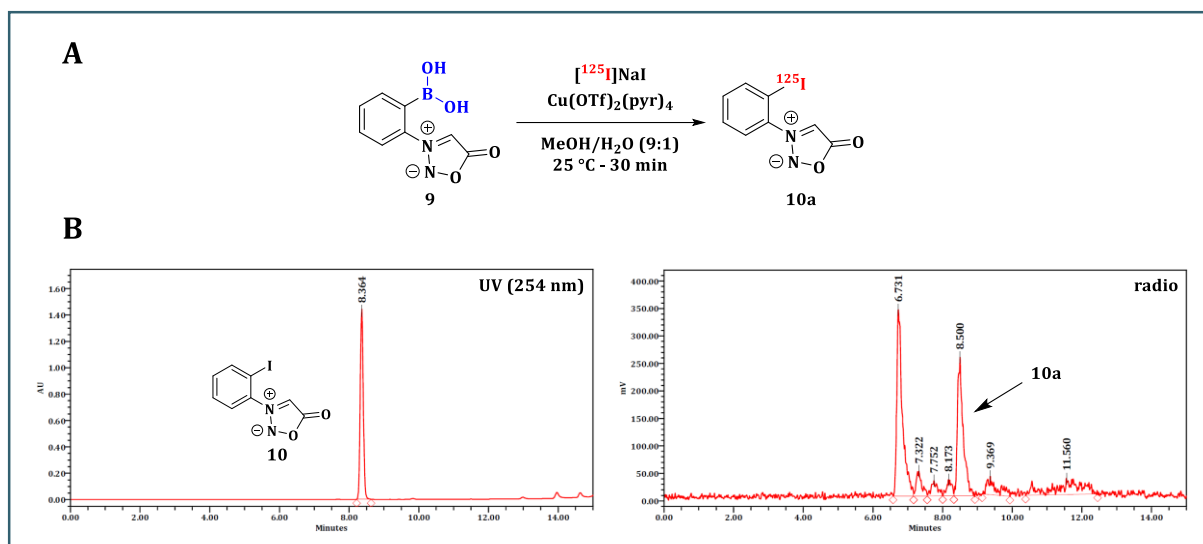


Figure 35. Radiomarquage du précurseur **9** à l'iode-125. (A) Conditions de marquage ; (B) Analyses HPLC de la référence iodée **10** et du brut réactionnel.

Etant donné que lors de la synthèse du précurseur **9**, une déprotonation au niveau du carbone en position C₄ du motif sydnone se produit (intermédiaire lithié), la première hypothèse pour expliquer le sous-produit majoritaire s'est orientée vers l'introduction de la fonction acide boronique et un radiomarquage à l'iode-125 à cette position. En effet, malgré une pureté HPLC supérieure à 99 % et même si les analyses ¹H et ¹³C indiquaient la formation du précurseur **9** souhaité, la présence d'un sous-produit, même en faible proportion, serait suffisante pour poser problème lors de l'étape de radiomarquage. Cependant, après avoir synthétisé la 3-phényl-4-iodosydnone **11** selon le protocole décrit par Taran et *al.*²²⁴ avec un rendement de 48 % (Schéma 71), une analyse HPLC (t_R = 8,29 min) a permis de conclure que ce produit ne correspondait pas au sous-produit majoritaire (t_R = 6,73 min).

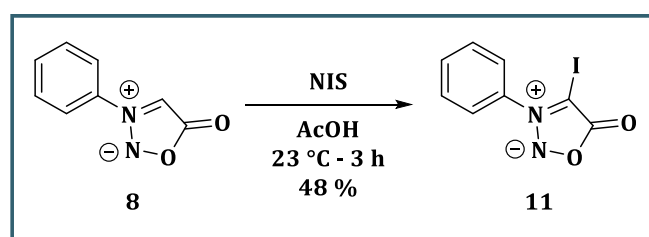


Schéma 71. Synthèse de la 3-phényl-4-iodosydnone **11**.

Certains travaux rapportent l'utilisation du motif sydnone comme groupement partant lors des marquages au fluor-18.²³³ L'iode-125 étant également un radiohalogène, l'hypothèse a été émise que le radionucléide ait été introduit à la place de la sydnone. Cependant, les conditions de températures nécessaires pour cette réaction (130-150 °C) rendent cette hypothèse peu plausible. À l'heure actuelle, le sous-produit formé n'a toujours pas été formellement identifié, mais il semble que celui-ci possède une fonction acide boronique puisqu'il est radiomarquable.

I-1.2.b) Introduction de la fonction acide boronique par couplage d'un dérivé arylboronique

Afin de contourner les problèmes rencontrés lors du radiomarquage de la sydnone **9** initialement envisagée, une nouvelle stratégie de synthèse a été étudiée. Celle-ci a consisté à introduire la fonction acide boronique *via* un composé commercial déjà fonctionnalisé tout en conservant le motif *N*-arylsydnone. La synthèse du précurseur **15** repose sur l'utilisation de la sydnone intermédiaire **14**, possédant une fonction acide carboxylique en position *para*. Contrairement aux premières stratégies, la synthèse de cet intermédiaire est effectuée en trois étapes selon la méthode décrite par Zhang et *al.*,²⁴⁸ avec un rendement global de 30 % (Schéma 72 A). Cette différence du nombre d'étape s'explique par le fait que la nitrosylation et la cyclodéshydratation aient été réalisées séparément.

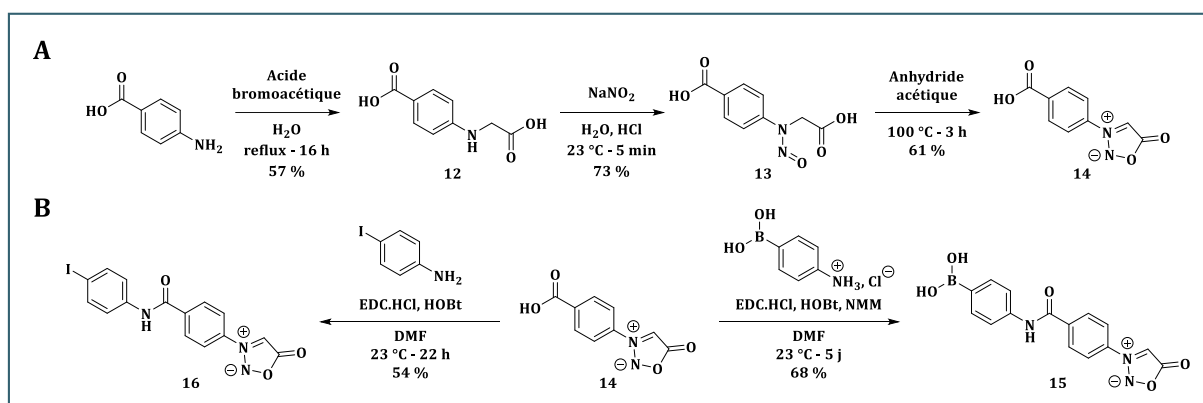


Schéma 72. (A) Synthèse en trois étapes de l'intermédiaire **14** ; (B) Synthèse du précurseur **15** et de la référence iodée **16**.

L'étape suivante consiste à introduire la fonction acide boronique *via* un couplage entre l'acide carboxylique de la sydnone **14** et l'amine primaire de l'aniline fonctionnalisée, en présence de *N*-méthylmorpholine (NMM), de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide chlorhydrate (EDC.HCl) et de 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) comme activateurs du carboxyle. La *N*-arylsydnone **15** a pu être obtenue par précipitation dans du méthanol, avec un rendement de 68 %. L'analogue iodé non-radioactif **16** a quant à lui été obtenu selon le même protocole, à partir de la *p*-iodoaniline et sans NMM, avec un rendement de 54 % (Schéma 72 B).

Un test préliminaire de radiomarquage à l'iode-125 a ensuite été réalisé sur le précurseur **15**, selon le même protocole que pour la sydnone **9**. L'objectif de ce test préliminaire était de voir si l'utilisation de cette sydnone, obtenue grâce à la nouvelle stratégie de synthèse, permettait d'améliorer le RRC brut obtenu avec le motif précédent (Figure 36 A). Pour éviter une précipitation du précurseur lors du radiomarquage, celui-ci est dissous au préalable dans un mélange MeOH/DMSO (9:1) avant d'être impliqué dans la réaction de marquage. Alors qu'avec le premier motif évalué, un RRC brut de seulement 29 % avait été obtenu, ce test a permis de valider

l'obtention de la sydnone radiomarquée **16a** avec un excellent RRC brut supérieur à 99 % (Figure 36 B).

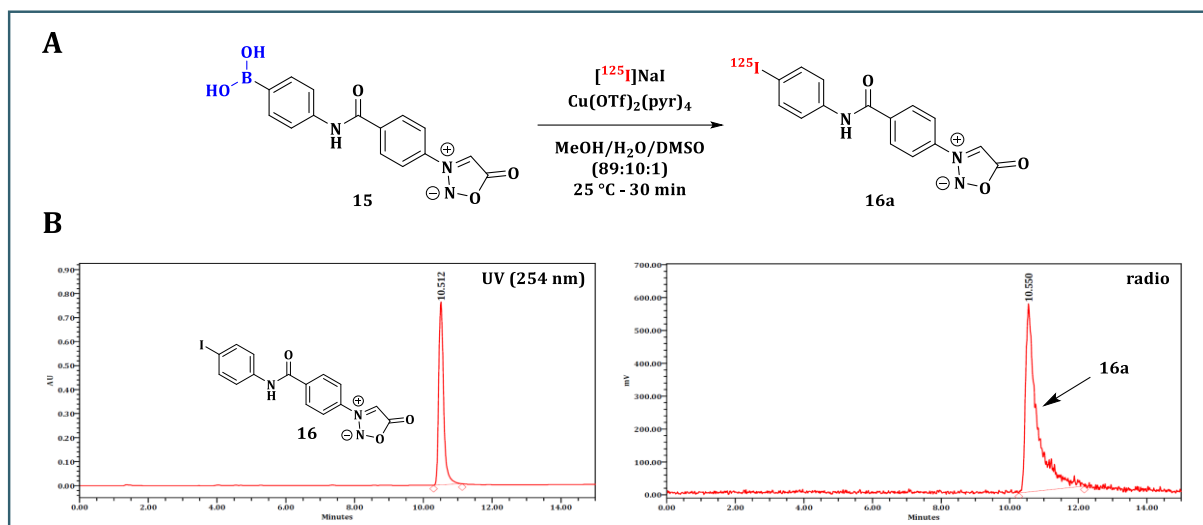


Figure 36. Radiomarquage du précurseur **15** à l'iode-125. (A) conditions de marquage ; (B) analyses HPLC de la référence iodée **16** et du brut réactionnel.

Après avoir amélioré la stratégie de synthèse et validé le radiomarquage à l'iode-125 de la sydnone grâce à un test préliminaire, l'impact de la structure de la sydnone sur la cinétique de réaction avec les peptides modèles a été évaluée. En effet, des travaux menés par le groupe de F. Taran ont montré que la substitution d'un groupement aryle par un groupement alkyle en position N₃ était préjudiciable à la réaction. Il est également décrit que la présence d'un halogène, en particulier le chlore, en position C₄ de la sydnone permettait d'accélérer considérablement la réactivité de celle-ci avec un BCN (30 fois plus rapide que la version hydrogénée).²²⁴ Si de meilleures cinétiques ont été rapportées quelques années plus tard grâce à la 4-fluorosydnone,²²⁰ cette dernière souffre néanmoins de problèmes de stabilité et le meilleur compromis en termes de stabilité et de réactivité reste son analogue chloré. Afin de voir si les tendances étaient similaires avec les peptides modèles, deux nouveaux précurseurs ont donc été sélectionnés en vue d'être intégrés aux études cinétiques (Figure 37).

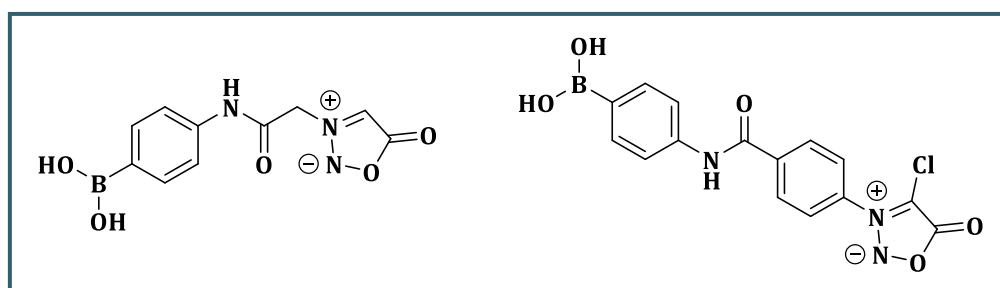


Figure 37. Structure des deux nouveaux précurseurs intégrés dans l'étude.

Les *N*-alkylsydnones **17** et **18** ont été obtenues en seulement une étape *via* un couplage entre la 3-carboxyméthylsydnone et l'aniline correspondante avec des rendements de 54 et 81 %,

respectivement (Schéma 73 A). Les *N*-arylchlorosydrones **20** et **21** ont quant à elles été synthétisées selon le même protocole mais en utilisant l'intermédiaire **19**, obtenu par chloration de la sydnone acide carboxylique **14** selon la procédure décrite par Taran et *al.*²²⁴ (Schéma 73 B). Si des rendements moyens à bons (49 et 65 %) ont été obtenus lors des réactions de couplage, les difficultés de purification rencontrées pour la préparation de l'intermédiaire **19** ont conduit à un rendement de seulement 20 %.

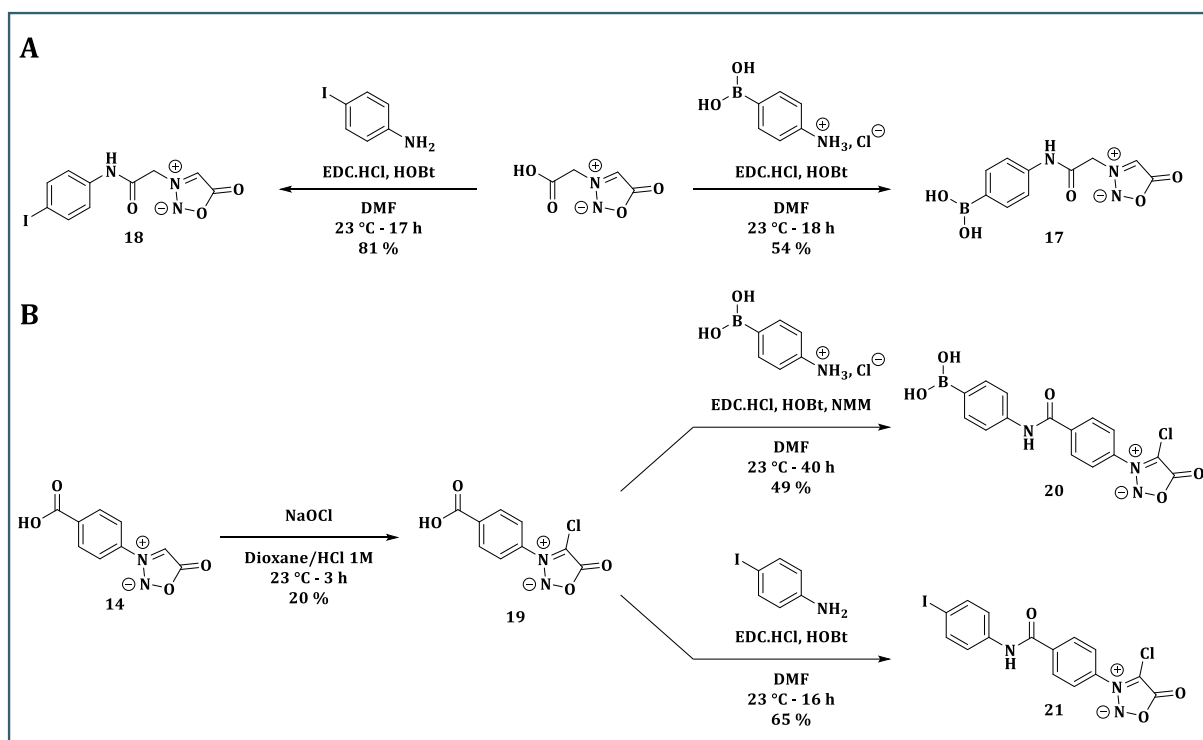


Schéma 73. Synthèse des sydnones d'intérêts. (A) *N*-alkylsydnones **17** et **18**; (B) *N*-arylchlorosydrones **20** et **21** à partir de l'intermédiaire **19**.

I-1.3. Génération des peptides modèles cliquables – références iodées

Après avoir synthétisé les précurseurs sydnones nécessaires à l'étude cinétique, l'étape suivante a consisté à synthétiser les peptides modèles cliquables. La SPAAC et la CuAAC servant de systèmes de référence, le choix des peptides s'est orienté vers ceux qui impliquaient les azotures lors de la précédente étude. Les tripeptides Gly-Lys-Gly modifiés par un DBCO (**22**), un BCN (**23**) ou un alcyne terminal (**24**) ont alors été préparés selon les protocoles décrit par Navarro et *coll.*²³⁶ (Figure 38).

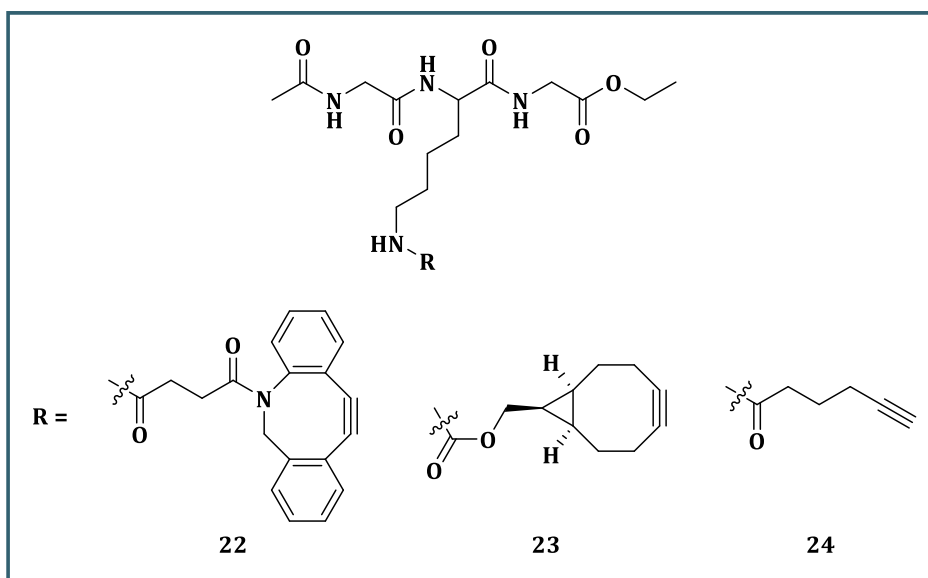


Figure 38. Structures des peptides modèles cliquables DBCO (**22**), BCN (**23**) et alcyne (**24**).

Alors qu'aucune complication n'avait été rapportée quant à la synthèse du peptide **22**, des problèmes de stabilité avec ce peptide ont été rencontrés. En effet, si après purification par chromatographie en phase normale un produit propre était obtenu, il a été observé que le peptide pouvait se dégrader lors de l'évaporation des solvants. La protection du peptide contre la lumière et la réduction de la température du bain-marie (40 °C à 25 °C) lors de la phase d'évaporation ne permettant pas toujours d'éviter cette dégradation, l'hypothèse a été émise que le contact prolongé du peptide avec un solvant chloré pouvait entraîner cette dégradation. Cette supposition a été vérifiée lors d'une analyse ^1H du produit qui, couplé à une analyse HPLC, a montré une dégradation à hauteur de 50 % du produit après 1 nuit dans du chloroforme deutéré. C'est pour cette raison que par la suite, toutes les analyses RMN des peptides modèles ont été réalisées en DMSO ou en méthanol. Etant détecté en UV, il est fort probable que le sous-produit de dégradation contienne le motif DBCO.

Afin d'obtenir une référence des différents peptides cliqués, les peptides DBCO (**22**) et BCN (**23**) ont été couplés aux sydnones iodées non-radioactives (**16**, **18** et **21**) (Schéma 74). Concernant le peptide alcyne (**24**), des problèmes ont été rencontrés tel que décrit en détail dans la section I-3. Ces sydnones présentant une solubilité limitée dans de nombreux solvants organiques, les réactions ont été réalisées exclusivement en DMF. Après purification des solutions de couplage par chromatographie en phase normale, les références des peptides modèles cliquables **25** à **30** ont été obtenues avec des rendements moyens (51 %) à bons (76 %).

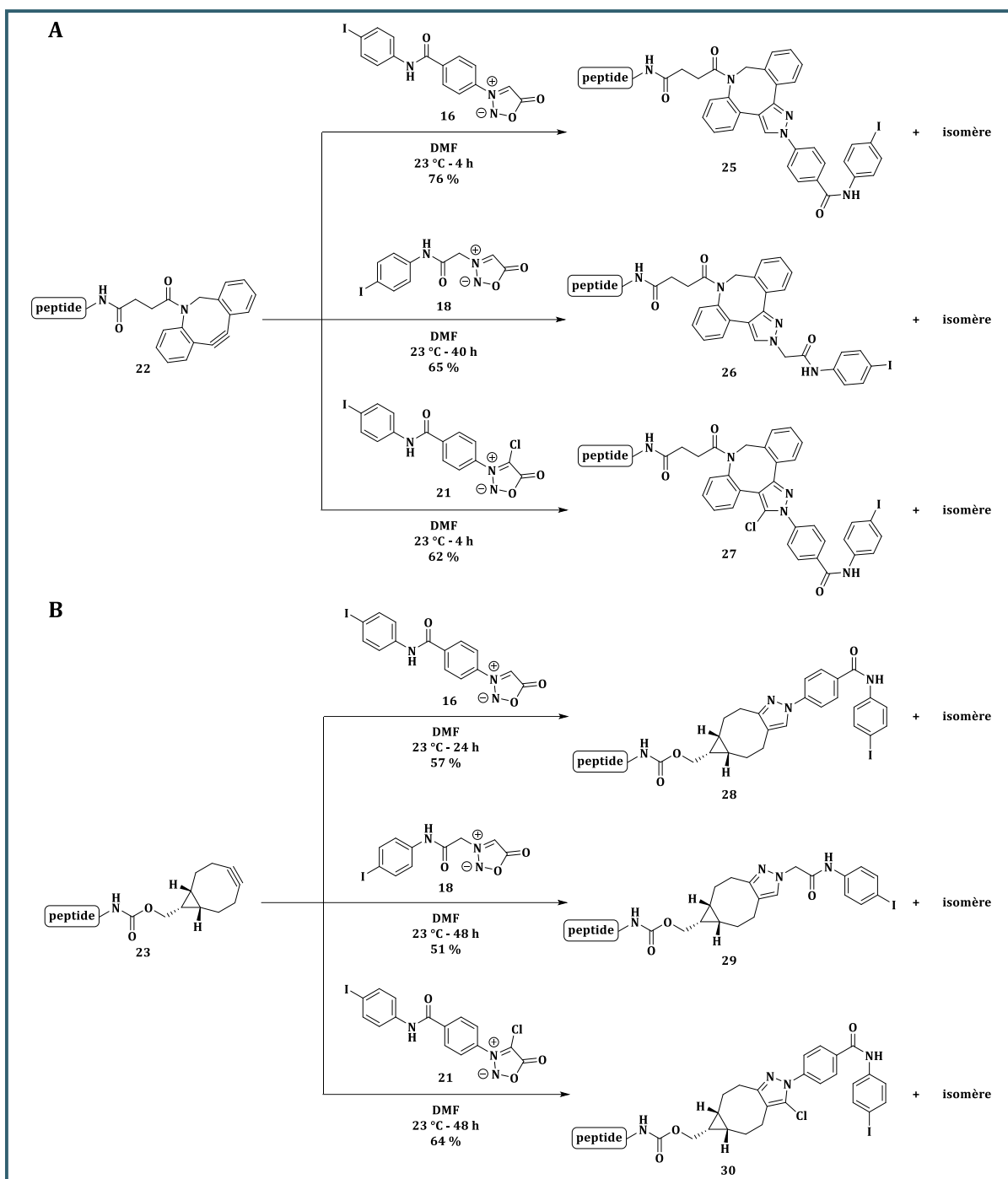


Schéma 74. Réactions de couplages bio-orthogonaux entre les peptides cliquables et les références iodées non-radioactives. (A) Avec le peptide-DBCO ; (B) Avec le peptide-BCN.

I-2. Etude comparative du système SPSAC avec le système SPAAC

I-2.1. Etude cinétique en conditions non-radioactives

I-2.1.a) Mise au point de la méthode analytique

Afin d'évaluer l'impact des substituants sur la réactivité des sydnones avec les cyclooctynes, une étude cinétique préliminaire avec les sydnones iodées non-radioactives (**16**, **18** et **21**) a été réalisée pour déterminer la constante de vitesse k de la réaction de cycloaddition avec

les peptides modèles cliquables modifiés par un motif DBCO (**22**) ou BCN (**23**). En raison de l'implication de deux réactifs, la réaction est supposée d'ordre 2 (Figure 39).

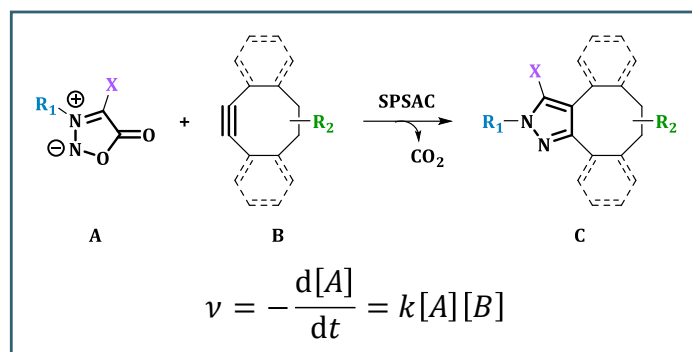


Figure 39. Loi de cinétique d'une réaction de cycloaddition entre une sydnone et un cyclooctyne.

Après intégration entre l'instant initial de la réaction et un temps t , on obtient une observable $\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ linéaire en fonction du temps. Le tracé des droites $\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ en fonction du temps, analysé par régression linéaire, permet ainsi de déterminer la constante de cinétique de la réaction qui correspond à la valeur de la pente de la régression.

$$\frac{\ln\left(\frac{[A]}{[B]}\right)}{[A]_0 - [B]_0} = kt + cste \quad k \text{ en } M^{-1}.s^{-1} \quad (1)$$

L'étude des deux systèmes SPSAC a été réalisée en adaptant le protocole décrit par Taran et al.²²⁴ Après préparation des différentes solutions mères, les réactions de cycloaddition ont été effectuées à 25 °C dans un milieu organo-aqueux composé de PBS (pH 7,4) et de DMSO. Afin d'éviter une précipitation des sydnones, la concentration du PBS a été diminuée de 100 à 10 mM et le pourcentage de DMSO a été augmenté à 50 %. Bien qu'elles puissent être obtenues par un suivi de fluorescence²³² ou par RMN,²⁴⁹ les constantes de vitesses ont été déterminées par HPLC en suivant l'évolution de la concentration des réactifs toutes les 30 minutes pendant 2 heures. En effet, la conversion de sydnone en pyrazole peut être suivie en mesurant l'aire du pic d'absorbance de la sydnone normalisée par rapport à l'aire du pic d'absorbance d'un standard interne (SI) qui dans notre cas est la benzamide. Cette méthode, choisie car elle se rapproche le plus de ce qui sera fait lorsque l'étude sera transposée à l'iode-125, permet d'accéder à la concentration en sydnone $[A]$ et d'en déduire celle en peptide cliquable $[B]$ pour chaque injection (Figure 40).

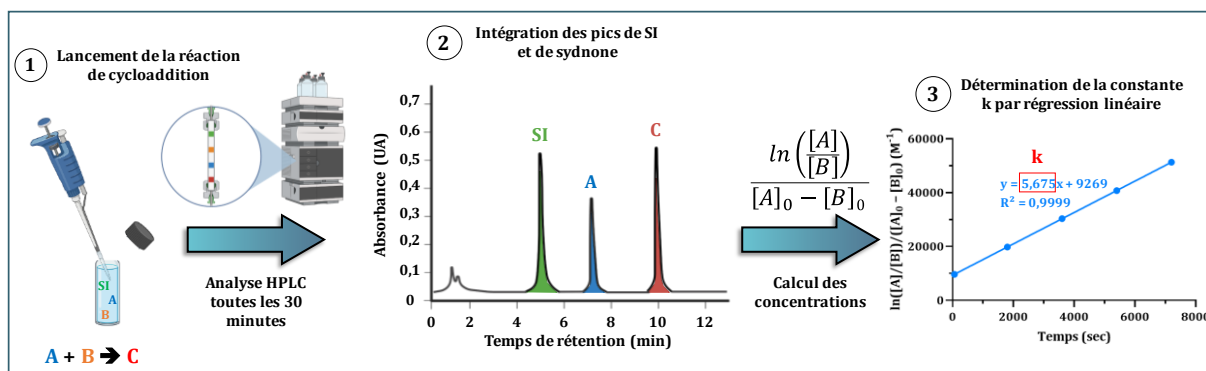


Figure 40. Représentation simplifiée du protocole utilisé pour la détermination des constantes de cinétique de réaction.

I-2.1.b) Etude cinétique des sydnones avec le peptide-DBCO

Les réactions de cycloadditions entre les sydnones et les cyclooctynes étant décrites comme plus rapides avec un motif DBCO qu'avec un motif BCN,²²³ nous avons tout d'abord étudié la réactivité des différentes sydnones sur le peptide **22** (Figure 41 A).

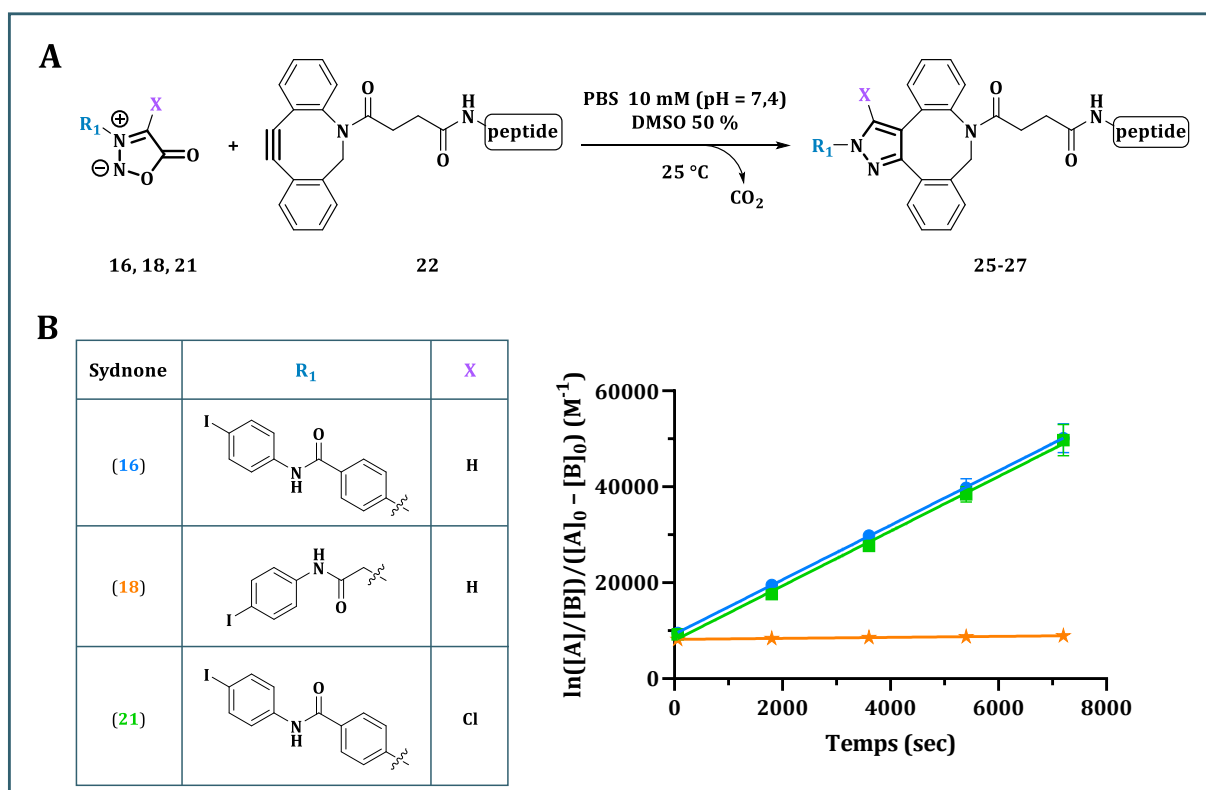


Figure 41. Etude cinétique sans radioactivité des sydnones **16** (●), **18** (★) et **21** (■) avec le peptide modifié par un DBCO **22** (n = 3). (A) Réaction de cycloaddition ; (B) Détermination de la constante k.

Comme attendu, la *N*-alkylsydnone **18** présente une cinétique de réaction très lente comparée aux autres motifs ($k = 0,104 \pm 0,010 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). En revanche, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature avec le BCN,²²⁴ la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome de chlore en position C₄ n'a aucun impact sur la réactivité avec le peptide-DBCO (**22**) puisque des constantes k de $5,675 \pm 0,424$ et $5,693 \pm 0,419 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ont respectivement été obtenues (Figure 41 B).

Des tests complémentaires ont été réalisés afin de comprendre pourquoi la *N*-arylchlorosydnone **21** n'avait pas montré une amélioration sur la cinétique de réaction, contrairement à ce qui peut être décrit dans la littérature.^{224,227} Dans un premier temps, nous avons tenté de reproduire les résultats issus de la littérature (Figure 42 A). Pour cela, le protocole développé par F. Taran a été utilisé pour mesurer les cinétiques de réaction des sydnones **14** et **19** avec un motif BCN-OH (Figure 42 B).²²⁴ Comme attendu, la sydnone s'est montrée beaucoup moins réactive avec un hydrogène en position C₄ qu'avec un atome de chlore ($k = 0,086 \pm 0,004 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ vs $1,477 \pm 0,175 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et des valeurs similaires à la littérature ont pu être obtenues ($k = 0,059 \pm 0,001 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $1,593 \pm 0,034 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). La proportion de solvant organique ayant un impact sur la vitesse des réactions bio-orthogonales,²⁵⁰ nous avons ensuite vérifié que l'augmentation de la proportion de DMSO de 10 à 50 %, quantités utilisées lors de l'étude cinétique avec le peptide-DBCO (**22**), n'était pas préjudiciable à l'effet bénéfique du chlore. Lors de ce test, non seulement l'ordre relatif de réactivité était respecté mais une légère amélioration de la réactivité a été observée avec des constantes k de $0,094 \pm 0,013 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la sydnone **14** et $2,022 \pm 0,589 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la sydnone **19** (Figure 42 C).

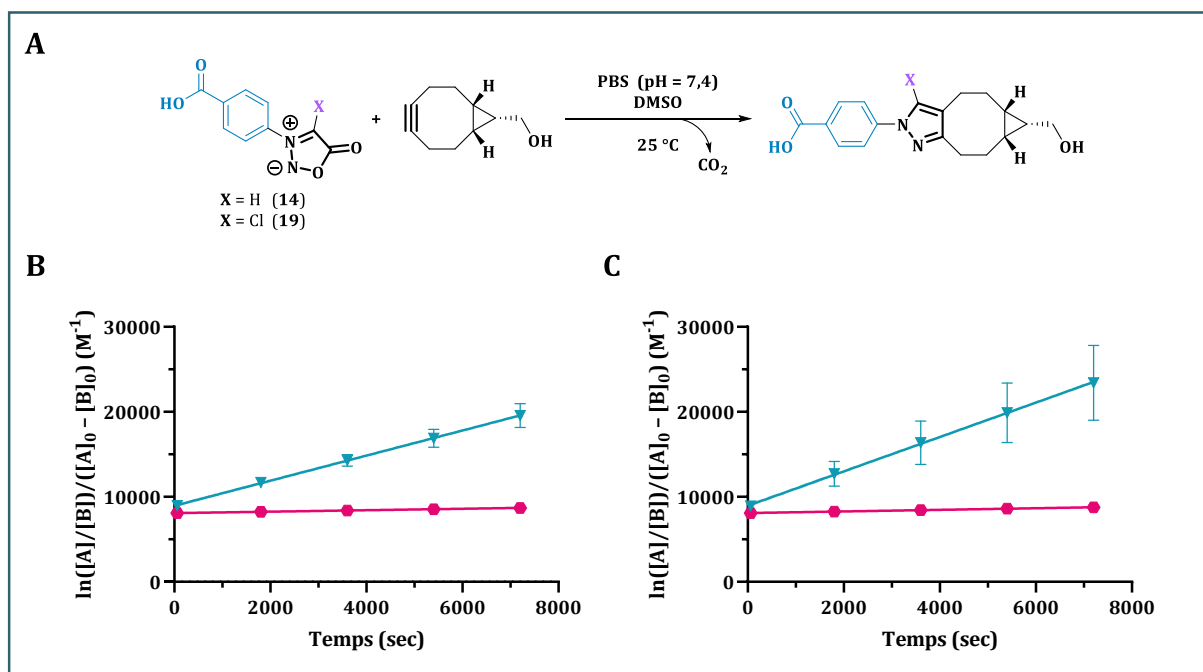


Figure 42. Etude cinétique des sydnones **14** (●) et **19** (▼) avec le BCN-OH ($n = 3$). (A) Réaction de cycloaddition ; (B) Détermination de la constante k avec le protocole de référence²²⁴ ; (C) Détermination de la constante k avec la méthode analytique développée.

Après avoir démontré que la méthode analytique développée n'était pas responsable de la perte de réactivité, la cycloaddition entre les sydnones d'intérêts (**16** et **21**) et le BCN-OH a été réalisée (Figure 43). Alors qu'une constante cinétique de $0,213 \pm 0,019 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est obtenue pour la sydnone **16**, cette valeur est multipliée par 16 lorsque l'hydrogène est substitué par un chlore (k

= $3,407 \pm 0,689 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), démontrant que le motif sydnone n'est pas responsable de la perte de l'effet de l'atome de chlore.

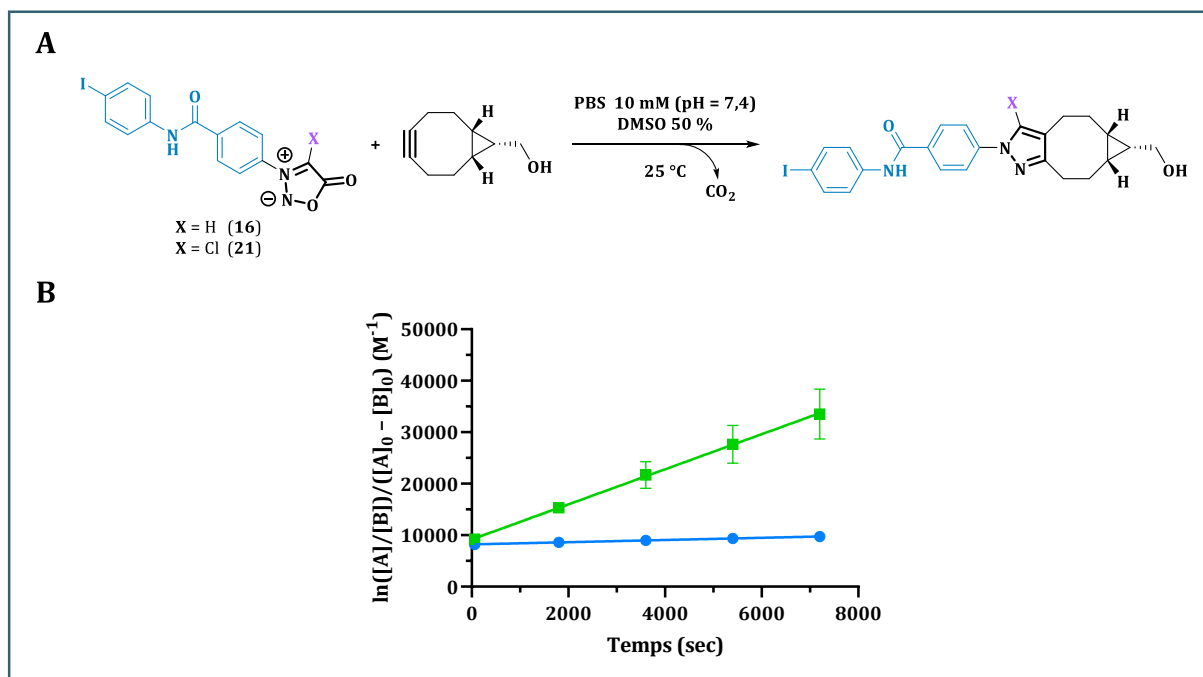


Figure 43. Etude cinétique des sydnones **16** (●) et **21** (■) avec le BCN-OH ($n = 3$). (A) Réaction de cycloaddition ; (B) Détermination de la constante k .

Mis en commun, tous ces résultats tendent plutôt à montrer que le passage d'un BCN au DBCO, plus encombré, contrebalance l'amélioration de la réactivité apportée par le chlore, et ce d'autant plus si l'on se réfère aux travaux de H-A. Wagenknecht en 2021.²⁴⁹ En effet, lors de cette étude, les auteurs ont observé que le passage d'un BCN à un analogue du DBCO permettait d'améliorer considérablement la cinétique de réaction avec une sydnone hydrogénée, mais que l'effet bénéfique du chlore était beaucoup moins important (Figure 44).

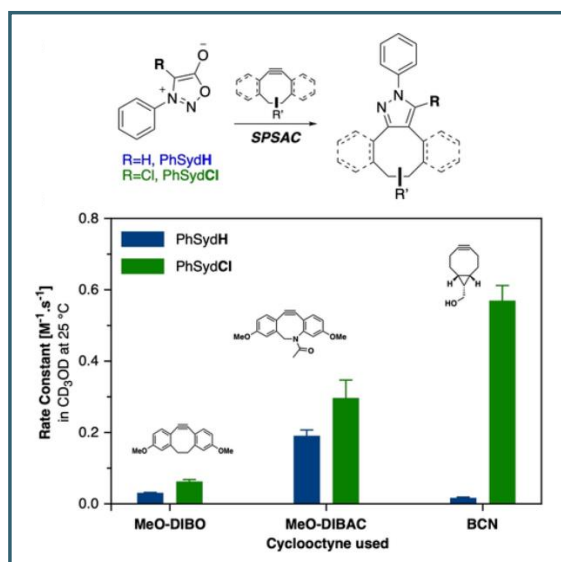


Figure 44. Constantes de vitesses du second ordre des réactions SPSAC entre des sydnones hydrogénées (■) ou chlorées (■) avec trois types de cyclooctynes.²⁴⁹

I-2.1.c) Etude cinétique des sydnones avec le peptide-BCN

Dans le but de compléter notre travail de comparaison des différents motifs sydnones et de voir si les tendances observées sur des motifs simples étaient similaires à nos composés modèles, une étude cinétique avec le peptide modifié par un BCN (**23**) a ensuite été réalisée (Figure 45).

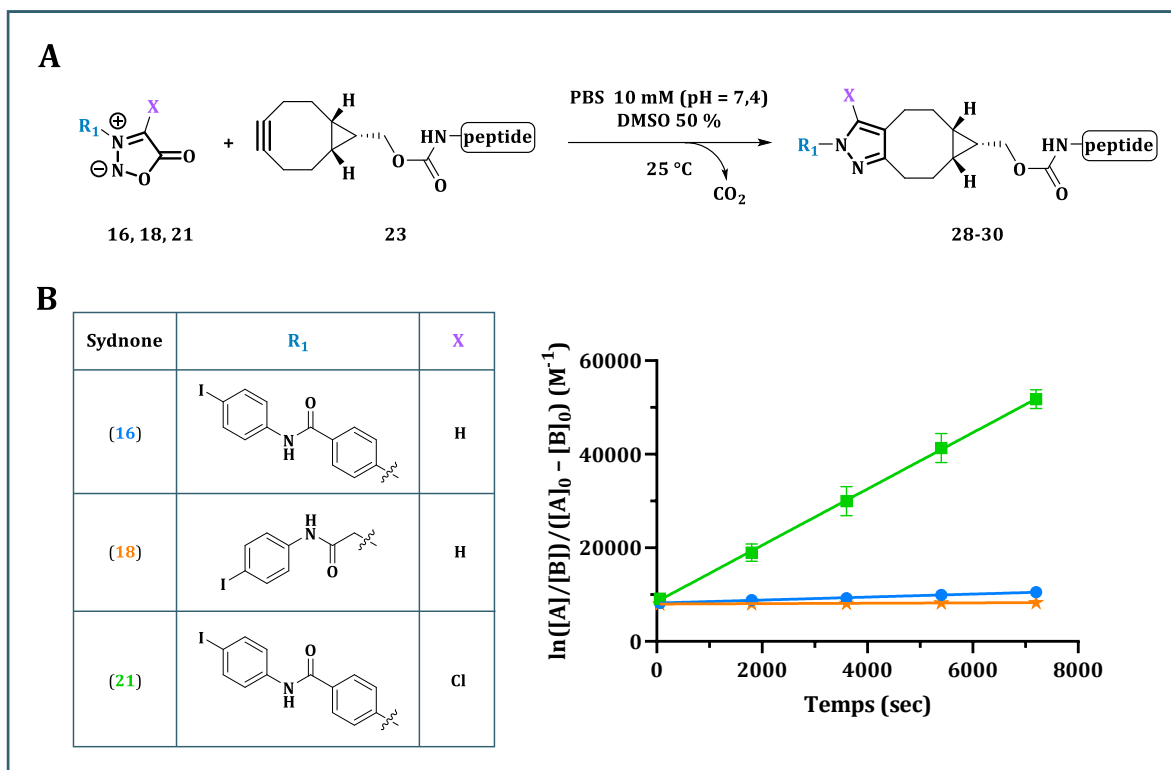


Figure 45. Etude cinétique sans radioactivité des sydnones **16** (●), **18** (★) et **21** (■) avec le peptide modifié par un BCN **23** (n = 3). (A) Réaction de cycloaddition ; (B) Détermination de la constante k.

Comme observé précédemment, la *N*-alkylsydnone **18** s'est révélée être la plus lente avec une constante k de seulement $0,042 \pm 0,007 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Cependant, contrairement au peptide-DBCO (**22**) et comme attendu, la présence du chlore a permis d'accélérer grandement la vitesse de la réaction de la sydnone **21** avec une constante de $6,017 \pm 0,299 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (contre $0,320 \pm 0,022 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la sydnone **16**).

I-2.1.d) Comparaison avec le système SPAAC

Après avoir étudié l'impact de la structure de la sydnone sur la constante de vitesse avec les peptides modèles cliquables **22** et **23**, l'étape suivante a consisté à resituer ces systèmes par rapport au système SPAAC précédemment décrit. Pour y parvenir, la constante de vitesse de l'azoture **2** avec le peptide-DBCO **22** a dans un premier temps été mesurée (Figure 46). Bien que la réaction de cycloaddition se soit montrée 34 fois plus rapide avec l'azoture **2** qu'avec la *N*-alkylsydnone **18** ($k = 3,506 \pm 0,328 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ vs $0,104 \pm 0,010 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), les résultats les plus intéressants ont été observés avec les *N*-arylsydnones **16** et **21**. En effet, lorsque ces sydnones sont utilisées, le système SPSAC est quasiment deux fois plus rapide que le système SPAAC.

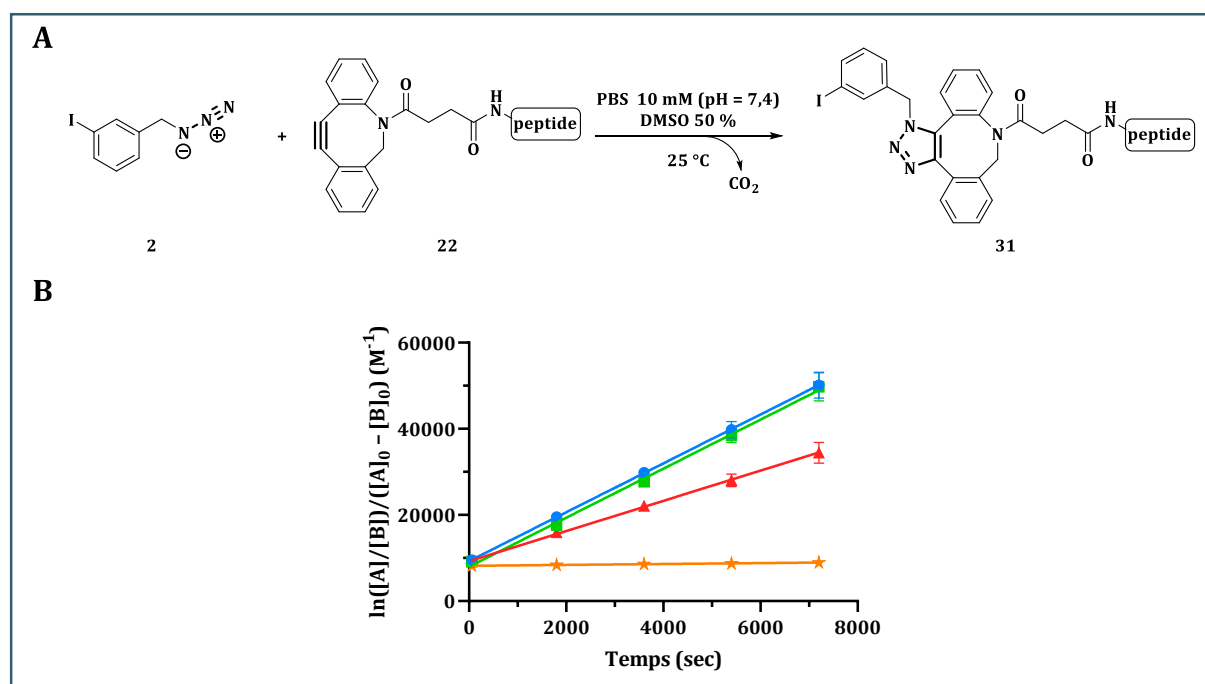


Figure 46. (A) Réaction de cycloaddition (B) Comparaison des vitesses du second ordre des réactions SPSAC et SPAAC avec le peptide cliquable **22**. Sydnones **16** (●) ; **18** (★) ; **21** (■) ; azoture **2** (▲) ($n = 3$).

La même comparaison a ensuite été effectuée sur le peptide-BCN **23** et des tendances totalement différentes ont été obtenues (Figure 47).

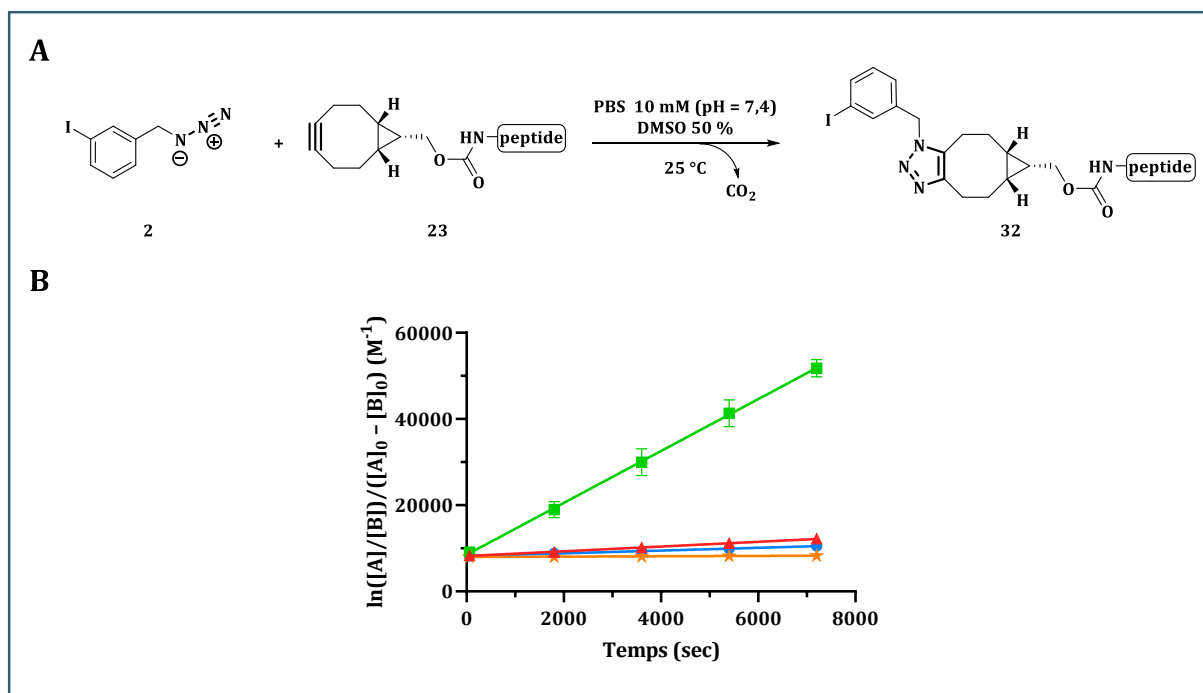


Figure 47. (A) Réaction de cycloaddition (B) Comparaison des vitesses du second ordre des réactions SPSAC et SPAAC avec le peptide cliquable 23. Sydnones 16 (●) ; 18 (★) ; 21 (■) ; azoture 2 (▲) ($n = 3$).

Alors que la réactivité de l'azoture 2 est toujours bien plus importante que la *N*-alkylsydnone 18, cette différence se réduit avec la sydnone hydrogénée 16 ($k = 0,549 \pm 0,053 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ vs $0,320 \pm 0,022 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). En revanche, lorsque la sydnone substituée par un chlore en position C₄ est utilisée, le système SPSAC devient 11 fois plus rapide que le système SPAAC.

I-2.2. Etude cinétique à l'iode-125

I-2.2.a) Mise au point du radiomarquage des précurseurs sydnones

Le marquage à l'iode-125 (0,5-12 MBq) des trois précurseurs sydnones (15, 17 et 20) a été réalisé dans un mélange MeOH/H₂O (9:1). Pour éviter une précipitation du précurseur lors du radiomarquage, celui-ci est solubilisé au préalable dans un mélange MeOH/DMSO (1:1) avant d'être impliqué dans la réaction de marquage. Ces réactions, réalisées en 30 minutes à 25 °C, ont toutes conduit à d'excellents RRC bruts (>95 %) (Figure 48).

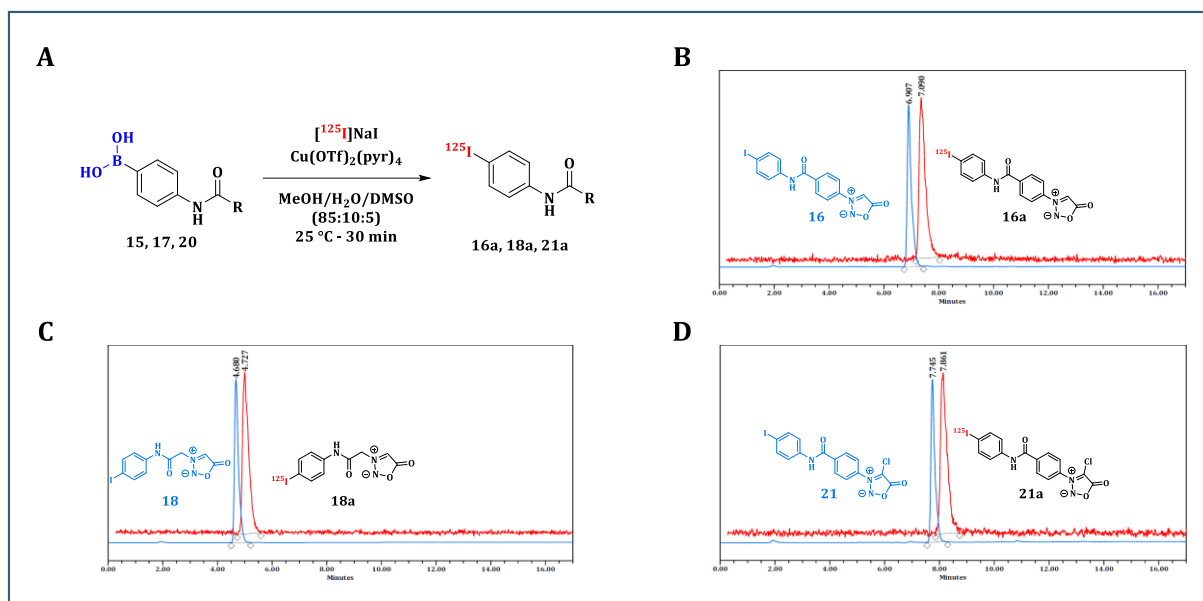


Figure 48. Marquage à l'iode-125 des sydnones **15**, **17** et **20** ; (A) Conditions de marquage ; (B) analyses HPLC de la référence iodée **16** et du brut réactionnel **16a** (RRC >99 % (n = 9)) ; (C) analyses HPLC de la référence iodée **18** et du brut réactionnel **18a** (RRC >99 % (n = 7)) ; analyses HPLC de la référence iodée **21** et du brut réactionnel **21a** (RRC = 97 ± 1% (n = 9)). RRC basés sur les analyses HPLC du produit brut.

Les sydnones radiomarquées ont ensuite été purifiées sur cartouche Sep-Pak® C₁₈ (Waters) par élution d'un mélange H₂O/MeCN afin d'éliminer le précurseur acide boronique ainsi que le catalyseur au cuivre. En plus de conduire à des PRC supérieures à 99 %, ce protocole permet d'obtenir d'excellents RRC isolés pour les sydnones **16a** (RRC = 91 ± 3 %) et **18a** (RRC = 90 ± 8 %) et légèrement plus faible pour la sydnone **21a** (RRC = 76 ± 8 %). Toutes les sydnones radioiodées obtenues se sont montrées stables dans MeCN pendant 7 jours à 4 °C et même jusqu'à 4 semaines, lors du dernier contrôle, pour les sydnones **16a** et **21a**.

I-2.2.b) Etude cinétique des sydnones radiomarquées avec le peptide-DBCO

Après l'obtention des sydnones radioiodées **16a**, **18a** et **21a**, l'étape suivante a consisté à réaliser l'étude cinétique avec le peptide-DBCO (**22**) (Figure 49). Afin d'obtenir des résultats au plus proche de ce qui devrait être obtenu lors du marquage de biomolécules d'intérêt, tels que les anticorps, la concentration en peptide cliquable a été fixée à 200 µM. Cette concentration équivaut à 6 fonctions bio-orthogonales couplées par anticorps pour un anticorps lui-même concentré à 5 mg/mL, plage de concentration habituellement utilisée pour des couplages en bioconjugaison classique. Etant donné l'importance du ratio PBS/DMSO sur la cinétique de réaction et pour faciliter la comparaison avec les études cinétiques sans radioactivité, les réactions de cycloaddition ont été réalisées dans une solution de PBS 10 mM (pH = 7,4) contenant 50 % de DMSO. Lors de ces études, chaque point cinétique a été réalisé avec 0,5 MBq de sydnones radioiodées et les rendements de couplage ont été déterminés par HPLC.

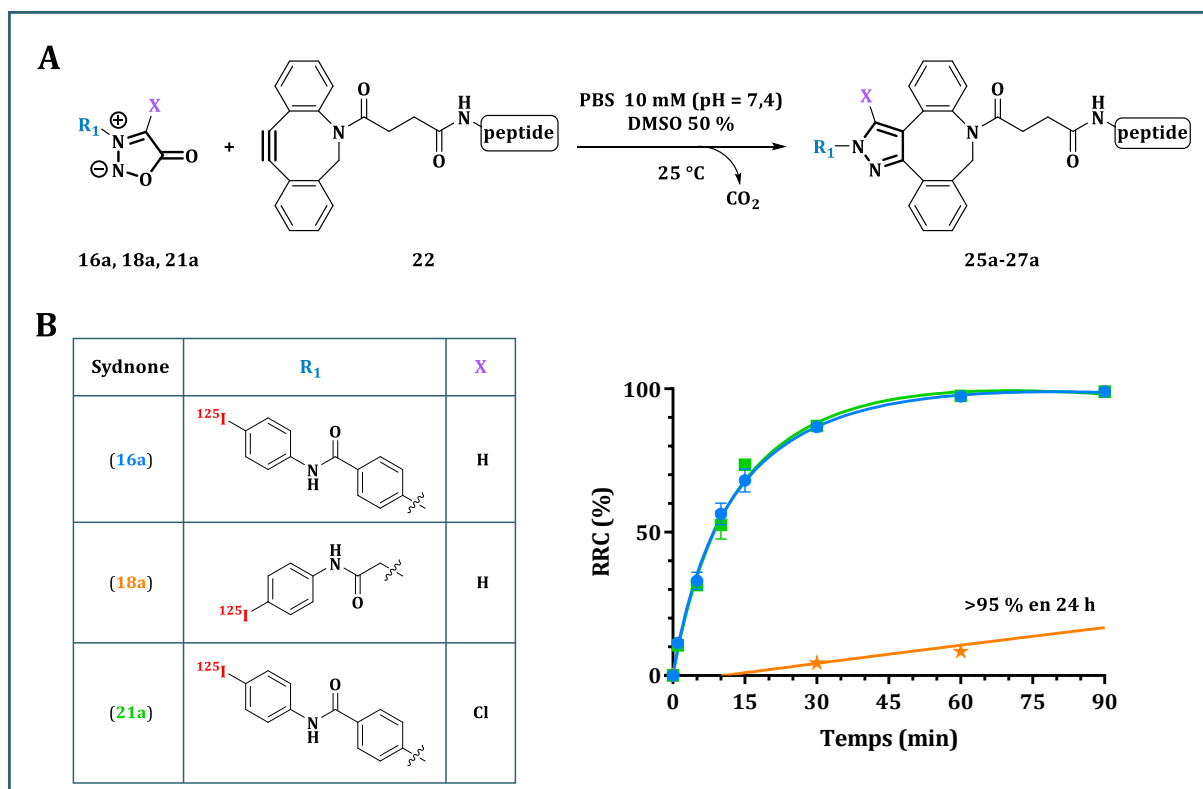


Figure 49. Etude cinétique à l'iode-125 des sydnones **16a** (●), **18a** (★) et **21a** (■) avec le peptide modifié par un DBCO **22** ($n = 3$). (A) Réaction de cycloaddition ; (B) Cinétiques des couplages bio-orthogonaux.

Alors que pour la *N*-alkylsydnone **18a** la réaction de couplage avec le peptide-DBCO (**22**) n'a présenté aucun problème, nous avons été surpris de voir que malgré des PRC supérieures à 99 % après purification, un même sous-produit était formé lors des réactions clics sur les deux autres motifs. Bien que celui-ci pouvait varier entre 3 et 15 %, en fonction des tests réalisés, il est néanmoins important de noter que celui-ci n'évolue pas dans le temps et qu'aucun changement sur les cinétiques de réactions ou la proportion des deux régioisomères n'a été constaté (Figure 50).

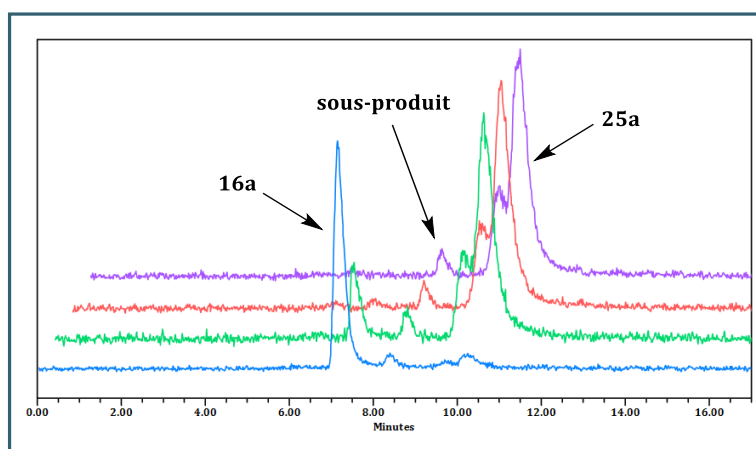


Figure 50. Analyses chromatographiques montrant l'évolution du sous-produit lors du marquage à l'iode-125 du peptide **22** avec la sydnone **16a** ; $t = 1$ min (—), 30 min (—), 60 min (—) et 90 min (—).

I-2.2.c) Etude cinétique des sydnones radiomarquées avec le peptide-BCN

L'étude cinétique à l'iode-125 avec le peptide-BCN (**23**) a ensuite été réalisée, selon les conditions décrites précédemment (Figure 51).

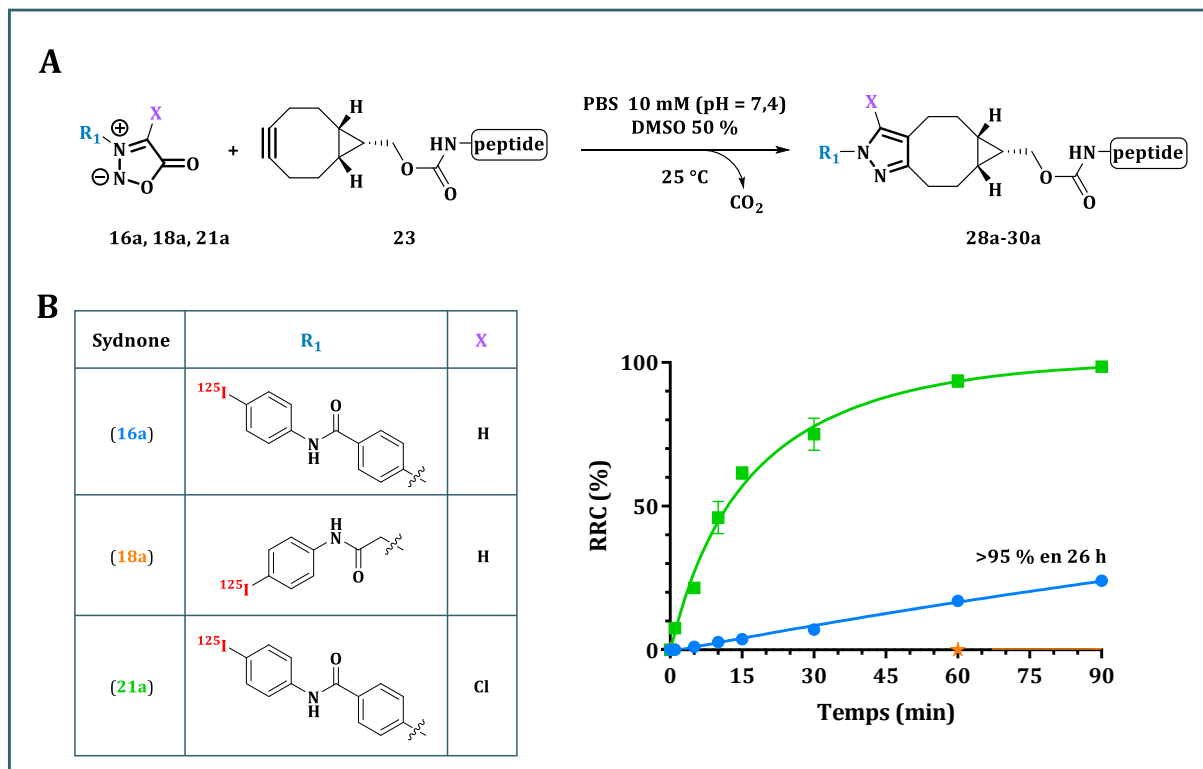


Figure 51. Etude cinétique à l'iode-125 des sydnones **16a** (●), **18a** (★) et **21a** (■) avec le peptide modifié par un BCN **23** ($n = 3$). (A) Réaction de cycloaddition ; (B) Cinétiques des couplages bio-orthogonaux.

Les mêmes tendances que pour l'étude cinétique sans radioactivité ont été observées. En effet, alors que la *N*-alkylsydnone **18a** s'est avérée extrêmement lente par rapport aux autres motifs (RRC = 11 ± 1 % après 24 heures), la *N*-arylsydnone s'est montrée beaucoup plus réactive lorsque l'hydrogène était substitué par un atome de chlore en position C₄. Il est également intéressant de noter que lors de cette étude, le même sous-produit observé précédemment sur les deux *N*-arylsydnones (**16a** et **21a**) a été formé. Cela confirme que le problème n'est pas lié à une réaction secondaire avec le peptide-DBCO mais plutôt à une dégradation de la sydnone ou la présence d'un sous-produit radiomarqué.

I-2.2.d) Comparaison avec le système SPAAC

Le travail s'est poursuivi en comparant les résultats précédents avec ceux obtenus avec le système SPAAC. Le marquage à l'iode-125 (5,7 MBq) du précurseur azoture **1**, réalisé selon les mêmes conditions que pour les précurseurs sydnones mais sans la présence de DMSO, a conduit lui aussi à une réaction quantitative (Figure 52).

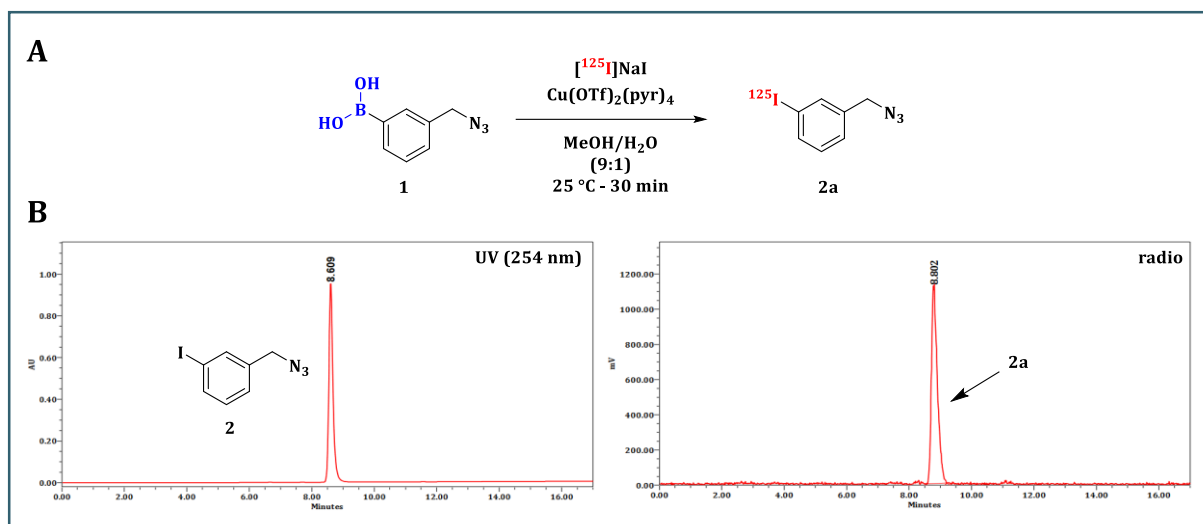


Figure 52. Radiomarquage du précurseur **1** à l'iode-125. (A) conditions de marquage ; (B) analyses HPLC de la référence iodée **2** et du brut réactionnel.

Les réactions de cycloadditions avec les peptides modifiés par un DBCO (**22**) ou BCN (**23**) ont ensuite été réalisées (Figure 53 A).

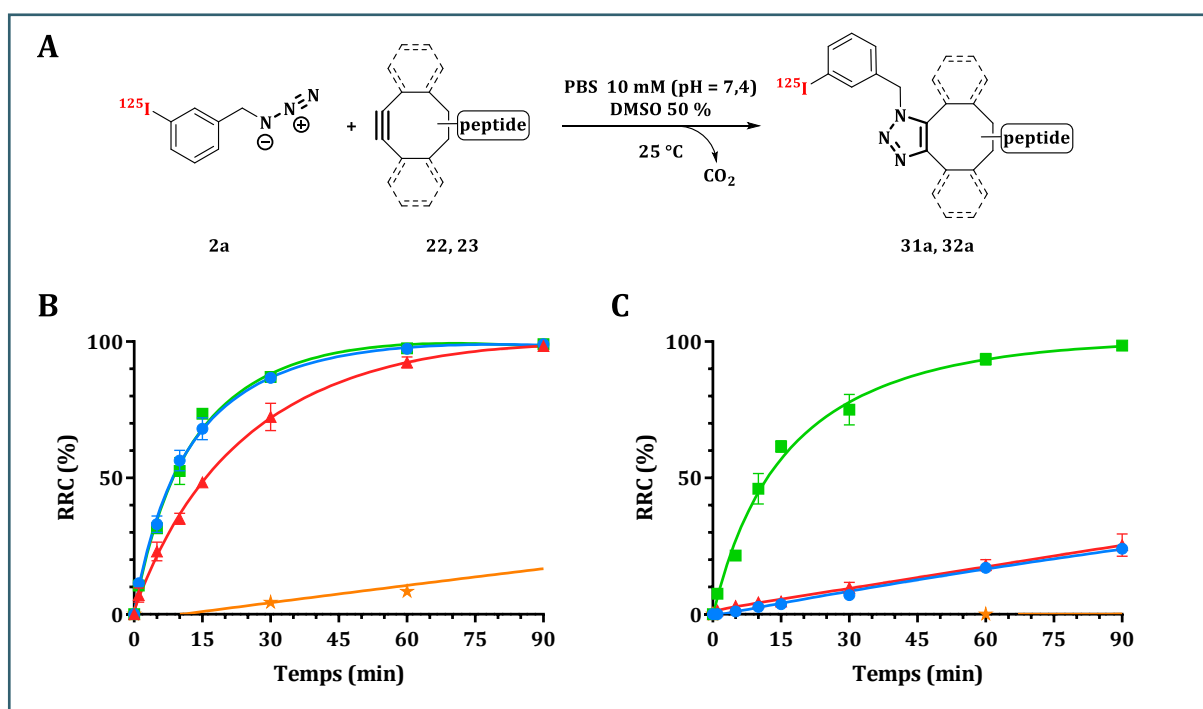


Figure 53. Comparaison des vitesses du second ordre des réactions SPSAC et SPAAC à l'iode-125 ; (A) Réactions de cycloaddition entre l'azoture **2a** et les peptides-DBCO (**22**) et BCN (**23**) ; (B) Cinétiques des couplages bio-orthogonaux avec le peptide cliquable **22** ; (C) Cinétique des couplages bio-orthogonaux avec le peptide cliquable **23**. Sydnones **16a** (●) ; **18a** (★) ; **21a** (■) ; azoture **2a** (▲) ($n = 3$).

Comme observé lors des études cinétiques sans radioactivité, la *N*-alkylsydnone (**18a**) a montré une cinétique de réaction beaucoup plus lente que l'azoture avec des RRC de 8 % avec le peptide-DBCO (**22**) et 0 % avec le peptide-BCN (**23**) après 60 minutes contre 92 ± 2 % et 18 ± 2 %, respectivement. La version *N*-aryle (**16a**) avec un hydrogène en position C₄ a démontré une

réactivité similaire à l'azoture avec des RRC de $97 \pm 1\%$ pour le peptide-DBCO (**22**) et $17 \pm 1\%$ pour le peptide-BCN (**23**). Cependant, les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec la *N*-chlorosydnone (**21a**). Bien qu'une réactivité similaire à l'azoture ait également été observée avec le peptide-DBCO (RRC = $98 \pm 1\%$ après 60 minutes), cette sydnone s'est avérée beaucoup plus réactive que l'azoture avec le peptide-BCN. En effet, alors que la réaction est quasi-terminée après 60 minutes (RRC = $94 \pm 2\%$) avec le système SPSAC, seul un RRC de $18 \pm 2\%$ est mesuré avec le système SPAAC (Figure 53 B et C).

I-2.3. Bilan

L'objectif de cette étude était d'explorer davantage le potentiel de la chimie clic pour la radiohalogénéation en évaluant le couple sydnone/cyclooctyne en tant que substrats potentiels. Plusieurs sydnones iodées de références (substituées par un groupe aryle ou alkyle en position N₃ et/ou chlorés en position C₄) ont été préparées afin d'évaluer l'impact de ces modifications sur la cinétique de réaction avec des peptides cliquables modifiés avec des groupes DBCO ou BCN. Une étude cinétique préliminaire avec les sydnones non-radioactives (**16**, **18**, **21**) a été réalisée pour déterminer la constante de vitesse de la réaction sur les peptides modifiés par un cyclooctyne (**22**, **23**). Les cinétiques de réaction des mêmes systèmes bio-orthogonaux ont également été étudiées avec des sydnones radioiodées (**16a**, **18a**, **21a**) obtenus à partir des précurseurs arylboroniques correspondants. Toutes les réactions de marquage des sydnones à l'¹²⁵I se sont montrées quasi-quantitatives (>95 %) et tous les composés ont été obtenus avec une pureté radiochimique supérieure à 99 %. Enfin, après avoir mené le même travail avec un azoture modèle, les résultats de ces études ont été comparés (Figure 54).

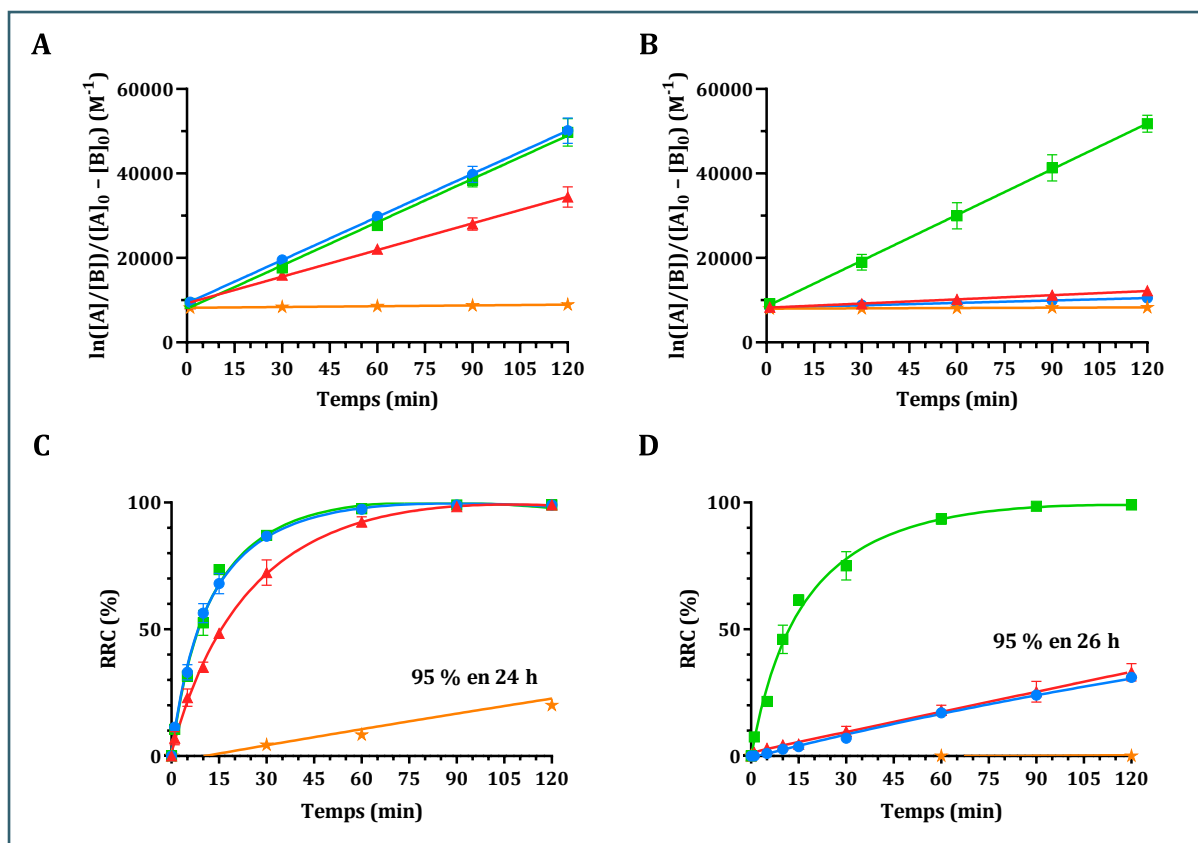


Figure 54. Cinétiques des couplages bio-orthogonaux. (A) Sans radioactivité avec le peptide-DBCO ; (B) Sans radioactivité avec le peptide-BCN ; (C) A l'iode-125 avec le peptide-DBCO ; (D) A l'iode-125 avec le peptide-BCN. Sydnones **16a** (●) ; **18a** (★) ; **21a** (■) ; azoture **2a** (▲) ($n = 3$).

Les réactions non-radioactives ont montré des profils similaires aux études cinétiques radioactives pour tous les systèmes. Comme prévu, les *N*-alkylsydnones (**18**, **18a**) ont montré une cinétique de réaction lente avec des rendements radiochimiques de 0% (**29a**) et 8 % (**26a**) après 60 minutes, comme anticipé par les expériences non-radioactives avec une constante de vitesse de 0,04 (**29**) et 0,10 $M^{-1}.s^{-1}$ (**26**).

La version *N*-aryle (**16**, **16a**) avec un hydrogène en position C_4 a démontré une efficacité de couplage prometteuse avec le peptide-DBCO (RCY >95 % après 60 minutes) alors que les résultats étaient plus modérés avec le peptide-BCN (17 ± 1 %). Une fois de plus, la même tendance a été obtenue dans les mesures non-radioactives avec des valeurs de $5,675 \pm 0,424$ et $0,320 \pm 0,022 M^{-1}.s^{-1}$ avec le peptide-DBCO et le peptide-BCN, respectivement. Enfin, les *N*-arylchlorosydnones (**21**, **21a**) semblaient être plus réactives que tous les autres systèmes avec un RRC >95 % après 60 minutes pour les systèmes DBCO et BCN, confirmant des cinétiques de réactions élevées ($k = 5,693 \pm 0,419 - 6,017 \pm 0,299 M^{-1}.s^{-1}$).

Les vitesses de réaction de cycloaddition entre les sydnones (**16/16a**, **18/18a** et **21/21a**) et les peptides modèles (**22** et **23**) ont ensuite été comparées avec celles obtenues avec un azoture (**2/2a**) utilisé lors d'une précédente étude. Une nouvelle fois, des profils similaires entre les

études cinétiques avec et sans radioactivité ont été obtenus. Alors que la *N*-alkylsydnone (**18/18a**) s'est avérée moins réactive que l'azoture avec les deux peptides, la *N*-arylsydnone (**16/16a**) avec un hydrogène en position C₄ a présenté une réactivité du même ordre de grandeur que pour l'azoture. Néanmoins, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus lorsque l'hydrogène en position C₄ est substitué par un atome de chlore. En effet, si la réactivité avec le peptide-DBC0 (**22**) est similaire à celle obtenue avec le système SPAAC, la réaction de cycloaddition avec le peptide-BCN (**23**) se produit 11 fois plus rapidement lorsque la sydnone chlorée (**20/20a**) est utilisée.

I-3. Evaluation du système CuSAC

Après avoir démontré que le système SPSAC pouvait présenter de meilleures cinétiques de réactions par rapport au système SPAAC, l'objectif a été de mener la même étude comparative sur le système CuSAC.

Dans un premier temps, la réactivité de la sydnone **16** avec le phénylacétylène a été investiguée comme modèle simple permettant de mettre au point les conditions de réaction. Le choix du catalyseur au cuivre s'est orienté vers le CuSO₄·5H₂O, déjà utilisé avec succès pour les réactions de CuSAC entre plusieurs sydnones et le phénylacétylène, ainsi que sur un conjugué BSA-sydnone.²⁵¹ De plus, contrairement à d'autres sels de cuivre comme le Cu(OTf)₂ ou du Cu(OAc)₂ qui peuvent également être utilisés dans ce type de cycloaddition, le CuSO₄·5H₂O est compatible avec de nombreux solvants, ce qui peut être bénéfique lorsque des problèmes de solubilité sont rencontrés, comme ce fut le cas avec nos dérivés sydnone.²⁵¹ Pour la préparation du pyrazole **33**, le protocole décrit par Taran et *al.*²⁵¹ a été utilisé en remplaçant le mélange *t*BuOH/H₂O par un mélange DMF/H₂O pour des raisons de solubilité de la sydnone. La réaction a donc été évaluée dans le DMF avec 20 % d'eau pour solubiliser le catalyseur, la base et le ligand (Schéma 75). Cependant, après 20 h à 60 °C, l'analyse HPLC réalisée sur le brut réactionnel n'a montré la formation d'aucun produit mais seulement la présence des réactifs de départ, résultat qui n'évolue pas même avec 5 jours supplémentaires.

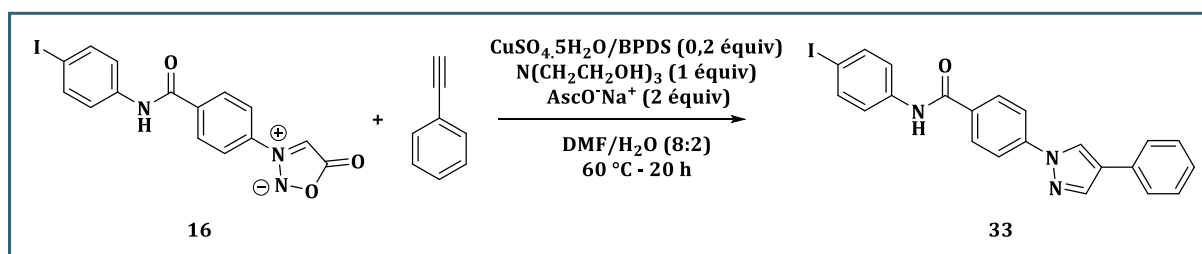


Schéma 75. Voie d'accès au pyrazole **33** étudiée.

Suite à l'échec de la préparation du pyrazole **33**, l'objectif a été de reproduire à l'identique une réaction de CuSAC déjà décrite entre le phénylacétylène et la *N*-phénylsydnone **8**, synthétisée

précédemment (section I-1.2.a)). La réaction de cycloaddition entre ces deux composés a donc été réalisée selon les conditions développées par le groupe de F. Taran (Schéma 76).²⁵¹ En raison de l'importance de minimiser l'exposition à l'oxygène durant une réaction CuAAC²⁵² et des similarités de ce système avec la CuSAC, la réaction a été réalisée avec et sans atmosphère inerte puis les résultats ont été comparés. Même si la réaction fonctionne en présence d'oxygène, de meilleurs rendements sont obtenus lorsque la réaction est faite sous atmosphère inerte (R = 60 % vs 88 %).

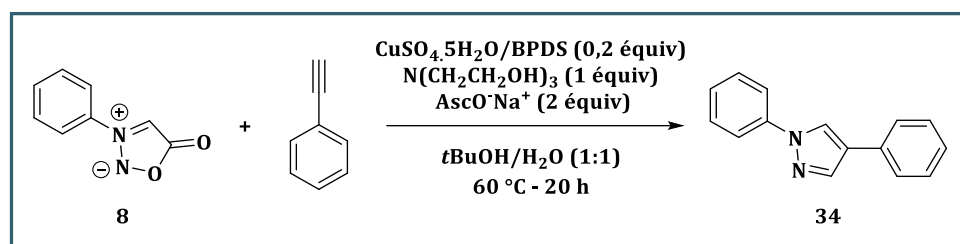


Schéma 76. Synthèse du pyrazole 34.

Bien que la réaction CuSAC se soit montrée compatible à la présence d'un mélange DMF/H₂O,²⁰⁸ l'hypothèse a été émise que l'utilisation de DMF était préjudiciable à la préparation du pyrazole 33. Par conséquent, pour vérifier cette hypothèse, la synthèse du pyrazole 34 a été reconduite en DMF/H₂O (8:2). Le rendement obtenu dans ces conditions était strictement identique à celui obtenu lorsque la réaction se fait dans un mélange tBuOH/H₂O (1:1), soit autour de 88 %.

Comme décrit dans la littérature et confirmé lors des études cinétiques sur le système SPSAC, la structure de la sydnone a un impact sur la réactivité, ce qui peut expliquer la non réactivité de la sydnone 16. Par conséquent, les réactions de cycloaddition entre les sydnones 18/21 et le phénylacétylène ont également été testées, selon les mêmes conditions que pour la sydnone 16 (Schéma 77), mais aucune réaction n'a toutefois été observée.

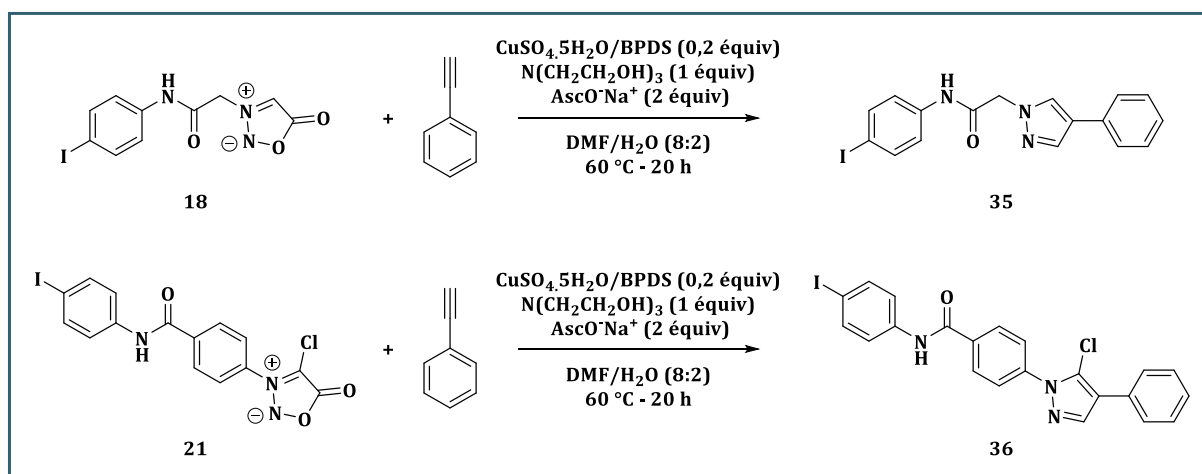


Schéma 77. Voie d'accès aux pyrazoles 35 et 36 envisagée.

Alors que l'échec de la réaction avec la *N*-alkylsydnone **18** était prévisible au vu des cinétiques très lentes et des résultats rapportés dans la littérature dans ces conditions, l'analyse HPLC réalisée sur le milieu réactionnel 24 heures après le lancement de la réaction de CuSAC avec la *N*-arylchlorosydnone **21**, n'a pas non plus montré la formation d'un nouveau produit.

Les conditions de réaction testées ne permettant pas d'obtenir les pyrazoles souhaités, des optimisations sur la réaction de cycloaddition entre la sydnone **16** et le phénylacétylène ont été réalisées. Dans un premier temps, le nombre d'équivalent de phénylacétylène a été augmenté, passant de 1 à 1,5 équivalents, mais aucun changement n'a été observé. Malgré l'augmentation des quantités de la solution [cuivre-ligand-réducteur] d'un facteur 5, les mêmes résultats ont été constatés. La température de la réaction a ensuite été augmentée jusqu'à 120 °C. Alors que des analyses HPLC réalisées sur le brut réactionnel montrent une consommation de la sydnone en faveur d'un nouveau produit en fonction de la température de chauffage (Figure 55 A), il s'est toutefois avéré que les produits formés correspondent à la dégradation de la sydnone de départ, comme le montre le suivi de sa stabilité en l'absence des autres réactifs (Figure 55 B). Le remplacement du BPDS par d'autres ligands tel que la 1,10-phénantroline ou le THPTA, comme précédemment rapporté par Taran et *al.*,²¹⁸ n'a pas non plus amélioré le résultat. Enfin, l'utilisation d'un sel de cuivre (I) directement, comme décrit par Taran et *al.*,²⁵¹ n'a pas permis de synthétiser le pyrazole souhaité.

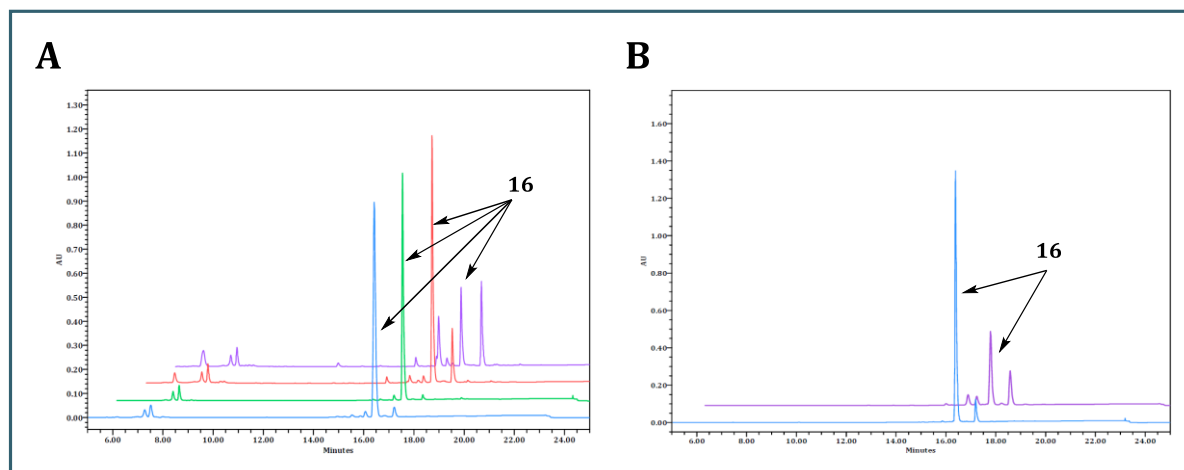


Figure 55. (A) Impact de la température sur la réaction de cycloaddition entre la sydnone **16** et le phénylacétylène ; (B) Dégradation de la sydnone en fonction de la température. $T = 60\text{ °C}$ (—), 80 °C (—), 100 °C (—) et 120 °C (—).

Alors que la réaction CuSAC entre la *N*-phénylsydnone **8** et le phénylacétylène permet d'obtenir des résultats similaires à la littérature, la transposition de ce système à nos sydnones d'intérêt est plus compliquée. Afin d'approfondir l'évaluation de ce système, la réactivité du phénylacétylène avec une sydnone fonctionnalisée par un groupement moins complexe que pour les sydnones d'intérêt a été investiguée (Schéma 78). Pour ce test, notre choix s'est porté sur la sydnone **14** fonctionnalisée par un acide carboxylique en position *para* et utilisée comme

intermédiaire pour la préparation des sydnones **16** et **21**. Alors que la réaction entre la sydnone **14** et le 4-phényl-1-butyne, un alcyne ayant une structure similaire, a été décrite par Taran et coll.,²⁵¹ aucun nouveau produit n'a été observé lorsque nous avons utilisé le phénylacétylène.

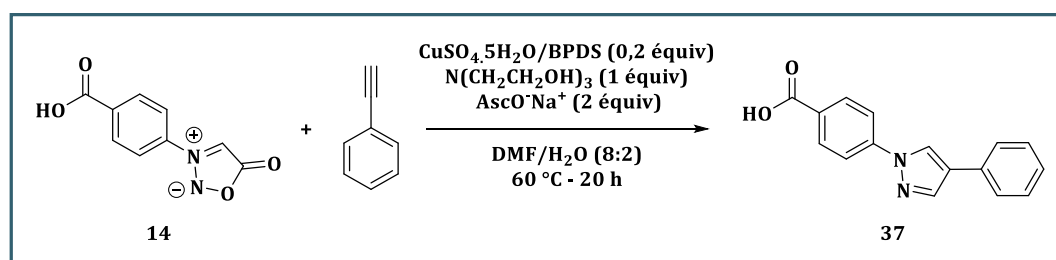


Schéma 78. Voie d'accès envisagée pour la préparation du pyrazole **37**.

Après avoir modifié la structure de la sydnone et les conditions de réaction, un paramètre qui n'avait pas encore été étudié était la structure de l'alcyne. Tout d'abord, notre choix s'est porté sur l'acide 5-hexynoïque, un alcyne disponible au laboratoire et déjà utilisé pour des réactions CuSAC avec plusieurs coumarine-sydnones.²⁰⁸ La réaction avec la *N*-arylsydnone **16** a alors été mise en place (Schéma 79 A) mais l'analyse HPLC réalisée sur le milieu réactionnel n'a montré la formation d'aucun nouveau produit. Enfin, même si les tests précédents n'ont pas permis de synthétiser les composés souhaités, un dernier test avec le peptide modèle **24** a été réalisé (Schéma 79 B). Sans surprise, la réaction n'a pas permis d'obtenir la référence iodée non-radioactive du peptide modèle.

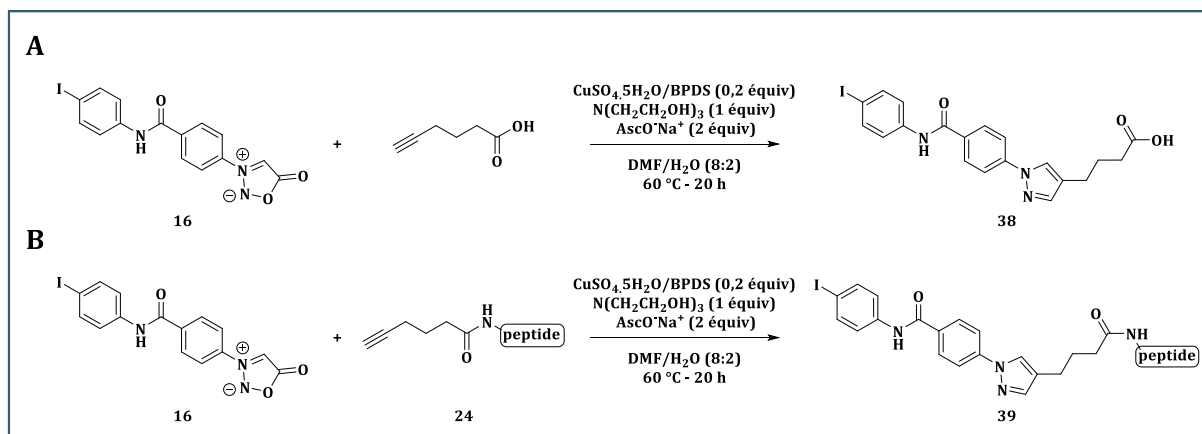


Schéma 79. Réaction CuSAC envisagée entre la sydnone **16** et différents alcynes. (A) Avec l'acide 5-hexynoïque ; (B) Avec le peptide modèle **24**.

Si le BPDS représente aujourd'hui le ligand le plus décrit pour des réactions CuSAC, une étude récente de l'équipe de F. Taran, visant à réduire les quantités de cuivre dans ce type de système, a mis en évidence certaines limites concernant l'utilisation de ce ligand.²⁰⁹ En effet, alors qu'il était attendu que ce ligand facilite la préparation de pyrazole, il a été surprenant de voir qu'en présence de BPDS, aucune réaction de cycloaddition n'avait lieu. Lors de ces travaux, les auteurs ont remarqué que l'utilisation de plusieurs lots de BPDS entraînait des variations significatives de rendements en fonction du fournisseur. Alors que certains permettaient d'obtenir d'excellents

rendements (92 %), cette valeur pouvait chuter à 21 % voire même empêcher que la réaction se produise, lorsque le fournisseur était différent. De plus, même en utilisant un produit provenant du même fournisseur, les rendements pouvaient fortement varier (92 à 14 %). Au vu de ces informations, il serait intéressant de tester la réaction avec un autre lot de ligand provenant du même fournisseur voire même d'un autre fournisseur, car dans le cadre de notre étude un seul lot de BPDS a été utilisé.

Lors de cette même étude et pour pallier ces problèmes de reproductibilité, un nouveau ligand de type biimidazole a été développé. L'avantage non-négligeable de ce ligand est la possibilité de diminuer la quantité de cuivre engagée dans la catalyse de cette cycloaddition, passant de 20 % avec le BPDS à 5 %. De plus, il s'est avéré que l'ajout de TPGS-750-M, un tensioactif, à des substrats hydrophobes permettait d'améliorer la réaction en milieu aqueux. Etant donné les problèmes de solubilité des sydnones d'intérêt (**16**, **18**, **21**), ces nouvelles conditions permettraient peut-être de favoriser la formation des références iodées des peptides modèles.

Enfin, si les tests préliminaires ont été réalisés avec du $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, d'autres sels de cuivre tels que le $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ou $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ seront également à tester. Cependant, même si des efforts ont été réalisés pour réduire la température de réaction (35 °C vs 140 °C),²¹³ permettant d'entrevoir plus facilement une transposition à des biomolécules, il sera toutefois important de prendre en compte les problèmes potentiels de solubilité des sydnones d'intérêts dans les solvants requis pour ces catalyseurs.

I-4. Radiomarquage d'un vecteur immunologique d'intérêt

Après avoir validé l'utilisation de la SPSAC pour le radiomarquage de peptides modèles cliquables, les systèmes bio-orthogonaux les plus prometteurs à savoir *N*-arylsydnone/DBCO, *N*-arylchlorosydnone/DBCO et *N*-arylchlorosydnone/BCN, ont été sélectionnés pour être appliqués au radiomarquage d'une biomolécule d'intérêt. Cette étude applicative a été réalisée avec l'anticorps monoclonal 9E7.4 dirigé contre le CD138 murin, développé spécifiquement par notre équipe de recherche afin de cibler les cellules de myélome multiple. Cette immunoglobuline, utilisée notamment lors de la précédente étude, a aussi fait l'objet de nombreux travaux visant à développer la radio-immunothérapie α .^{253,254}

I-4.1. Modification chimique par des groupements DBCO ou BCN

Comme pour les peptides modèles, l'utilisation de ces systèmes bio-orthogonaux a nécessité au préalable une modification de l'anticorps par des fonctions DBCO ou BCN. L'introduction de ces fonctions s'est effectuée au niveau des résidus lysines de l'anticorps à l'aide

des motifs DBCO-NHS **40** et BCN-PNP **41**, utilisés pour la préparation des peptides **22** et **23** (Figure 56).

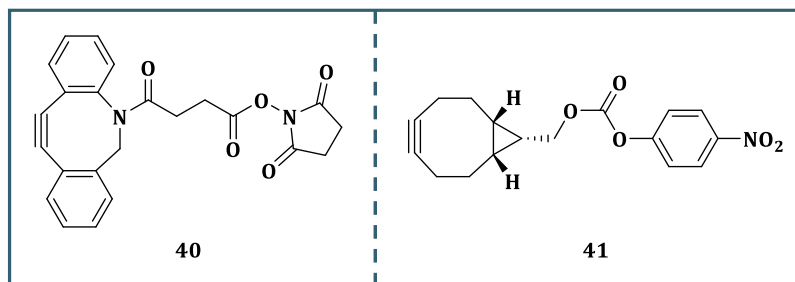


Figure 56. Structures des motifs DBCO-NHS (**40**) et BCN-PNP (**41**).

Afin de rendre les amines des fonctions lysines à la surface de l'anticorps réactives vis-à-vis de ces groupements, une étape d'ultracentrifugation permettant de modifier le tampon de stockage de l'anticorps (PBS, pH = 7,2) par un tampon borate 0,1M (pH = 8,6) a été réalisée. Cette nouvelle solution a ensuite été concentrée à 4,5 mg/mL qui est la gamme de concentration habituellement utilisée pour le couplage. Une fois solubilisés dans du DMSO, les motifs cliquables **40** et **41** (15 équivalents) ont été ajoutés à la solution d'anticorps pour l'étape de couplage. Après 60 minutes, l'excès de motif (**40** et **41**) est éliminé par purification sur une colonne à exclusion stérique et les solutions d'anticorps modifiés sont conditionnées en tampon PBS (pH = 7,2) à une concentration de 2 mg/mL.

I-4.2. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 par les systèmes SPSAC

Les anticorps 9E7.4-DBCO et 9E7.4-BCN ont ensuite été radiomarqués par l'intermédiaire des sydnones radioiodées **16a** et/ou **21a** obtenues par la méthode décrite en section I-2.2.a). Le milieu réactionnel a été maintenu sous agitation à 25 °C et le suivi de la réaction a été effectué à des temps de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 min. Les rendements de chaque système ont été évalués par analyse iTLC-SG du brut réactionnel à l'aide d'un scanner Cyclone phosphorimageur (Figure 57).

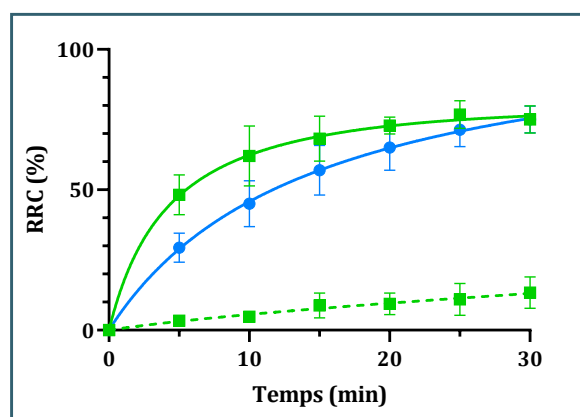


Figure 57. Cinétiques des couplages bio-orthogonaux entre les sydnones radiomarquées **16a** (●), **21a** (■) et l'anticorps 9E7.4-DBCO (—) ou 9E7.4-BCN (---). RRC basés sur l'analyse iTLC-SG du produit brut (n = 3).

Contrairement à ce qui avait pu être observé lors des études cinétiques avec les peptides modèles, les systèmes *N*-arylsydnone/DBCO et *N*-arylchlorosydnone/BCN se sont avérés plus lents que le couple *N*-arylchlorosydnone/DBCO après 30 minutes à 25 °C. Après radiomarquage, chaque solution d'anticorps a été purifiée grâce à une colonne d'exclusion stérique conduisant à des PRC supérieures à 99 % pour tous les systèmes étudiés. Afin de vérifier que l'affinité de l'anticorps pour son antigène n'était pas altérée, des tests d'immunoréactivité ont été réalisés sur chaque lot d'anticorps marqué à l'iode-125. Des valeurs de 27 % pour le système *N*-arylchlorosydnone/DBCO, 45 % pour *N*-arylsydnone/DBCO et 59 % pour *N*-arylchlorosydnone/BCN, ont ainsi été mesurées. Malheureusement, le système a priori le plus rapide est celui qui montre l'immunoréactivité la plus faible, alors que la meilleure valeur a été obtenue avec le système ayant montré la plus faible cinétique. De plus, les valeurs obtenues restent bien en dessous de celles attendues par comparatif avec l'anticorps natif radiomarqué sur les résidus tyrosines (entre 80-85 %), signe que la modification des anticorps avec les différents motifs a une influence sur les propriétés de reconnaissance de l'anticorps. La gamme de valeurs obtenues ne permet pas une transposition du système SPSAC pour des expérimentations biologiques, et une des possibilités pour minimiser l'impact de la modification de l'anticorps serait de diminuer le nombre d'équivalent de motif utilisé lors de l'étape de fonctionnalisation.

I-4.3. Modification du nombre d'équivalents de motifs

Suite à ces résultats, le meilleur système (*N*-arylchlorosydnone/DBCO) a été choisi en vue d'être optimisé et surtout d'améliorer l'immunoréactivité de l'anticorps 9E7.4 radiomarqué. Pour ce faire, les anticorps ont donc été modifiés selon le protocole précédemment décrit, mais en réduisant progressivement le nombre d'équivalents de DBCO-NHS utilisé lors du couplage à 10 eq., 5 eq., 3 eq. et 1 eq.. A partir de la sydnone radiomarquée **21a**, l'étude cinétique a été reproduite avec chaque nouveau lot d'anticorps (Figure 58).

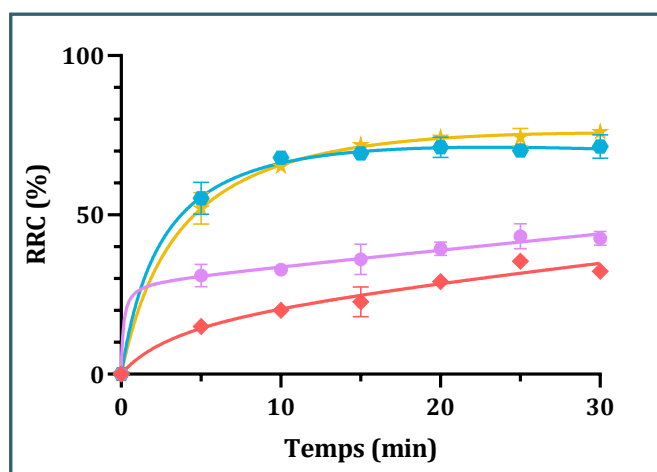


Figure 58. Impact du nombre d'équivalent de DBCO-NHS sur la cinétique de couplage entre la *N*-arychlorosydnone **21a** et l'anticorps 9E7.4-DBCO. 10 eq. (★) ; 5 eq. (●) ; 3 eq. (●) ; 1 eq. (◆).

D'un point de vue cinétique de réaction, aucun impact significatif n'est constaté entre le lot modifié avec 15 équivalents de motif DBCO et les lots d'anticorps modifiés avec 10 et 5 équivalents. En revanche, l'utilisation de 1 ou 3 équivalents entraînent une diminution du rendement de marquage avec des valeurs autour de 32 % et 42 %, respectivement. En ce qui concerne l'immunoréactivité de ces nouveaux lots, on obtient des valeurs de 34 %, 43 %, 50 % et 54 % pour les lots de 10 eq., 5 eq., 3 eq. et 1 eq.. Les résultats obtenus indiquent qu'une diminution du nombre d'équivalent de motif utilisé pour le greffage permet d'avoir un effet positif sur l'immunoréactivité, signe que les zones de reconnaissance (paratope) semblent moins impactées. Néanmoins, il est clair qu'une diminution du nombre d'équivalent conduit également à une diminution de la cinétique de réaction.

I-4.4. Détermination du nombre de motifs par anticorps par analyses de spectrométrie de masse

Le nombre de motifs (DBCO ou BCN) greffés par anticorps a ensuite été déterminé par analyse de spectrométrie de masse et ce pour tous les lots d'anticorps préparés. La méthode d'analyse a consisté à réduire les anticorps entiers, c'est-à-dire dissocier les chaînes lourdes, des chaînes légères. Cette stratégie a pour avantage de simplifier les signaux générés par l'électrospray (multiples états de charges), notamment pour les protéines de haut poids moléculaire (>80 kDa). En revanche, cette méthode rend les interprétations plus complexes étant donné qu'il est impossible de différencier spécifiquement les 2 chaînes légères et les 2 chaînes lourdes libérées par la réduction. Les chaînes lourdes et légères sont ensuite séparées par chromatographie liquide puis détectées par spectrométrie de masse. Les spectres de masse mesurés restent complexes dus aux multiples états de charge inhérents à l'ionisation des macromolécules. Une analyse par déconvolution des spectres a alors été réalisée afin d'estimer le poids moléculaire de chaque chaîne et de ses isoformes potentielles. Une première analyse a été

effectuée sur l'anticorps natif (non couplé) conduisant à une masse pour la chaîne légère de 24 182 g.mol⁻¹ et de 49 436 g.mol⁻¹ pour la chaîne lourde (Figure 59 A). Les mêmes analyses ont ensuite été effectuées sur les anticorps 9E7.4 modifiés par 15 éq., 10 éq., 5 éq., 3 éq. ou 1 éq. de DBCO-NHS (**40**) et 15 éq. de BCN-PNP (**41**). La comparaison des spectres déconvolués avant et après modification permet de déterminer le rendement de greffage (Figure 59 B).

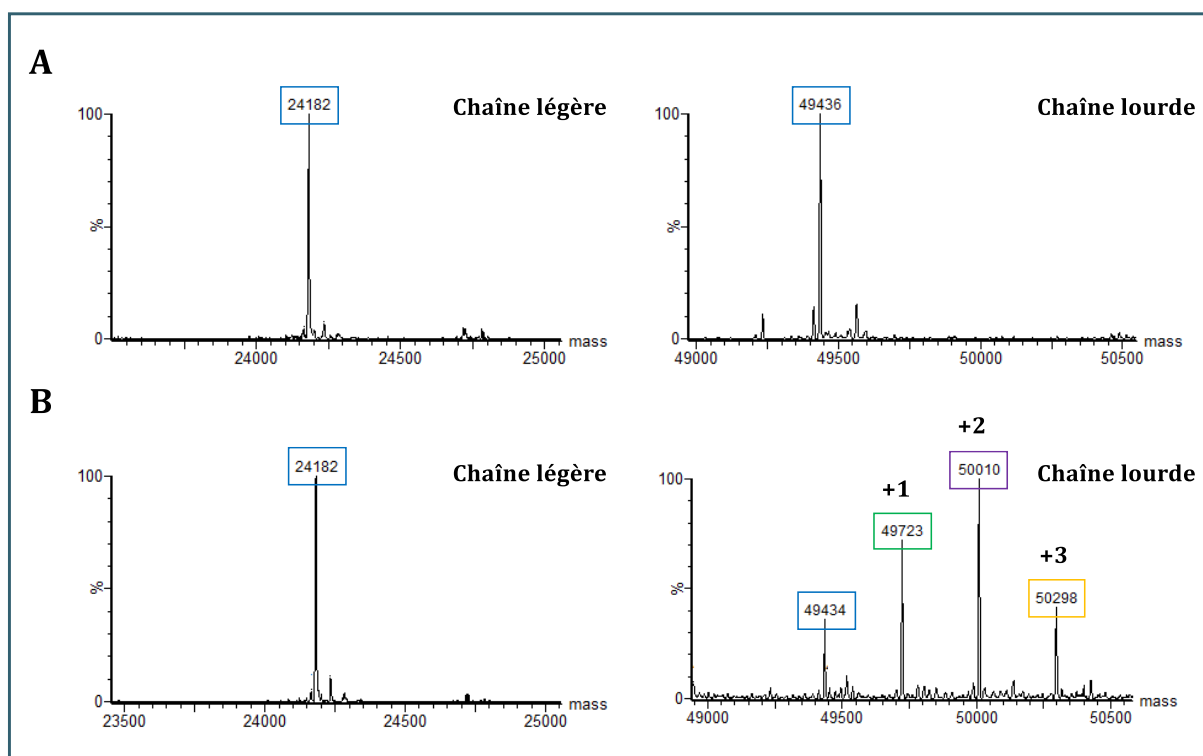


Figure 59. Exemples d'analyses de spectrométrie de masse des chaînes légères et lourdes des anticorps. (A) Anticorps natif ; (B) Anticorps modifié par 15 équivalents de DBCO.

Ces analyses de spectrométrie de masse ont permis de montrer que toutes les modifications par les motifs DBCO (≈ 290 g.mol⁻¹) ou BCN (≈ 178 g.mol⁻¹) ont été réalisées sur les chaînes lourdes des anticorps. Le nombre de greffage moyen par anticorps est calculé en additionnant les proportions de chaque signal déterminé par les analyses de masses (Tableau 3).

Cyclooctyne	Nombre d'équivalent	Nombre de greffage moyen par anticorps
BCN	15	0,66
DBCO	15	3,12
DBCO	10	3
DBCO	5	1,62
DBCO	3	0,94
DBCO	1	0,58

Tableau 3. Tableau récapitulatif du nombre de greffage moyen par anticorps, déterminé par spectrométrie de masse.

De manière générale, une bonne corrélation entre le nombre de greffage moyen et la vitesse de la réaction de cycloaddition est observée. En effet, plus le nombre de greffage est

important, plus la réaction est rapide. Toutefois, ces résultats restent cohérents avec la perte d'immunoréactivité observée sur les anticorps modifiés par 10 ou 15 équivalents. Enfin, bien qu'attendu comme le plus rapide, le système *N*-arylchlorosydnone/BCN n'a pas répondu aux attentes, mais cela n'est probablement pas lié au système en lui-même mais plutôt à un nombre de motif BCN insuffisant.

I-5. Conclusion

Pour conclure, cette étude préliminaire a permis de montrer qu'il était possible de transposer le système SPSAC pour le marquage à l'iode-125 d'un anticorps anti-CD138. Ce travail met également en avant le côté prédictif des études menées sur peptides modèles, puisque la tendance cinétique révélée semble être conservée lors de l'application à un anticorps. Toutefois, les systèmes transférés ne sont pas utilisables dans les conditions testées, du fait d'une immunoréactivité de l'anticorps marqué assez moyenne. Un travail d'optimisation serait nécessaire, que ce soit au niveau des conditions de modifications, mais aussi au niveau des motifs utilisés et notamment du type d'ester activé utilisé comme semblent l'indiquer les résultats des analyses de spectrométrie de masse.

II- Conception d'un précurseur azoture pour le radiomarquage avec les halogènes

Bien que la chimie clic soit aujourd'hui très utilisée pour la production des radiopharmaceutiques, il est néanmoins important de garder à l'esprit l'impact potentiel de cette chimie sur le produit obtenu. Si l'on se concentre sur le système SPAAC, l'un des systèmes de chimie clic les plus étudiés, la formation de deux régioisomères ayant des propriétés biochimiques et biophysiques potentiellement différentes peut s'avérer problématique. D'autre part, le caractère hydrophobe des cyclooctynes utilisés peut entraîner une modification de la biodistribution naturelle des biomolécules, en particulier si le vecteur utilisé est de petite taille.

Cette contrainte s'est illustrée lors de l'utilisation de ce système pour la préparation du peptide [Tyr³, Lys⁵] octréotate acétate radiomarqué à l'iode-125, entraînant une augmentation de sa lipophilie (logP = 1,81 et logD = 1,57) comparé à ce qui est décrit dans la littérature pour le radiomarquage du même analogue peptidique au gallium-68 (logP = -2,9).²⁵⁵ De plus, l'utilisation de sels d'aryliodoniums comme précurseurs pour la préparation d'un radioiodoaryle fonctionnalisé par un azoture a également montré certaines limites : la formation d'un sous-produit radiomarqué, la présence d'analogue iodé non-radioactif et une perte d'activité non-négligeable pendant les phases d'évaporation due à la volatilité du produit radiomarqué.

Pour tenter de pallier ces problèmes, une modification de la structure du précurseur a été envisagée avec l'introduction d'une fonction acide boronique pour le radiomarquage, permettant ainsi de limiter la formation de sous-produits et d'éviter la présence d'analogue iodé non-radioactif. De plus, une chaîne PEG (n = 3) a également été introduite à ce nouveau précurseur. En plus de limiter la volatilité du produit radiomarqué, cette fonction connue pour son hydrophilie devrait permettre de contrebalancer la lipophilie du motif DBCO (Figure 60).

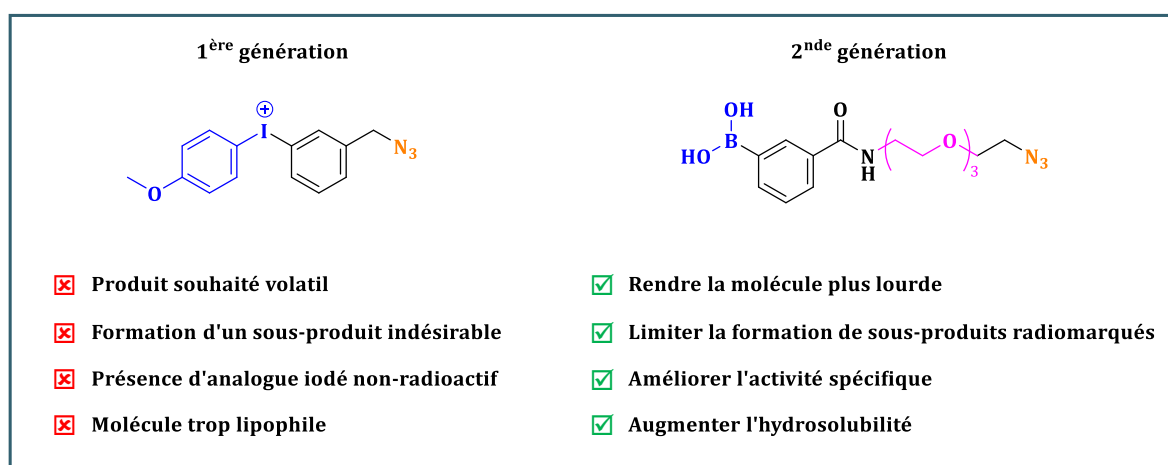


Figure 60. Structures des azotures de 1^{ère} et 2^{nde} génération.

II-1. Préparation du précurseur

Le précurseur **42** a été obtenu par une réaction de couplage entre l'acide 3-carboxyphénylboronique et l'azoture-PEG₃-amine, en présence d'EDC. HCl et d'HOBT, avec un rendement de 45 %. Ce rendement moyen s'explique par les difficultés de purification rencontrées pour isoler le précurseur **42** de l'acide boronique de départ. La référence iodée non-radioactive **43** a quant à elle été préparée selon le même protocole, à partir de l'acide 3-iodobenzoïque, avec un rendement de 69 % (Schéma 80).

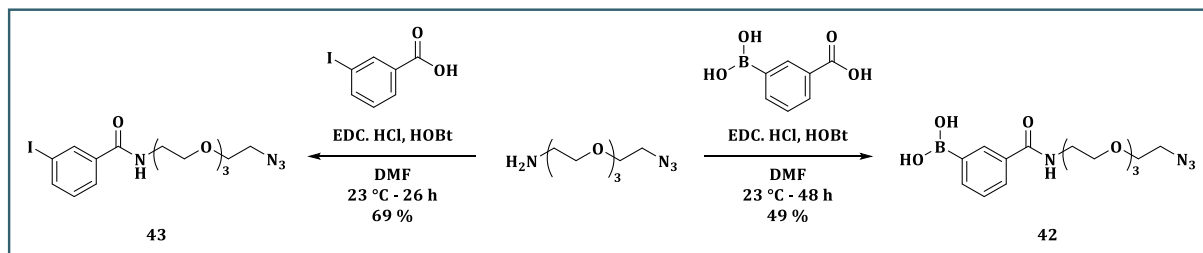


Schéma 80. Préparation du précurseur **42** et de la référence iodée **43**.

II-2. Radiomarquage du précurseur azoture à l'iode-125

Le marquage à l'iode-125 (0,2–10,8 MBq) de l'azoture **42**, réalisé selon les conditions décrites en section I-2.2.d) a conduit à un RRC >99 % (n = 9) (Figure 61).

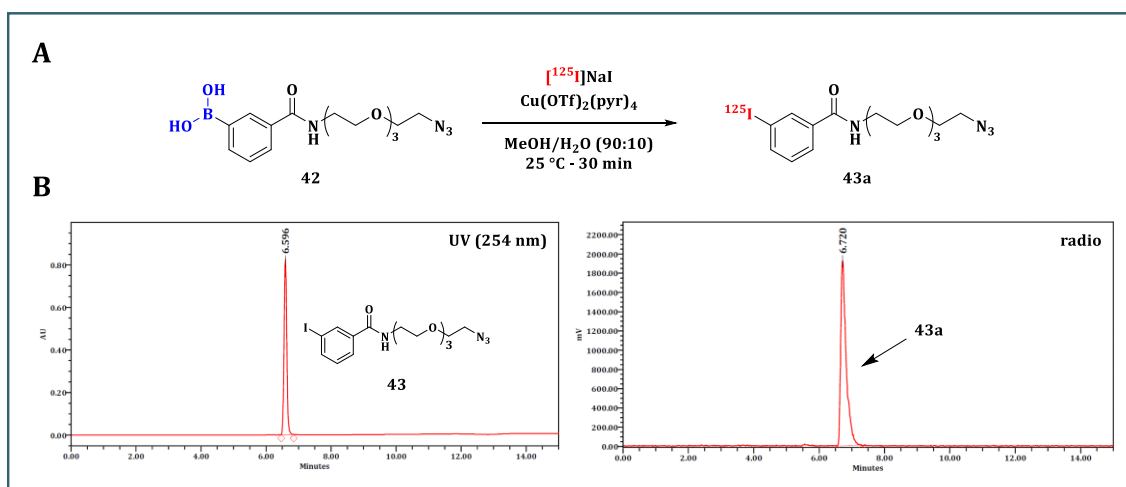


Figure 61. Radiomarquage du précurseur **42** à l'iode-125. (A) conditions de marquage ; (B) analyses HPLC de la référence iodée **43** et du brut réactionnel.

L'azoture radiomarqué **43a** a ensuite été purifié sur cartouche Sep-Pak® C₁₈ (Waters) par élution d'un mélange H₂O/MeCN afin d'éliminer le précurseur acide boronique ainsi que le catalyseur au cuivre. En plus de conduire à une PRC supérieure à 99 %, ce protocole permet d'obtenir un excellent RRC isolé de 91 ± 5 % (n = 9) qui, comparé à la première génération d'azoture (RRC = 65 %), démontre les effets bénéfiques de l'ajout de la chaîne PEG et du changement de fonction de radiomarquage. De plus, ce composé s'est avéré très stable puisque même après 7 jours à 4 °C en MeCN, aucune dégradation n'a été observée.

II-3. Application pour le radiomarquage d'un peptide analogue de la somatostatine

II-3.1. Mise au point de la réaction de couplage

L'un des objectifs de cet axe de travail consistait à utiliser cet azoture pour améliorer l'hydrophilie d'un peptide [Tyr³, Lys⁵] octréotate acétate modifié par un DBCO. L'octréotate, un peptide analogue de la somatostatine, permet le ciblage des récepteurs de la somatostatine qui sont surexprimés dans certains types de cancers et notamment dans le cas des tumeurs neuroendocrines. Ce peptide a permis le développement d'une imagerie spécifique utilisant les analogues de la somatostatine radiomarqués au gallium-68 pour le suivi de la maladie. Ces analogues ont également été étudiés pour une application en radiothérapie interne vectorisée, en utilisant des émetteurs β^- comme le lutetium-177, dont l'efficacité a pu être démontrée dans l'essai clinique de phase 3 NETTER-1.²⁵⁶ Ce traitement, connu sous le nom Lutathera®, est aujourd'hui couramment utilisé en clinique en seconde ligne de traitement pour les tumeurs neuroendocrines digestives. Une des pistes d'amélioration de ce traitement est de remplacer l'émetteur β^- par un émetteur α tel que l'astate-211. En raison de la faible disponibilité de ce radionucléide, comme pour l'étude sur les sydnones, les tests de radiomarquage ont été réalisés avec l'iode-125. L'étape suivante a donc consisté à réaliser la réaction de cycloaddition entre l'azoture radioiodé **43a** et le peptide **44** obtenu commercialement (Figure 62).

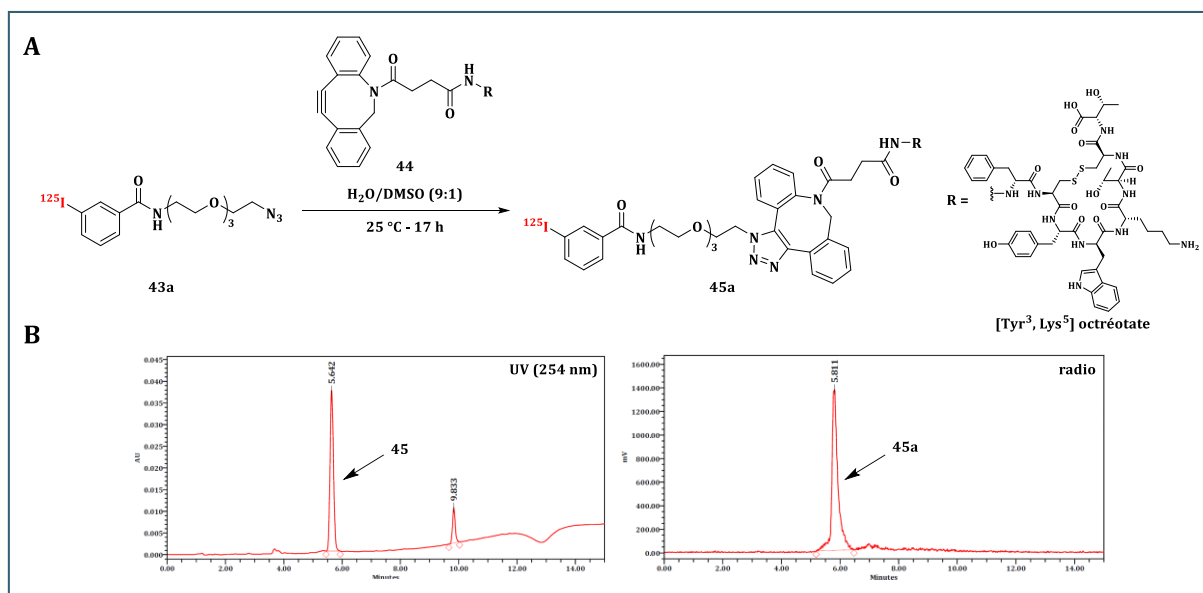


Figure 62. Radiomarquage du peptide **44** à l'iode-125. (A) conditions de marquage ; (B) analyses HPLC de la référence du peptide **45** et du brut réactionnel.

Alors qu'avec l'azoture de première génération (**2a**), la réaction SPAAC était réalisée avec 36 μ g de peptide en raison de la présence d'analogue iodé non-radioactif, les optimisations réalisées avec l'azoture **43a** ont permis de diviser par 6 les quantités de peptides requises. Après 17 heures à 25 °C, le peptide radioiodé **45a** a pu être obtenu avec une PRC supérieure à 95 % et

une activité molaire de 0,6 MBq/μg. Contrairement à ce qui est attendu pour une réaction de chimie clic, la réaction SPAAC a été volontairement laissée sur un temps suffisamment long pour s'assurer qu'il ne restait plus d'azoture **43a**. Etant donné la demi-vie de l'iode-125 (59,4 jours), cela n'a pas eu d'impact sur l'activité molaire de la solution finale. De plus, le peptide **45a** s'est avéré très stable à 4 °C puisque même après 65 heures en H₂O/DMSO (9:1), aucune dégradation n'a été observée.

Le coefficient de partage du peptide **45a** a ensuite été déterminé afin de comparer le caractère lipophile de cette molécule à son analogue précédemment étudié. Visiblement, l'ajout d'une chaîne PEG (n = 3) n'a pas permis de contrebalancer la lipophilie liée à l'ajout d'un groupement DBCO. En effet, alors qu'un logP de $1,81 \pm 0,07$ et un logD (7,4) de $1,57 \pm 0,13$ avaient été mesurés pour le peptide sans chaîne PEG, des valeurs de $1,80 \pm 0,05$ et $1,56 \pm 0,03$ ont été respectivement obtenues pour le peptide **45a**.

II-3.2. Etude cellulaire des peptides radiomarqués

Même si les modifications apportées n'ont pas montré d'effet significatif sur la lipophilie du peptide radiomarqué (**45a**), des tests *in vitro* réalisés en collaboration avec les biologistes de l'équipe ont permis de comparer le comportement de ce peptide avec celui obtenu en utilisant l'azoture de première génération (¹²⁵I-DBCO-TATE), ainsi qu'à un peptide radiomarqué au lutécium-177 (¹⁷⁷Lu-DOTATATE), utilisé en clinique et servant de référence. Dans un premier temps, le pourcentage d'activité internalisée par rapport à l'activité cellulaire totale a été étudié (Figure 63).

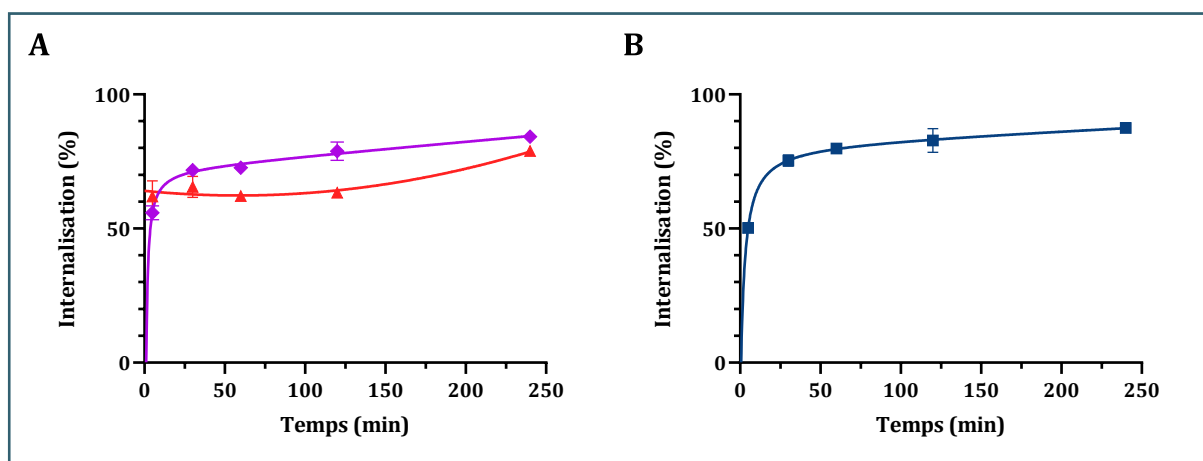


Figure 63. Comparaison du pourcentage d'activité internalisée de peptide **45a** (◆) par rapport à l'activité cellulaire totale. (A) Comparaison avec le ¹²⁵I-DBCO-TATE (▲); (B) Profil obtenu pour le peptide de référence ¹⁷⁷Lu-DOTATATE.

Alors que la courbe d'internalisation de l'¹²⁵I-DBCO-TATE montrait une internalisation immédiate du peptide (>60 % à 5 min) non saturable, puisque cette valeur augmentait jusqu'au point à 4 heures, le peptide **45a** a montré une internalisation saturable semblable à celle du ¹⁷⁷Lu-DOTATATE et représentatif d'une internalisation *via* un récepteur.

De plus, l'internalisation du peptide **45a** n'était pas totalement bloquée après saturation par de l'octréotide comme observé avec le ^{177}Lu -DOTATATE (0,2% d'internalisation). Ceci est synonyme d'une internalisation non spécifique, néanmoins, une légère amélioration a été constatée avec $3,85 \pm 0,15$ % d'activité internalisée par rapport à l'activité totale contre $5,58 \pm 0,38$ % lorsque l'azoture de première génération a été utilisé (Figure 64).

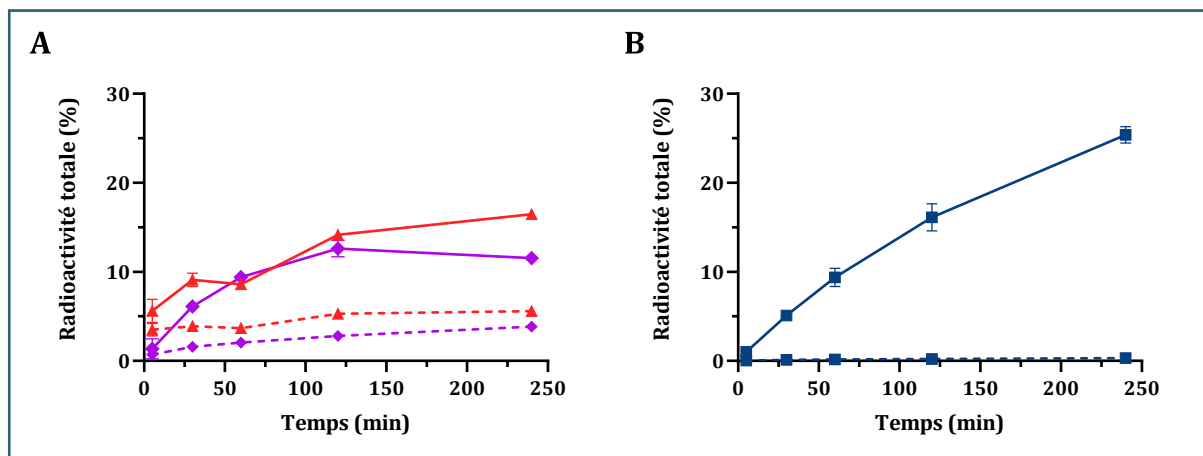


Figure 64. Comparaison du pourcentage d'activité internalisée de peptide **45a** (◆) par rapport à l'activité totale, en présence (--) et absence (—) d'un excès de peptide octréotide. (A) Comparaison avec le ^{125}I -DBCO-TATE (▲); (B) Profil obtenu pour le peptide de référence ^{177}Lu -DOTATATE.

II-3.3. Allongement de la chaîne PEG

Suite aux résultats encourageants montrant une amélioration du profil d'internalisation du peptide [Tyr³, Lys⁵] octréotate acétate avec une chaîne PEG₃, une troisième génération d'azoture a été introduite. L'idée a été d'allonger la longueur de la chaîne PEG (n= 6 et 10) afin d'évaluer l'impact de ces modifications sur la lipophilie de la molécule finale et le comportement cellulaire. Les précurseurs **46** et **47** et les références iodées **48** et **49** ont été préparés en utilisant les mêmes procédures que présentées précédemment avec des rendements de 58 à 79 % (Schéma 81).

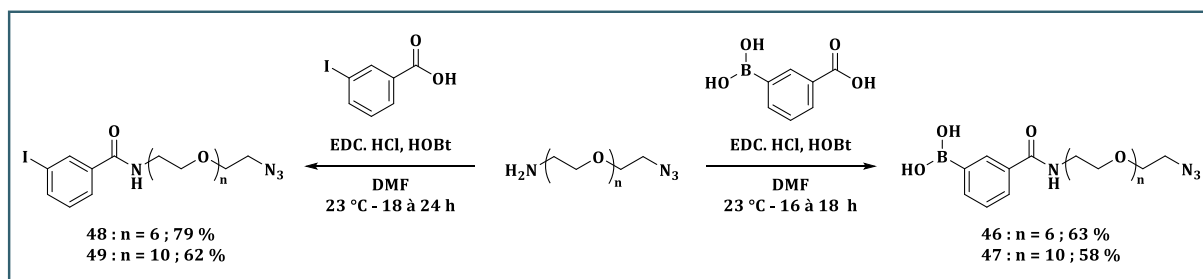


Schéma 81. Préparation des précurseurs **45** et **46** et des références iodées **47** et **48**.

Le marquage à l'iode-125 (0,3–5,7 MBq) des précurseurs azotures (**46** et **47**) a été réalisé selon les conditions utilisées pour l'azoture-PEG₃ **42**. Après 30 minutes à 25 °C, ces marquages ont tous conduits à d'excellents RRC bruts (>95 %) (Figure 65).

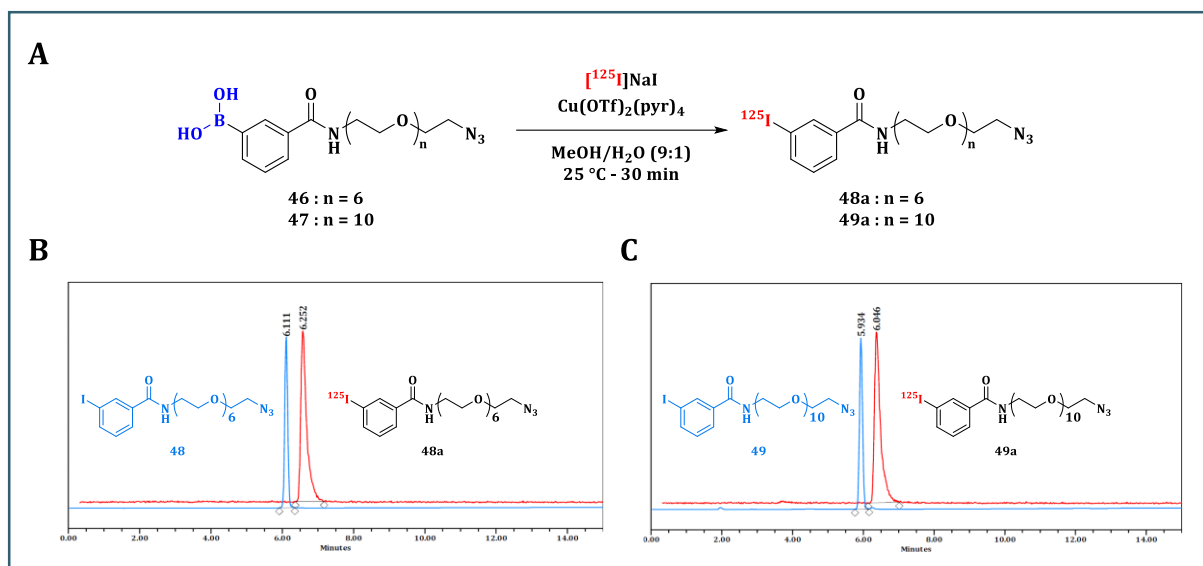


Figure 65. Marquage à l'iode-125 des azotures **46** et **47**. (A) conditions de marquage ; (B) analyses HPLC de la référence iodée **48** et du brut réactionnel (RRC = 98 ± 2 % ($n = 4$)) ; (C) analyses HPLC de la référence iodée **49** et du brut réactionnel (RRC = 98 ± 1 % ($n = 2$)). RRC basés sur les analyses HPLC du produit brut.

La purification des bruts réactionnels sur SepPak® C₁₈, réalisée selon le même protocole que celui décrit précédemment, a conduit à des PRC supérieures à 99 % et des RRC isolés légèrement plus faibles que pour l'azoture **43a**, avec des valeurs de 72 ± 1 % (**48a**) et 83 % (**49a**). Ensuite, le peptide **44** a été ajouté aux azotures radioiodés pour l'étape de cycloaddition, cependant, alors qu'aucun problème n'avait été constaté avec l'azoture-PEG₃ (**43a**), des difficultés ont été rencontrées sur cette étape. En effet, dans les deux cas et malgré 30 heures à 25 °C, aucune réaction n'a été observée, seulement la présence de l'azoture de départ.

Des tests complémentaires ont été réalisés afin de comprendre pourquoi la réaction SPAAC n'avait pas eu lieu avec ces deux azotures. Etant donné que l'allongement de la chaîne PEG semble avoir un impact sur la réaction, les optimisations sur les conditions de réactions ont été effectuées sur l'azoture **49a** possédant la chaîne la plus longue (Figure 66 A). Le premier test a consisté à augmenter les quantités de peptide et à chauffer à 60 °C afin de favoriser la réaction. Pour cela, la réaction SPAAC a donc été effectuée avec 36 µg de peptide **44**, masse utilisée pour l'azoture de première génération. Après seulement 30 minutes, l'analyse HPLC effectuée sur le brut réactionnel a permis de montrer que la réaction était totale et que le peptide **50a** était bien obtenu (Figure 66 B). Suite à cela, l'objectif a ensuite été de réduire la quantité de peptide à 6 µg, afin d'augmenter l'activité molaire du produit final et de se placer dans la même gamme que le peptide **45a** et faciliter la comparaison de l'impact de l'allongement de la chaîne PEG. L'analyse HPLC du brut réactionnel réalisée après 80 minutes a montré que dans ces conditions, 81 % de l'azoture radioiodé **49a** était couplé au peptide (Figure 66 C).

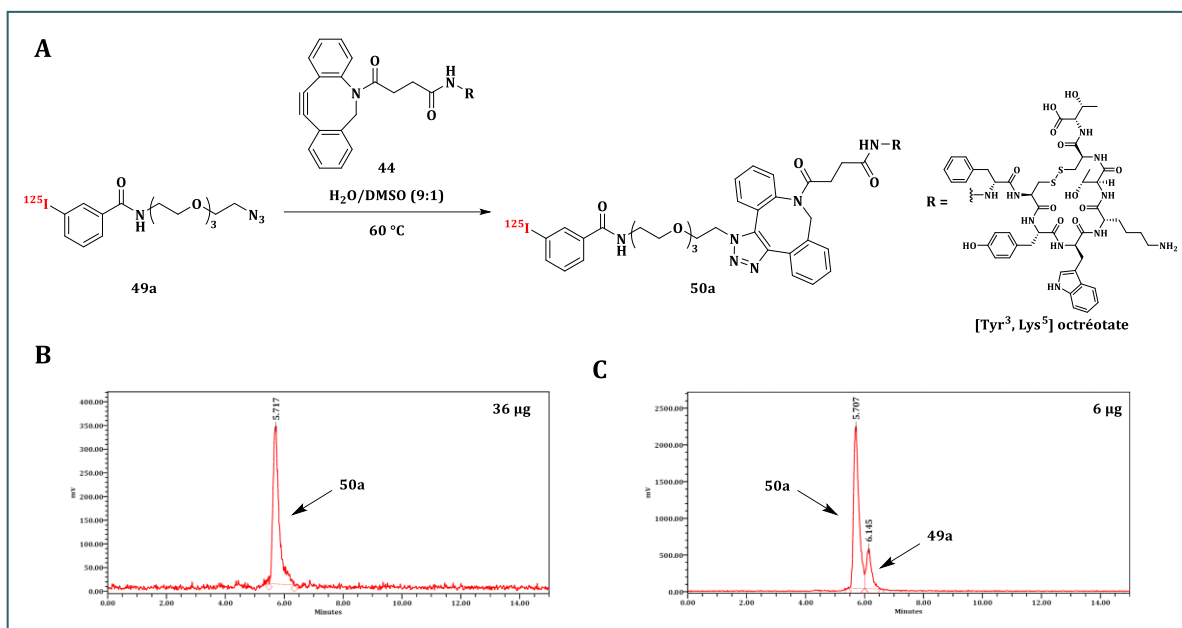


Figure 66. Radiomarquage du peptide **44** à l'iode-125. (A) conditions de marquage ; (B) Analyse HPLC du brut réactionnel après 30 min avec 36 µg de peptide ; (C) Analyse HPLC du brut réactionnel après 80 min avec 6 µg de peptide

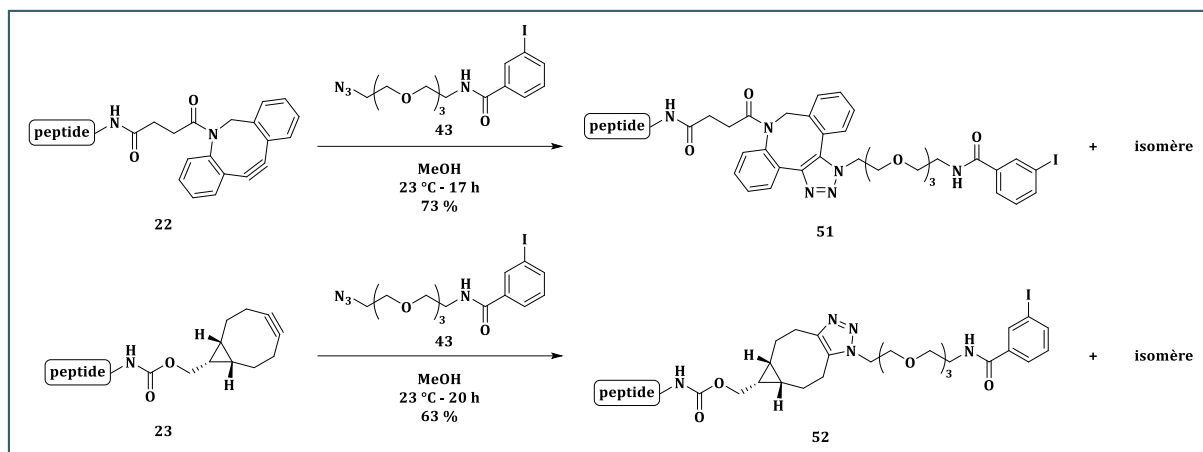
Malheureusement, ces résultats n'ont pas pu être reproduits lors d'un radiomarquage visant à préparer le peptide **50a** pour des tests cellulaires. Après contrôle, il s'avère que le peptide [Tyr³, Lys⁵] octréotate acétate de départ s'était dégradé depuis les précédents tests réalisés, pouvant expliquer les problèmes de reproductibilité rencontrés. Étant donné que le peptide **44** n'est pas facilement disponible et doit être préparé sur commande par la société Eurogentec, de nouveaux tests n'ont pas encore pu être réalisés. En revanche, il serait intéressant de tester le couplage avec les azotures sur un nouveau lot de peptide afin de pouvoir déterminer le logP et logD (7,4) des produits correspondants puis de poursuivre les études cellulaires.

Même si des difficultés ont été rencontrées pour la préparation de ces peptides, cette étude a permis de montrer qu'avec les nouvelles générations d'azotures, les réactions de marquages étaient quasi-totales et qu'en raison de leur volatilité moins importante, il était plus facile de les manipuler et donc d'obtenir de meilleurs RRC. De plus, l'absence de génération d'analogue iodé non-radioactif pendant la réaction a permis de réduire les quantités de peptides nécessaires pour la réaction clic, conduisant à une amélioration de l'activité molaire du produit final.

II-4. Etude de l'impact des modifications structurales sur la réactivité de l'azoture

Si l'amélioration de l'azoture a permis de résoudre la majorité des problèmes mis en évidence quant à l'utilisation de la première génération de précurseur, l'idée a ensuite été de voir si les optimisations effectuées avaient un impact sur la réactivité de l'azoture. Par conséquent, similairement aux sydnones, des études cinétiques avec et sans radioactivité ont été réalisées sur l'azoture **43** avec les peptides modèles cliquables modifiés par un DBCO (**22**) ou un BCN (**23**).

Avant de commencer ces études, comme pour les sydnones, un travail de synthèse a été réalisé afin d'obtenir la référence iodée des différents peptides cliqués. Les peptides DBCO (**22**) et BCN (**23**) ont donc été couplés à l'azoture iodé non-radioactif **43**. Après purification des solutions de couplage par chromatographie en phase normale, les références des peptides modèles cliquables **51** et **52** ont été obtenues avec de bons rendements de 73 et 65 %, respectivement (Schéma 82).



*Schéma 82. Réactions de couplages bio-orthogonaux entre les peptides cliquables (**22**, **23**) et l'azoture iodé non-radioactif **43**.*

Une fois les références obtenues, les constantes de vitesse k des réactions de cycloaddition entre l'azoture iodé non-radioactif (**43**) et les peptides modèles cliquables modifiés par un DBCO (**22**) ou un BCN (**23**) ont été mesurées suivant le protocole décrit en section I-2.1.a). Les résultats ont ensuite été comparés aux valeurs obtenues pour l'azoture de référence (Figure 67). Comme attendu, l'azoture **43** s'est montré beaucoup plus réactif lorsque le peptide était modifié par un DBCO que par un BCN, avec des constantes k de $2,772 \pm 0,145 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $0,419 \pm 0,046 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement. Cependant, peu importe le motif, l'ajout de la chaîne PEG entraîne une légère diminution de la réactivité comparée à l'azoture de référence ($k = 3,506 \pm 0,328 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $0,549 \pm 0,053 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

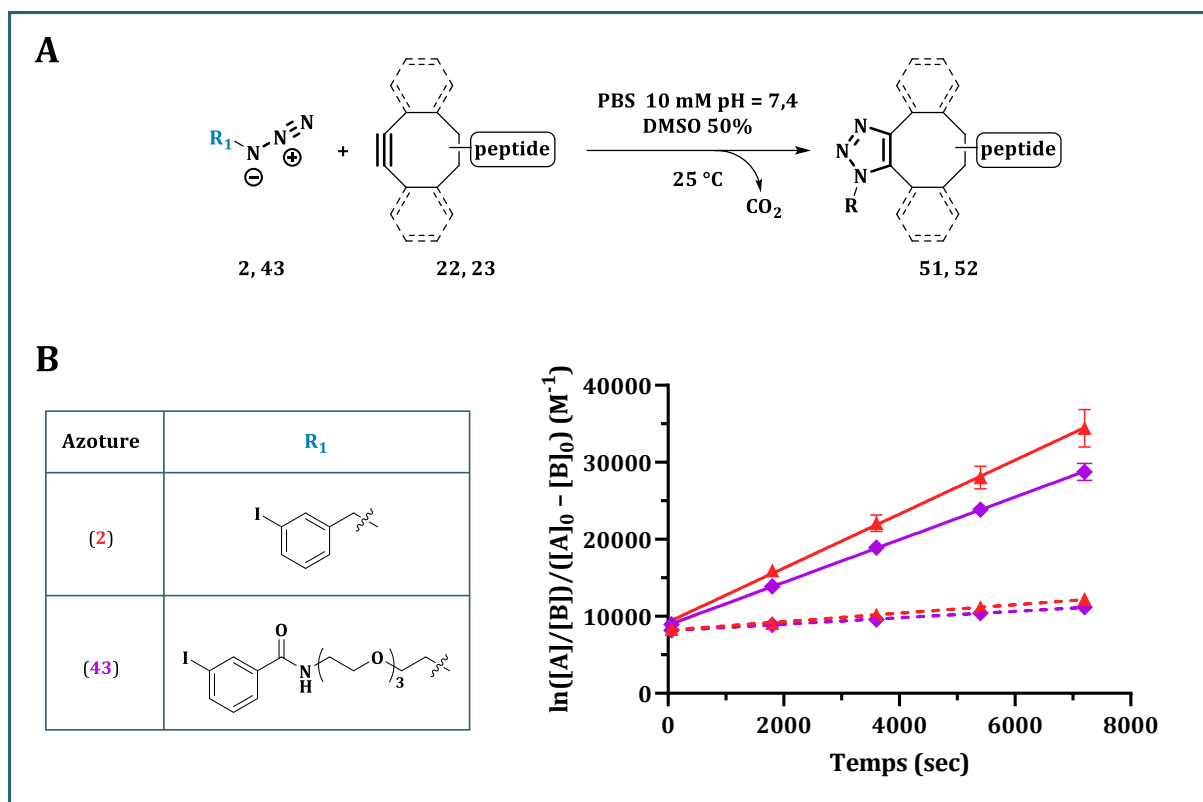


Figure 67. Comparaison des vitesses du second ordre des réactions SPAAC entre les azotures **2** (▲) et **43** (◆) avec le peptide modifié par un DBCO **22** (—) ou BCN **23** (--) ($n = 3$).

Ce travail comparatif s'est poursuivi par la réalisation de la même étude à l'iode-125 (Figure 68). Après l'obtention des azotures radioiodés **2a** et **43a**, en utilisant les conditions décrites en section I-2.2.d) et II-2, les réactions de cycloaddition avec les peptides modifiés par un DBCO (**22**) ou un BCN (**23**) ont été réalisées. Comme observé lors de l'étude cinétique sans radioactivité, les azotures (**2a**, **43a**) ont montré une meilleure réactivité lorsque le peptide était modifié par un DBCO plutôt qu'un BCN. En effet, alors que la réaction était quasi-quantitative après 90 minutes avec le peptide **22** (RRC(**2a**) = $98 \pm 1 \%$; RRC(**43a**) = $97 \pm 2 \%$), la réaction était respectivement à $25 \pm 4 \%$ et $20 \pm 1 \%$ au même temps pour le peptide **23**.

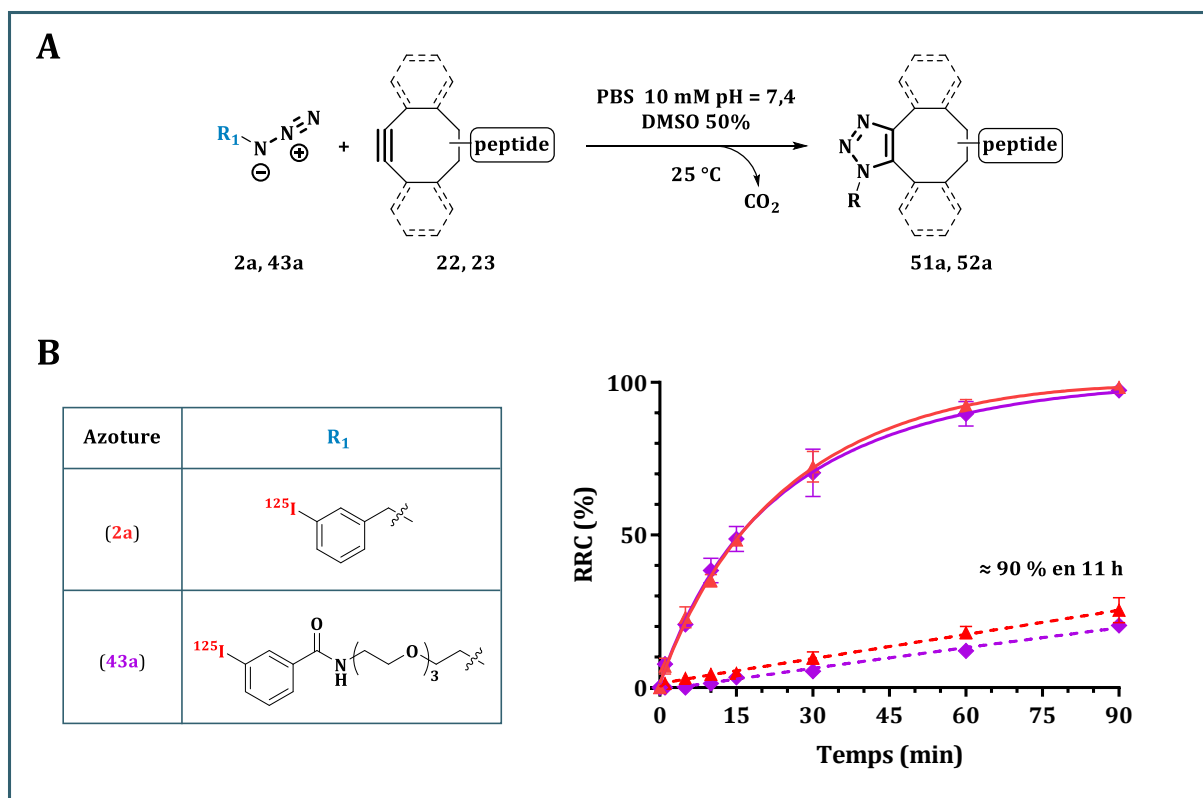


Figure 68. Cinétiques des couplages bio-orthogonaux entre les azotures radiomarqués **2a** (\blacktriangle) et **43a** (\blacklozenge) avec le peptide modifié par un DBCO **22** (—) ou BCN **23** (---) ($n = 3$).

II-5. Application au radiomarquage au fluor-18

Une collaboration entre notre équipe et le laboratoire de recherche radiopharmaceutique de Louvain en Belgique (équipe du Pr. Guy Bormans) a permis d'approfondir l'étude de ce groupement prosthétique azoture-PEG₃ avec des tests de radiomarquages au fluor-18 pour comparaison avec son analogue non-pégylé. C'est un travail qui a d'ailleurs fait l'objet d'une mobilité et dont les résultats préliminaires sont présentés ici.

Comme pour l'iode, avant de s'intéresser à l'étape de radiomarquage, un travail de synthèse a été nécessaire pour la préparation des références fluorées non-radioactives **53** et **54**. L'azoture **53** a été obtenu par substitution nucléophile entre le bromure de 3-fluorobenzyle et l'azoture de sodium, selon le protocole utilisé pour l'azoture **2**, avec un rendement de 44 % (Schéma 83 A). Similairement à l'azoture iodé **2**, ce rendement moyen s'explique par les pertes de produit lors de l'évaporation du solvant, lié à la volatilité du composé. L'azoture-PEG **54** a quant à lui été préparé par couplage entre l'azoture-PEG₃-amine et l'acide 3-fluorobenzoïque, selon le même protocole que son analogue iodé, avec un rendement de 24 % (Schéma 83 B).

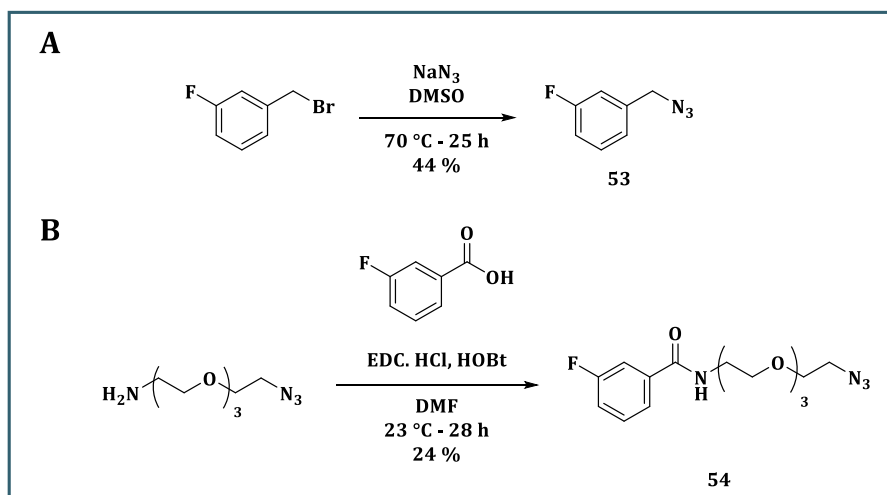


Schéma 83. Préparation des références fluorées. (A) Azoture 53 ; (B) Azoture-PEG₃ 54.

Un test préliminaire de radiomarquage au fluor-18 sur le précurseur **42** a ensuite été réalisé, à l'aide d'un semi-automate (Figure 69), en s'inspirant des conditions développées par Scott et *al.*²⁵⁷

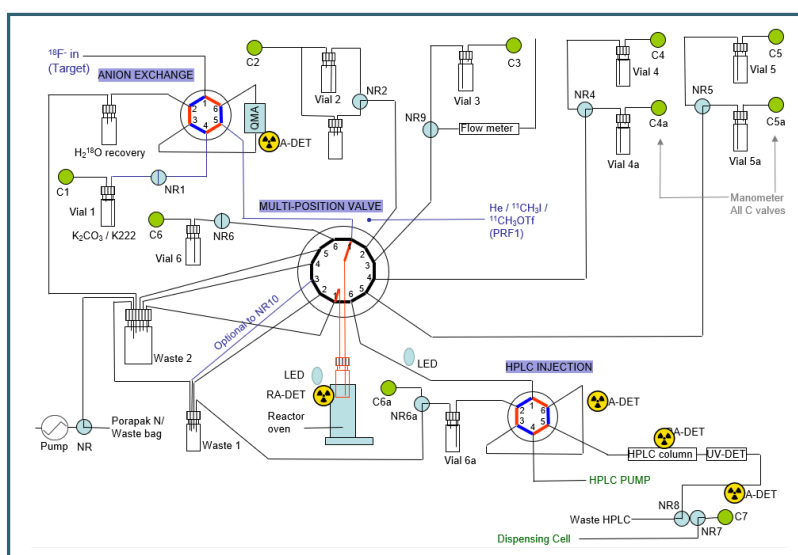


Figure 69. Représentation simplifiée du semi-automate utilisé pour les radiomarquages au fluor-18.

La solution aqueuse de [¹⁸F]fluorure (12 GBq) provenant du cyclotron a été transférée sur une cartouche échangeuse d'ion (PS-HCO₃) pour piéger les ions fluorures F⁻. Après élution avec une solution de K₂C₂O₄/Kryptofix 2.2.2 dans un mélange H₂O/MeCN (89:11), les [¹⁸F]fluorures ont été récupérés dans le réacteur. Après évaporation du solvant présent dans le réacteur, en chauffant à 90 °C, un séchage azéotropique avec de l'acétonitrile a été réalisé pour éliminer les traces d'eau. Une fois le séchage terminé, le réacteur a été refroidi à 30 °C et une solution de DMF contenant le précurseur **41**, la pyridine et le Cu(OTf)₂ a été ajoutée. Après 20 minutes à 110 °C, le réacteur a été refroidi à 50 °C avant que de l'eau y soit ajoutée. En raison de la viscosité du DMF et du fait que le réacteur soit dans une cellule blindée qu'il n'est pas possible d'ouvrir tant que le seuil de radioactivité est dépassé, l'ajout d'eau a permis de faciliter le transfert de la solution

provenant du réacteur vers une boîte à gants permettant de récupérer le milieu réactionnel et de l'analyser. Des problèmes lors de ce transfert ont été rencontrés, ne permettant de récupérer que 100 μL (11 MBq) au lieu des 1,1 mL attendus. Néanmoins, ce volume était suffisant pour analyser le milieu réactionnel en HPLC. Alors qu'à l'iode-125, des RRC quantitatifs sont obtenus, la transposition de cet azoture au marquage au fluor-18 est plus compliquée puisque les analyses HPLC ont permis de déterminer un RRC brut de seulement 1 % (Figure 70).

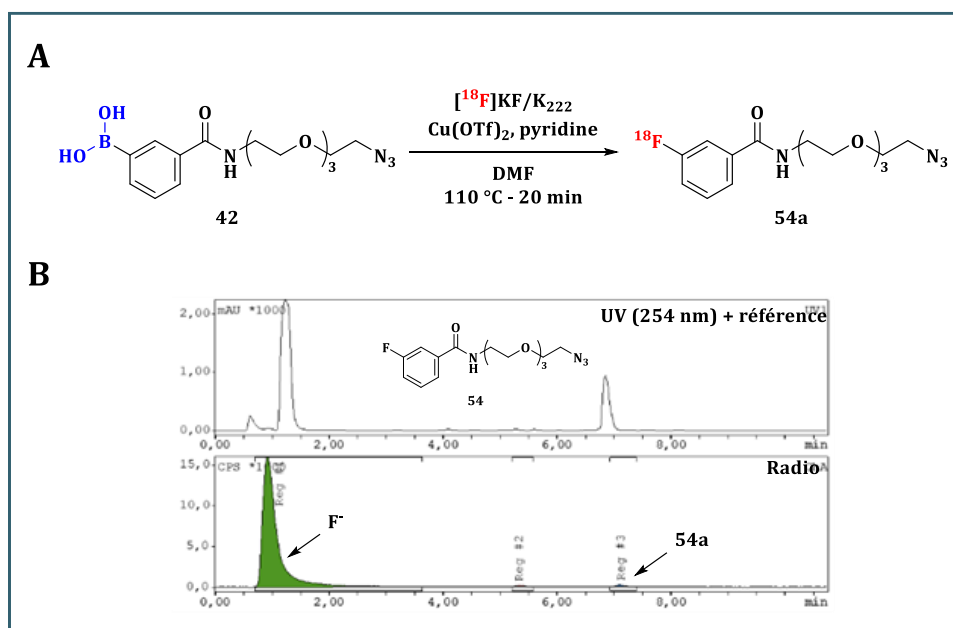


Figure 70. Radiomarquage du précurseur 42 au fluor-18. (A) Conditions de marquage ; (B) Analyses HPLC du brut réactionnel en présence de la référence fluorée 54.

La température nécessaire pour le radiomarquage étant plus élevée qu'à l'iode-125, l'hypothèse a été émise que le précurseur 42 se dégradait, pouvant impacter le rendement de marquage. Cette hypothèse a pu être vérifiée lors d'un test consistant à chauffer le précurseur en solution dans le DMF sans la pyridine ni $\text{Cu}(\text{OTf})_2$. Après 20 minutes à 110°C , les analyses HPLC ont révélé que jusqu'à 40 % de précurseur se dégradait en faveur d'un sous-produit (Figure 71). Des analyses par spectrométrie de masse ont permis de déterminer que ce sous-produit correspondait à un motif phénol.

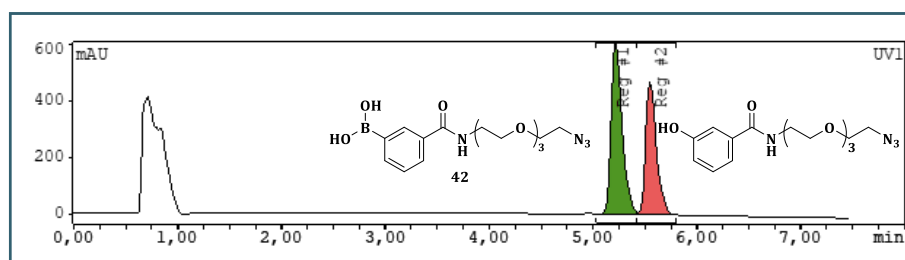


Figure 71. Analyse HPLC de la solution de DMF contenant le précurseur 42 après chauffage à 110°C pendant 20 minutes.

Ces résultats sont similaires à ce qui est rapporté dans la littérature. En effet, lors d'une étude visant à optimiser l'automatisation de la radiofluoration des acides boroniques, l'équipe de P. J. H. Scott a montré une forte diminution du RRC (de 73 à 1 %) lorsque le précurseur était consommé avant la dissolution du $[^{18}\text{F}]\text{KF}$.²⁵⁸ Pour pallier ce problème, les auteurs rapportent que la pré-dissolution des $[^{18}\text{F}]$ fluorures dans du DMF permet d'améliorer considérablement les rendements de la réaction de radiofluoration (43 vs 10 %). Par conséquent, il a été envisagé de transposer cette méthode pour le radiomarquage de l'azoture **42**.

Contrairement au premier test, la solution aqueuse de $[^{18}\text{F}]$ fluorure provenant du cyclotron à cette fois-ci été transférée sur une cartouche Sep-Pak Plus Light QMA Cl^- (Waters) et l'élution a été réalisée avec une solution de $\text{KOTf}/\text{K}_2\text{CO}_3$ dans l'eau. Une fois les étapes de séchages effectuées, les $[^{18}\text{F}]$ fluorures ont été activés avec du DMF pendant 5 min à 110 °C. Après avoir refroidi le réacteur à environ 30 °C, la solution de DMF contenant l'azoture **42**, la pyridine et le $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ a été ajoutée, puis la réaction a été laissée à 110 °C pendant 20 minutes. Une fois le milieu réactionnel refroidi à 50 °C, comme pour le test précédent, de l'eau a été ajoutée dans le réacteur pour faciliter le transfert du mélange réactionnel en dehors de la cellule blindée. En plus de n'avoir rencontré aucun problème lors du transfert, avec la quasi-totalité du volume récupéré (environ 1 mL, 145,7 MBq), cette méthode a conduit à un RRC brut de 12 % (Figure 72).

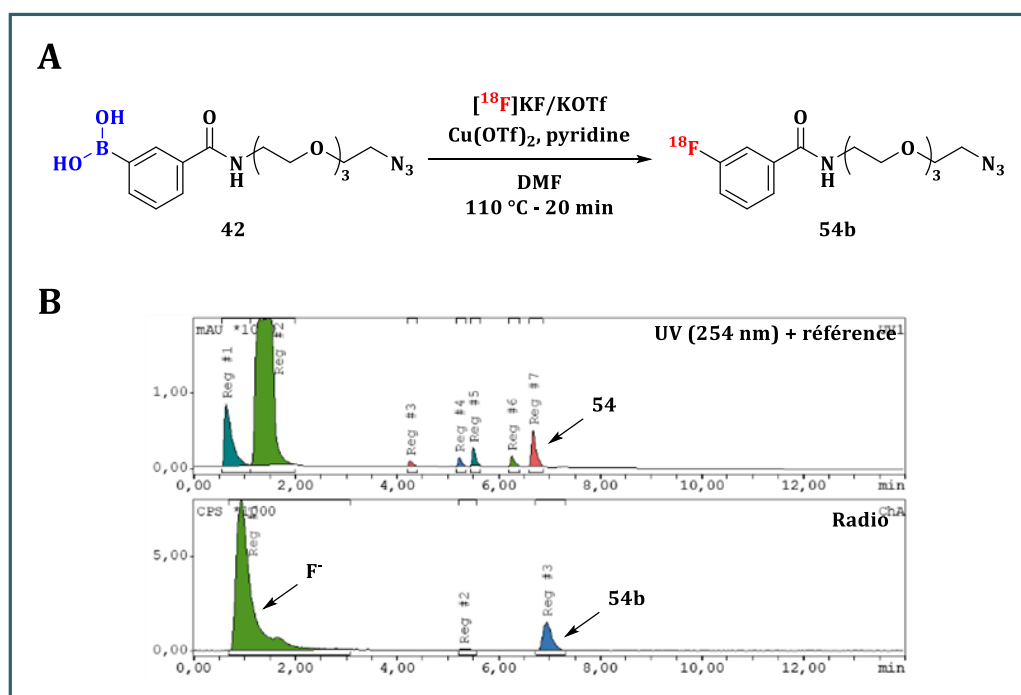


Figure 72. Radiomarquage du précurseur **42** au fluor-18. (A) Conditions de marquage ; (B) Analyses HPLC du brut réactionnel en présence de la référence fluorée **54**.

Etant donné ces bons résultats, le précurseur aryliodonium **55** utilisé lors de la précédente étude a lui aussi été radiomarqué en activant les $[^{18}\text{F}]$ fluorures à l'aide de DMF. L'objectif de ce test était, comme pour l'iode, de comparer l'azoture de seconde génération à celui de première

génération. Comme démontrées par les analyses HPLC du brut réactionnel, bien que le marquage ait également fonctionné, celui-ci était cependant moins bon que pour l'azoture amélioré avec un RRC brut de 6 % (Figure 73).

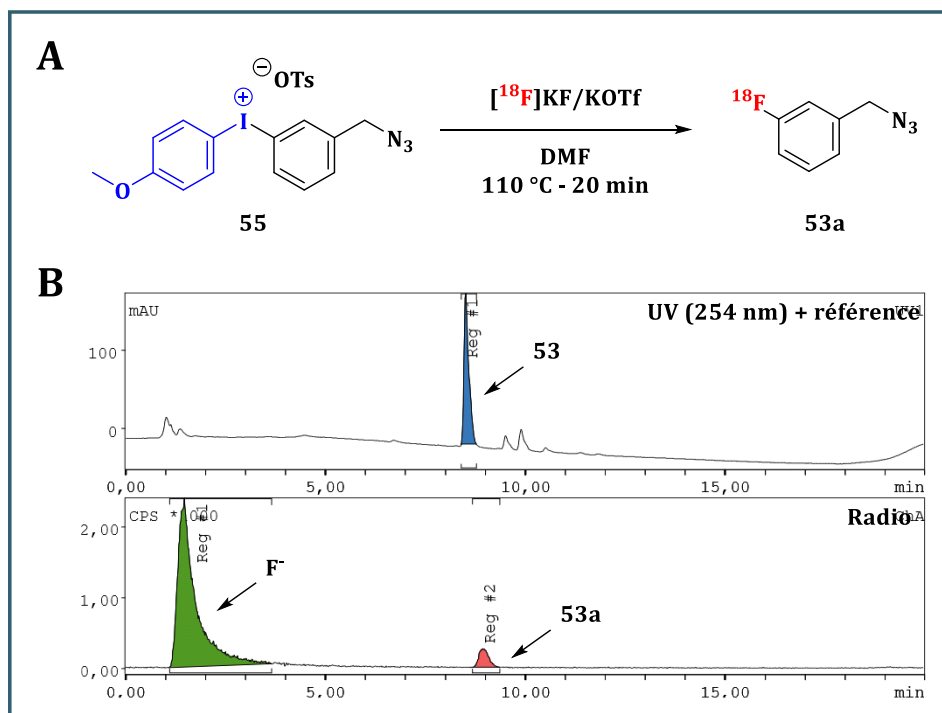


Figure 73. Radiomarquage du précurseur 55 au fluor-18. (A) Conditions de marquage ; (B) Analyses HPLC du brut réactionnel en présence de la référence fluorée 53.

Alors que les deux premiers tests effectués nécessitaient un séchage azéotropique pour éliminer les traces d'eau présentes dans le réacteur, l'idée a ensuite été de tester une méthode permettant d'éluer les $[^{18}\text{F}]$ fluorures de la cartouche sans utiliser de milieu aqueux, évitant ainsi cette étape. En 2017, Zlatopolskiy et *al.*²⁵⁹ rapportent une approche permettant d'éluer les $[^{18}\text{F}]$ fluorures à l'aide d'une solution de bicarbonate de tétraéthylammonium (Et_4NHCO_3) dilué dans le *n*-BuOH. En plus de récupérer jusqu'à 95 % des $[^{18}\text{F}]$ fluorures de la cartouche, l'utilisation de ce protocole a permis aux auteurs de marquer au fluor-18 plusieurs précurseurs acides boroniques. De plus, la présence de diméthylacétamide (DMA) à la place du DMF comme co-solvant a également permis d'améliorer les RRC (87 % vs 50 %). C'est pourquoi, ces conditions ont été transposées pour le radiomarquage du précurseur 42. Contrairement à ce qui avait pu être décrit, l'élution des $[^{18}\text{F}]$ fluorures de la cartouche Sep-Pak Plus Light QMA Cl^- n'a pas fonctionné ne permettant pas le radiomarquage du précurseur. Si l'hypothèse a été émise que le contre ion utilisé était problématique, comparé à l'ion carbonate (CO_3^{2-}) utilisé par l'équipe de B. D. Zlatopolskiy, des résultats similaires ont été rapportés quelques années plus tard par l'équipe de O. Meilhac.²⁶⁰ En effet, lors de l'utilisation de Et_4NHCO_3 dilué en *n*-BuOH, les auteurs ont rapporté l'élution de moins de 20 % des $[^{18}\text{F}]$ fluorures alors que dans leurs conditions habituelles plus de

95 % de l'activité est récupérée. Ces résultats démontrent la sensibilité de cette méthode et justifient le fait qu'elle ne soit pas plus présente pour le marquage au fluor-18.

N'ayant pas pu évaluer l'impact de la présence de *n*-BuOH comme co-solvant pour le radiomarquage du précurseur **42**, un dernier test a consisté à utiliser les meilleures conditions développées (activation des [¹⁸F]fluorures) en remplaçant le DMF par un mélange DMF/*n*-BuOH (2:1). Cependant, le problème rencontré lors de ce test s'est situé lors de l'étape d'élution des ions F⁻. En effet, alors que l'élution avec une solution de KOTf/K₂CO₃ dans l'eau avait permis de récupérer la quasi-totalité de l'activité (>90 %) présente sur la colonne lors du test précédent, cette fois-ci aucune élution n'a été constatée. L'hypothèse a alors été émise que la solution de KOTf/K₂CO₃, préparée quelques heures avant le radiomarquage, s'était dégradée. Pour vérifier cette hypothèse, une solution fraîchement préparée de KOTf/K₂CO₃ a été passée dans la colonne permettant cette fois-ci de récupérer les [¹⁸F]fluorures. Néanmoins, ce test ayant été réalisé le lendemain de la production de fluor-18, en raison de l'activité empêchant l'ouverture de la cellule blindée, le radiomarquage du précurseur **42** n'a pas été réalisé.

II-6. Conclusion

L'objectif de cette partie était de développer un nouveau précurseur azoture permettant de répondre aux limites mises en évidence lors de l'application de la chimie clic (SPAAC) pour la préparation d'un peptide analogue de la somatostatine (sous-produit, présence d'analogue iodée non-radioactif, volatilité, lipophilie). Pour pallier ces problèmes, notre choix s'est porté sur l'utilisation des acides boroniques comme fonction de radiomarquage et d'une chaîne PEG (n = 3) pour rendre la molécule plus hydrophile et moins volatile. Après une étape de synthèse, les tests de radiomarquage ont permis de montrer qu'avec cette nouvelle génération d'azoture, les réactions étaient totales et qu'en raison de la volatilité moins importante, il était plus facile de manipuler ce nouveau précurseur et d'obtenir de très bons RRC isolés. De plus, en raison de l'absence d'analogue iodé non-radioactif pendant la réaction, la quantité de peptide nécessaire pour la réaction clic a pu être réduite, conduisant à une amélioration de l'activité molaire du produit final. Malgré ces résultats prometteurs, l'ajout d'un PEG₃ n'a pas permis de contrebalancer la lipophilie induite par le DBCO. Si l'allongement de la chaîne PEG a également pu être exploré, des difficultés lors de la préparation du peptide correspondant ont été rencontrées, nécessitant des tests complémentaires.

Lors de cette étude, la réactivité de ce nouveau motif azoture a également été étudié sur des peptides modèles cliquables modifiés par un DBCO ou un BCN. Une étude cinétique avec les azotures non-radioactifs (**2**, **43**) a été réalisée pour déterminer la constante de vitesse de la réaction sur les peptides modifiés par un cyclooctyne (**22**, **23**). Les cinétiques de réaction des

mêmes systèmes bio-orthogonaux ont également été étudiées avec les azotures radioiodées (**2a**, **43a**) obtenus à partir des précurseurs arylboroniques correspondants.

Comme pour les sydnones, les réactions non-radioactives avec les azotures ont montré des profils similaires aux études cinétiques radioactives. Comme attendu, l'azoture-PEG₃ (**43**, **43a**) a montré une cinétique de réaction plus lente avec le peptide modifié par un BCN (**23**) comparé au DBCO (**22**). Néanmoins, aucun impact sur la réactivité n'a été observé suite à la modification de la structure de l'azoture puisque les constantes de vitesses et les RRC obtenus n'ont pas montré de changements significatifs.

Enfin, dans un dernier temps, des tests de radiomarquages au fluor-18 ont permis d'approfondir l'étude de ce groupement prosthétique azoture-PEG. Malgré un faible RRC brut de seulement 1 % lors du premier test, des optimisations sur les conditions de marquage ont permis d'améliorer considérablement ce rendement atteignant 12 %, soit 2 fois plus que le RRC obtenu avec le précurseur azoture de 1^{ère} génération.

Conclusion générale

Introduit en 2001 par K. Barry Sharpless, le concept de chimie clic s'est rapidement révélé intéressant pour faciliter l'accès à une plus large gamme de composés que la chimie conventionnelle. La possibilité d'utiliser cette chimie dans un milieu biologique avec des réactions bio-orthogonales, et ce, sans interférer avec les processus biochimiques naturels, a eu un impact significatif dans de nombreux domaines de la chimie et notamment en médecine nucléaire pour la production des radiopharmaceutiques.

Alors que les méthodes de bioconjugaison conventionnelles, permettant d'associer un radionucléide à une protéine vectrice, ont montré certaines limites, la chimie bio-orthogonale est apparue comme une méthode alternative prometteuse. En effet, des travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire ont permis de montrer que l'utilisation de systèmes bio-orthogonaux basés sur des réactions telles que la SPAAC (DBCO/N₃) ou la IEDDA (TCO/Tz) pouvait améliorer le radiomarquage d'un anticorps anti-CD138 à l'iode-125 et à l'astate-211. En plus de conduire à de meilleurs rendements de couplage et d'avoir une cinétique de réaction rapide, aucun impact négatif sur les propriétés biologiques de l'anticorps (immunoréactivité, stabilité sérique) n'a été observé.²³⁶ Toutefois, ces systèmes restent encore perfectibles en raison de la possible isomérisation progressive du TCO ou encore du possible effet du motif DBCO, en particulier sa lipophilie, sur les propriétés pharmacocinétiques du vecteur radiomarqué. De plus, les précurseurs utilisés pour le radiomarquage (sels d'iodoniums) peuvent également engendrer quelques complications, notamment la génération de sous-produits ou d'analogues iodés non-radioactifs, qui peuvent entrer en compétition dans la réaction de cycloaddition.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'explorer davantage le potentiel de la chimie bio-orthogonale pour le marquage de protéines avec des radiohalogènes lourds, ceci afin d'étendre le catalogue de systèmes cliquables à disposition pour la production des radiopharmaceutiques. La disponibilité de l'astate-211 étant limitée, ces travaux ont été réalisés avec l'iode-125, l'iode étant l'élément le plus proche dans le tableau périodique et ayant démontré des propriétés physico-chimiques similaires à l'astate.

La première partie de ce projet a donc consisté à identifier le ou les systèmes les plus intéressants en termes d'efficacité de radiomarquage et de cinétique de réaction. Ce sont deux systèmes impliquant des sydrones, la CuSAC et la SPSAC, qui se sont révélés les plus intéressants, notamment en raison de leur facilité de synthèse, leur très bonne stabilité chimique et surtout des cinétiques de réactions clic parmi les plus rapides décrites dans la littérature. De plus, les sydrones étant impliquées dans des réactions équivalentes aux azotures, ce choix est d'autant plus pertinent pour faciliter la comparaison avec les études menées précédemment.

Avant de s'intéresser au radiomarquage d'un vecteur d'intérêt, il a été nécessaire d'évaluer l'efficacité de ces nouveaux systèmes sur un modèle plus simple. Pour cela, une série de sydnones iodées avec différents substituants au niveau du motif sydnone (alkyle et aryle en position N₃, et chloré en position C₄) ainsi que des peptides modèles cliquables (DBCO, BCN, alcyne vrai) ont été préparés afin d'étudier l'effet de ces modifications de structures sur les cinétiques de réactions.

A l'issue de ce travail de synthèse, une étude cinétique préliminaire avec les sydnones iodées non-radioactives a été réalisée pour déterminer les constantes de vitesses des réactions avec des peptides modèles. Alors que des difficultés ont été rencontrées pour les synthèses entre le peptide alcyne vrai et les sydnones d'intérêt, empêchant l'étude du système CuSAC, les études menées avec les deux autres peptides modifiés par des cyclooctynes ont conduit à des résultats très intéressants. En effet, alors que la *N*-alkylsydnone s'est révélée être la moins réactive, la *N*-arylsydnone avec un hydrogène en position C₄ a montré une réactivité plus importante avec le peptide-DBCO qu'avec le peptide-BCN. Cependant, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus lorsque l'hydrogène a été substitué par un atome de chlore. Alors que la réaction de la *N*-arylchlorosydnone avec le peptide-DBCO a montré une réactivité du même ordre de grandeur que la *N*-arylsydnone, la réactivité avec un BCN s'est trouvée être d'améliorée par un facteur 19.

Cette étude a été poursuivie avec les mêmes dérivés sydnones radiomarquées à l'iode-125. Pour se faire, un site de radiomarquage a dû être introduit et malgré l'utilisation des sels d'iodoniums dans l'étude initiale de Laurent Navarro, le groupement partant acide boronique, récemment rapporté comme efficace pour le radiomarquage avec l'iode-125 et l'astate-211, a été ici préféré pour un meilleur contrôle du radiomarquage. Les précurseurs sydnones correspondants ont donc été synthétisés et marqués à l'iode-125 avec une excellente pureté radiochimique et de très bons rendements radiochimiques.

Concernant l'étude cinétique à l'iode-125 avec les peptides modèles, comme anticipé par l'étude préliminaire, la *N*-alkylsydnone s'est avérée la plus lente pour le peptide-DBCO et le peptide-BCN. La *N*-arylsydnone avec un hydrogène en position C₄ a démontré une efficacité de couplage prometteuse avec le peptide-DBCO (RRC >95 % après 60 minutes) quand les résultats étaient plus modérés avec le peptide-BCN (seulement 17 %). Enfin, la *N*-arylchlorosydnone s'est avérée être la plus réactive avec des RRC supérieurs à 95 % après 60 minutes avec les deux peptides, confirmant les résultats obtenus lors de l'étude préliminaire.

Les mêmes études cinétiques ont ensuite été réalisées avec un azoture pour la SPAAC étudiées antérieurement pour comparaison. Une nouvelle fois, des profils similaires entre les études cinétiques avec et sans radioactivité ont été obtenus. Alors que la *N*-alkylsydnone s'est avérée moins réactive que l'azoture avec les deux peptides, la *N*-arylsydnone a présenté une

réactivité du même ordre de grandeur que pour l'azoture. Toutefois, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec la *N*-arylchlorosydnone. En effet, si la réactivité avec le peptide-DBCO s'est montrée similaire à celle obtenue avec le système SPAAC, la réaction de cycloaddition avec le peptide-BCN s'est produite 11 fois plus rapidement.

Suite à ces études cinétiques, les trois systèmes les plus prometteurs ont été sélectionnés pour le transfert vers le radiomarquage d'un anticorps monoclonal anti-CD138 d'intérêt (9E7.4) : *N*-arylsydnone/DBCO, *N*-arylchlorosydnone/DBCO et *N*-arylchlorosydnone/BCN. Après modification, les différents lots d'anticorps 9E7.4-DBCO et 9E7.4-BCN ont été radiomarqués à partir des sydnones radioiodées correspondantes, conduisant à des rendements de couplages après 30 minutes de 75 % pour les systèmes *N*-arylsydnone/DBCO et *N*-arylchlorosydnone/DBCO, et de seulement 13 % pour le couple *N*-arylchlorosydnone/BCN. Toutefois, les tests d'immunoréactivités ont montré une perte d'affinité du vecteur pour sa cible puisque des valeurs de 27 à 59 % ont été obtenus au lieu d'une valeur supérieure à 80 % pour l'anticorps natif. Malgré des optimisations réalisées sur le système le plus rapide (*N*-arylchlorosydnone/DBCO) et permettant d'améliorer l'immunoréactivité de l'anticorps radiomarqué en réduisant le nombre d'équivalents de motif DBCO lors du couplage, cela n'est pas sans conséquence sur la réactivité qui elle diminue.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au développement d'un nouveau système de chimie bio-orthogonale pour le marquage à l'iode-125 d'un anticorps anti-CD138. Les premiers résultats ont permis de montrer que l'utilisation de la SPSAC pouvait être une alternative intéressante pour y parvenir. En effet, en fonction de la structure de la sydnone, certaines se sont avérées plus rapides que l'azoture de référence testé, en particulier le dérivé *N*-arylchlorosydnone. Néanmoins, des problèmes ont été rencontrés lors de la transposition de certaines des réactions SPSAC pour le radiomarquage d'anticorps. Bien que certains systèmes montraient des cinétiques de réaction prometteuses, des problèmes d'immunoréactivité ont été observés. Des tests supplémentaires ont montré une corrélation entre ces deux paramètres, à savoir plus la réaction est rapide et moins l'immunoréactivité est conservée. Des optimisations sur les conditions de réactions sont à envisager afin de trouver le meilleur compromis. Pour cela, des efforts sur la concentration en anticorps utilisé, les conditions de modification des anticorps ou encore de nouveaux types d'ester activé sont envisagés. En effet, il semble que ce dernier point impacte fortement le nombre de motif par anticorps, comme cela a pu être observé entre le nombre de DBCO et de BCN greffé par l'anticorps pour le même nombre d'équivalent. Pour éviter que les sites de reconnaissance de la protéine ne soient modifiés, il serait également intéressant d'utiliser des méthodes de couplage « site-spécifique ». L'objectif étant de créer un site de couplage unique sur la biomolécule permettant de maîtriser précisément le lieu

de fixation ainsi que le nombre de motifs fixés. Parmi ces méthodes on peut notamment citer la réduction des ponts disulfures ou encore l'insertion d'acides aminés non naturels.

Si ce travail peut être appliqué à d'autres isotopes de l'iode tel que l'iode-123 ou l'iode-131, une transposition de cette étude à l'astate-211 est à envisager. En effet, l'astate-211 est l'un des émetteurs alpha les plus prometteurs et une application de ces systèmes bio-orthogonaux pour la radiothérapie ciblée des cancers pourrait être considérée. Toutefois, la demi-vie de ce radionucléide étant plus courte (7,2 heures), la vitesse de réaction est un paramètre extrêmement important. Afin de gagner du temps sur la production du radiopharmaceutique, du temps pourrait être gagné sur le radiomarquage des sydnones. Si pendant l'étude, les marquages étaient réalisés à 25 °C pendant 30 minutes, il serait intéressant d'optimiser ces conditions en réduisant le temps ou en chauffant légèrement pour accélérer la réaction.

Il serait également intéressant de tester la *N*-phénylsydnone fonctionnalisée en position *para* envisagée au début de l'étude. En effet, mise de côté pour des problèmes de synthèse du précurseur, son développement a récemment été rapporté par l'équipe de F. Taran²⁴⁵ et permet d'envisager à nouveau ce composé. Etant donné que l'ajout d'un groupement électroattracteur en position *para* permet d'accélérer la réaction de cycloaddition, l'effet -I de l'iode pourrait permettre d'atteindre des cinétiques de réaction tout aussi rapides, voire peut-être plus intéressantes que les systèmes étudiés. Enfin, en plus d'avoir déjà été radiomarké en position *para* du phényle, il se peut que cette molécule plus simple puisse permettre d'étudier le système CuSAC et de le comparer à la CuAAC.

La deuxième partie de ce projet s'est portée sur la transposition d'un système de chimie clic à d'autres biomolécules et/ou radionucléides. Lors des travaux antérieurs, l'utilisation de précurseurs de sels d'aryliodoniums fonctionnalisés par un azoture a pu montrer certaines limites comme la formation d'un sous-produit radiomarké, la formation d'un analogue iodé non-radioactif ou encore la formation d'un produit radiomarké volatil. Ces limites se sont illustrées lors de l'utilisation du système SPAAC pour le marquage à l'iode-125 du peptide [Tyr³, Lys⁵] octréotate acétate couplé au groupe DBCO. De plus, l'utilisation de ce système a engendré des modifications au niveau des caractéristiques du peptide final et en particulier une augmentation de sa lipophilie.

Afin de résoudre ces limites, un nouveau précurseur a alors été développé avec une nouvelle fonction de radiomarquage et l'ajout d'une chaîne hydrophile pour contrebalancer la lipophilie du DBCO. Dans ce but, un précurseur azoture fonctionnalisé par une fonction acide boronique et incluant une chaîne PEG (n = 3) a été développé afin de modérer les difficultés rencontrées.

Ce nouveau motif azoture-PEG₃ a pu être synthétisé et radiomarqué à l'iode-125 avec de très bons RRC (>90%), ce qui permet de valider d'ores et déjà l'amélioration du procédé avec ce type de précurseur (aucun sous-produit radiomarqué, pas d'analoge iodé non-radioactif et produit non volatil). L'étape de couplage de cet azoture radioiodé avec le peptide octréotate modifié par un DBCO a ensuite été réalisée. En plus de tous les avantages mentionnés précédemment, il apparaît que l'absence d'analoge iodé non-radioactif a permis de diviser la quantité de peptide utilisé par 6 comparé à l'azoture de première génération, et donc d'augmenter l'activité molaire du produit final. Néanmoins, les calculs de logP et logD (7,4) de ce peptide radiomarqué à l'iode-125 n'ont montré aucune amélioration quant à la lipophilie globale après réaction clic avec ce nouvel azoture. Cependant, des tests *in vitro* ont montré une amélioration du profil d'internalisation de ce nouveau peptide, laissant penser que l'ajout de la chaîne PEG a quand même eu un effet bénéfique sur ses propriétés. C'est pour cette raison qu'il a été envisagé d'allonger la chaîne PEG (n = 6, 10), mais la dégradation du peptide de départ n'a permis de finaliser cette étude.

Les modifications de structures ayant un impact sur les cinétiques de réactions pour les sydnones, une étude cinétique avec et sans radioactivité a donc été réalisée sur l'azoture PEG₃ avec les peptides modifiés par des cyclooctynes avant d'être comparée à l'azoture de référence également utilisé dans la première partie de ce projet. Si le choix du cyclooctyne a montré un impact sur la vitesse de cycloaddition, aucune différence significative entre les deux générations d'azotures n'a été constatée.

Enfin, l'étude de ce groupement prosthétique a également pu être approfondi par des tests de marquage au fluor-18. Si des difficultés lors de cette étape ont pu être rencontrées, liées à une dégradation du précurseur acide boronique, les optimisations réalisées, notamment l'activation des [¹⁸F]fluorures, ont permis d'améliorer le RRC brut passant de 1 à 12 %.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, l'objectif était d'optimiser la structure d'un azoture pour radiomarquer un peptide analogue de la somatostatine à l'iode-125 *via* la SPAAC, et d'utiliser ce nouveau motif pour des radiomarquages à l'astate-211 et au fluor-18 de nouveaux vecteurs d'intérêt pour une approche thérapeutique.

Concernant le radiomarquage du peptide, bien que l'amélioration de la structure de l'azoture ait conduit à une nette amélioration des résultats de marquages, cela n'a pas été suffisant pour contrebalancer la lipophilie liée à l'utilisation d'un motif DBCO. Alors que de nouveaux tests sont nécessaires pour évaluer l'impact de l'allongement de la chaîne PEG, d'autres motifs pourraient être envisagés comme par exemple les dérivés guanidiniums ou mêmes des composés ioniques (sulfonate, phosphonate). Le cyclooctyne pourrait également être modifié par un BCN

étant donné les problèmes connus concernant le motif DBCO. En plus d'être moins lipophile, les résultats rapportés lors de la première partie de cette étude montrent que l'utilisation d'une sydnone chlorée à la place d'un azoture avec un BCN permettrait d'avoir une cinétique de réaction équivalente voir même plus importante que le système DBCO/N₃.

Alors que les premiers tests de marquage au fluor-18 ont permis de montrer que le précurseur de seconde génération pouvait être utilisé, un travail d'optimisation est encore nécessaire. En effet, il serait intéressant d'aller plus loin que l'étape de radiomarquage, en ajoutant une étape de purification du composé radiofluoré et également de le conjuguer à d'autres vecteurs d'intérêt. Ces travaux, toujours en cours dans le cadre de la collaboration avec l'équipe du Pr. Guy Bormans, permettraient d'appliquer la chimie clic à de nouveaux vecteurs élargissant ainsi le champ d'application de la chimie bio-orthogonale.

L'utilisation de la chimie clic pourrait également permettre le développement d'approche théranostique, basé sur le couple fluor-18/astate-211. Des kits, basés sur ces deux radionucléides, permettraient alors de faire le suivi de la thérapie tout en gardant le même vecteur qu'utilisé en imagerie. Enfin, de manière plus générale, les kits employant la chimie clic permettraient aux cliniciens de pouvoir adapter le vecteur à la pathologie du patient et la molécule radioactive pourrait être préparée sur un site distinct de la préparation du vecteur radiomarqué. Le clinicien n'aurait besoin que d'équipements simples pour réaliser le marquage, ce qui permettrait d'éviter les risques de radiolyse altérants les vecteurs, souvent fragiles, pendant le transport.

Experimental part

I- General informations

All commercial Reagents, solvents and chromatography reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Fisher Scientific, TCI, VWR, Fluorochem, Click Chemistry Tools or BroadPharm. Reactions were monitored by analytical thin-layer chromatography (TLC) using 60 F254 silica gel plates on aluminium support (Merck) and revealed either by UV lamp (254 nm), ninhydrin (10 mg/mL in EtOH) or with Dragendorff reagent. Purifications were carried out using a Puriflash 600 (Interchim) with 15 or 30 μm silica pre-packed columns.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AC spectrometer at 400 (^1H) and 100 (^{13}C) MHz. Chemical shifts (δ) are reported in part per million (ppm) relative to deuterated solvents (CDCl_3 : 7.26 ppm, MeOD: 3.31 ppm, DMSO- d_6 : 2.50 ppm) and coupling constant (J) are given in Hertz (Hz). Multiplicities are described by symbols s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quint. (quintuplet), dt (doublet of triplet) and m (multiplet).

High-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed on a Synapt G2 HRMS Q-TOF mass spectrometer (Waters) equipped with an electrospray ionization (ESI) interface operating in the positive mode.

HPLC analyses were carried out on a Waters Alliance e2695 system using several chromatographic methods and UV-Vis detection was achieved with a Waters 2489 UV/Vis PDA detector set at 254 nm.

Method A: C18 column (Symmetry ShieldTM RP18 5 μm , 4,6 mm x 15 cm, Waters) with the flow rate set at 1.50 mL/min with the following gradient: t = 0: 95% A, 5% B; t = 15 min: 100% B. A = H_2O with 0.05% TFA and B = CH_3CN with 0.05% TFA.

Method B: C18 column (Spherisorb ODS2 5 μm , 4,6 mm x 25 cm, Waters) with the flow rate set at 1.50 mL/min with the following gradient: t = 0: 60% A, 40% B; t = 15 min: 100% B; 17 min 100% B. A = H_2O with 0.05% TFA and B = CH_3CN with 0.05% TFA.

Method C: C18 column (Symmetry ShieldTM RP18 5 μm , 4,6 mm x 15 cm, Waters) with the flow rate set at 1.50 mL/min with the following gradient: t = 0-7 min 20-70% B; 7-11 min 70-100% B; 11-15 min 100% B. A = H_2O with 0.05% TFA and B = CH_3CN with 0.05% TFA.

Method D: C18 column (XBridge 3.5 μm , 3.0 mm x 10 cm, Waters) with the flow rate set at 0.8 mL/min with the following gradient: t = 0-12 min 10-95% B; 12-15 min 95% B. A = 50 mM Acetate buffer pH 5 and B = CH_3CN with 0.05% TFA.

Method E: C18 column (Spherisorb ODS2 5 μm , 4.6 mm x 25 cm, Waters) with the flow rate set at 1.50 mL/min with the following gradient: t = 0-11 min 5-60% B; 11-18 min 60-100% B; 18-21 min 100% B. A = H₂O with 0.05% TFA and B = CH₃CN with 0.05% TFA.

CAUTION: Note that azido compounds are potentially explosive intermediates, and reactions should be performed behind a plastic shield. Nevertheless, in our hands, we never observed hazardous reactions with our experimental procedures

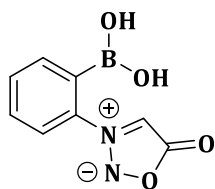
II-Synthesis of compounds

II-1. Synthesis of sydnones building blocks

II-1.1. Precursors

(4-Iodophenyl)glycine (**3**),²³¹ 3-(4-iodophenyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**4**),²³¹ *N*-phenylglycine (**7**),²⁶¹ 5-oxo-3-phenyl-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**8**),²⁶¹ 3-(2-iodophenyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**10**),²⁴⁷ 4-iodo-5-oxo-3-phenyl-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**11**),²²⁴ 4-((carboxymethyl)amino)benzoic acid (**12**),²⁴⁸ 4-((carboxymethyl)(nitroso)amino)benzoic acid (**13**),²⁴⁸ 3-(4-carboxyphenyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**14**),²⁴⁸ were synthesized according to literature protocols.

3-(2-boronophenyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**9**)



C₈H₇BN₂O₄
MW: 205.96 g.mol⁻¹
Yield: 23%
Orange solid

To a stirred solution of **8** (278.0 mg, 1.71 mmol, 1 eq) in dry THF (30 mL), under an atmosphere of argon at -78 °C, *n*-butyl lithium (1.6 M hexane, 3.21 mL, 5.14 mmol, 3 eq) was added. After 30 min, trimethyl borate (0.19 mL, 1.71 mmol, 1 eq) was added and, after 1 h more, the reaction was slowly brought back to 23 °C and left under stirring. After 16 h, a 2M solution of HCl (10 mL) was added and the reaction is left stirring for 6 hours before the reaction mixture was dried under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH). After evaporation, sydnone **9** was obtained as an orange solid (80.1 mg, 23%).

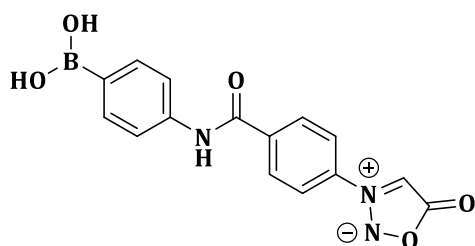
R_f (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.32.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.83 – 7.62 (m, 4H, H_{Ar}), 7.33 (s, 1H, H_{sydnone}).

HRMS (ESI): calculated for C₈H₈BN₂O₄ [M+H]⁺ 207.0577; found 207.0559 (-8.7 ppm).

Analytical HPLC (Method A): t_R = 4.54 min (purity = 99%).

3-(4-((4-boronophenyl)carbamoyl)phenyl)-5-oxo-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (15)



$C_{15}H_{12}BN_3O_5$
MW: 325.09 g.mol⁻¹
Yield: 68%
Beige Solid

To a solution of *p*-carboxyphenyl-sydnone **14** (194.7 mg, 0.94 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (12.3 mL) was added in the following order: 4-aminophenylboronic acid hydrochloride (254.7 mg, 1.42 mmol, 1.5 eq), EDC. HCl (271.6 mg, 1.42 mmol, 1.5 eq), HOBT (191.4 mg, 1.42 mmol, 1.5 eq) and NMM (260 μ L, 2.36 mmol, 2.5 eq). The solution was stirred under argon for 5 days at 23 °C. The reaction mixture was dried under *vacuum* and the residue was washed with methanol. The precipitate was collected by filtration, washed with small amount of methanol and dried under *vacuum* to give sydnone **15** as beige solid (209.6 mg, 68%).

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.45.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.50 (s, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.99 (s, 2H, OH), 7.89 (s, 1H, H_{sydnone}), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}).

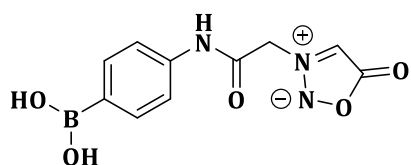
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.4 (CO), 164.0 (CO_{NH}), 140.4 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 136.4 (C_{Ar}), 134.7 (3C, C_B, C_{Ar}), 129.5 (2C, C_{Ar}), 121.6 (2C, C_{Ar}), 119.1 (2C, C_{Ar}), 95.1 (C_{sydnone}).

HRMS (ESI): calculated for C₁₅H₁₃BN₃O₅ [M+H]⁺ 326.0948; found 326.0951 (0.9 ppm).

Analytical HPLC (Method A): t_R = 6.68 min (purity >99 %).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 2.81 min (purity >99 %).

3-(2-((4-boronophenyl)amino)-2-oxoethyl)-5-oxo-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (17)



$C_{10}H_{10}BN_3O_5$
MW: 263.02 g.mol⁻¹
Yield: 54%
Yellow solid

To a solution of 3-(carboxymethyl)-5-oxo-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (83.3 mg, 0.58 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (5 mL) was added in the following order: 4-aminophenylboronic acid hydrochloride (150.4 mg, 0.87 mmol, 1.5 eq), EDC. HCl (166.2 mg, 0.87 mmol, 1.5 eq) and HOBT (117.2 mg, 0.87 mmol, 1.5 eq). The solution was stirred under argon for 18 hours at 23 °C and the

reaction mixture was dried under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH) to give sydnone **17** as yellow solid (82.3 mg, 54%).

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.32.

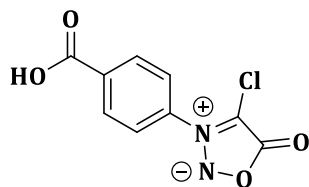
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.63 (s, 1H, NH), 7.98 (s, 2H, OH), 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.13 (s, 1H, H_{sydnone}), 5.40 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 168.6 (CO), 161.5 (CO_{NH}), 139.6 (C_{Ar}), 135.0 (3C, C_B, C_{Ar}), 118.1 (2C, C_{Ar}), 97.3 (C_{sydnone}), 55.1 (CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₁₀H₁₁BN₃O₅ [M+H]⁺ 264.0792; found 264.0792 (0 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 2.14 min (purity > 99%).

3-(4-carboxyphenyl)-4-chloro-5-oxo-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (19)



C₉H₅ClN₂O₄
MW: 240.60 g.mol⁻¹
Yield: 20%
Orange solid

The procedure was adapted from previous reports.²²⁴ To a stirred solution of sydnone **14** (512.3 mg, 2.47 mmol) in a mixture dioxane/HCl 1M 2/1 (30 mL) was added dropwise over a period of 30 min a solution of sodium hypochlorite 10% (5.84 mL). The mixture was stirred at 23 °C for 3 h. The mixture was poured in 40 mL of a solution of Na₂S₂O₃ 20%. EtOAc (50 mL) was added and the aqueous layer was extracted 3 times with EtOAc (3 x 80 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH with 1% of AcOH) to afford the chlorinated compound **19** as an orange solid (120.0 mg, 20 %).

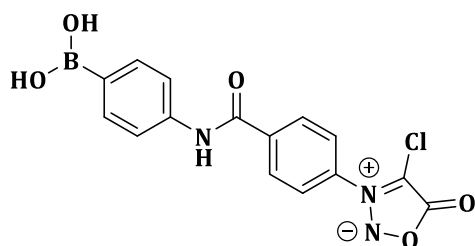
Rf (silica, dichloromethane/methanol 95:5) = 0.16.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H).

HRMS (ESI⁺): calculated for C₁₀H₆ClN₂O₄ [M+H]⁺ 241.0016 ; found 241.0007 (-3.7 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 3.43 min (purity 99 %).

3-(4-((4-boronophenyl)carbamoyl)phenyl)-4-chloro-5-oxo-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (20)



$C_{15}H_{11}BClN_3O_5$
MW: 359.53 g.mol⁻¹
Yield: 49%
Dark yellow solid

To a solution of sydnone **19** (50.9 mg, 0.21 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (3.2 mL) was added in the following order: 4-aminophenylboronic acid hydrochloride (55.0 mg, 0.32 mmol, 1.5 eq), EDC. HCl (60.8 mg, 0.32 mmol, 1.5 eq), HOBt (42.9 mg, 0.32 mmol, 1.5 eq) and NMM (58 μ L, 0.53 mmol, 2.5 eq). The solution was stirred under argon for 40 hours at 23 °C and the reaction mixture was dried under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH) and washed with water to afford sydnone **20** as dark yellow solid (36.9 mg, 49%).

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.78.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.54 (s, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.95 (s, 2H, OH), 7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}).

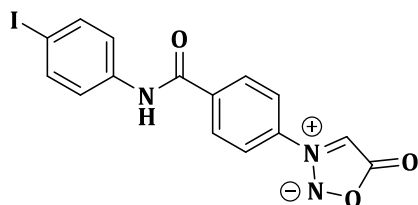
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.2 (CO_{NH}), 163.4 (CO), 140.4 (C_{Ar}), 139.0 (C_{Ar}), 134.8 (2C, C_{Ar}), 134.6 (2C, C_B, C_{Ar}), 129.4 (2C, C_{Ar}), 125.5 (2C, C_{Ar}), 119.1 (2C, C_{Ar}), 99.4 (C_{Cl}).

HRMS (ESI): calculated for C₁₅H₁₂BN₃O₅Cl [M+H]⁺ 360.0559; found 360.0560 (0.3 ppm).

Analytical HPLC (Method B): *t*_R = 3.43 min (purity >99 %).

II-1.2. Iodinated references

3-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-5-oxo-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (16)



$C_{15}H_{10}IN_3O_3$
MW: 407.17 g.mol⁻¹
Yield: 54%
Beige solid

To a solution of *p*-carboxyphenyl-sydnone **14** (191.3 mg, 0.93 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (12.75 mL) was added in the following order: *p*-iodoaniline (406.5 mg, 1.86 mmol, 2 eq), EDC. HCl (266.8 mg, 1.39 mmol, 1.5 eq) and HOBt (188.1 mg, 1.39 mmol, 1.5 eq). The solution was stirred for 22 hours under argon at 23 °C. The reaction mixture was dried under *vacuum* and the residue

was washed with methanol. The precipitate was collected by filtration, washed with small amount of methanol and dried under *vacuum* to give compound **16** as beige solid (202.1 mg, 54%).

Rf (silica, dichloromethane/methanol 95:5) = 0.58.

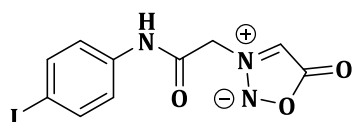
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.61 (s, 1H, NH), 8.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.91 (s, 1H, H_{sydnone}), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.4 (CO), 164.0 (CO_{NH}), 138.6 (2C, C_{Ar}), 138.0 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 136.4 (C_{Ar}), 129.5 (2C, C_{Ar}), 122.5 (2C, C_{Ar}), 121.6 (2C, C_{Ar}), 95.1 (C_{sydnone}), 87.8 (C_I).

HRMS (ESI⁺): calculated for C₁₅H₁₁IN₃O₃ [M+H]⁺ 407.9845; found 407.9847 (0.5 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 6.91 min (purity >99 %).

3-(2-((4-iodophenyl)amino)-2-oxoethyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**18**)



C₁₀H₈IN₃O₃
MW: 345.10 g.mol⁻¹
Yield: 81%
Beige solid

To a solution of 3-(carboxymethyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (77.5 mg, 0.54 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) was added in the following order: *p*-iodoaniline (235.6 mg, 1.08 mmol, 2 eq), EDC·HCl (123.7 mg, 0.65 mmol, 1.2 eq) and HOBT (87.2 mg, 0.65 mmol, 1.2 eq). The solution was stirred for 17 hours under argon at 23 °C. The reaction mixture was dried under *vacuum* and the residue was washed with methanol. The precipitate was collected by filtration, washed with a small amount of methanol and dried under *vacuum* to give reference **18** as beige solid (150.0 mg, 81%).

Rf (silica, dichloromethane/methanol 95:5) = 0.21.

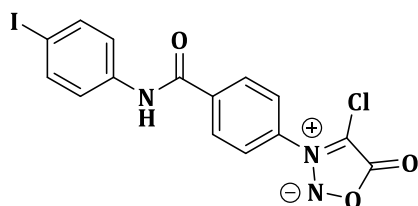
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.72 (s, 1H, NH), 7.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.13 (s, 1H, H_{sydnone}), 5.40 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.6 (CO), 161.6 (CO_{NH}), 137.9 (C_{Ar}), 137.6 (2C, C_{Ar}), 121.5 (2C, C_{Ar}), 97.3 (C_{sydnone}), 87.8 (C_I), 55.0 (CH₂).

HRMS (ESI⁺): calculated for C₁₀H₉IN₃O₃ [M+H]⁺ 345.9689; found 345.9695 (1.7 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 4.68 min (purity >99 %).

**4-chloro-3-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-5-oxo-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide
(21)**



$C_{15}H_9ClIN_3O_3$
MW: 441.61 g.mol⁻¹
Yield: 65%
Light brown solid

To a solution of sydnone **19** (48.2 mg, 0.20 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) was added in the following order: *p*-iodoaniline (87.8 mg, 0.40 mmol, 2 eq), EDC. HCl (46.1 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq) and HOBT (32.5 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq). The solution was stirred for 16 hours under argon at 23 °C. The reaction mixture was dried under *vacuum* and the residue was washed with methanol. The precipitate was collected by filtration, washed with a small amount of methanol and dried under *vacuum* to give compound **21** as light brown solid (57.8 mg, 65%).

Rf (silica, dichloromethane/methanol 95:5) = 0.68.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.66 (s, 1H, NH), 8.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.3 (C_ONH), 163.4 (C_O), 138.7 (C_{Ar}), 138.7 (C_{Ar}), 137.4 (2C, C_{Ar}), 134.7 (C_{Ar}), 129.4 (2C, C_{Ar}), 125.5 (2C, C_{Ar}), 122.5 (2C, C_{Ar}), 99.4 (C_{Cl}), 87.8 (C_I).

HRMS (ESI⁺): calculated for C₁₅H₁₀ClIN₃O₃ [M+H]⁺ 441.9455; found 441.9456 (0.2 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 7.75 min (purity >99 %).

II-2. Synthesis of azides building blocks

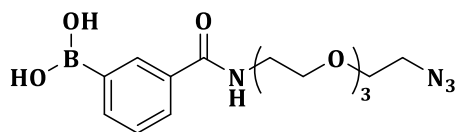
(3-(Azidomethyl)phenyl)boronic acid (**1**),²⁴¹ 1-(azidomethyl)-3-iodobenzene (**2**),²³⁶ were synthesized according to literature protocols.

II-2.1. Precursors

General procedure for synthesis of arylboronic precursors:

To a solution of starting azide (1 eq) in anhydrous DMF was added in the following order: 3-boronobenzoic acid (1 eq), EDC. HCl (1.2 eq) and HOBT (1.2 eq). The reaction mixture was stirred under argon at 23 °C until completion by TLC monitoring (16-48 h). Then 5 mL of CH₂Cl₂ and 5 mL of H₂O were added and the resulting solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). The organics layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure before being purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH).

(3-((2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)boronic acid (42)



$C_{15}H_{23}BN_4O_6$
MW: 366.18 g.mol⁻¹
Yield: 49%
Pale yellow oil

The title compound **42** was obtained in 49% yield from 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (97,1 mg, 0.45 mmol), 3-boronobenzoic acid (73.8 mg, 0.45 mmol), EDC. HCl (102.3 mg, 0.53 mmol) and HOBT (72.1 mg, 0.53 mmol) in 3 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.69.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.26 (s, 1H, H_{Ar}), 7.95 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.39 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.34 (s, 1H, NH), 5.39 (s, 2H, OH), 3.70 – 3.53 (m, 14H), 3.29 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂-N₃).

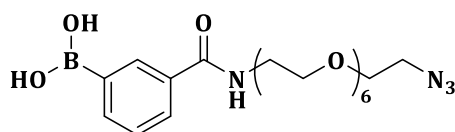
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 168.6 (CO), 137.7 (C_{Ar}), 133.2 (C_{Ar}), 132.4 (C_{Ar}), 129.9 (C_{Ar}), 128.2 (2C, C_{Ar}), 70.7 (C_{PEG}), 70.6 (C_{PEG}), 70.3 (C_{PEG}), 70.1 (C_{PEG}), 70.0 (2C, C_{PEG}), 50.7 (CH₂-N₃), 40.2 (CH₂-NH).

HRMS (ESI): calculated for C₁₅H₂₄BN₄O₆ [M+H]⁺ 367.1789; found 367.1787 (-0.5 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 2.91 min (purity >99 %).

Analytical HPLC (Method C): t_R = 3.53 min (purity >99 %).

(3-((20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosyl)carbamoyl)phenyl)boronic acid (46)



$C_{21}H_{35}BN_4O_9$
MW: 498.34 g.mol⁻¹
Yield: 63%
Yellow oil

The title compound **46** was obtained in 63% yield from 20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-amine (64.8 mg, 0.19 mmol), 3-boronobenzoic acid (30.7 mg, 0.19 mmol), EDC. HCl (42.6 mg, 0.22 mmol) and HOBT (30.0 mg, 0.22 mmol) in 3 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.50.

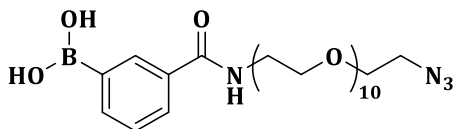
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): Non-exploitable

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): Non-exploitable

HRMS (ESI): calculated for C₂₁H₃₆BN₄O₉ [M+H]⁺ 499.2575; found 499.2575 (0 ppm).

Analytical HPLC (Method C): $t_R = 3.80$ min (purity >99 %).

(3-((32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontyl)carbamoyl)phenyl)boronic acid (47)



$C_{29}H_{51}BN_4O_{13}$
MW: 674.55 g.mol⁻¹
Yield: 58%
Yellow oil

The title compound **47** was obtained in 58% yield from 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amine (77.2 mg, 0.15 mmol), 3-boronobenzoic acid (24.3 mg, 0.15 mmol), EDC. HCl (33.7 mg, 0.18 mmol) and HOBt (23.8 mg, 0.18 mmol) in 3 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.42.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.28 (s, 1H, H_{Ar}), 7.97 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.33 (s, 1H, NH), 3.69 – 3.53 (m, 42H, CH₂-PEG), 3.36 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂-N₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 168.1 (CO), 137.5 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 130.2 (2C, C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 70.7 – 70.0 (20C, C_{PEG}), 50.8 (CH₂-N₃), 40.0 (CH₂-NH).

HRMS (ESI): calculated for $C_{29}H_{52}BN_4O_{13}$ [M+H]⁺ 675.3624; found 675.3638 (2.1 ppm).

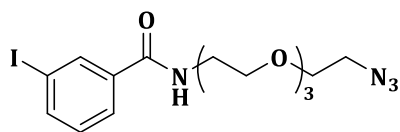
Analytical HPLC (Method C): $t_R = 3.98$ min (purity >99 %).

II-2.2. Iodinated references

General procedure for synthesis of iodinated references:

To a solution of starting azide (1 eq) in anhydrous DMF was added in the following order: 3-iodobenzoic acid (1 eq), EDC. HCl (1.2 eq) and HOBt (1.2 eq). The reaction mixture was stirred under argon at 23 °C until completion by TLC monitoring (18-26 h). Then 5 mL of CH₂Cl₂ and 5 mL of H₂O were added and the resulting solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). The organics layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure before being purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH).

***N*-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-iodobenzamide (43)**



$C_{15}H_{21}IN_4O_4$
MW: 448.26 g.mol⁻¹
Yield: 69%
Pale yellow oil

The title compound **43** was obtained in 69% yield from 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (97.8 mg, 0.45 mmol), 3-iodobenzoic acid (111.1 mg, 0.45 mmol), EDC. HCl (103.1 mg, 0.54 mmol) and HOBT (72.7 mg, 0.54 mmol) in 3 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 95:5) = 0.60.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.82 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.77 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.17 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.86 (s, 1H, NH), 3.71 – 3.58 (m, 14H, CH₂-PEG), 3.34 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂-N₃).

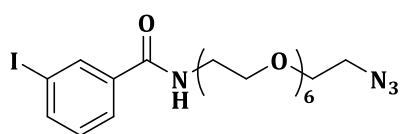
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.1 (CO), 140.4 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 94.3 (C_I), 70.9 (C_{PEG}), 70.8 (C_{PEG}), 70.7 (C_{PEG}), 70.4 (C_{PEG}), 70.2 (C_{PEG}), 69.8 (C_{PEG}), 50.8 (CH₂-N₃), 40.1 (CH₂-NH).

HRMS (ESI): calculated for C₁₅H₂₂IN₄O₄ [M+H]⁺ 449.0686; found 449.0688 (0.4 ppm);

Analytical HPLC (Method B): t_R = 6.63 min (purity >99 %).

Analytical HPLC (Method C): t_R = 6.48 min (purity >99 %).

***N*-(20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosyl)-3-iodobenzamide (48)**



$C_{21}H_{33}IN_4O_7$
MW: 580.42 g.mol⁻¹
Yield: 79%
Yellow oil

The title compound **48** was obtained in 79% yield from 20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-amine (53.3 mg, 0.15 mmol), 3-iodobenzoic acid (37.7 mg, 0.15 mmol), EDC. HCl (35.0 mg, 0.18 mmol) and HOBT (24.7 mg, 0.18 mmol) in 3 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.66.

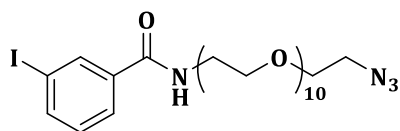
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.16 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.83 – 7.74 (m, 2H, H_{Ar}), 7.15 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.10 (s, 1H, NH), 3.72 – 3.52 (m, 26H, CH₂-PEG), 3.36 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂-N₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.1 (CO), 140.3 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 94.2 (C_I), 70.8 – 69.8 (12C, C_{PEG}), 50.8 (CH₂-N₃), 40.1 (CH₂-NH).

HRMS (ESI): calculated for $C_{21}H_{34}IN_4O_7$ $[M+H]^+$ 581.1472; found 581.1476 (0.7 ppm);

Analytical HPLC (Method C): $t_R = 6.29$ min (purity >99 %).

***N*-(32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontyl)-3-iodobenzamide (49)**



$C_{29}H_{49}IN_4O_{11}$
MW: 756.63 g.mol⁻¹
Yield: 62%
Yellow oil

The title compound **49** was obtained in 62% yield from 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amine (79.2 mg, 0.15 mmol), 3-iodobenzoic acid (37.3 mg, 0.15 mmol), EDC. HCl (34.6 mg, 0.18 mmol) and HOBt (24.4 mg, 0.18 mmol) in 3 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.54.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.15 (s, 1H, H_{Ar}), 7.82 – 7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 7.14 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.07 (s, 1H, NH), 3.62 (m, 42H, CH₂-PEG), 3.36 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂-N₃).

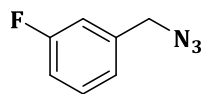
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.0 (CO), 140.2 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 94.2 (C_i), 70.8 – 69.8 (20C, C_{PEG}), 50.8 (CH₂-N₃), 40.1 (CH₂-NH).

HRMS (ESI): calculated for $C_{29}H_{50}IN_4O_{11}$ $[M+H]^+$ 757.2521; found 757.2543 (2.9 ppm);

Analytical HPLC (Method C): $t_R = 5.98$ min (purity >99 %).

II-2.3. Fluorinated references

1-(azidomethyl)-3-fluorobenzene (53)

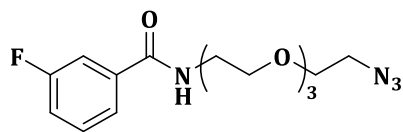


$C_7H_6FN_3$
MW: 151.14 g.mol⁻¹
Yield: 44%
Pale yellow oil

The procedure was adapted from previous reports.²³⁶ To a solution of 3-fluorobenzyl bromide (302.0 mg, 1.60 mmol, 1 eq) in anhydrous DMSO was added sodium azide (415.5 mg, 6.39 mmol, 4 eq). The reaction mixture was stirred under argon at 70 °C for 25 h. Then 5 mL of CH₂Cl₂ and 5 mL of H₂O were added and the resulting solution was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 10 mL). The organics layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure before being purified by flash chromatography (gradient *n*-heptane/ethyl acetate) to afford azide **53** as pale yellow oil (106.1 mg, 44%). Identity confirmed by comparison with published characterization data.²⁶²

Analytical HPLC (Method D): $t_R = 8.52$ min (purity >99 %).

***N*-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-fluorobenzamide (54)**



$C_{15}H_{21}FN_4O_4$
MW: 340.36 g.mol⁻¹
Yield: 24%
Pale yellow oil

To a solution of 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (98.5 mg, 0.45 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) was added in the following order: 3-fluorobenzoic acid (63.2 mg, 0.45 mmol, 1 eq), EDC. HCl (103.8 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq) and HOBT (73.2 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq). The reaction stirred for 28 hours under argon at 23 °C. Then 5 mL of CH₂Cl₂ and 5 mL of H₂O were added and the resulting solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). The organics layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure before being purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH) to afford azide **54** as pale yellow oil (36.1 mg, 24%).

Rf (silica, dichloromethane/methanol 95:5) = 0.50.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.61 – 7.48 (m, 2H, H_{Ar}), 7.40 (td, *J* = 7.9, 5.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.19 (td, *J* = 8.3, 2.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.88 (s, 1H, NH), 3.75 – 3.59 (m, 14H, CH₂-PEG), 3.42 – 3.31 (m, 2H, CH₂-N₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.7 (CO), 163.2 (C_F), 137.4 (C_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}), 123.1 (C_{Ar}), 118.8 (C_{Ar}), 114.9 (C_{Ar}), 71.2 (CH₂-PEG), 71.1 (CH₂-PEG), 71.1 (CH₂-PEG), 70.8 (CH₂-PEG), 70.5 (CH₂-PEG), 70.2 (CH₂-PEG), 51.1 (CH₂-N₃), 40.4 (CH₂-NH).

HRMS (ESI): calculated for C₁₅H₂₂FN₄O₄ [M+H]⁺ 341.1625; found 341.1615 (-2.9 ppm).

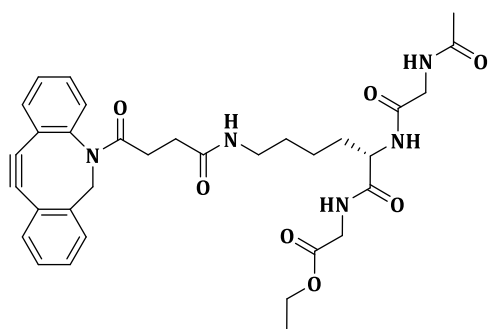
Analytical HPLC (Method C): t_R = 5.44 min (purity >99 %).

Analytical HPLC (Method D): t_R = 6.68 min (purity >99 %).

II-3. Synthesis of peptides building blocks

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-((((1*R*,8*S*,9*S*)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-lysylglycinate (**23**),²³⁶ ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(hex-5-ynoyl)-*L*-lysylglycinate (**24**),²³⁶ were synthesized according to literature protocols.

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-("dibenzocyclooctyne (DIBAC)")-*L*-lysylglycinate (**22**)



$C_{33}H_{39}N_5O_7$
MW: 617.70 g.mol⁻¹
Yield: 75%
White solid

The procedure was adapted from previous reports.²³⁶ To a solution of (*S*)-5-(2-acetamidoacetamido)-6-((2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-6-oxohexan-1-aminium (194.8 mg, 0.44 mmol, 1.2 eq) in anhydrous DMF (52.5 mL), was added Et₃N (183 μL, 1.32 mmol, 3.6 eq) and DBCO-NHS-ester (147.0 mg, 0.37 mmol, 1 eq). The solution was stirred for 16 hours under argon at 23 °C before being concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (gradient CH₂Cl₂/MeOH) to give the desired peptide **22** as a white solid (170.2 mg, 75%). Identity confirmed by comparison with published characterization data.²³⁶

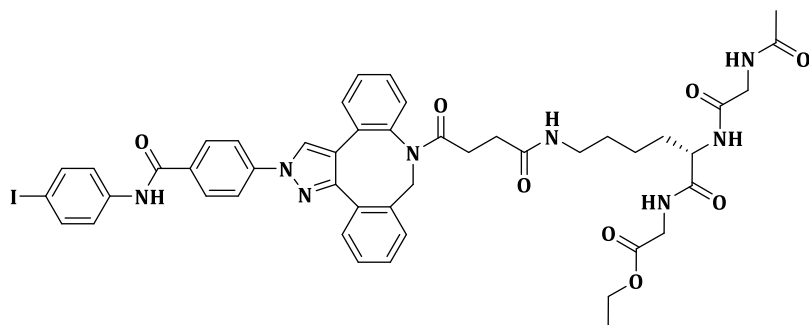
II-3.1. Synthesis of iodinated reference peptides

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(4-(1-(3-iodobenzyl)-1,9-dihydro-8*H*-dibenzo[*b,f*][1,2,3]triazolo[4,5-*d*]azocin-8-yl)-4-oxobutanoyl)-*L*-lysylglycinate (**31**),²³⁶ ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(((5*aR*,6*S*,6*aS*)-1-(3-iodobenzyl)-1,4,5,5*a*,6,6*a*,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-6-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-lysylglycinate (**32**),²³⁶ were synthesized according to literature protocols.

General procedure for synthesis iodinated reference peptides:

The procedure was adapted from previous reports.²³⁶ To a stirred solution of peptide (1 eq) in DMF or MeOH (depends on the product) was added sydnone (or azide) (1.2 eq). The reaction mixture was stirred at 23 °C until completion with HPLC monitoring (4-48 h) before being concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (gradient CH₂Cl₂/MeOH).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(4-(2-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-2,9-dihydro-8*H*-dibenzo[*b,f*]pyrazolo[4,3-*d*]azocin-8-yl)-4-oxobutanoyl)-*L*-lysylglycinate (25)



$C_{47}H_{49}IN_8O_8$
MW: 980.86 g.mol⁻¹
Yield: 76%
White solid

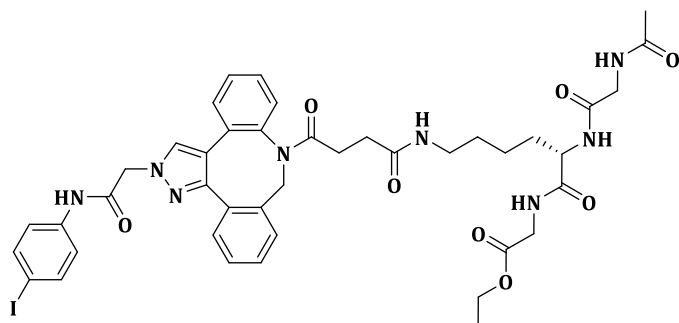
The title compound **25** was obtained in 76% yield from peptide **22** (40.9 mg, 66.2 μ mol) and *N*-arylsydnone **16** (32.3 mg, 79.5 μ mol) in 5 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.40.

HRMS (ESI): calculated for $C_{47}H_{50}IN_8O_8$ [M+H]⁺ 981.2796 ; found 981.2827 (3.2 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 9.31 – 9.77 min (purity >99 %).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(4-(2-(2-((4-iodophenyl)amino)-2-oxoethyl)-2,9-dihydro-8*H*-dibenzo[*b,f*]pyrazolo[4,3-*d*]azocin-8-yl)-4-oxobutanoyl)-*L*-lysylglycinate (26)



$C_{42}H_{47}IN_8O_8$
MW: 918.79 g.mol⁻¹
Yield: 65%
White solid

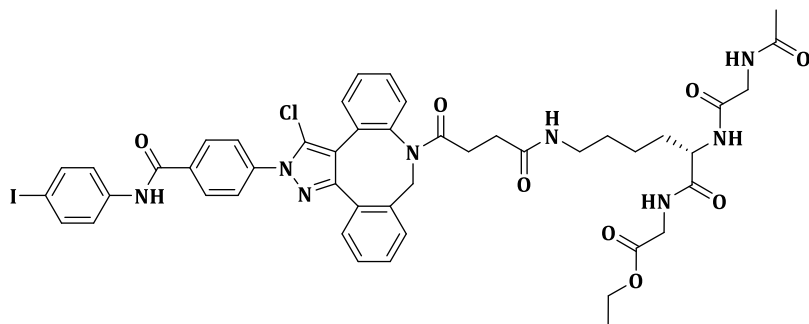
The title compound **26** was obtained in 65% yield from peptide **22** (36.8 mg, 59.6 μ mol) and *N*-alkylsydnone **18** (24.7 mg, 71.5 μ mol) in 4.5 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.34.

HRMS (ESI): calculated for $C_{42}H_{48}IN_8O_8$ [M+H]⁺ 919.2640 ; found 919.2684 (4.8 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 6.48 min (purity >99 %).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(4-(3-chloro-2-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-2,9-dihydro-8*H*-dibenzo[*b,f*]pyrazolo[4,3-*d*]azocin-8-yl)-4-oxobutanoyl)-*L*-lysylglycinate (27)



$C_{47}H_{48}ClIN_8O_8$
MW: 1015.30 g.mol⁻¹
Yield: 62%
Light orange solid

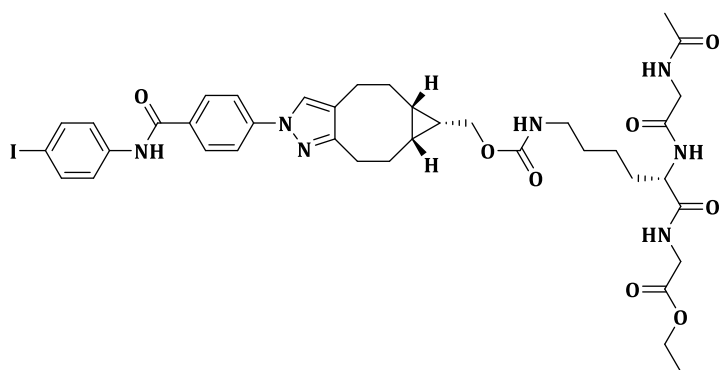
The title compound **27** was obtained in 62% yield from peptide **22** (14.0 mg, 22.7 μ mol) and *N*-arylchlorosydnone **21** (12.0 mg, 27.2 μ mol) in 1.7 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.42.

HRMS (ESI): calculated for $C_{47}H_{49}ClIN_8O_8$ [M+H]⁺ 1015.2407 ; found 1015.2430 (2.3 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 9.70 – 10.04 min (purity = 91 %).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-((((5*aS*,6*S*,6*aR*)-2-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-2,4,5,5*a*,6,6*a*,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-*c*]pyrazol-6-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-lysylglycinate (28)



$C_{39}H_{48}IN_7O_8$
MW: 869.76 g.mol⁻¹
Yield: 57%
Light yellow solid

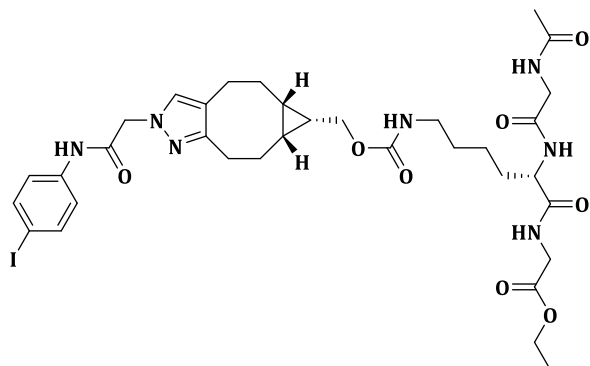
The title compound **28** was obtained in 57% yield from peptide **23** (10.4 mg, 20.6 μ mol) and *N*-arylsydnone **16** (10.1 mg, 24.7 μ mol) in 1.3 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.67.

HRMS (ESI): calculated for $C_{39}H_{49}IN_7O_8$ [M+H]⁺ 870.2687 ; found 870.2722 (4.0 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 8.88 min (purity >99 %).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-((((5*aS*,6*S*,6*aR*)-2-(2-((4-iodophenyl)amino)-2-oxoethyl)-2,4,5,5*a*,6,6*a*,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-*c*]pyrazol-6-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-lysylglycinate (**29**)



$C_{34}H_{46}IN_7O_8$
MW: 807.69 g.mol⁻¹
Yield: 51%
White solid

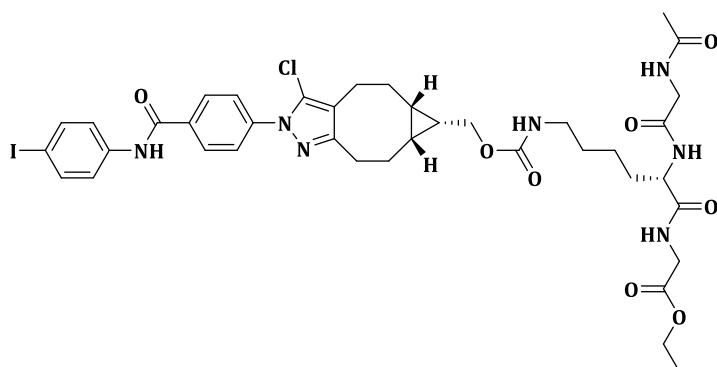
The title compound **29** was obtained in 51% yield from peptide **23** (11.4 mg, 22.5 μ mol) and *N*-alkylsydnone **18** (9.3 mg, 27.1 μ mol) in 1.4 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.63.

HRMS (ESI): calculated for $C_{34}H_{47}IN_7O_8$ [M+H]⁺ 808.2531 ; found 808.2538 (0.9 ppm).

Analytical HPLC (Method B): t_R = 9.01 min (purity >99 %).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-((((5*aS*,6*S*,6*aR*)-3-chloro-2-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-2,4,5,5*a*,6,6*a*,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-*c*]pyrazol-6-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-lysylglycinate (**30**)



$C_{39}H_{47}ClIN_7O_8$
MW: 904.20 g.mol⁻¹
Yield: 64%
Light orange solid

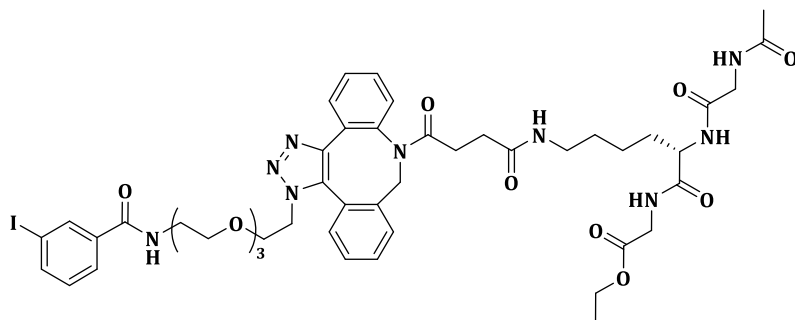
The title compound **30** was obtained in 64% yield from peptide **23** (5.5 mg, 10.9 μ mol) and *N*-arylchlorosydnone **21** (5.8 mg, 13.1 μ mol) in 0.7 mL of DMF according to general procedure.

Rf (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.71.

HRMS (ESI): calculated for $C_{39}H_{48}ClIN_7O_8$ [M+H]⁺ 904.2298 ; found 904.2319 (2.3 ppm).

Analytical HPLC (Method B): $t_R = 9.76$ min (purity = 80 %).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(4-(1-(1-(3-iodophenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-yl)-1,9-dihydro-8*H*-dibenzo[*b,f*][1,2,3]triazolo[4,5-*d*]azocin-8-yl)-4-oxobutanoyl)-*L*-lysylglycinate (51)



$C_{48}H_{60}IN_9O_{11}$
MW: 1065.35 g.mol⁻¹
Yield: 73%
White solid

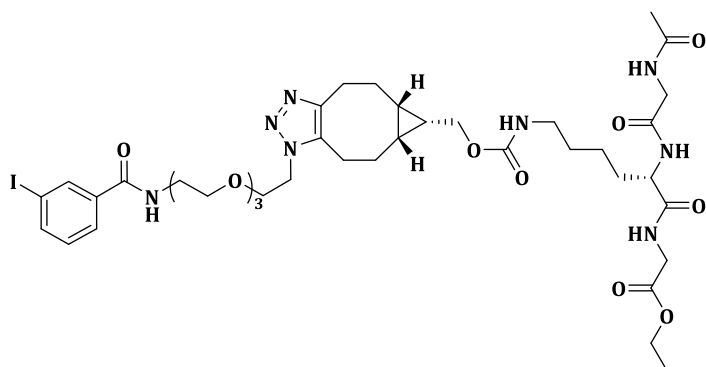
The title compound **51** was obtained in 73% yield from peptide **22** (25.0 mg, 40.5 μ mol) and azide **43** (21.8 mg, 48.6 μ mol) in 3.0 mL of MeOH according to general procedure.

R_f (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.28.

HRMS (ESI): calculated for $C_{48}H_{61}IN_9O_{11}$ [M+H]⁺ 1066.3535 ; found 1066.3541 (0.6 ppm).

Analytical HPLC (Method B): $t_R = 6.18$ min (purity >99 %).

Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(((5*aR*,6*S*,6*aS*)-1-(1-(3-iodophenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-yl)-1,4,5,5*a*,6,6*a*,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-6-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-lysylglycinate (52)



$C_{40}H_{59}IN_8O_{11}$
MW: 954.86 g.mol⁻¹
Yield: 63%
White solid

The title compound **52** was obtained in 63% yield from peptide **23** (11.8 mg, 23.2 μ mol) and azide **43** (12.5 mg, 27.9 μ mol) in 1.2 mL of MeOH according to general procedure.

R_f (silica, dichloromethane/methanol 9:1) = 0.62.

HRMS (ESI): calculated for $C_{40}H_{60}IN_8O_{11}$ [M+H]⁺ 955.3426; found 955.3459 (3.5 ppm).

Analytical HPLC (Method B): $t_R = 9.59$ min (purity = 98 %).

III- Kinetic studies with ¹²⁷I-compounds (non-radioactive)

III-1. Stability of compounds

General procedure for measuring the stability of azides (2, 43) or sydnone (16, 18, 21):

To 240 μL of DMSO was added 5 μL of a solution of benzamide (internal standard, 100 mM in DMSO) and 5 μL of azide or sydnone (10 mM in DMSO). After 10 seconds of stirring, 250 μL of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM) was added. After 1 minute of stirring at 25 °C, a 50 μL aliquot of the resulting mixture was injected in HPLC and the ratio of azide or sydnone *versus* benzamide peak areas was calculated. The next injections were carried out every 30 min until 2 hours. Stability level was evaluated by comparing the initial compound/benzamide peak area ratio with the peak area ratio after incubation. (Analytical HPLC Method B). In the kinetic study conditions, all compounds showed no observable degradation.

III-2. Kinetics of the click reaction with model peptides

Reactions of azides (2, 43) and sydnone (16, 18, 21) with peptide 22 and 23 were carried out in PBS/DMSO (1:1) mixtures at 100 μM concentration of sydnone/azides and 150 μM concentration of peptide using the following procedure: To 232.5 μL of DMSO was added 5 μL of the solution of benzamide (internal standard, 100 mM in DMSO) and 5 μL of azide or sydnone (10 mM in DMSO). After 10 seconds of stirring, 250 μL of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM) and 7.5 μL of the solution of peptide (10 mM in DMSO) were added. After 1 minute of stirring at 25 °C, a 50 μL aliquot of the resulting mixture was injected in HPLC and the next injections were carried out every 30 min until 2 hours (Analytical HPLC Method B). The conversion was followed by measuring the normalized azide/sydnone peak area.

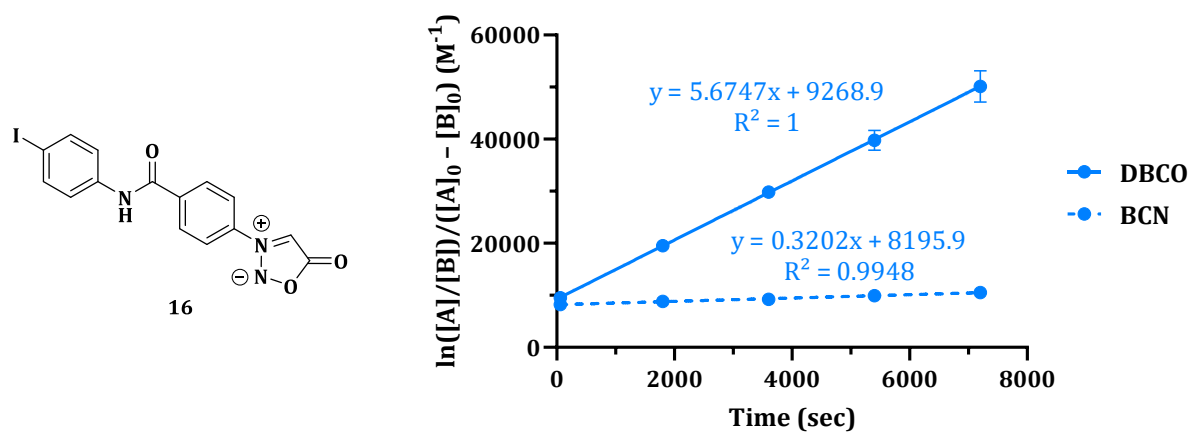
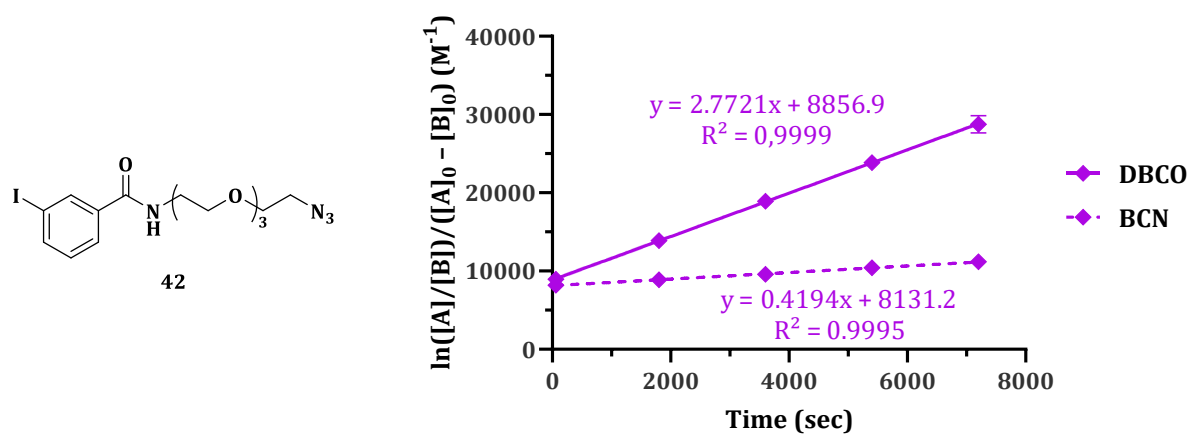
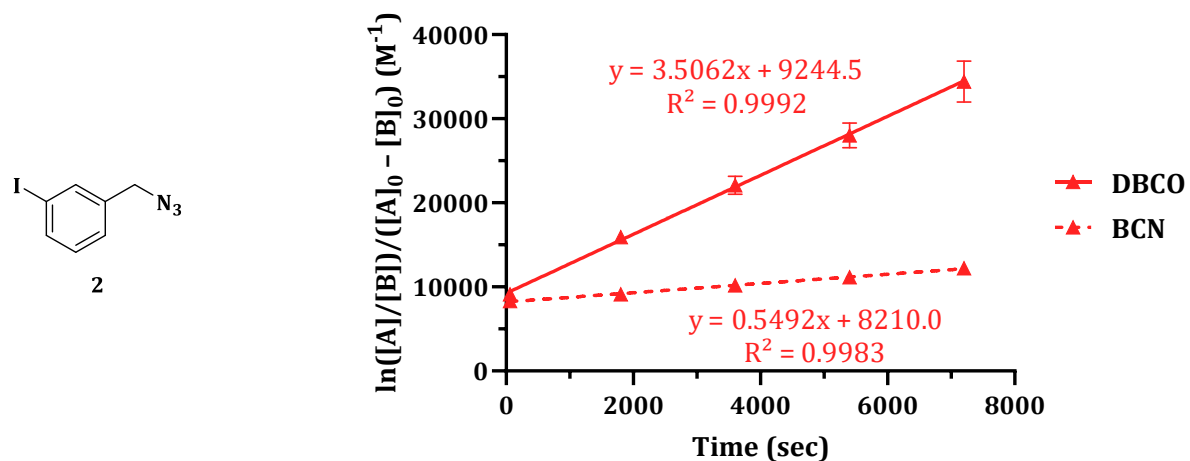
Second order reaction rate was determined by plotting $\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ *versus* time and analyzing by linear regression (**Equation S1**) on GraphPad Prism software (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA). Second order rate constant corresponds to the slope of this linear regression.

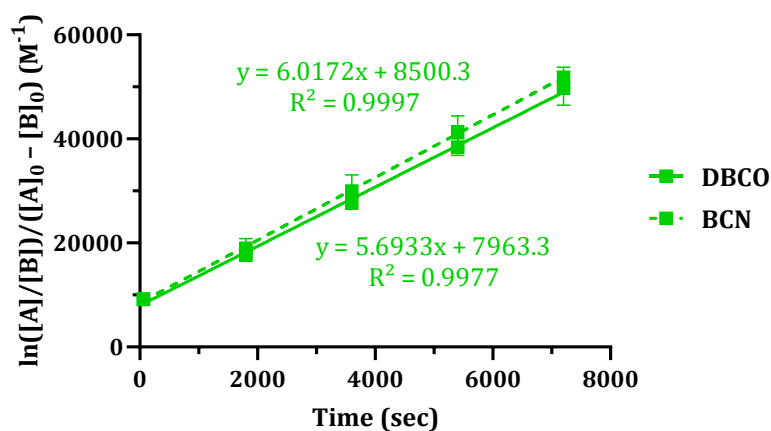
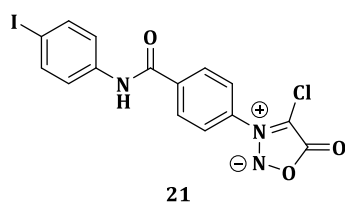
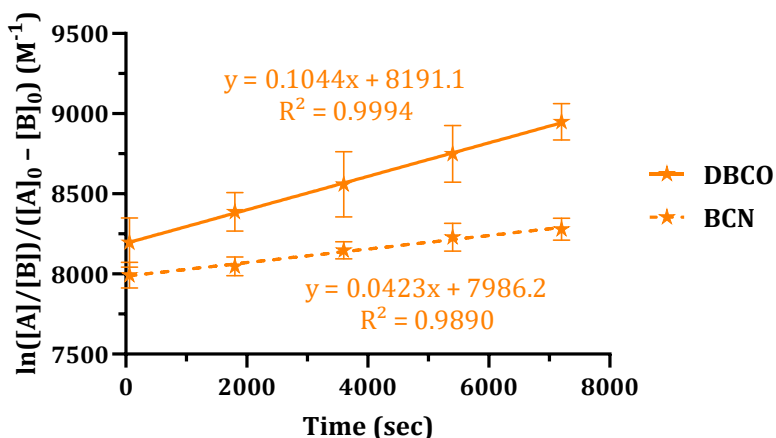
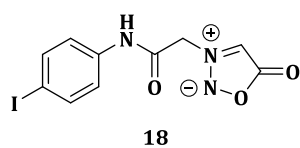
$$\frac{\ln\left(\frac{[A]}{[B]}\right)}{[A]_0 - [B]_0} = kt + const$$

Equation S1. [A] – concentration of azide or sydnone (M); [B] – concentration of peptide (M); t – reaction time (sec); k – reaction rate (M⁻¹ · sec⁻¹).

Linear regression curves for the reactive azides/sydnone (n = 3) are illustrated in **Table S1**.

Table S1. Linear regression curves showing $\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ plotted versus time.





III-3. Kinetics of the click reaction between sydnone and BCN-OH

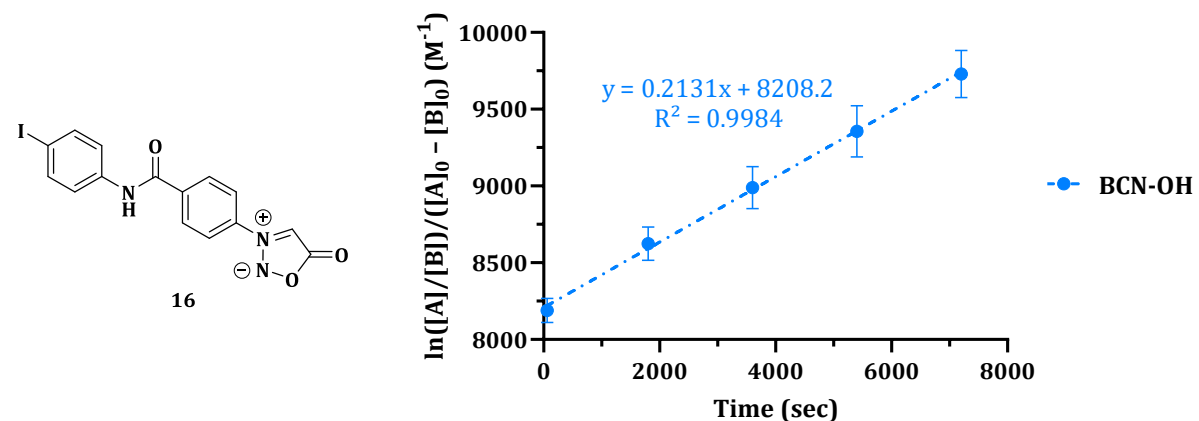
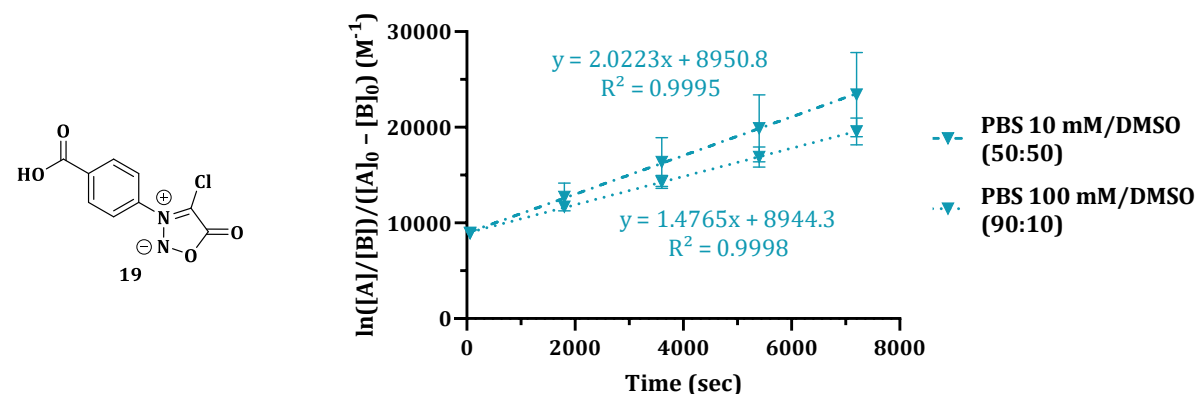
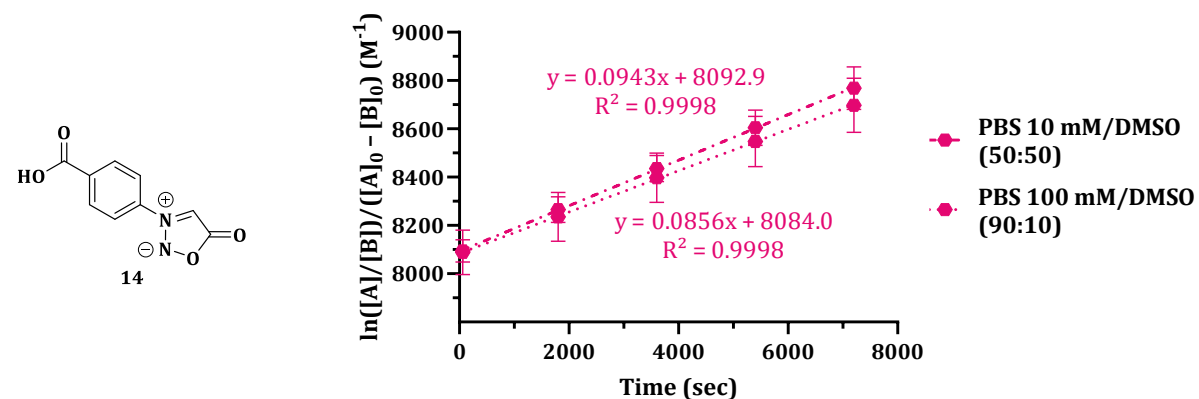
Reactions of sydnone (**14**, **19**) with BCN-OH were carried out in PBS/DMSO (9:1) mixtures at 100 μM concentration of sydnone and 150 μM concentration of BCN-OH using the following procedure: To 32.5 μL of DMSO was added 5 μL of the solution of benzamide (internal standard, 100 mM in DMSO) and 5 μL of sydnone (10 mM in DMSO). After 10 seconds of stirring, 450 μL of phosphate buffered saline (PBS, 100 mM) and 7.5 μL of the solution of peptide (10 mM in DMSO) were added. After 1 minute of stirring at 25 $^{\circ}\text{C}$, a 50 μL aliquot of the resulting mixture was injected in HPLC and the next injections were carried out every 30 min until 2 hours (Analytical HPLC Method E). The conversion was followed by measuring the normalized sydnone peak area.

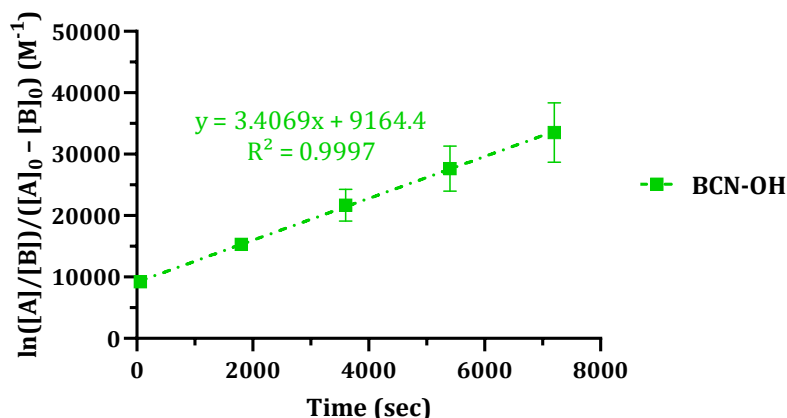
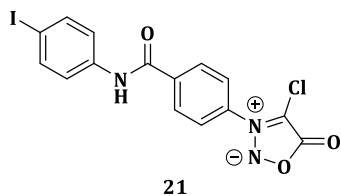
Reactions of sydnone (**14**, **16**, **19**, **21**) with BCN-OH were carried out in PBS/DMSO (1:1) mixtures at 100 μM concentration of sydnone and 150 μM concentration of BCN-OH using the following procedure: To 232.5 μL of DMSO was added 5 μL of the solution of benzamide (internal standard, 100 mM in DMSO) and 5 μL of sydnone or azide (10 mM in DMSO). After 10 seconds of stirring, 250 μL of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM) and 7.5 μL of the solution of peptide (10 mM in DMSO) were added. After 1 minute of stirring at 25 $^{\circ}\text{C}$, a 50 μL aliquot of the resulting

mixture was injected in HPLC and the next injections were carried out every 30 min until 2 hours (Analytical HPLC Method E). The conversion was followed by measuring the normalized sydnone peak area.

Second order reaction rate was determined according to **Equation S1**. Linear regression curves for the reactive sydnones (n = 3) with BCN-OH are illustrated in **Table S2**.

Table S2. Linear regression curves showing $\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ plotted versus time.





IV- Radiochemistry

IV-1. General informations

[¹²⁵I]NaI was obtained commercially from Revvity in 10⁻⁵ M NaOH solution with a volumic activity of 100 μCi/μL (3.7 MBq/μL). Radio-HPLC analyses were performed on the same system as the non-radioactive iodinated references. After UV detection cell, the eluent is redirected to a Flow Star LB 513 radioactivity detector (BERTHOLD Technologies).

Fluorine-18 was produced on site using a cyclotron (IBA Cyclone 18/9, IBA, Louvain-la-Neuve, Belgium) by irradiation of [¹⁸O]H₂O with 18-MeV protons. Radioactivity was measured using an ionization chamber-based activity meter (Capintec Radioisotope Calibrator CRC-721, Ramsey, NJ, USA).

IV-2. General procedures for ¹²⁵I-radiolabelling

IV-2.1. Preparation of the ¹²⁵I-azides:

General labelling method:

A stock solution of [¹²⁵I]NaI was prepared by diluting the commercial solution in deionized water. To 70 μL of MeOH was added 10 μL of a solution of azide (2.5 mM or 1 mM in MeOH) and 10 μL of a solution of Cu(OTf)₂(pyr)₄ (100 mM in MeOH). Then, 10 μL of a stock solution of [¹²⁵I]NaI (0.3-10.8 MBq) was added and the reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 min before analysis. After 30 min reaction, samples for reverse-phase HPLC analyses were prepared by diluting an aliquot of the reaction solution in a 6:4 H₂O/MeCN solution before analysis using the appropriate HPLC system. All reactions led to crude RCY >95 %. The reaction mixture was diluted in 1 mL of H₂O, dropped off on a pre-washed Sep-Pak C₁₈ Plus Long cartridge (Waters), washed with 45 mL of H₂O/MeCN (8:2) solution and 2 mL of MeCN. The solution was diluted in 10 mL of H₂O, dropped off on a pre-washed Sep-Pak C₁₈ Plus Light cartridge (Waters) and washed with 600 μL of MeCN to recover the expected product. Samples for reverse-phase HPLC analyses were prepared by

diluting an aliquot of the solution in a 6:4 H₂O/MeCN solution before analysis using the appropriate HPLC system. All compounds were obtained with RCP >99 %.

[¹²⁵I]1-(azidomethyl)-3-iodobenzene (**2a**): **Analytical HPLC (Method B)**: 8.80 min; **RCY** = 82 %.

[¹²⁵I]N-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-iodobenzamide (**43a**): **Analytical HPLC (Method B)**: 6.71 min; **Analytical HPLC (Method C)**: 6.73 min; **RCY** = 91 ± 5 %.

[¹²⁵I]N-(20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosyl)-3-iodobenzamide (**47a**): **Analytical HPLC (Method C)**: 6.28 min; **RCY** = 72 ± 1 %.

[¹²⁵I]N-(32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontyl)-3-iodobenzamide (**48a**): **Analytical HPLC (Method C)**: 6.05 min; **RCY** = 83 %.

IV-2.2. Preparation of the ¹²⁵I-sydnonones:

General labelling method:

A stock solution of [¹²⁵I]NaI was prepared by diluting the commercial solution in deionized water. To 70 μL of MeOH was added 10 μL of a solution of sydnone (1 mM in MeOH/DMSO 1:1) and 10 μL of a solution of Cu(OTf)₂(pyr)₄ (100 mM in MeOH). Then, 10 μL of a stock solution of Na[¹²⁵I]I (0.5-12 MBq) was added and the reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 min before analysis. After 30 min reaction, samples for reverse-phase HPLC analyses were prepared by diluting an aliquot of the reaction solution in a 6:4 H₂O/MeCN solution before analysis using the appropriate HPLC system. All reactions led to crude RCY >97 %. The reaction mixture was diluted in 1 mL of H₂O, dropped off on a pre-washed Sep-Pak C₁₈ Plus Long cartridge (Waters), washed with 45 mL of H₂O/MeCN (85:15 (**18a**), 80:20 (**16a**) or 75:25 (**21a**)) solution and 2 mL of MeCN. The solution was diluted in 10 mL of H₂O, dropped off on a pre-washed Sep-Pak C₁₈ Plus Light cartridge (Waters) and washed with 600 μL of MeCN to recover the expected product. Samples for reverse-phase HPLC analyses were prepared by diluting an aliquot of the reaction solution in a 6:4 H₂O/MeCN solution before analysis using the appropriate HPLC system. All compounds were obtained with RCP >99 %.

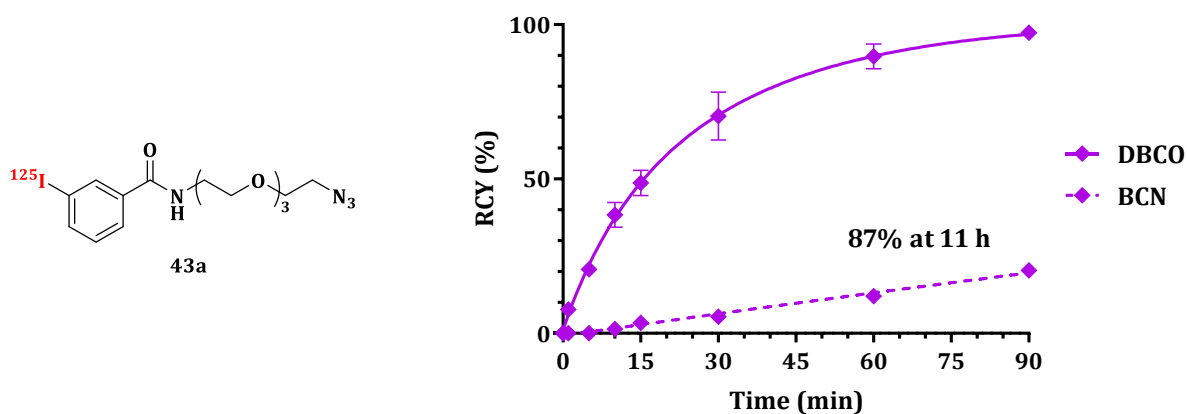
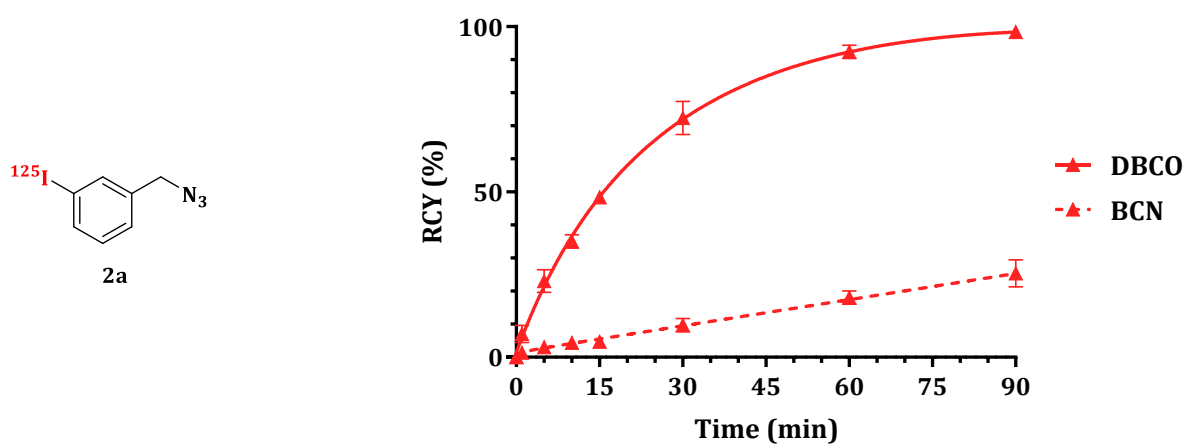
[¹²⁵I]3-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**16a**): **Analytical HPLC (Method A)**: 10.55 min; **Analytical HPLC (Method B)**: 7.00 min; **RCY** = 91 ± 3%.

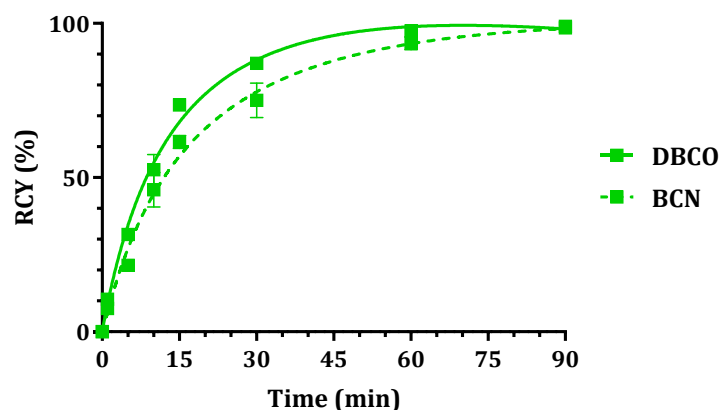
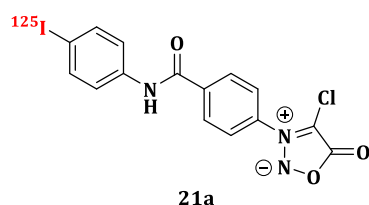
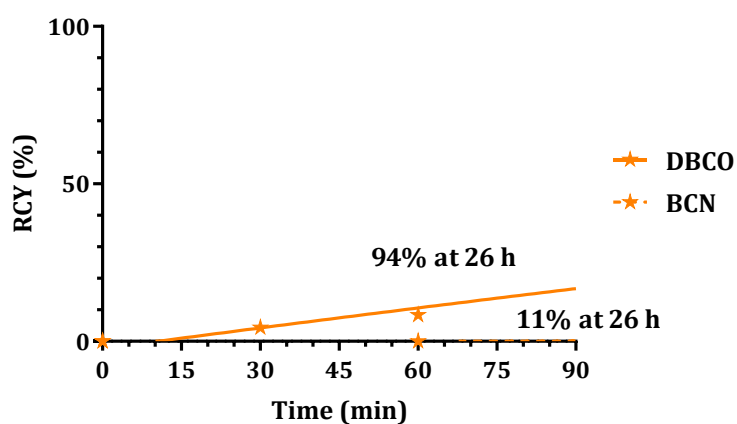
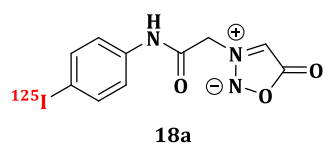
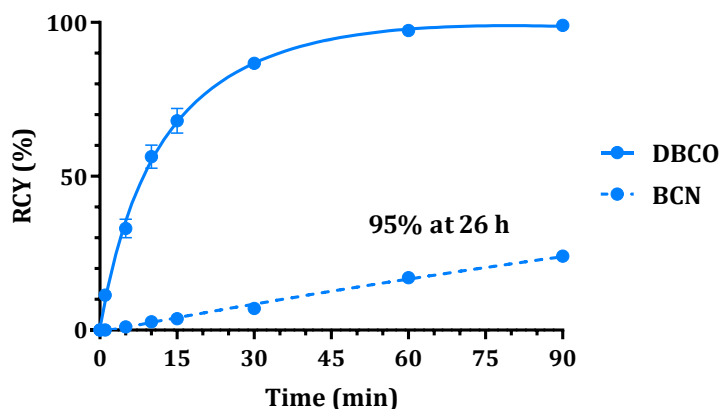
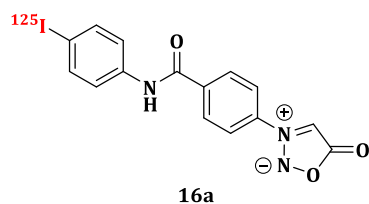
[¹²⁵I]3-(2-((4-iodophenyl)amino)-2-oxoethyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**18a**): **Analytical HPLC (Method B)**: 4.70 min; **RCY** = 90 ± 8%.

[¹²⁵I]4-chloro-3-(4-((4-iodophenyl)carbamoyl)phenyl)-5-oxo-5*H*-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide (**21a**): **Analytical HPLC (Method B)**: 7.93 min; **RCY** = 76 ± 8%.

IV-3. Kinetics of the click reaction with model peptides

To a solution of radioiodinated azides (**2a**, **43a**) or sydrones (**16a**, **18a**, **21a**) (0.5 MBq, 10 μ L) in DMSO was added a solution of clickable peptide **22** or **23** (90 μ L, 200 μ M) in a PBS/DMSO (55:45) mixture. The coupling solution was stirred at 25 $^{\circ}$ C and at selected times, a 10 μ L aliquot (50 kBq) of the resulting mixture was added to 40 μ L of H₂O/MeCN (6:4). The resulting solution was analysed by reverse-phase HPLC and the conversion was followed by measuring the compound peak area (**Analytical HPLC Method B**).





IV-4. General procedures for ^{18}F -radiolabelling

General labelling method 1:

After production in a cyclotron (12 GBq), $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ was separated from $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ by trapping on a Chromabond PS- HCO_3^- cartridge to remove $[^{18}\text{O}]\text{water}$ and other impurities. This was followed by elution of $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ into the reactor with a solution containing 6.5 mg $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ and 26 mg Kryptofix 2.2.2 in 750 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (89:11). The reactor was heated to 90 $^\circ\text{C}$ for 7 minutes followed by

the addition of MeCN (500 μ L). Azeotropic drying/evaporation (2 times) was achieved by heating the open reaction vessel to 90 $^{\circ}$ C for 3 min. Following azeotropic drying, the reactor was cooled to 50 $^{\circ}$ C and a solution of DMF (500 μ L) containing azide **42** (0.7 mg, 2 μ mol, 1 equiv), Cu(OTf)₂ (3.6 mg, 10 μ mol, 5 equiv) and pyridine (9.8 mg, 250 μ mol, 125 equiv) was added. The reactor was then heated without stirring at 110 $^{\circ}$ C for 20 min. After 20 min, the reaction was allowed to cool to 50 $^{\circ}$ C and H₂O (600 μ L) was added to the reaction mixture to be transferred to a vial for subsequent HPLC analysis.

General labelling method 2:

After production in a cyclotron (the test being conducted with a cyclotron purge, no activity could be measured) [¹⁸F]F⁻ was separated from [¹⁸O]H₂O by trapping on a SepPak Light Accel plus QMA anion exchange cartridge (Cl⁻ form, Waters) to remove [¹⁸O]water and other impurities. This was followed by elution of [¹⁸F]F⁻ into the reactor with a solution containing 5 mg potassium trifluoromethanesulfonate and 50 μ g of potassium carbonate in 500 μ L of water. The reactor was heated to 110 $^{\circ}$ C for 7 minutes followed by the addition of MeCN (500 μ L). Azeotropic drying/evaporation (2 times) was achieved by heating the reaction vessel to 110 $^{\circ}$ C for 3 min. The reaction vessel was then heated for an additional 3 min at 110 $^{\circ}$ C. Following azeotropic drying, 300 μ L of DMF was added to the dried reagent, and heated at 110 $^{\circ}$ C for 5 min. The resulting stock solution of [¹⁸F]KF/KOTf was cooled to 50 $^{\circ}$ C and a solution of DMF (300 μ L) containing azide **42** (3.7 mg, 10 μ mol, 1 equiv), Cu(OTf)₂ (18.1 mg, 50 μ mol, 5 equiv) and pyridine (98.9 mg, 250 μ mol, 125 equiv) or azide **55** was added. The reactor was then heated without stirring at 110 $^{\circ}$ C for 20 min. After 20 min, the reaction was allowed to cool to 50 $^{\circ}$ C and H₂O (600 μ L) was added to the reaction mixture to be transferred to a vial for subsequent HPLC analysis.

[¹⁸F]1-(azidomethyl)-3-fluorobenzene (**53a**): **Analytical HPLC (Method D):** 8.95 min; **Crude RCY = 6 %.**

[¹⁸F]N-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-fluorobenzamide (**54a**): **Analytical HPLC (Method D):** 6.95 min; **Crude RCY (Method 1) = 1 %; Crude RCY (Method 2) = 12 %.**

IV-5. Determination of partition coefficient

To an Eppendorf tube containing 2 mL of 1-octanol/H₂O (or PBS) (1:1) was added 1 μ L of peptide **45a**. The mixture was vortexed for 10 min and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. Then, 100 μ L aliquots of organic and aqueous layers were separated in different test tubes in order to measure their radioactivity. Partition coefficient were determined by calculating the ratio of cpm in 1-octanol to that in aqueous media, and expressed as a common logarithm (log P). Each logP or log D(7.4) determination was performed in triplicate.

IV-6. Protein radiolabelling

IV-6.1. 9E7.4-IgG modification

To a solution of 9E7.4-IgG (388 μ L 4.5 mg/mL, produced as reported previously)²⁶³ in borate buffer (0.1 M, pH 8.6) was added 1, 3, 5, 10 or 15 eq. of **40** or 15 eq. of **41** in DMSO. After 60 min of incubation at 23 °C, excess of moieties was removed by purification by gel filtration on a Sephadex G-25 resin loaded column (PD-10, GE healthcare) and the obtained 9E7.4-DBCO (or BCN) was stored in PBS (pH = 7.2, 1.33 mg/mL) at 4 °C.

IV-6.2. Average number of reactive groups per antibody

Antibodies were conditioned in PBS (pH = 7.2) with a concentration set at 200 μ g/mL and then diluted by half in an aqueous solution of tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) at 50 mmol/L. Desalting and separation of proteins were achieved on an H-Class UPLC system (Waters Corporation, Milford) by injection of 10 μ L of solutions onto an Acquity® CSH C18 column (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m; Waters) held at 60 °C. The mobile phase was composed of 5 % acetonitrile as solvent A and 100 % acetonitrile as solvent B, each containing 0.1 % formic acid. The elution was carried out using a gradient of solvent B in solvent A over 12 min at a constant flow rate of 400 μ L/min (from 0 to 8 min: from 5 % to 95 % of solvent B, from 8 to 10 min: kept constant at 95% of solvent B, from 10 to 12 min: from 95 % to 5 % of solvent B). High-resolution mass spectrometry (HRMS) detection of proteins was performed by a Synapt G2 HRMS Q-TOF mass spectrometer equipped with a Z-Spray interface for electrospray ionization (Waters Corporation). The resolution mode was applied in a mass-to-charge (m/z) ratio ranging from 200 to 4,000 at a mass resolution of 25,000 Full Width Half Maximum in the positive ionization mode. Ionization parameters were as follow: capillary voltage of 3 kV, cone voltage of 30 V, desolvation gas flow of 900 L/h, source temperature of 120 °C, desolvation temperature of 450 °C, nitrogen as desolvation gas. Data were collected in the continuum mode at a rate of four spectra per second. Leucine enkephalin solution prepared at 2 μ g/mL in an acetonitrile/water (50/50, v/v) mixture was infused at a constant flow in the lock spray channel. A spectrum of 1 s was acquired every 20 s and allowed mass correction during experiments. The experimental molecular weights of proteins were finally deducted by deconvolution with the MaxEnt1 extension of MassLynx® software (version 4.1, Waters Corporation).

IV-6.3. ¹²⁵I-iodination of modified antibody

To **16a** or **21a** in EtOH (10 μ L) prepared as described above, was added 9E7.4-DBCO or 9E7.4-BCN (90 μ L of a 1.33 mg/mL solution in PBS). The conjugation yield was assessed every 5 min until 30 min by elution of an aliquot deposited on an ITLC-SG strip (methanol as eluent), and integration of the plate using a Cyclone phosphorimager scanner (Perkin Elmer). Purification was

performed by gel filtration on a Sephadex G-25 resin loaded column (PD-10, GE healthcare) using PBS as eluent, affording the purified radiolabeled antibody with a >99 % radiochemical purity as assessed by ITLC-SG.

IV-6.4. Immunoreactivity assays

The immunoreactive fraction of **16a**-DBCO-9E7.4, **21a**-DBCO-9E7.4 and **21a**-BCN-9E7.4 were determined using coated tubes saturated with a 40 amino acids peptide which is recognized by the anti-CD138 antibody (9E7.4) according to the supplier's protocol. 0.1 pmol of radiolabeled 9E7.4 was incubated for 60 min at 25 °C in coated tubes containing different mass of peptide (0.25 to 2 µg). Then, supernatants containing non-reactive antibodies were collected separately and the radioactivity in each fraction was measured in a gamma counter.

Références bibliographiques

1. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2004–2021 (2001). [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
2. Ahmed, Md. K., Kumer, A. & Imran, A. B. Facile fabrication of polymer network using click chemistry and their computational study. *R Soc Open Sci* **8**, 202056 (2021). <https://doi.org/10.1098/rsos.202056>.
3. Jiang, X., Hao, X., Jing, L., Wu, G., Kang, D., Liu, X., & Zhan, P. Recent applications of click chemistry in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* **14**, 779–789 (2019). <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1614910>.
4. Hang, H. C., Yu, C., Kato, D. L. & Bertozzi, C. R. A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 14846–14851 (2003). <https://doi.org/10.1073/pnas.2335201100>.
5. Bird, R. E., Lemmel, S. A., Yu, X. & Zhou, Q. A. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. *Bioconjug Chem.* **32**, 2457–2479 (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00461>.
6. Blizzard, R. J., Backus, D. R., Brown, W., Bazewicz, C. G., Li, Y & Mehl, R. A. Ideal Bioorthogonal Reactions Using A Site-Specifically Encoded Tetrazine Amino Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 10044–10047 (2015). <https://doi.org/10.1021/jacs.5b03275>.
7. Dirksen, A. & Dawson, P. E. Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling. *Bioconjug Chem.* **19**, 2543–2548 (2008). <https://doi.org/10.1021/bc800310p>.
8. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I & Kent, S. B. H. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science* **266**, 776–779 (1994). <https://doi.org/10.1126/science.7973629>.
9. Wieland, T., Bokelmann, E., Bauer, L., Lang, H. U. & Lau, H. Über Peptidsynthesen. 8. Mitteilung Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **583**, 129–149 (1953). <https://doi.org/10.1002/jlac.19535830110>.
10. Cistrone, P. A., Bird, M. J., Flood, D. T., Silvestri, A. P., Hintzen, J. C. J., Thompson, D. A., & Dawson, P. E. Native Chemical Ligation of Peptides and Proteins. *Curr Protoc Chem Biol* **11**, e61 (2019). <https://doi.org/10.1002/cpch.61>.
11. Dittmann, M., Sadek, M., Seidel, R. & Engelhard, M. Native chemical ligation in dimethylformamide can be performed chemoselectively without racemization. *J Pept Sci.* **18**, 312–316 (2012). <https://doi.org/10.1002/psc.2401>.

12. Pal, S., Mandal, A., Hong, L., Ortuso, R. D., Petri-Fink, A., Salentinig, S. & Kilbinger, A. F. M. Native Chemical Ligation: Ultrafast Synthesis of Block Copolymers. *Macromolecules* **55**, 2854–2860 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.2c00154>.
13. Diemer, V., Firstova, O., Agouridas, V. & Melnyk, O. Pedal to the Metal: The Homogeneous Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction. *Chem. Eur. J.* **28**, e202104229 (2022). <https://doi.org/10.1002/chem.202104229>.
14. Johnson, E. C. B. & Kent, S. B. H. Insights into the Mechanism and Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6640–6646 (2006). <https://doi.org/10.1021/ja058344i>.
15. Kent, S. Chemical protein synthesis: Inventing synthetic methods to decipher how proteins work. *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 4926–4937 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.020>.
16. Erickson, P. W., Fulcher, J. M., Spaltenstein, P. & Kay, M. S. Traceless Click-Assisted Native Chemical Ligation Enabled by Protecting Dibenzocyclooctyne from Acid-Mediated Rearrangement with Copper(I). *Bioconjug Chem.* **32**, 2233–2244 (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00403>
17. Bode, J. W., Fox, R. M. & Baucom, K. D. Chemoselective Amide Ligations by Decarboxylative Condensations of N-Alkylhydroxylamines and α -Ketoacids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1248–1252 (2006). <https://doi.org/10.1002/anie.200503991>.
18. Noda, H., Erős, G. & Bode, J. W. Rapid Ligations with Equimolar Reactants in Water with the Potassium Acyltrifluoroborate (KAT) Amide Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5611–5614 (2014). <https://doi.org/10.1021/ja501844z>.
19. Saxon, E. & Bertozzi, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **287**, 2007–2010 (2000). <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>.
20. Staudinger, H. & Meyer, J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta.* **2**, 635–646 (1919). <https://doi.org/10.1002/hlca.19190020164>.
21. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* **44**, 666–676 (2011). <https://doi.org/10.1021/ar200148z>.
22. Saxon, E., Armstrong, J. I. & Bertozzi, C. R. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2**, 2141–2143 (2000). <https://doi.org/10.1021/ol006054v>.

23. Nilsson, B. L., Kiessling, L. L. & Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Org. Lett.* **2**, 1939–1941 (2000). <https://doi.org/10.1021/ol0060174>.
24. van Berkel, S. S., van Eldijk, M. B. & van Hest, J. C. M. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation. *Angew Chem Int Ed.* **50**, 8806–8827 (2011). <https://doi.org/10.1002/anie.201008102>.
25. Prescher, J. A., Dube, D. H. & Bertozzi, C. R. Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature* **430**, 873–877 (2004). <https://doi.org/10.1038/nature02791>.
26. Böhrsch, V., Serwa, R., Majkut, P., Krause, E. & Hackenberger, C. P. R. Site-specific functionalisation of proteins by a Staudinger-type reaction using unsymmetrical phosphites. *Chem. Commun.* **46**, 3176 (2010). <https://doi.org/10.1039/B926818A>.
27. Bednarek, C., Wehl, I., Jung, N., Schepers, U. & Bräse, S. The Staudinger Ligation. *Chem. Rev.* **120**, 4301–4354 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00665>.
28. Mamat, C., Gott, M. & Steinbach, J. Recent progress using the Staudinger ligation for radiolabeling applications. *J Labelled Comp Radiopharm.* **61**, 165–178 (2018). <https://doi.org/10.1002/jlcr.3562>.
29. Maric, T., Mikhaylov, G., Khodakivskyi, P., Bazhin, A., Sinisi, R., Bonhoure, N., Yevtodiyenko, A., Jones, A., Muhunthan, V., Abdelhady, G., Shackelford, D., & Goun, E. Bioluminescent-based imaging and quantification of glucose uptake in vivo. *Nat Methods* **16**, 526–532 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0421-z>.
30. Ollivier, N. *et al.* Catalysis of Hydrazone and Oxime Peptide Ligation by Arginine. *Org. Lett.* **22**, 8608–8612 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03195>.
31. Kalia, J. & Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew Chem Int Ed.* **47**, 7523–7526 (2008). <https://doi.org/10.1002/anie.200802651>.
32. Kölmel, D. K. & Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem Rev.* **117**, 10358–10376 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
33. Cordes, E. H. & Jencks, W. P. Nucleophilic Catalysis of Semicarbazone Formation by Anilines. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 826–831 (1962). <https://doi.org/10.1021/ja00864a030>.
34. Davies, L. J., Shuttleworth, L. M., Zhang, X., Peng, S. & Nitsche, C. Bioorthogonal Peptide Macrocyclization Using Oxime Ligation. *Org. Lett.* **25**, 2806–2809 (2023). <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.3c00695>.

35. Carrico, I. S., Carlson, B. L. & Bertozzi, C. R. Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. *Nat Chem Biol.* **3**, 321–322 (2007). <https://doi.org/10.1038/nchembio878>.
36. Hardy, J. G., Lin, P. & Schmidt, C. E. Biodegradable hydrogels composed of oxime crosslinked poly(ethylene glycol), hyaluronic acid and collagen: a tunable platform for soft tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* **26**, 143–161 (2015). <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.975393>.
37. Agarwal, P., van der Weijden, J., Sletten, E. M., Rabuka, D. & Bertozzi, C. R. A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 46–51 (2013). <https://doi.org/10.1073/pnas.1213186110>.
38. Michael, A. Ueber die Einwirkung von Diazobenzolimid auf Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Prakt. Chem.* **48**, 94–95 (1893). <https://doi.org/10.1002/prac.18930480114>.
39. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed.* **2**, 565–598 (1963). <https://doi.org/10.1002/anie.196305651>.
40. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chem Int Ed.* **41**, 2596–2599 (2002). [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
41. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002). <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
42. Héron, J. & Balcells, D. Concerted Cycloaddition Mechanism in the CuAAC Reaction Catalyzed by 1,8-Naphthyridine Dicopper Complexes. *ACS Catal.* **12**, 4744–4753 (2022). <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c00723>.
43. Ramil, C. P. & Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: strategies and recent development. *Chem Commun (Camb)* **49**, 11007–11022 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3cc44272a>.
44. Rodionov, V. O., Fokin, V. V. & Finn, M. G. Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew Chem Int Ed.* **44**, 2210–2215 (2005). <https://doi.org/10.1002/anie.200461496>.
45. Worrell, B. T., Malik, J. A. & Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloadditions. *Science* **340**, 457–460 (2013). <https://doi.org/10.1126/science.1229506>.

46. Pineda-Castañeda, H. M., Rivera-Monroy, Z. J. & Maldonado, M. Copper(I)-Catalyzed Alkyne–Azide Cycloaddition (CuAAC) “Click” Reaction: A Powerful Tool for Functionalizing Polyhydroxylated Platforms. *ACS Omega* **8**, 3650–3666 (2023). <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06269>.
47. Haldón, E., Nicasio, M. C. & Pérez, P. J. Copper-catalysed azide–alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9528–9550 (2015). <https://doi.org/10.1039/C5OB01457C>.
48. Bauer, D., Sarrett, S. M., Lewis, J. S. & Zeglis, B. M. Click chemistry: A transformative technology in nuclear medicine. *Nat Protoc* **18**, 1659–1668 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00825-8>.
49. González-Lainez, M. *et al.* Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC) by Functionalized NHC-Based Polynuclear Catalysts: Scope and Mechanistic Insights. *Organometallics* **41**, 2154–2169 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.2c00246>.
50. Amo, D. S. del *et al.* Biocompatible copper(I) catalysts for in vivo imaging of glycans. *J Am Chem Soc.* **132**, 16893–16899 (2010). <https://doi.org/10.1021/ja106553e>.
51. Raju, C., Kunnikuruvan, S. & Sureshan, K. M. Topochemical Cycloaddition Reaction between an Azide and an Internal Alkyne. *Angew Chem Int Ed.* **61**, e202210453 (2022). <https://doi.org/10.1002/anie.202210453>.
52. Chatkewitz, L. E., Halonski, J. F., Padilla, M. S. & Young, D. D. Investigation of copper-free alkyne/azide 1,3-dipolar cycloadditions using microwave irradiation. *Bioorg Med Chem Lett.* **28**, 81–84 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.007>.
53. Choinopoulos, I. Grubbs’ and Schrock’s Catalysts, Ring Opening Metathesis Polymerization and Molecular Brushes—Synthesis, Characterization, Properties and Applications. *Polymers (Basel)* **11**, 298 (2019). <https://doi.org/10.3390/polym11020298>.
54. Zhang, L. *et al.* Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15998–15999 (2005). <https://doi.org/10.1021/ja054114s>.
55. Ma, X., Wang, H. & Chen, W. N-Heterocyclic Carbene-Stabilized Palladium Complexes as Organometallic Catalysts for Bioorthogonal Cross-Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **79**, 8652–8658 (2014). <https://doi.org/10.1021/jo5014228>.
56. Lim, R. K. V., Li, N., Ramil, C. P. & Lin, Q. Fast and Sequence-Specific Palladium-Mediated Cross-Coupling Reaction Identified from Phage Display. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2139–2148 (2014). <https://doi.org/10.1021/cb500443x>.

57. Scinto, S. L., Bilodeau, D. A., Hincapie, R., Lee, W., Nguyen, S. S., Xu, M., Am Ende, C. W., Finn, M. G., Lang, K., Lin, Q., Pezacki, J. P., Prescher, J. A., Robillard, M. S., & Fox, J. M. Bioorthogonal chemistry. *Nat Rev Methods Primers* **1**, 30 (2021). <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00028-z>.
58. Wittig, G. & Krebs, A. Zur Existenz niedergliederiger Cycloalkine, I. *Chemische Berichte* **94**, 3260–3275 (1961). <https://doi.org/10.1002/cber.19610941213>.
59. Chang, P. V., Prescher, J. A., Sletten, E. M., Baskin, J. M., Miller, I. A., Agard, N. J., Lo, A., & Bertozzi, C. R. Copper-free click chemistry in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1821–1826 (2010). <https://doi.org/10.1073/pnas.0911116107>.
60. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004). <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
61. Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A., & Bertozzi, C. R. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16793–16797 (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>.
62. Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A. & Boons, G.-J. Visualizing Metabolically-Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew Chem Int Ed.* **47**, 2253–2255 (2008). <https://doi.org/10.1002/anie.200705456>.
63. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org Lett.* **10**, 3097–3099 (2008). <https://doi.org/10.1021/ol801141k>.
64. Debets, M. F. *et al.* Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem. Commun.* **46**, 97–99 (2010). <https://doi.org/10.1039/b917797c>.
65. Jewett, J. C., Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 3688–3690 (2010). <https://doi.org/10.1021/ja100014q>.
66. Qin, L.-H., Hu, W. & Long, Y.-Q. Bioorthogonal chemistry: Optimization and application updates during 2013–2017. *Tetrahedron Lett.* **59**, 2214–2228 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.058>.
67. Weterings, J., Riicken, C. J. F., Veldhuis, H., Meulemans, T., Hadavi, D., Timmers, M., Honing, M., Ippel, H., Liskamp, R. M. J. TMTHSI, a superior 7-membered ring alkyne containing reagent for strain-promoted azide–alkyne cycloaddition reactions. *Chem. Sci.* **11**, 9011–9016 (2020). <https://doi.org/10.1039/D0SC03477K>.

68. Dommerholt, J., Rutjes, F. P. J. T. & van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top Curr Chem (Chem)* **374**, 16 (2016). <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4>.
69. Dommerholt, J., Schmidt, S., Temming, R., Hendriks, L. J., Rutjes, F. P., van Hest, J. C., Lefeber, D. J., Friedl, P., & van Delft, F. L. Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew Chem Int Ed.* **49**, 9422–9425 (2010). <https://doi.org/10.1002/anie.201003761>.
70. Dommerholt, J., van Rooijen, O., Borrmann, A., Guerra, C. F., Bickelhaupt, F. M., & van Delft, F. L. Highly accelerated inverse electron-demand cycloaddition of electron-deficient azides with aliphatic cyclooctynes. *Nat Commun* **5**, 5378 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms6378>.
71. McKay, C. S., Blake, J. A., Cheng, J., Danielson, D. C. & Pezacki, J. P. Strain-promoted cycloadditions of cyclic nitrones with cyclooctynes for labeling human cancer cells. *Chem. Commun.* **47**, 10040 (2011). <https://doi.org/10.1039/c1cc13808a>.
72. Baldwin, J. E., Pudussery, R. G., Qureshi, A. K. & Sklarz, B. Valence rearrangement of hetero systems. The 4-isoxazolines. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5325–5326 (1968). <https://doi.org/10.1021/ja01021a078>.
73. McKay, C. S., Moran, J. & Pezacki, J. P. Nitrones as dipoles for rapid strain-promoted 1,3-dipolar cycloadditions with cyclooctynes. *Chem. Commun.* **46**, 931–933 (2010). <https://doi.org/10.1039/b921630h>.
74. Sanders, B. C., Friscourt, F., Ledin, P. A., Mbua, N. E., Arumugam, S., Guo, J., Boltje, T. J., Popik, V. V., & Boons, G. J. Metal-Free Sequential [3 + 2]-Dipolar Cycloadditions using Cyclooctynes and 1,3-Dipoles of Different Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 949–957 (2011). <https://doi.org/10.1021/ja1081519>.
75. Singh, I. & Heaney, F. Solid phase strain promoted “click” modification of DNA via [3+2]-nitrile oxide–cyclooctyne cycloadditions. *Chem. Commun.* **47**, 2706–2708 (2011). <https://doi.org/10.1039/C0CC03985C>.
76. Diels, O. & Alder, K. Synthesen in der hydro-aromatischen Reihe, II. Mitteilung: Über Cantharidin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **62**, 554–562 (1929). <https://doi.org/10.1002/cber.19290620318>.
77. Oliveira, B. L., Guo, Z. & Bernardes, G. J. L. Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4895–4950 (2017). <https://doi.org/10.1039/C7CS00184C>.

78. Carboni, R. A. & Lindsey, R. V. Jr. Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4342–4346 (1959). <https://doi.org/10.1021/ja01525a060>.
79. Sauer, J. Heldmann, D. K., Hetzenegger, J., Krauthan, J., Sichert, H. & Schuster, J. 1,2,4,5-Tetrazine: Synthesis and Reactivity in [4+2] Cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2885–2896 (1998). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199812\)1998:12<2885::AID-EJOC2885>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199812)1998:12<2885::AID-EJOC2885>3.0.CO;2-L).
80. Blackman, M. L., Royzen, M. & Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13518–13519 (2008). <https://doi.org/10.1021/ja8053805>.
81. Devaraj, N. K., Weissleder, R. & Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjug Chem* **19**, 2297–2299 (2008). <https://doi.org/10.1021/bc8004446>.
82. Taylor, M. T., Blackman, M. L., Dmitrenko, O. & Fox, J. M. Design and Synthesis of Highly Reactive Dienophiles for the Tetrazine–trans-Cyclooctene Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9646–9649 (2011). <https://doi.org/10.1021/ja201844c>.
83. Darko, A., Wallace, S., Dmitrenko, O., Machovina, M. M., Mehl, R. A., Chin, J. W., & Fox, J. M. Conformationally strained trans-cyclooctene with improved stability and excellent reactivity in tetrazine ligation. *Chem. Sci.* **5**, 3770–3776 (2014). <https://doi.org/10.1039/C4SC01348D>.
84. Ravasco, J. M. J. M. & Coelho, J. A. S. Predictive Multivariate Models for Bioorthogonal Inverse-Electron Demand Diels–Alder Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 4235–4241 (2020). <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11948>.
85. Rossin, R. *et al.* Highly Reactive trans-Cyclooctene Tags with Improved Stability for Diels–Alder Chemistry in Living Systems. *Bioconjug Chem.* **24**, 1210–1217 (2013). <https://doi.org/10.1021/bc400153y>.
86. Handula, M., Chen, K.-T. & Seimbille, Y. IEDDA: An Attractive Bioorthogonal Reaction for Biomedical Applications. *Molecules* **26**, 4640 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26154640>.
87. Karver, M. R., Weissleder, R. & Hilderbrand, S. A. Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation. *Bioconjug Chem.* **22**, 2263–2270 (2011). <https://doi.org/10.1021/bc200295y>.

88. Clovis, J. S., Eckell, A., Huisgen, R. & Sustmann, R. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXV. Der Nachweis des freien Diphenylnitrilimins als Zwischenstufe bei Cycloadditionen. *Chemische Berichte* **100**, 60–70 (1967). <https://doi.org/10.1002/cber.19671000108>.
89. Song, W., Wang, Y., Qu, J., Madden, M. M. & Lin, Q. A Photoinducible 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction for Rapid, Selective Modification of Tetrazole-Containing Proteins. *Angew Chem Int Ed* **47**, 2832–2835 (2008). <https://doi.org/10.1002/anie.200705805>.
90. Song, W., Wang, Y., Qu, J. & Lin, Q. Selective Functionalization of a Genetically Encoded Alkene-Containing Protein via “Photoclick Chemistry” in Bacterial Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9654–9655 (2008). <https://doi.org/10.1021/ja803598e>.
91. Ramil, C. P. & Lin, Q. Photoclick chemistry: A fluorogenic light-triggered in vivo ligation reaction. *Curr Opin Chem Biol* **0**, 89–95 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.024>.
92. Stöckmann, H., Neves, A. A., Stairs, S., Brindle, K. M. & Leeper, F. J. Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 7303 (2011). <https://doi.org/10.1039/c1ob06424j>.
93. Stairs, S. *et al.* Metabolic Glycan Imaging by Isonitrile–Tetrazine Click Chemistry. *Chembiochem* **14**, 1063–1067 (2013). <https://doi.org/10.1002/cbic.201300130>.
94. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation. *J Am Chem Soc.* **133**, 17570–17573 (2011). <https://doi.org/10.1021/ja2072934>.
95. Hooker, J. M., Kovacs, E. W. & Francis, M. B. Interior Surface Modification of Bacteriophage MS2. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3718–3719 (2004). <https://doi.org/10.1021/ja031790q>.
96. Addy, P. S., Erickson, S. B., Italia, J. S. & Chatterjee, A. A Chemoselective Rapid Azo-Coupling Reaction (CRACR) for Unclickable Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 11670–11673 (2017). <https://doi.org/10.1021/jacs.7b05125>.
97. Kang, D. & Kim, J. Bioorthogonal Retro-Cope Elimination Reaction of *N,N*-Dialkylhydroxylamines and Strained Alkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 5616–5621 (2021). <https://doi.org/10.1021/jacs.1c00885>.
98. Eychenne, R., Chérel, M., Haddad, F., Guérard, F. & Gestin, J.-F. Overview of the Most Promising Radionuclides for Targeted Alpha Therapy: The “Hopeful Eight”. *Pharmaceutics* **13**, 906 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060906>.

99. Guérard, F. Propriétés et applications de l'astate en médecine nucléaire. *Techniques de l'Ingénieur* <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharmath15/imagerie-medicale-therapies-par-ondes-42607210/proprietes-et-applications-de-l-astate-en-medicine-nucleaire-in225/>.
100. Pu, Y., Wang, C., Zhao, S., Xie, R., Zhao, L., Li, K., Yang, C., Zhang, R., Tian, Y., Tan, L., Li, J., Li, S., Chen, L., & Sun, H. The clinical application of 18F-FDG PET/CT in pancreatic cancer: a narrative review. *Transl Cancer Res* **10**, 3560–3575 (2021). <https://doi.org/10.21037/tcr-21-169>.
101. Koppula, B. R., Morton, K. A., Al-Dulaimi, R., Fine, G. C., Damme, N. M., & Brown, R. K. J. SPECT/CT in the Evaluation of Suspected Skeletal Pathology. *Tomography* **7**, 581–605 (2021). <https://doi.org/10.3390/tomography7040050>.
102. Gudkov, S., Shilyagina, N., Vodeneev, V. & Zvyagin, A. Targeted Radionuclide Therapy of Human Tumors. *Int J Mol Sci*. **17**, 33 (2015). <https://doi.org/10.3390/ijms17010033>.
103. Aghevlian, S., Boyle, A. J. & Reilly, R. M. Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting α -particles or Auger electrons. *Adv Drug Deliv Rev*. **109**, 102–118 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.003>.
104. Lin, M., Paolillo, V., Le, D. B., Macapinlac, H. & Ravizzini, G. C. Monoclonal antibody based radiopharmaceuticals for imaging and therapy. *Curr Probl Cancer*. **45**, 100796 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2021.100796>.
105. Hennrich, U. & Benešová, M. [68Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals (Basel)* **13**, 38 (2020). <https://doi.org/10.3390/ph13030038>.
106. Rong, J., Haider, A., Jeppesen, T. E., Josephson, L. & Liang, S. H. Radiochemistry for positron emission tomography. *Nat Commun* **14**, 3257 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36377-4>.
107. Juweid, M. E. Radioimmunotherapy with 131I-Rituximab: What We Know and What We Don't Know. *Cancer Biother Radiopharm*. **18** (4), 489-495 (2003). <https://doi.org/10.1089/108497803322287565>.
108. Petrov, S. A., Yusubov, M. S., Beloglazkina, E. K. & Nenajdenko, V. G. Synthesis of Radioiodinated Compounds. Classical Approaches and Achievements of Recent Years. *Int J Mol Sci*. **23**, 13789 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms232213789>.

109. Chomet, M., van Dongen, G. A. M. S. & Vugts, D. J. State of the Art in Radiolabeling of Antibodies with Common and Uncommon Radiometals for Preclinical and Clinical Immuno-PET. *Bioconjug Chem.* **32**, 1315–1330 (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00136>.
110. Bolton, A. E. & Hunter, W. M. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. *Biochem J.* **133**, 529–538 (1973). <https://doi.org/10.1042/bj1330529>.
111. Cavina, L., van der Born, D., Klaren, P. H. M., Feiters, M. C., Boerman, O. C., & Rutjes, F. P. J. T. Design of Radioiodinated Pharmaceuticals: Structural Features Affecting Metabolic Stability towards in Vivo Deiodination. *European J Org Chem.* **2017**, 3387–3414 (2017). <https://doi.org/10.1002/ejoc.201601638>.
112. Guérard, F., Navarro, L., Lee, Y. S., Roumesy, A., Alliot, C., Chérel, M., Brechbiel, M. W., & Gestin, J. F. Bifunctional arylodonium salts for highly efficient radioiodination and astatination of antibodies. *Bioorg Med Chem.* **25**, 5975–5980 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.022>.
113. Tang, Y., Hu, Y., Liu, W., Chen, L., Zhao, Y., Ma, H., Yang, J., Yang, Y., Liao, J., Cai, J., Chen, Y., & Liu, N. A radiopharmaceutical [⁸⁹Zr]Zr-DFO-nimotuzumab for immunoPET with epidermal growth factor receptor expression in vivo. *Nuclear Medicine and Biology* **70**, 23–31 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.01.007>.
114. Wei, W., Rosenkrans, Z. T., Liu, J., Huang, G., Luo, Q. Y., & Cai, W. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **120**, 3787–3851 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00738>.
115. Berdal, M., Gouard, S., Eychenne, R., Marionneau-Lambot, S., Croyal, M., Faivre-Chauvet, A., Chérel, M., Gaschet, J., Gestin, J-F. & Guérard, F. Investigation on the reactivity of nucleophilic radiohalogens with arylboronic acids in water: access to an efficient single-step method for the radioiodination and astatination of antibodies. *Chem. Sci.* **12**, 1458–1468 (2021). <https://doi.org/10.1039/D0SC05191H>.
116. Ochtrop, P. & Hackenberger, C. P. R. Recent advances of thiol-selective bioconjugation reactions. *Curr Opin Chem Biol.* **58**, 28–36 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.017>.
117. Bolzati, C. & Spolaore, B. Enzymatic Methods for the Site-Specific Radiolabeling of Targeting Proteins. *Molecules* **26**, 3492 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26123492>.

118. Eychenne, R., Alliot, C., Gestin, J.-F. & Guérard, F. Radiolabeling chemistry with heavy halogens iodine and astatine. *Nucl. Med. Mol. Imaging.* 121–132 (2022). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822960-6.00013-2>.
119. Van Staveren, D. R., Mundwiler, S., Hoffmanns, U., Pak, J. K., Spingler, B., Metzler-Nolte, N. & Alberto, R. Conjugation of a novel histidine derivative to biomolecules and labelling with $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2593 (2004). <https://doi.org/10.1039/B405575F>.
120. Mindt, T. L., Struthers, H., Brans, L., Anguelov, T., Schweinsberg, C., Maes, V., Tourwé, D., & Schibli, R. “Click to Chelate”: Synthesis and Installation of Metal Chelates into Biomolecules in a Single Step. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15096–15097 (2006). <https://doi.org/10.1021/ja066779f>.
121. Erfani, M., Malek, H., Sadat Ebrahimi, S. E. & Hassanzadeh, L. New $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -radiolabeled arylpiperazine pharmacophore as potent 5HT_{1A} serotonin receptor radiotracer: Docking studies, chemical synthesis, radiolabeling, and biological evaluation. *J Labelled Comp Radiopharm.* **62**, 166–177 (2019). <https://doi.org/10.1002/jlcr.3709>.
122. Giammei, C., Balber, T., Benčurová, K., Cardinale, J., Berroterán-Infante, N., Brandt, M., Jouini, N., Hacker, M., Mitterhauser, M., & Mindt, T. L. Sorbitol as a Polar Pharmacological Modifier to Enhance the Hydrophilicity of ^{99m}Tc -Tricarbonyl-Based Radiopharmaceuticals. *Molecules* **25**, 2680 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25112680>.
123. Wharton, L., Jaraquemada-Peláez, M. G., Zhang, C., Zeisler, J., Rodríguez-Rodríguez, C., Osooly, M., Radchenko, V., Yang, H., Lin, K. S., Bénard, F., Schaffer, P., & Orvig, C. H₄picoopa—Robust Chelate for $^{225}\text{Ac}/^{111}\text{In}$ Theranostics. *Bioconjug Chem.* **33**, 1900–1921 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00364>.
124. Wharton, L., Zhang, C., Zeisler, J., Rodríguez-Rodríguez, C., Osooly, M., Radchenko, V., Yang, H., Lin, K.-S., Bénard, F., Schaffer, P. & Orvig, C. H₃TPAN-Triazole-Bn-NH₂: Tripicolinate Clicked-Bifunctional Chelate for $[^{225}\text{Ac}]/[^{111}\text{In}]$ Theranostics. *Bioconjug Chem.* **33**, 2381–2397 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00465>.
125. Pisaneschi, F., Kelderhouse, L. E., Hardy, A., Engel, B. J., Mukhopadhyay, U., Gonzalez-Lepera, C., Gray, J. P., Ornelas, A., Takahashi, T. T., Roberts, R. W., Fiacco, S. V., Piwnica-Worms, D., & Millward, S. W. Automated, Resin-Based Method to Enhance the Specific Activity of Fluorine-18 Clicked PET Radiotracers. *Bioconjug Chem.* **28**, 583–589 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00678>.
126. Walker, D., Li, Y., Roxin, Á., Schaffer, P., Adam, M. J., & Perrin, D. M. Facile synthesis and ^{18}F -radiolabeling of α 4 β 1 -specific LLP2A-aryltrifluoroborate peptidomimetic conjugates. *Bioorg Med Chem Lett.* **26**, 5126–5131 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.011>.

127. Iannone, M. N. *et al.* Synthesis and automated fluorine-18 radiolabeling of new PSMA-617 derivatives with a CuAAC radiosynthetic approach. *J Labelled Comp Radiopharm.* **65**, 48–62 (2022). <https://doi.org/10.1002/jlcr.3959>.
128. Yan, R., Sander, K., Galante, E., Rajkumar, V., Badar, A., Robson, M., El-Emir, E., Lythgoe, M. F., Pedley, R. B., & Årstad, E. A One-Pot Three-Component Radiochemical Reaction for Rapid Assembly of ¹²⁵I-Labeled Molecular Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 703–709 (2013). <https://doi.org/10.1021/ja307926g>.
129. Denk, C., Wilkovitsch, M., Aneheim, E., Herth, M. M., Jensen, H., Lindegren, S., & Mikula, H. Multifunctional Clickable Reagents for Rapid Bioorthogonal Astatination and Radio-Crosslinking. *ChemPlusChem.* **84**, 775–778 (2019). <https://doi.org/10.1002/cplu.201900114>.
130. Quigley, N. G., Steiger, K., Hoberück, S., Czech, N., Zierke, M. A., Kossatz, S., Pretze, M., Richter, F., Weichert, W., Pox, C., Kotzerke, J., & Notni, J. PET/CT imaging of head-and-neck and pancreatic cancer in humans by targeting the “Cancer Integrin” $\alpha\beta 6$ with Ga-68-Trivehexin. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **49**, 1136–1147 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05559-x>.
131. Reissig, F., Bauer, D., Zarschler, K., Novy, Z., Bendova, K., Ludik, M. C., Kopka, K., Pietzsch, H. J., Petrik, M., & Mamat, C. Towards Targeted Alpha Therapy with Actinium-225: Chelators for Mild Condition Radiolabeling and Targeting PSMA—A Proof of Concept Study. *Cancers (Basel)* **13**, 1974 (2021). <https://doi.org/10.3390/cancers13081974>.
132. Baranski, A. C., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Wacker, A., Schmidt, J., Liolios, C., Mier, W., Haberkorn, U., Eisenhut, M., Kopka, K., & Eder, M. Improving the Imaging Contrast of ⁶⁸Ga-PSMA-11 by Targeted Linker Design: Charged Spacer Moieties Enhance the Pharmacokinetic Properties. *Bioconjug Chem.* **28**, 2485–2492 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00458>.
133. Hugenberg, V., Hermann, S., Galla, F., Schäfers, M., Wunsch, B., Kolb, H. C., Szardenings, K., Lebedev, A., Walsh, J. C., Mocharla, V. P., Gangadharmath, U. B., Kopka, K., & Wagner, S. Radiolabeled hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitors: How chemical modifications affect pharmacokinetics and metabolic stability. *Nucl Med Biol.* **43**, 424–437 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.03.005>.
134. Grob, N. M., Schibli, R., Béhé, M., Valverde, I. E. & Mindt, T. L. 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles as Amide Bond Isosteres Yield Novel Tumor-Targeting Minigastrin Analogs. *ACS Med. Chem. Lett.* **12**, 585–592 (2021). <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00636>.
135. Cai, Z., Ouyang, Q., Zeng, D., Nguyen, K. N., Modi, J., Wang, L., White, A. G., Rogers, B. E., Xie, X. Q., & Anderson, C. J. ⁶⁴Cu-Labeled Somatostatin Analogues Conjugated with Cross-Bridged

- Phosphonate-Based Chelators via Strain-Promoted Click Chemistry for PET Imaging: In silico through in Vivo Studies. *J Med Chem.* **57**, 6019–6029 (2014). <https://doi.org/10.1021/jm500416f>.
136. Kwon, D., Lozada, J., Zhang, Z., Zeisler, J., Poon, R., Zhang, C., Roxin, Á., Lin, K. S., Perrin, D., & Benard, F. High-Contrast CXCR4-Targeted ¹⁸F-PET Imaging Using a Potent and Selective Antagonist. *Mol. Pharmaceutics* **18**, 187–197 (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00785>.
137. Campbell-Verduyn, L. S., Mirfeizi, L., Schoonen, A.K., Dierckx, R.A. Elsinga, P.H. & Feringa, B. L. Strain-Promoted Copper-Free “Click” Chemistry for ¹⁸F Radiolabeling of Bombesin. *Angew Chem Int Ed* **50**, 11117–11120 (2011). <https://doi.org/10.1002/anie.201105547>.
138. Vaidyanathan, G., McDougald, D., Choi, J., Pruszynski, M., Koumariou, E., Zhou, Z., & Zalutsky, M. R. N-Succinimidyl 3-((4-(4-[¹⁸F]fluorobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-5-(guanidinomethyl)benzoate ([¹⁸F]SFBTMGMB): a residualizing label for ¹⁸F-labeling of internalizing biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 1261–1271 (2016). <https://doi.org/10.1039/c5ob02258d>.
139. Zhou, Z., Chitneni, S. K., Devoogdt, N., Zalutsky, M. R. & Vaidyanathan, G. Fluorine-18 labeling of an anti-HER2 VHH using a residualizing prosthetic group via a strain-promoted click reaction: Chemistry and preliminary evaluation. *Bioorg Med Chem.* **26**, 1939–1949 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.040>.
140. Zeng, D., Guo, Y., White, A. G., Cai, Z., Modi, J., Ferdani, R., & Anderson, C. J. Comparison of Conjugation Strategies of Cross-Bridged Macrocyclic Chelators with Cetuximab for Copper-64 Radiolabeling and PET Imaging of EGFR in Colorectal Tumor-Bearing Mice. *Mol. Pharmaceutics* **11**, 3980–3987 (2014). <https://doi.org/10.1021/mp500004m>.
141. Lodhi, N. A., Park, J. Y., Kim, K., Kim, Y. J., Shin, J. H., Lee, Y-S., Im, Y-J., Jeong, J. M., Khalid, M., Cheon, G. J., Lee, D. S. & Kang, K. W. Development of ^{99m}Tc-Labeled Human Serum Albumin with Prolonged Circulation by Chelate-then-Click Approach: A Potential Blood Pool Imaging Agent. *Mol. Pharmaceutics* **16**, 1586–1595 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01258>.
142. Ahn, S. H., Vaughn, B. A., Solis, W. A., Luper Jr, M. L., Hallam, T. J. & Boros, E. Site-Specific ⁸⁹Zr- and ¹¹¹In-Radiolabeling and In Vivo Evaluation of Glycan-free Antibodies by Azide–Alkyne Cycloaddition with a Non-natural Amino Acid. *Bioconjug Chem.* **31**, 1177–1187 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00100>.
143. Wang, Y., Zhang, C., Lai, J., Zhao, Y., Lu, D., Bao, R., Feng, X., Zhang, T., & Liu, Z. Noninvasive PET tracking of post-transplant gut microbiota in living mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **47**, 991–1002 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04639-3>.

144. Kettenbach, K., Reffert, L. M., Schieferstein, H., Pektor, S., Eckert, R., Miederer, M., Rösch, F., & Ross, T. L. Comparison Study of Two Differently Clicked ¹⁸F-Folates—Lipophilicity Plays a Key Role. *Pharmaceuticals* **11**, 30 (2018). <https://doi.org/10.3390/ph11010030>.
145. Li, Z., Cai, H., Hassink, M., Blackman, M. L., Brown, R. C., Conti, P. S., & Fox, J. M. Tetrazine–trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of ¹⁸F labeled probes. *Chem. Commun.* **46**, 8043 (2010). <https://doi.org/10.1039/c0cc03078c>.
146. Albu, S. A., Al-Karmi, S. A., Vito, A., Dzandzi, J. P., Zlitni, A., Beckford-Vera, D., Blacker, M., Janzen, N., Patel, R. M., Capretta, A., & Valliant, J. F. ¹²⁵I-Tetrazines and Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Chemistry: A Convenient Radioiodination Strategy for Biomolecule Labeling, Screening, and Biodistribution Studies. *Bioconjug Chem.* **27**, 207–216 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00609>.
147. Zeglis, B. M., Mohindra, P., Weissmann, G. I., Divilov, V., Hilderbrand, S. A., Weissleder, R., & Lewis, J. S. Modular Strategy for the Construction of Radiometalated Antibodies for Positron Emission Tomography Based on Inverse Electron Demand Diels–Alder Click Chemistry. *Bioconjug Chem* **22**, 2048–2059 (2011). <https://doi.org/10.1021/bc200288d>.
148. Poty, S., Membreno, R., Glaser, J. M., Ragupathi, A., Scholz, W. W., Zeglis, B. M., & Lewis, J. S. The inverse electron-demand Diels–Alder reaction as a new methodology for the synthesis of ²²⁵Ac-labelled radioimmunoconjugates. *Chem. Commun.* **54**, 2599–2602 (2018). <https://doi.org/10.1039/c7cc09129j>.
149. Zhou, Z., Meshaw, R., Zalutsky, M. R. & Vaidyanathan, G. Site-Specific and Residualizing Linker for ¹⁸F Labeling with Enhanced Renal Clearance: Application to an Anti-HER2 Single-Domain Antibody Fragment. *J Nucl Med.* **62**, 1624–1630 (2021). <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.261446>.
150. Booth, B. J., Ramakrishnan, B., Narayan, K., Wollacott, A. M., Babcock, G. J., Shriver, Z., & Viswanathan, K. Extending human IgG half-life using structure-guided design. *MAbs* **10**, 1098–1110 (2018). <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1490119>.
151. Verhoeven, M., Seimbille, Y. & Dalm, S. U. Therapeutic Applications of Pretargeting. *Pharmaceutics* **11**, 434 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090434>.
152. Altai, M., Membreno, R., Cook, B., Tolmachev, V. & Zeglis, B. M. Pretargeted Imaging and Therapy. *J Nucl Med* **58**, 1553–1559 (2017). <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.189944>.
153. Goodwin, D., Meares, C., Diamanti, C., McCall, M., Lai, C., Torti, F., McTigue, M., & Martin, B. Use of specific antibody for rapid clearance of circulating blood background from radiolabeled

tumor imaging proteins. *Eur J Nucl Med* **9**, 209–215 (1984).
<https://doi.org/10.1007/BF00448541>.

154. Reardan, D. T., Meares, C. F., Goodwin, D. A., McTigue, M., David, G. S., Stone, M. R., Leung, J. P., Bartholomew, R. M., & Frincke, J. M. Antibodies against metal chelates. *Nature* **316**, 265–268 (1985). <https://doi.org/10.1038/316265a0>.

155. Hnatowich, D. J., Virzi, F. & Rusckowski, M. Investigations of Avidin and Biotin for Imaging Applications. **28**, (1987).

156. Weiden, P. L. & Breitz, H. B. Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT™) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **40**, 37–51 (2001).
[https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00133-0).

157. Grana, C., Chinol, M., Robertson, C., Mazzetta, C., Bartolomei, M., De Cicco, C., Fiorenza, M., Gatti, M., Caliceti, P., & Paganelli, G. Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with Yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: A pilot study. *Br J Cancer* **86**, 207–212 (2002).
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600047>.

158. Goodwin, D. A., Meares, C. F., McCall, M. J. & McTigue, M. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J Nucl Med.* **29**, 226-234 (1988).

159. Summerton, J., Stein, D., Huang, S. B., Matthews, P., Weller, D., & Partridge, M. Morpholino and Phosphorothioate Antisense Oligomers Compared in Cell-Free and In-Cell Systems. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**, 63–70 (1997). <https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.63>.

160. Liu, G., Dou, S., Liu, Y., Wang, Y., Rusckowski, M., & Hnatowich, D. J. 90Y labeled Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer for Pretargeting Radiotherapy. *Bioconjug Chem.* **22**, 2539–2545 (2011). <https://doi.org/10.1021/bc200366t>.

161. Leonidova, A., Foerster, C., Zarschler, K., Schubert, M., Pietzsch, H. J., Steinbach, J., Bergmann, R., Metzler-Nolte, N., Stephan, H., & Gasser, G. *In vivo* demonstration of an active tumor pretargeting approach with peptide nucleic acid bioconjugates as complementary system. *Chem. Sci.* **6**, 5601–5616 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5sc00951k>.

162. Vugts, D. J., Vervoort, A., Stigter-van Walsum, M., Visser, G. W., Robillard, M. S., Versteegen, R. M., Vulders, R. C., Herscheid, J. K., & van Dongen, G. A. Synthesis of Phosphine and Antibody–Azide Probes for in Vivo Staudinger Ligation in a Pretargeted Imaging and Therapy Approach. *Bioconjug Chem.* **22**, 2072–2081 (2011). <https://doi.org/10.1021/bc200298v>.

163. van den Bosch, S. M., Rossin, R., Renart Verkerk, P., Ten Hoeve, W., Janssen, H. M., Lub, J., & Robillard, M. S. Evaluation of strained alkynes for Cu-free click reaction in live mice. *Nucl Med Biol.* **40**, 415–423 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.12.006>.
164. Qian, R., Jing, B., Jiang, D., Gai, Y., Zhu, Z., Huang, X., Gao, Y., Lan, X., & An, R. Multi-antitumor therapy and synchronous imaging monitoring based on exosome. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **49**, 2668–2681 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05696-x>.
165. Au, K. M., Tripathy, A., Lin, C. P., Wagner, K., Hong, S., Wang, A. Z., & Park, S. I. Bespoke Pretargeted Nanoradioimmunotherapy for the Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma. *ACS Nano.* **12**, 1544–1563 (2018). <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08122>.
166. Rossin, R., Verkerk, P. R., van den Bosch, S. M., Vulders, R. C., Verel, I., Lub, J., & Robillard, M. S. In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew Chem Int Ed.* **122**, 3447–3450 (2010). <https://doi.org/10.1002/anie.200906294>.
167. Houghton, J. L., Zeglis, B. M., Abdel-Atti, D., Sawada, R., Scholz, W. W., & Lewis, J. S. Pretargeted Immuno-PET of Pancreatic Cancer: Overcoming Circulating Antigen and Internalized Antibody to Reduce Radiation Doses. *J Nucl Med.* **57**, 453–459 (2016). <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.163824>.
168. Houghton, J. L., Membreno, R., Abdel-Atti, D., Cunanan, K. M., Carlin, S., Scholz, W. W., Zanzonico, P. B., Lewis, J. S., & Zeglis, B. M. Establishment of the *In Vivo* Efficacy of Pretargeted Radioimmunotherapy Utilizing Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. *Mol Cancer Ther.* **16**, 124–133 (2017). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0503>.
169. Membreno, R., Cook, B. E., Fung, K., Lewis, J. S. & Zeglis, B. M. Click-Mediated Pretargeted Radioimmunotherapy of Colorectal Carcinoma. *Mol. Pharmaceutics* **15**, 1729–1734 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00093>.
170. Shah, M. A., Zhang, X., Rossin, R., Robillard, M. S., Fisher, D. R., Bueltmann, T., Hoeben, F. J. M., & Quinn, T. P. Metal-Free Cycloaddition Chemistry Driven Pretargeted Radioimmunotherapy Using α -Particle Radiation. *Bioconjug Chem.* **28**, 3007–3015 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00612>.
171. Keinänen, O., Fung, K., Brennan, J. M., Zia, N., Harris, M., van Dam, E., Biggin, C., Hedt, A., Stoner, J., Donnelly, P. S., Lewis, J. S., & Zeglis, B. M. Harnessing ^{64}Cu / ^{67}Cu for a theranostic approach to pretargeted radioimmunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 28316–28327 (2020). <https://doi.org/10.1073/pnas.2009960117>.

172. Maitz, C. A., Delaney, S., Cook, B. E., Genady, A. R., Hoerres, R., Kuchuk, M., Makris, G., Valliant, J. F., Sadeghi, S., Lewis, J. S., Hennkens, H. M., Bryan, J. N., & Zeglis, B. M. Pretargeted PET of Osteodestructive Lesions in Dogs. *Mol. Pharmaceutics* **19**, 3153–3162 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00220>.
173. Ollis, W. D. & Poole, V. D. 73. Cyclic meso-ionic compounds. Part I. The structure of the sydnones and related compounds. *J. Chem. Soc.* 307-314 (1949). <https://doi.org/10.1039/JR9490000307>.
174. Decuypère, E., Plougastel, L., Audisio, D. & Taran, F. Sydnone–alkyne cycloaddition: applications in synthesis and bioconjugation. *Chem. Commun.* **53**, 11515–11527 (2017). <https://doi.org/10.1039/C7CC06405E>.
175. Browne, D. L. & Harrity, J. P. A. Recent developments in the chemistry of sydnones. *Tetrahedron* **66**, 553–568 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.10.085>.
176. Ear, J. C. & Mackney, A. W., The Action of Acetic Anhydride on *N*-nitrosophenylglycine and some of its derivatives. *J. Chem. Soc.* 899-900 (1935). <https://doi.org/10.1039/JR9350000899>.
177. Champagne, P. A. & Houk, K. N. Influence of Endo- and Exocyclic Heteroatoms on Stabilities and 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactivities of Mesoionic Azomethine Ylides and Imines. *J. Org. Chem.* **82**, 10980–10988 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01928>.
178. Baker, W., Ollis, W. D. & Poole, V. D. 320. Cyclic meso-ionic compounds. Part III. Further properties of the sydnones and the mechanism of their formation. *J. Chem. Soc.* 1542 (1950) <https://doi.org/10.1039/JR9500001542>.
179. Applegate, J. & Turnbull, K. The Efficient Synthesis of 3-Arylsydnones Under Neutral Conditions. *Synthesis* **1988**, 1011–1012 (1988). <https://doi.org/10.1055/s-1988-27791>.
180. Isobe, T. & Ishikawa, T. 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium Chloride. 2. Its Application to the Construction of Heterocycles through Dehydration Reactions. *J. Org. Chem.* **64**, 6989–6992 (1999). <https://doi.org/10.1021/jo9909756>.
181. Azarifar, D., Tajbaksh, M., Ghasemnejad-Bosra, H. & Ghorbani-Vaghei, R. *N,N,N',N'*-Tetrabromobenzene-1,3-disulfonamide (TBBDS) as an Efficient Promoter for One-Pot Conversion of *N*-Arylglycines to Sydnones in the Presence of $\text{NaNO}_2/\text{Ac}_2\text{O}$ under Neutral Conditions. *HETEROCYCLES* **68**, 2343 (2006). <https://doi.org/10.3987/com-06-10859>.
182. Azarifar, D. & Ghasemnejad-Bosra, H. Catalytic Activity of 1,3-Dibromo-5,5-dimethylhydantoin (DBH) in the One-Pot Transformation of *N*-Arylglycines to *N*-Arylsydnones in the Presence of $\text{NaNO}_2/\text{Ac}_2\text{O}$ under Neutral Conditions: Subsequent Bromination of these

Sydnones to Their 4-Bromo Derivatives. *ChemInform* **37**, 1123-1126 (2006). <https://doi.org/10.1055/s-2006-926380>.

183. Azarifar, D., Ghasemnejad-Bosra, H., Tajbaksh, M. & Habibzadeh, S. One-Pot Conversion of N-Arylglycines to Sydnones Efficiently Promoted by Bis-chlorine-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane Complex (Cl₂-DABCO) in the Presence of NaNO₂/Ac₂O under Neutral Conditions. *HETEROCYCLES* **71**, 1815 (2007). <https://doi.org/10.3987/com-07-11033>.

184. Specklin, S., Decuypere, E., Plougastel, L., Aliani, S. & Taran, F. One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted Pyrazoles from Arylglycines via Copper-Catalyzed Sydnone-Alkyne Cycloaddition Reaction. *J. Org. Chem.* **79**, 7772–7777 (2014). <https://doi.org/10.1021/jo501420r>.

185. Dol, R., Vemulapalli, S., Azeez, O. & Dudding, T. A catalytic one-pot synthesis of sydnone heterocycles with mechanistic insights. *Tetrahedron* **148**, 133704 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2023.133704>.

186. Pétry, N., Vanderbeeken, T., Malher, A., Bringer, Y., Retailleau, P., Bantreil, X., & Lamaty, F. Mechanosynthesis of sydnone-containing coordination complexes. *Chem. Commun.* **55**, 9495–9498 (2019). <https://doi.org/10.1039/c9cc04673a>.

187. Jendrossek, V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer Lett.* **332**, 313–324 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.01.012>.

188. Boyd, S. T. & Fremming, B. A. Rimonabant—A Selective CB1 Antagonist. *Ann Pharmacother* **39**, 684–690 (2005). <https://doi.org/10.1345/aph.1E499>.

189. Byon, W., Garonzik, S., Boyd, R. A. & Frost, C. E. Apixaban: A Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Review. *Clin Pharmacokinet* **58**, 1265–1279 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40262-019-00775-z>.

190. Zhang, L., Zhang, X., Yao, Z., Jiang, S., Deng, J., Li, B., & Yu, Z. Discovery of Fluorogenic Diarylsydnone-Alkene Photoligation: Conversion of ortho-Dual-Twisted Diarylsydnones into Planar Pyrazolines. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 7390–7394 (2018). <https://doi.org/10.1021/jacs.8b02493>.

191. Ikawa, T., Masuda, S., Nakajima, H. & Akai, S. 2-(Trimethylsilyl)phenyl Trimethylsilyl Ethers as Stable and Readily Accessible Benzyne Precursors. *J. Org. Chem.* **82**, 4242–4253 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00238>.

192. McMahon, T. C., Medina, J. M., Yang, Y. F., Simmons, B. J., Houk, K. N., & Garg, N. K. Generation and Regioselective Trapping of a 3,4-Piperidyne for the Synthesis of Functionalized Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 4082–4085 (2015). <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01589>.

193. Medina, J. M., McMahon, T. C., Jiménez-Osés, G., Houk, K. N. & Garg, N. K. Cycloadditions of Cyclohexynes and Cyclopentyne. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14706–14709 (2014). <https://doi.org/10.1021/ja508635v>.
194. Huisgen, R., Grashey, R., Gotthardt, H. & Schmidt, R. 1,3-Dipolar Additions of Sydnones to Alkynes. A New Route into the Pyrazole Series. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1**, 48–49 (1962). <https://doi.org/10.1002/anie.196200482>.
195. Houk, K. N., Sims, Joyner., Duke, R. E., Strozier, R. W. & George, J. K. Frontier molecular orbitals of 1,3 dipoles and dipolarophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 7287–7301 (1973). <https://doi.org/10.1021/ja00803a017>.
196. Padwa, A., Burgess, E. M., Gingrich, H. L. & Roush, D. M. On the problem of regioselectivity in the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of munchedones and sydnones with acetylenic dipolarophiles. *J. Org. Chem.* **47**, 786–791 (1982). <https://doi.org/10.1021/jo00344a008>.
197. Chang, E.-M., Chen, T.-H., Wong, F., Chang, E.-C. & Yeh, M.-Y. Convenient and Efficient Synthesis of Pyrazole-Based DHODase Inhibitors from 3-Aryl-4-cyanosydnone. *Synlett.* **2006**, 901–904 (2006). <https://doi.org/10.1055/s-2006-939041>.
198. Croce, P. D., La Rosa, C. & Zecchi, G. 1,3-Dipolar cycloadditions with alkynyl phenyl sulphones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2621 (1985). <https://doi.org/10.1039/P19850002621>.
199. Brown, A. W. & Harrity, J. P. A. Expanding available pyrazole substitution patterns by sydnone cycloaddition reactions. *Tetrahedron* **73**, 3160–3172 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.04.049>.
200. Brown, A. W., Fisher, M., Tozer, G. M., Kanthou, C. & Harrity, J. P. A. Sydnone Cycloaddition Route to Pyrazole-Based Analogs of Combretastatin A4. *J. Med. Chem.* **59**, 9473–9488 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01128>.
201. González-Nogal, A. M., Calle, M., Cuadrado, P. & Valero, R. 1,3-Dipolar cycloadditions of silicon and tin alkynes and alkenes. Regiospecific synthesis of silyl and stannylpyrazoles and pyrazolines. *Tetrahedron* **63**, 224–231 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.10.026>.
202. Browne, D. L., Helm, M. D., Plant, A. & Harrity, J. P. A. A Sydnone Cycloaddition Route to Pyrazole Boronic Esters. *Angew Chem Int Ed.* **46**, 8656–8658 (2007). <https://doi.org/10.1002/anie.200703767>.
203. Browne, D. L., Vivat, J. F., Plant, A., Gomez-Bengoia, E. & Harrity, J. P. A. Investigation of the Scope and Regiochemistry of Alkynylboronate Cycloadditions with Sydnones. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7762–7769 (2009). <https://doi.org/10.1021/ja902460n>.

204. Brown, A. W., Comas-Barceló, J. & Harrity, J. P. A. A Mild and Regiospecific Synthesis of Pyrazoleboranes. *Chem. Eur. J.* **23**, 5228–5231 (2017). <https://doi.org/10.1002/chem.201701019>.
205. Kolodych, S. *et al.* Discovery of Chemoselective and Biocompatible Reactions Using a High-Throughput Immunoassay Screening. *Angewandte Chemie* **125**, 12278–12282 (2013). <https://doi.org/10.1002/anie.201305645>.
206. Hein, J. E. & Fokin, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides. *Chem Soc Rev.* **39**, 1302–1315 (2010). <https://doi.org/10.1039/b904091a>.
207. Wezeman, T., Comas-Barceló, J., Nieger, M., Harrity, J. P. A. & Bräse, S. Synthesis of aminopyrazoles from sydnones and ynamides. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 1575–1579 (2017). <https://doi.org/10.1039/C6OB02518H>.
208. Decuypère, E., Riomet, M., Sallustrau, A., Bregant, S., Thai, R., Pieters, G., Clavier, G., Audisio, D. & Taran, F. Sydnone-coumarins as clickable turn-on fluorescent sensors for molecular imaging. *Chem. Commun.* **54**, 10758–10761 (2018). <https://doi.org/10.1039/C8CC06070C>.
209. Louis, M., Force, G., D'Anfray, T., Bourgeat, E., Romero, E., Thuéry, P., Audisio, D., Sallustrau, A., & Taran, F. Exploration of the Copper-Catalyzed Sydnone and Sydnimine-Alkyne Cycloaddition Reactions by High-Throughput Experimentation. *Chem. Eur. J.* **30**, e202302713 (2023). <https://doi.org/10.1002/chem.202302713>.
210. Comas-Barceló, J., Foster, R. S., Fiser, B., Gomez-Bengoa, E. & Harrity, J. P. A. Cu-Promoted Sydnone Cycloadditions of Alkynes: Scope and Mechanism Studies. *Chem. Eur. J.* **21**, 3257–3263 (2015). <https://doi.org/10.1002/chem.201406118>.
211. Theunissen, C., Lecomte, M., Jouvin, K., Laouiti, A., Guissart, C., Heimbürger, J., Loire, E. & Evano, G. Convenient and Practical Alkynylation of Heteronucleophiles with Copper Acetylides. *Synthesis* **46**, 1157–1166 (2014). <https://doi.org/10.1055/s-0033-1341025>.
212. Comas-Barceló, J., Blanco-Ania, D., van den Broek, S. A. M. W., Nieuwland, P. J., Harrity, J. P. A. & Rutjes, F. P. J. T. Cu-catalysed pyrazole synthesis in continuous flow. *Catal. Sci. Technol.* **6**, 4718–4723 (2016). <https://doi.org/10.1039/C5CY02247A>.
213. Lu, J., Man, Y., Zhang, Y., Lin, B., Lin, Q. & Weng, Z. Copper-catalyzed chemoselective synthesis of 4-trifluoromethyl pyrazoles. *RSC Adv.* **9**, 30952–30956 (2019). <https://doi.org/10.1039/C9RA07694H>.

214. Greco, C. V. & O'Reilly, B. P. Mesoionic compounds VI. Metallation of sydrones. An estimation of acidity. *J. Heterocycl. Chem.* **7**, 1433–1434 (1970). <https://doi.org/10.1002/jhet.5570070637>.
215. Brown, D. C. & Turnbull, K. Improved Method for the Iodination of Sydrones. *Synth. Commun.* **43**, 3233–3237 (2013). <https://doi.org/10.1080/00397911.2013.779713>.
216. Rodriguez, A. & Moran, W. Palladium-Catalysed Direct Arylation of Sydrones. *Synthesis* **2009**, 650–654 (2009). <https://doi.org/10.1055/s-0028-1083344>.
217. Pétry, N., Luttringer, F., Bantreil, X. & Lamaty, F. A mechanochemical approach to the synthesis of sydrones and derivatives. *Faraday Discuss.* **241**, 114–127 (2023). <https://doi.org/10.1039/D2FD00096B>.
218. Decuypere, E., Specklin, S., Gabillet, S., Audisio, D., Liu, H., Plougastel, L., Kolodych, S., & Taran, F. Copper(I)-Catalyzed Cycloaddition of 4-Bromosydrones and Alkynes for the Regioselective Synthesis of 1,4,5-Trisubstituted Pyrazoles. *Org. Lett.* **17**, 362–365 (2015). <https://doi.org/10.1021/ol503482a>.
219. Furuya, T., Kaiser, H. M. & Ritter, T. Palladium-Mediated Fluorination of Arylboronic Acids. *Angew Chem Int Ed.* **47**, 5993–5996 (2008). <https://doi.org/10.1002/anie.200802164>.
220. Liu, H., Audisio, D., Plougastel, L., Decuypere, E., Buisson, D. A., Koniev, O., Kolodych, S., Wagner, A., Elhabiri, M., Krzyczmonik, A., Forsback, S., Solin, O., Gouverneur, V., & Taran, F. Ultrafast Click Chemistry with Fluorosydrones. *Angew Chem Int Ed.* **55**, 12073–12077 (2016). <https://doi.org/10.1002/anie.201606495>.
221. Sloop, J. C., Holder, C. & Henary, M. Selective Incorporation of Fluorine in Pyrazoles, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 3405–3422 (2015). <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500258>.
222. Wallace, S. & Chin, J. W. Strain-promoted sydnone bicyclo-[6.1.0]-nonyne cycloaddition. *Chem. Sci.* **5**, 1742–1744 (2014). <https://doi.org/10.1039/C3SC53332H>.
223. Narayanam, M. K., Liang, Y., Houk, K. N. & Murphy, J. M. Discovery of new mutually orthogonal bioorthogonal cycloaddition pairs through computational screening. *Chem. Sci.* **7**, 1257–1261 (2016). <https://doi.org/10.1039/c5sc03259h>.
224. Plougastel, L., Koniev, O., Specklin, S., Decuypere, E., Créminon, C., Buisson, D. A., Wagner, A., Kolodych, S., & Taran, F. 4-Halogeno-sydrones for fast strain promoted cycloaddition with bicyclo-[6.1.0]-nonyne. *Chem. Commun.* **50**, 9376–9378 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4cc03816a>.

225. de la Concepción, J. G., Ávalos, M., Cintas, P. & Jiménez, J. L. Computational Screening of New Orthogonal Metal-Free Dipolar Cycloadditions of Mesomeric Betaines. *Chem. Eur. J.* **24**, 7507–7512 (2018). <https://doi.org/10.1002/chem.201800869>.
226. Gimadiev, T., Klimchuk, O., Nugmanov, R. I., Madzhidov, T. & Varnek, A. Sydnone-alkyne cycloaddition: Which factors are responsible for reaction rate? *J. Mol. Struct.* **1198**, 126897 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.126897>.
227. Tao, H., Liu, F., Zeng, R., Shao, Z., Zou, L., Cao, Y., Murphy, J. M., Houk, K. N. & Liang, Y. Origins of halogen effects in bioorthogonal sydnone cycloadditions. *Chem. Commun.* **54**, 5082–5085 (2018). <https://doi.org/10.1039/c8cc02128g>.
228. Chinoy, Z. S., Bodineau, C., Favre, C., Moremen, K. W., Durán, R. V., & Friscourt, F. Selective Engineering of Linkage-Specific α 2,6-N-Linked Sialoproteins Using Sydnone-Modified Sialic Acid Bioorthogonal Reporters. *Angew Chem Int Ed.* **58**, 4281–4285 (2019). <https://doi.org/10.1002/anie.201814266>.
229. Favre, C. & Friscourt, F. Fluorogenic Sydnone-Modified Coumarins Switched-On by Copper-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **20**, 4213–4217 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01587>.
230. Shao, Z., Zhang, C., Zhu, X., Wang, Y., Xu, W., Chen, Y., Wang, X., Zhu, H. & Liang, Y. Design of a 1,8-naphthalimide-based OFF-ON type bioorthogonal reagent for fluorescent imaging in live cells. *Chin. Chem. Lett.* **30**, 2169–2172 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.06.023>.
231. Plougastel, L., Pattanayak, M. R., Riomet, M., Bregant, S., Sallustrau, A., Nothisen, M., Wagner, A., Audisio, D. & Taran, F. Sydnone-based turn-on fluorogenic probes for no-wash protein labeling and in-cell imaging. *Chem. Commun.* **55**, 4582–4585 (2019). <https://doi.org/10.1039/C9CC01458F>.
232. Plougastel, L., Lamaa, D., Yen-Pon, E., Audisio, D. & Taran, F. Fluorogenic probes based on polycyclic sydnone scaffolds. *Tetrahedron* **76**, 131250 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131250>.
233. Narayanam, M. K., Ma, G., Champagne, P. A., Houk, K. N. & Murphy, J. M. Synthesis of [^{18}F]Fluoroarenes by Nucleophilic Radiofluorination of *N*-Arylsydnes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 13006–13010 (2017). <https://doi.org/10.1002/anie.202107495>.
234. Narayanam, M. K., Lai, B. T., Loredó, J. M., Wilson, J. A., Eliassen, A. M., LaBerge, N. A., Nason, M., Cantu, A. L., Luton, B. K., Xu, S., Agnew, H. D., & Murphy, J. M. Positron Emission Tomography

Tracer Design of Targeted Synthetic Peptides via ¹⁸F-Sydnone Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug Chem.* **32**, 2073–2082 (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00379>.

235. Richard, M., Truillet, C., Tran, V. L., Liu, H., Porte, K., Audisio, D., Roche, M., Jego, B., Cholet, S., Fenaille, F., Kuhnast, B., Taran, F. & Specklin, S. New fluorine-18 pretargeting PET imaging by bioorthogonal chlorosydnone–cycloalkyne click reaction. *Chem. Commun.* **55**, 10400–10403 (2019). <https://doi.org/10.1039/C9CC05486C>.

236. Navarro, L., Berdal, M., Chérel, M., Pecorari, F., Gestin, J. F., & Guérard, F. Prosthetic groups for radioiodination and astatination of peptides and proteins: A comparative study of five potential bioorthogonal labeling strategies. *Bioorg Med Chem.* **27**, 167–174 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.034>.

237. Prabhakar, G., Mathur, A., Shunmugam, G., Teje, Y. D., Sachdev, S. S., & Sivaprasad, N. Efficient production of therapeutic doses of [¹³¹I]-metaiodobenzylguanidine for clinical use. *Appl Radiat Isot.* **69**, 63–67 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2010.08.020>.

238. Sloan, N. L., Luthra, S. K., McRobbie, G., Pimlott, S. L. & Sutherland, A. A one-pot radioiodination of aryl amines via stable diazonium salts: preparation of ¹²⁵I-imaging agents. *Chem. Commun.* **53**, 11008–11011 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7cc06211g>.

239. Wilson, T. C., Cailly, T. & Gouverneur, V. Boron reagents for divergent radiochemistry. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 6990–7005 (2018). <https://doi.org/10.1039/C8CS00499D>.

240. Kondo, Y., Kimura, H., Fukumoto, C., Yagi, Y., Hattori, Y., Kawashima, H., & Yasui, H. Copper-mediated radioiodination reaction through aryl boronic acid or ester precursor and its application to direct radiolabeling of a cyclic peptide. *J Labelled Comp Radiopharm.* **64**, 336–345 (2021). <https://doi.org/10.1002/jlcr.3925>.

241. Zhou, J., Stapleton, P., Haider, S. & Healy, J. Boronic acid inhibitors of the class A β -lactamase KPC-2. *Bioorg Med Chem.* **26**, 2921–2927 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.055>.

242. Wiechmann, S., Freese, T., Drafz, M. H. H., Hübner, E. G., Namyslo, J. C., Niegerb, M. & Schmidt, A. Sydnone anions and abnormal N-heterocyclic carbenes of *O*-ethylsydnones. Characterizations, calculations and catalyses. *Chem. Commun.* **50**, 11822–11824 (2014). <https://doi.org/10.1039/C4CC05461J>.

243. Kliś, T. & Serwatowski, J. Halogen–lithium exchange versus deprotonation: synthesis of diboronic acids derived from aryl–benzyl ethers. *Tetrahedron Lett.* **48**, 1169–1173 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.12.076>.

244. Agarwal, N., Nayak, P. K., Ali, F., Patankar, M. P. P., Narasimhan, K. L. N. & Periasamy, N. Tuning of HOMO levels of carbazole derivatives: New molecules for blue OLED. *Synth. Met.* **161**, 466–473 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2011.01.001>.
245. Anh Nguyen, K., Lesur, E., Ribéraud, M., Sallustrau, A., Audisio, D. & Taran, F. Sydnone-Cyanines as Clickable Probes for Fluorescent Labelling. *Helvetica Chimica Acta* **106**, e202200187 (2023). <https://doi.org/10.1002/hlca.202200187>.
246. Cherepanov, I. A., Trankina, E. S., Frolova, N. G., Godovikov, I. A. & Lyssenko, K. A. Unusual sydnones based di- and trisilamacrocycles. *J. Organomet. Chem.* **923**, 121349 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2020.121349>.
247. Weisner, A. J., Cooper, T. M. & Turnbull, K. Routes to Sydnone-Containing Oligomeric Arenynes. *Synth. Commun.* **35**, 639–651 (2005). <https://doi.org/10.1081/SCC-200050343>.
248. Liu, X., Xiang, L., Li, J., Wu, Y. & Zhang, K. Stoichiometric imbalance-promoted step-growth polymerization based on self-accelerating 1,3-dipolar cycloaddition click reactions. *Polym. Chem.* **11**, 125–134 (2020). <https://doi.org/10.1039/C9PY01362H>.
249. Krell, K., Pfeuffer, B., Rönicke, F., Chinoy, Z. S., Favre, C., Friscourt, F., & Wagenknecht, H. A. Fast and Efficient Postsynthetic DNA Labeling in Cells by Means of Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloadditions. *Chemistry* **27**, 16093–16097 (2021). <https://doi.org/10.1002/chem.202103026>.
250. Davis, D. L., Price, E. K., Aderibigbe, S. O., Larkin, M. X., Barlow, E. D., Chen, R., Ford, L. C., Gray, Z. T., Gren, S. H., Jin, Y., Keddington, K. S., Kent, A. D., Kim, D., Lewis, A., Marrouche, R. S., O'Dair, M. K., Powell, D. R., Scadden, M. H., Session, C. B., Tao, J., ... Heemstra, J. M. Effect of Buffer Conditions and Organic Cosolvents on the Rate of Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **81**, 6816–6819 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01112>.
251. Kolodych, S., Rasolofonjatovo, E., Chaumontet, M., Nevers, M. C., Créminon, C., & Taran, F. Discovery of Chemoselective and Biocompatible Reactions Using a High-Throughput Immunoassay Screening. *Angew Chem Int Ed.* **52**, 12056–12060 (2013). <https://doi.org/10.1002/anie.201305645>.
252. Presolski, S. I., Hong, V. P. & Finn, M. G. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Current Protocols in Chemical Biology* **3**, 153–162 (2011). <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110148>.
253. Gouard, S., Maurel, C., Marionneau-Lambot, S., Dansette, D., Bailly, C., Guérard, F., Chouin, N., Haddad, F., Alliot, C., Gaschet, J., Eychenne, R., Kraeber-Bodéré, F., & Chérel, M. Targeted-Alpha-

Therapy Combining Astatine-211 and anti-CD138 Antibody in a Preclinical Syngeneic Mouse Model of Multiple Myeloma Minimal Residual Disease. *Cancers (Basel)* **12**, 2721 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12092721>.

254. Chérel, M., Gouard, S., Gaschet, J., Saï-Maurel, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Bourgeois, M., Gestin, J. F., Bodéré, F. K., Barbet, J., Moreau, P., & Davodeau, F. ²¹³ Bi Radioimmunotherapy with an Anti-mCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma. *J Nucl Med.* **54**, 1597–1604 (2013). <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.111997>.

255. Seemann, J., Waldron, B., Parker, D. & Roesch, F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type 68Ga labelling of TOC at ambient temperature. *EJNMMI radiopharm. chem.* **1**, 4 (2017). <https://doi.org/10.1186/s41181-016-0007-3>.

256. Strosberg, J., El-Haddad, G., Wolin, E., Hendifar, A., Yao, J., Chasen, B., Mittra, E., Kunz, P. L., Kulke, M. H., Jacene, H., Bushnell, D., O'Dorisio, T. M., Baum, R. P., Kulkarni, H. R., Caplin, M., Lebtahi, R., Hobday, T., Delpassand, E., Van Cutsem, E., Benson, A., ... NETTER-1 Trial Investigators. Phase 3 Trial of 177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med* **376**, 125–135 (2017). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607427>.

257. Mossine, A. V., Brooks, A. F., Makaravage, K. J., Miller, J. M., Ichiishi, N., Sanford, M. S., & Scott, P. J. Synthesis of [18F]Arenes via the Copper-Mediated [18F]Fluorination of Boronic Acids. *Org. Lett.* **17**, 5780–5783 (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02875>.

258. Mossine, A. V., Brooks, A. F., Bernard-Gauthier, V., Bailey, J. J., Ichiishi, N., Schirmacher, R., Sanford, M. S., & Scott, P. J. H. Automated synthesis of PET radiotracers by copper-mediated 18F-fluorination of organoborons: Importance of the order of addition and competing protodeborylation. *J Labelled Comp Radiopharm.* **61**, 228–236 (2018). <https://doi.org/10.1002/jlcr.3583>.

259. Zischler, J., Kolks, N., Modemann, D., Neumaier, B. & Zlatopolskiy, B. D. Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chem. Eur. J.* **23**, 3251–3256 (2017). <https://doi.org/10.1002/chem.201604633>.

260. Guibbal, F., Meneyrol, V., Ait-Arsa, I., Diotel, N., Patché, J., Veeren, B., Bénard, S., Gimié, F., Yong-Sang, J., Khantaline, I., Veerapen, R., Jestin, E., & Meilhac, O. Synthesis and Automated Labeling of [18F]Darapladib, a Lp-PLA2 Ligand, as Potential PET Imaging Tool of Atherosclerosis. *ACS Med Chem Lett* **10**, 743–748 (2019). <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00643>.

261. Smedley, C. J., Li, G., Barrow, A. S., Gialelis, T. L., Giel, M. C., Ottonello, A., Cheng, Y., Kitamura, S., Wolan, D. W., Sharpless, K. B., & Moses, J. E. Diversity Oriented Clicking (DOC): Divergent

Synthesis of SuFExable Pharmacophores from 2-Substituted-Alkynyl-1-Sulfonyl Fluoride (SASF) Hubs. *Angew Chem Int Ed.* **59**, 12460–12469 (2020). <https://doi.org/10.1002/anie.202003219>.

262. Trujillo, M., Hull-Crew, C., Outlaw, A., Stewart, K., Taylor, L., George, L., Duensing, A., Tracey, B., & Schoffstall, A. Green Methodologies for Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions: A Comparative Study. *Molecules* **24**, 973 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24050973>.

263. Fichou, N., Gouard, S., Maurel, C., Barbet, J., Ferrer, L., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Faivre-Chauvet, A., Bigot-Corbel, E., Davodeau, F., Gaschet, J., & Chérel, M. Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front Med. (Lausanne)* **2**, 76 (2015). <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00076>.

Publication

- **Ludovic Le Saux**, Ferid Haddad, Jean-François Gestin, Romain Eychenne, François Guérard, *Sydnone-based prosthetic groups for radioiodination*, Org. Biomol. Chem. (soumise le 21 mai 2024).

Communications orales et posters

- **Ludovic Le Saux**, Alexandre Lugat, Joëlle Gaschet, Michel Chérel, François Guérard, Romain Eychenne, Jean-François Gestin, Radioiodation de dérivés acides boroniques pour une utilisation en chimie click, 16^{èmes} Journées du Cancéropôle Grand Ouest (CGO), Angers, France, 23-24 Juin 2022 (présentation de poster)
- **Ludovic Le Saux**, Ferid Haddad, Jean-François Gestin, Romain Eychenne, François Guérard, Evaluation of bioorthogonal strategies for radioiodination and astatination of cancer targeting vectors, Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé Nantes-Angers (JBS), Nantes, France, 4-5 Avril 2023 (présentation orale)
- **Ludovic Le Saux**, Férid Haddad, Jean-François Gestin, Romain Eychenne, François Guérard, Sydnones-based approach for radioiodination and astatination of cancer targeting vectors, Congrès Société Chimique de France (SCF), Nantes, France, 26-28 Juin 2023 (présentation orale)
- **Ludovic Le Saux**, Ferid Haddad, Jean-François Gestin, Romain Eychenne, François Guérard, Evaluation of sydnones-based click chemistry for the labeling with heavy radiohalogens, 21st European Symposium on Radiopharmacy & Radiopharmaceuticals (ESRR), Coimbra, Portugal, 18-21 Avril 2024 (présentation orale)

Titre : Approches bio-orthogonales pour la production de radiopharmaceutiques

Mots clés : Chimie clic, bioconjugaison, acides arylboroniques, sydnones, radiohalogènes lourds

Résumé : L'iode et l'astate présentent plusieurs radioisotopes d'intérêt pour la médecine nucléaire, que ce soit pour l'imagerie ou la thérapie. Les méthodes de bioconjugaison conventionnelles permettant l'association d'un radionucléide à une protéine vectrice présentent certaines limites : rendements de couplage non-optimaux, cinétiques de réaction lentes ou encore absence de régiospécificité. La chimie bio-orthogonale apparaît comme une alternative intéressante à la bioconjugaison conventionnelle car elle est compatible avec les systèmes biologiques et peut interagir sans interférer avec les processus biochimiques naturels. L'objectif de cette thèse est d'explorer davantage le potentiel de la chimie clic pour la radiohalogénéation et d'identifier les systèmes bio-orthogonaux les plus intéressants en termes d'efficacité de radiomarquage et de cinétique de réaction

Plusieurs sydnones ont été préparées afin d'évaluer la cinétique de réaction de cycloaddition sydnone-alcyne sous contrainte stérique (SPSAC) avec des peptides modèles cliquables. Des études cinétiques avec des sydnones non-radioactives et radioiodées ont été réalisées pour déterminer la constante de vitesse de la réaction avec des peptides modèles. La comparaison des deux études a permis d'identifier les systèmes les plus réactifs pour une application potentielle. Dans le cadre de la deuxième partie du projet, l'optimisation de la chimie bio-orthogonale pour son application à d'autres vecteurs ou radionucléides a également été étudiée. Un nouveau précurseur azoture a été développé et évalué pour la radiofluoruration de dérivés peptidiques.

Title: Bioorthogonal approaches for radiopharmaceuticals development

Keywords: Click chemistry, bioconjugation, aryl boronic acids, sydnones, heavy radiohalogens

Abstract: Iodine and astatine exhibit several radioisotopes of interest for nuclear medicine whether for imaging or therapy. Conventional bioconjugation methods allowing association of a radionuclide to a targeting vector showed limitations: moderate coupling yields, slow chemical kinetics, or lack of regioselectivity. Bioorthogonal chemistry appears as an interesting alternative to conventional bioconjugation as it is compatible with biological systems and can interact without interfering with natural biochemical processes. The aim of this thesis is to further explore the potential of click chemistry for radiohalogenation and identify the most interesting bioorthogonal systems in terms of radiolabeling efficiency and reaction kinetics.

Several sydnones were prepared in order to evaluate strain-promoted sydnone-alkyne cycloaddition (SPSAC) reaction kinetics with clickable model peptides. Kinetic studies with non-radioactive and radioiodinated sydnones were performed to determine rate constant of the reaction with model peptides. Comparison of both studies allowed identification of the most reactive systems for a potential application. As a second part of the project optimization of bioorthogonal chemistry for application to other vectors or radionuclides was also investigated. A new azide precursor has been developed and evaluated for radiofluorination of peptide derivatives.