



**HAL**  
open science

# Synthèses et applications d'iminosydnonnes en chemobiologie

Maxime Ribéraud

► **To cite this version:**

Maxime Ribéraud. Synthèses et applications d'iminosydnonnes en chemobiologie. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASF072 . tel-04812233

**HAL Id: tel-04812233**

**<https://theses.hal.science/tel-04812233v1>**

Submitted on 30 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.

# Synthèses et applications d'iminosydnones en chémobiologie

*Synthesis and applications of iminosydnones in chemical biology*

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

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

Spécialité de doctorat : Chimie

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

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

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 29 novembre 2022, par

**Maxime RIBERAUD**

## Composition du Jury

<b>Boris VAUZEILLES</b> Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Président
<b>Christophe BIOT</b> Professeur, Université de Lille	Rapporteur & Examineur
<b>Line BOUREL</b> Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur & Examineur
<b>Sébastien PAPOT</b> Professeur, Université de Poitiers	Examineur
<b>Pauline POINOT</b> Maître de conférence, Université de Poitiers	Examinatrice
<b>Frédéric TARAN</b> Chef de service, CEA saclay	Directeur de thèse

**Titre :** Utilisation de sydnone et d'iminosydnone pour le diagnostic du cancer.

**Mots clés :** cancer, détection multiplexé, Iminosydnones aryle et alkyle, chlorosydnone, préciblage <sup>18</sup>F, Anticorps.

**Résumé :** Basé sur les récentes découvertes de nos laboratoires dans le domaine de la chemobiologie, mon projet de thèse vise à développer une approche permettant la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de différents marqueurs tumoraux en combinant la chimie bioorthogonale et l'analyse par spectrométrie de masse des fluides biologiques. Cette technologie impliquerait l'injection d'un cocktail d'anticorps étiquetés avec des marqueurs de masse, liés par un espaceur clivable par réaction bioorthogonale. Plusieurs jours après, un dérivé cyclooctyne serait injecté pour induire une réaction de coupure ligation SPICC avec le cocktail d'anticorps fixés dans la zone tumorale. Ainsi cette réaction entrainerait la libération des marqueurs de masse analysable dans les fluides biologiques (sang, plasma, urine). La quantification de l'abondance de chaque marqueur permettrait alors de connaître la répartition de chaque récepteur tumoral au sein de la lésion.

Cette analyse permettrait de déterminer quel récepteur est le plus abondant et donc de déterminer quel anticorps peut être utilisé pour soigner le patient. Le second projet vise quant à lui à développer une approche de préciblage pour localiser une tumeur solide chez une souris par imagerie PET. L'originalité de ce projet repose sur l'utilisation de PNAs et de la réaction de cycloaddition entre une chlorosydnone et un cyclooctyne. Dans cette approche les PNAs jouent un rôle important en permettant d'effectuer la réaction avec une très bonne vitesse réactionnelle même à des concentrations de l'ordre du nM. Le projet vise donc à évaluer l'utilité des PNAs dans une approche de préciblage. Enfin le dernier projet reporte la synthèse de deux nouvelles famille d'iminosydnone capable de libérer des isocyanate stable très rapidement ( $k > 300 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )

**Title :** Use of sydnone and iminosydnone for cancer diagnosis.

**Keywords :** cancer, multiplexed detection, aryl and alkyl Iminosydnones, chlorosydnone, <sup>18</sup>F pretargeting, antibodies.

**Abstract :** Based on recent discoveries in our laboratories in the field of chemobiology, my thesis project aims to develop an approach allowing the *in vitro* and *in vivo* characterization of various tumor markers by combining bioorthogonal chemistry and mass spectrometry analysis of biological fluids. This technology would involve the injection of a cocktail of antibodies labeled with mass markers, linked by a spacer cleavable by bioorthogonal reaction. Several days later, a cyclooctyne derivative would be injected to induce a SPICC cleavage reaction with the cocktail of antibodies fixed in the tumor area. This reaction would lead to the release of analyzable mass markers in biological fluids (blood, plasma, urine). The quantification of the abundance of each marker would then allow to know the distribution of each tumor receptor within the lesion.

This analysis would make it possible to determine which receptor is the most abundant and thus to determine which antibody can be used to treat the patient. The second project aims to develop a pre-targeting approach to localize a solid tumor in a mouse by PET imaging. The originality of this project lies in the use of PNAs and the cycloaddition reaction between a chlorosydnone and a cyclooctyne. In this approach, PNAs play an important role by allowing to perform the reaction with a very good reaction speed even at concentrations in the nM range. The project therefore aims at evaluating the usefulness of PNAs in a pre-targeting approach. Finally, the last project reports the synthesis of two new families of iminosydnones capable of fast release of stable isocyanates ( $k > 300 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

# Abréviations

---

<b>AC</b>	Agent activant
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>Alloc</b>	Allyloxycarbonyle
<b>aq</b>	Aqueux
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>Atc</b>	Anticorps
<b>BCA</b>	BiCinchoninic acid Assay
<b>BHQ</b>	Black Hole Quencher
<b>Bn</b>	Benzyle
<b>BTES</b>	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
<b>BVZ</b>	Bevacizumab
<b>CA 19.9</b>	Antigène carbohydrate 19.9
<b>CCO</b>	Cis-cyclooctène
<b>CDI</b>	1,1 -Carbonyldiimidazole
<b>CEA</b>	Commissariat à l'énergie atomique
<b>Conc.</b>	Concentration
<b>Conv.</b>	Conversion
<b>CTX</b>	Cétuximab
<b>CuAAC</b>	Copper-azide-alkyne Huisgen cycloaddition
<b>DBCO</b>	Dibenzocyclooctyne
<b>DCC</b>	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DIFO</b>	Difluorinated cyclooctyne
<b>DiPEA</b>	N, N-diisopropyléthylamine
<b>DMF</b>	Diméthylformamide
<b>DUR</b>	Durvalumab
<b>DMEM</b>	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
<b>DMS</b>	Diméthylsulfate
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EGFR</b>	Epithelial Growth Factor Receptor
<b>EI</b>	Enrichissement isotopique
<b>EM</b>	Etiquette de masse
<b>Eq.</b>	Equivalent
<b>Et</b>	Ethyle
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GSH</b>	Glutathion forme réduite
<b>GSSG</b>	Glutathion forme oxydé
<b>h</b>	Heure

<b>HATU</b>	hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3] triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaninium
<b>HER2</b>	Human epidermal growth factor receptor 2
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>HRMS</b>	High-resolution mass spectrometry
<b>HSA</b>	Human serum albumin
<b>HRPO</b>	Horseradish peroxidase
<b>IEDDA</b>	Inverse electron demand Diels–Alder reaction
<b>IC50</b>	Concentration inhibitrice médiane
<b>IS</b>	Standard interne
<b>k</b>	Constante de vitesse
<b>LUMO</b>	Lowest unoccupied molecular orbital
<b>MS</b>	Mass spectrometry
<b>m/z</b>	Masse sur charge
<b>MALDI-ToF</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
<b>MM</b>	Marqueur de masse
<b>MP</b>	Melting Point
<b>MW</b>	Molecular weight
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hydroxyfimide
<b>n.d</b>	non détecté
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimide
<b>NCTS</b>	<i>N</i> -Cyano- <i>N</i> -phenyl- <i>p</i> -toluenesulfonamide
<b>NIS</b>	<i>N</i> -iodosuccinimide
<b>NP</b>	Hydrazide naphthoïque
<b>Nu</b>	Nucléophile
<b>OCT</b>	Octyne
<b>p.i</b>	post-injection
<b>PdNP</b>	Palladium Nano Particule
<b>PNP</b>	<i>para</i> -nitrophénol
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PD-L1</b>	Programmed death-ligand 1
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>Ph</b>	Phényl
<b>PSA</b>	Antigène spécifique de la prostate
<b>ACE</b>	Antigène carcino-embryonnaire
<b>pyr.</b>	Pyridine
<b>Qté</b>	Quantité
<b>Quant.</b>	Quantitatif
<b>Rdt</b>	Rendement
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire

<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>S/B</b>	Signal sur bruit
<b>SDS PAGE</b>	Sigle anglophone de sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SNAr</b>	Substitution nucléophile aromatique
<b>SPAAC</b>	Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition
<b>SPI</b>	Service de Pharmacologie et Immunoanalyse
<b>SPICC</b>	Strain-promoted Iminosydnone-cycloalkyne cycloaddition
<b>SPSAC</b>	Strain-promoted Sydnone-alkyne cycloaddition
<b>Su</b>	<i>N</i> -hydroxysuccinoyl
<b>ta</b>	Température ambiante
<b>TAMRA</b>	5-Carboxytetramethylrhodamine
<b><sup>t</sup>Bu</b>	Tert-butyle
<b>TCDI</b>	Thio-1,1 -Carbonyldiimidazole
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
<b>TCO</b>	<i>Trans</i> -cyclooctène
<b>TEA</b>	Triéthylamine
<b>TEMP</b>	Tomographie par émission monophotonique
<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positon
<b>Tf</b>	Triflate
<b>TFA</b>	acide trifluoroacétique
<b>TFAA</b>	anhydride trifluoroacétique
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>TMB</b>	Triméthoxybenzène
<b>TMPP</b>	Tris(2,4,6-triméthoxyphényl)phosphine
<b>TMTH</b>	3,3,6,6-tetraméthylthiaheptyne
<b>TMTHSI</b>	3,3,6,6-tetraméthylthiaheptyne sulfoximine
<b>TRZ</b>	Trastuzumab
<b>Ts</b>	Tosyle
<b>TSTU</b>	<i>O</i> -( <i>N</i> -Succinimidyl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium
<b>Tz</b>	Tétrazine
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor

# Remerciements

---

Ce travail de recherche a été réalisé dans le Service de Chimie Bioorganique et Marquage du CEA-Saclay et a été financé par la fondation pour la recherche médicale (FRM). J'adresse donc mes premiers remerciements à la FRM, ainsi qu'au CEA pour son infrastructure et ses équipements.

Ensuite, je tiens à adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ces travaux de thèse, Dr. Boris Vauzeilles, Pr. Line Bourel, Pr Christophe Biot, Dr. Pauline Poinot et le Pr. Sébastien Papot qui a suivi l'avancée de ces travaux au fur et à mesure des trois années de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement mon directeur de thèse Frédéric Taran pour la confiance qu'il a su m'accorder. J'ai passé quatre super années très enrichissantes tant sur le point scientifique que sur le point humain. Fred tu es un passionné de chimie et tu as su me transmettre ton dévouement pour la science avec des projets toujours plus ambitieux. J'ai adoré nos discussions, les moments passés à s'arracher les cheveux sur des résultats parfois étranges, bref j'en serais pas là sans toi !

Je remercie également mon co-encadrant de thèse Dr. Davide Audisio, qui avec sa joie de vivre et sa gentillesse a su m'apporter les réponses à mes questions parfois farfelues.

Je souhaite adresser tous mes remerciements aux personnes avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer, et notamment les personnes du SHFJ, Simon, Charles et Estelle qui ont toujours répondu avec plaisir à mes questions. J'adresse également mes remerciements à l'équipe SmartMS du SPI. Bien sûr je remercie Arnaud, qui a initié le projet sur les iminosydnones alkyle et qui par la suite nous à aider à finaliser le projet avec de super clichés cellulaire. Et merci pour ta disponibilité.

Merci également aux anciens du C14 que j'ai pu côtoyer, Victor, Alex, Expédite, Karine, Minghao, Séréna, Carlotta, Diana, avec qui j'ai de super souvenirs. Alex, Victor on a passé de super moment au labo et au bureau, et je tiens à te citer Victor : La LC-MS n'est pas juge de paix (2019).

Bien sûr je ne vais pas oublier de remercier Oliver et Dominique, vous avez été mes guides spirituels pendant ces trois années.

Maintenant je souhaite remercier les membres actuels de l'équipe C14: Joao, Léa, Manon, Guillaume, Emilie, Clara, Emma, Juba, Antoine avec une mention particulière pour les boys du Lab10 : Alexandre, Augustin, Maxime, Bouchaib. Et bonne chance pour les nouveaux, la thèse c'est fun mais fatigant...

Bien sûr j'adresse un immense merci à David et son équipe : Tim, Amélie et Sabrina. Merci pour votre aide sans faille pour les études de masse et les purifications ainsi que les précieux conseil sur la fabrication de confitures.

Un grand merci à Chantal pour son aide et sa gentillesse tu es vraiment super et profite de ta retraite bien méritée. Merci à Christophe pour ses blagues parfois douteuses mais toujours de bon conseil. Merci Karen pour avoir pris soin de notre sécurité au fil de ces années.

Je remercie tout particulièrement Cristelle et Goulven pour toutes les discussions enrichissantes et bizarres (voir très bizarres) que j'ai pu avoir avec vous. Vous m'avez transporté. Cristelle garde mes poèmes.

Finalement, je souhaite remercier plus généralement tous les membres du SCBM, anciens et actuels et particulièrement Florian pour le travail qu'il a fourni sur les iminosydnones aryliques.

Merci à Hugo, mon frérot, on a commencé ensemble cette aventure il y a de ça 4 ans, c'est passé tellement vite.

Je souhaite remercier toute ma famille pour leur soutien sans faille depuis le début de mes études, et à qui je dédie cette thèse. Vous avez toujours cru en moi et ça a été un moteur pour réussir.

Enfin, Judith, merci ma chérie, toi qui m'as supporté pendant ces trois ans de thèse. Tu as su me canaliser, m'écouter, être là pour moi, ça m'a permis de franchir cette grande étape dans nos vies à tous les deux. J'ai beaucoup apprécié collaborer avec toi même si notre projet était très ambitieux. La thèse nous a rapproché pour le meilleur et j'ai hâte de pouvoir continuer la suite de cette aventure à tes côtés.

# Sommaire

---

<b>Introduction générale</b> .....	13
I La chimie bioorthogonale, concept et définition .....	13
I.1 Concepts et définitions.....	14
I.2 Les réactions de ligation.....	15
I.2.i Condensation aldéhyde-cétone .....	15
I.2.ii Ligation de Staudinger.....	16
I.2.iii CuAAC.....	17
I.2.iv SPAAC .....	18
I.2.v SPSAC.....	20
I.2.vi iEDDA.....	20
I.3 Les réactions de coupure.....	22
I.3.i Les réactions de coupures photoactivables .....	22
I.3.ii Les réactions de coupures induites par des métaux de transition.....	22
I.3.iii Coupures induites par la réaction de Staudinger .....	23
I.4 Les réactions de ligation-coupure .....	24
I.4.i Ligation-coupure de Staudinger .....	24
I.4.ii iEDDA.....	25
II Les iminosydnones .....	29
II.1 Généralités sur les mésoioniques et les iminosydnones.....	29
II.2 Historique .....	29
II.3 Travaux antérieurs du laboratoire.....	31
II.4 Utilisation des iminosydnones <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	37
<b>Chapitre 1 : Développement d'une méthode de détection multiplexée de récepteurs tumoraux</b> .....	43
I Introduction.....	43
I.1 Généralités sur le cancer .....	43
I.2 Analyses cliniques des marqueurs tumoraux.....	44
I.2.i Analyse des marqueurs du cancer dans les fluides biologiques .....	44
I.2.ii Analyse des marqueurs du cancer par biopsie tumorale.....	44
I.2.iii Analyse génétique et moléculaire des tumeurs.....	45
I.3 Méthodes chemobiologiques d'analyses des marqueurs tumoraux décrites dans la littérature .....	47

II	Présentation du projet .....	52
III	Résultats .....	54
III.1	Conception et synthèse de l'immunoconjugué <b>TRZ-d<sub>0</sub></b> .....	54
III.1.i	Synthèse de l'iminosydnone <b>I-4</b> .....	56
III.1.ii	Carbonylation palladocatalysée du composé <b>I-4</b> .....	57
III.1.iii	Synthèse de l'alcool primaire <b>I-7</b> .....	57
III.1.iv	Activation de l'alcool primaire <b>I-7</b> .....	57
III.1.v	Substitution nucléophile sur l'alcool activé <b>I-8</b> .....	58
III.1.vi	Déprotection de l'acide et activation .....	58
III.1.vii	Synthèse de l'immunoconjugué <b>TRZ-d<sub>0</sub></b> .....	59
III.2	Caractérisation de <b>TRZ-d<sub>0</sub></b> .....	61
III.3	Synthèse des phosphines <b>TMPP-d<sub>9</sub></b> , <b>TMPP-d<sub>18</sub></b> , <b>TMPP-d<sub>27</sub></b> .....	63
III.4	Synthèse des immunoconjugués <b>CTX-d<sub>9</sub></b> , <b>DUR-d<sub>18</sub></b> , <b>BVZ-d<sub>27</sub></b> .....	67
III.5	Etudes de la cinétique de relargage des étiquettes de masse <b>EM-d<sub>0</sub></b> , <b>EM-d<sub>9</sub></b> , <b>EM-d<sub>18</sub></b> , <b>EM-d<sub>27</sub></b> . 68	
III.6	Quantification des étiquettes de masse .....	70
III.7	Evaluation de la technologie <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> .....	74
III.8	Evaluation de la technologie <i>in vivo</i> .....	76
III.8.i	Pharmacocinétique .....	76
IV	Conclusions et perspectives .....	78

## **Chapitre 2 : Développement d'une approche de préciblage au <sup>18</sup>F assistée par reconnaissance moléculaire pour la détection de tumeurs solides** .....

I	Introduction .....	79
I.1	La tomographie par émission de positons (TEP) .....	79
I.2	Préciblage par réaction bioorthogonale .....	80
I.2.i	Préciblage par réaction SPAAC .....	82
I.2.ii	Préciblage par réaction TCO/Tz .....	82
I.2.iii	Préciblage par réaction SPSAC .....	83
I.2.iv	Utilisation des PNA pour des approches de préciblage .....	84
I.3	Présentation du projet .....	86
II	Résultats .....	87
II.1	Synthèse de l'immunoconjugué <b>CTX-PNA-CISYD</b> .....	87
II.2	Synthèse du <b>PNA-DBCO</b> et étude cinétique de la réaction de ligation .....	89
II.3	Marquage du <b>PNA-CISYD</b> .....	90

II.4	Évaluation de la technologie sur cellules .....	92
II.5	Évaluation <i>in vivo</i> de la technologie .....	92
III	Conclusions et perspective .....	96

## **Chapitre 3 : Synthèse et développement d'Alkyl et d'Aryl-iminosydnonnes pour des applications en bioconjugaison** .....

I	Synthèse et développement de 6- <i>N</i> -alkyl iminosydnonnes .....	97
I.1	Travaux antérieurs du laboratoire .....	98
I.2	Etude de l'étendue de la réaction .....	99
II	Synthèse et développement de 6- <i>N</i> -aryl-iminosydnonnes .....	101
II.1	Voie de synthèse envisagée .....	101
II.2	Mise au point de la réaction de cyclodeshydratation pour l'obtention de <i>N</i> -6-aryl-iminosydnonnes .....	103
II.3	Etude mécanistique de la réaction de cyclodeshydratation. ....	104
II.4	Etude de l'étendue de la réaction .....	105
III	Etude des propriétés physicochimiques des 6- <i>N</i> -Alkyl/Aryl iminosydnonnes .....	109
III.1	Analyses structurales .....	109
III.2	Détermination des pKa .....	110
III.3	Réactivité des 6- <i>N</i> -alkyl et 6- <i>N</i> -aryl iminosydnonnes .....	111
III.4	Calcul DFT .....	118
III.5	Réactivité des isocyanates relargués .....	123
IV	Relargage contrôlé d'alkyl/aryl isocyanates pour des applications de bioconjugaison. ....	124
IV.1	Synthèse et caractérisation des sondes fluorogéniques .....	124
IV.2	Réaction d'alkyl et d'aryl isocyanates avec des biomolécules .....	127
IV.3	Test de stabilité dans le plasma humain .....	129
IV.4	Relargage d'alkyl/Aryl-isocyanates et toxicité .....	129
IV.5	Relargage d'alkyl-isocyanates dans des cellules vivantes .....	131
IV.6	Application pour le Target Fishing .....	135
V	Post-fonctionnalisation des <i>N</i> -6-Alkyl/Aryl-iminosydnonnes. ....	137
V.1	Halogénéation de la position C <sup>4</sup> .....	138
V.2	Autres fonctionnalisations en position C <sup>4</sup> .....	139
V.3	Influence des groupements en position C <sup>4</sup> sur le pKa du proton en position N <sup>6</sup> .....	140
V.4	Influence des groupements en position C <sup>4</sup> sur la réaction SPICC .....	140
VI	Conclusions et perspectives .....	144

<b>Conclusion générale</b> .....	147
<b>Partie expérimentale</b> .....	151
I Material and equipment .....	151
II Partie expérimentale Chapitre 1 .....	152
II.1 Synthetic Procedure and analytical Data for TMPP Tags .....	152
II.1.i Synthesis of iminosydnone linker .....	152
II.1.ii Synthesis of trimethoxybenzene .....	155
II.1.iii Synthesis of tris-trimethoxyphenylphosphines.....	157
II.1.iv TAG Synthesis .....	160
II.2 General procedure for antibody-Tag conjugates preparation .....	164
II.3 Kinetic studies .....	166
II.4 Detection and quantitation limits of TMPP-tags by UPLC-MS/MS .....	168
III Partie expérimentale Chapitre 2 .....	170
III.1 Analytical data .....	170
III.2 General procedure for antibody-Tag conjugates preparation .....	171
III.3 Kinetic study with PNA-chlorosydnone and PNA-DBCO .....	172
III.4 Radio-labelling.....	173
IV Partie expérimentale Chapitre 3 .....	175
IV.1 N-alkyl-Iminosydnone.....	175
IV.1.i Optimization of the reductive amination.....	175
IV.1.ii Synthetic procedure and analytical data.....	175
IV.2 N-aryl-Iminosydnone .....	184
IV.2.i Optimization of the cyclization reaction .....	184
IV.2.ii Mechanistic investigations.....	184
IV.2.iii Synthetic procedure and analytical data.....	186
IV.3 Physico-chemical properties of iminosydnone.....	214
IV.3.i Crystallographic data.....	214
IV.3.ii Calculation of Hirshfeld surfaces.....	220
IV.3.iii pKa determination.....	221
IV.3.iv Stability experiments.....	222
IV.4 Kinetics .....	223
IV.4.i Influence of the pH.....	224
IV.4.ii Influence of the media .....	224
IV.4.iii Influence of the iminosydnone structure.....	224
IV.4.iv Graphs .....	225

IV.5	In vitro bioconjugation with bio-nucleophiles .....	257
IV.5.i	Isocyanate trapping with GSH .....	257
IV.5.ii	Isocyanate trapping with HSA .....	264
IV.5.iii	Isocyanate Trapping with 2-naphthohydrazide NP .....	266
IV.6	Experiments with cells.....	273
IV.6.i	Toxicity assay .....	273
IV.6.ii	Imaging and Fishing experiments.....	274
IV.7	Post-functionalization of <i>N</i> -6-Alkyl/Aryl-iminosydnonnes.....	281
IV.7.i	Analytical data .....	281
IV.7.ii	Kinetics .....	283
IV.7.iii	Graphs .....	284
IV.7.iv	pKa determination.....	296
<b>Bibliographie</b>	.....	<b>298</b>

# Introduction générale

---

## I La chimie bioorthogonale, concept et définition

Comprendre le rôle et le fonctionnement des biomolécules au sein de milieux aussi complexes que ceux rencontrés dans le monde du vivant est un défi majeur. De nombreux scientifiques dans le monde essaient de résoudre ce challenge en développant de nouvelles méthodes d'analyse. L'étude du comportement *in vivo* d'une biomolécule au sein de son environnement natif est essentielle afin d'appréhender ses mécanismes biologiques, aussi complexes soient-ils. Leur visualisation au sein de leurs environnements est rendue possible grâce à des modifications structurales sélectives, et notamment *via* l'introduction d'étiquettes capables de rendre la molécule visible par l'utilisation de détecteurs spécifiques (fluorescence, masse, infrarouge, radioactivité...). Modifier sélectivement la structure d'une molécule cible *in vivo* sans interagir avec la multitude de fonctions chimiques présentes dans le milieu biologique n'est pas sans difficulté, et cela requiert des réactions hautement sélectives. Au début des années 2000, le terme « **click chemistry** » (**chimie click**) a été utilisé pour la première fois par K. Barry Sharpless pour décrire ce type de réactions quasi parfaites. Elles permettent l'élaboration d'édifices moléculaires complexes, rapidement, simplement, et en accord avec l'environnement.



*“The reaction must be modular, wide in scope, give very high yields, generate only inoffensive by-products that can be removed by non-chromatographic methods, and be stereospecific (but not necessarily enantioselective). The required process characteristics include simple reaction conditions, readily available starting materials and reagents, the use of no solvents or a solvent that is benign (such as water) or easily removed, and simple product isolation”.*<sup>1</sup>

K. Barry Sharpless pose alors les bases d'un nouveau domaine de la chimie organique que C. R. Bertozzi complétera un peu plus tard en y intégrant des critères de compatibilité avec les milieux biologiques et de sélectivité vis-à-vis des fonctions chimiques présentes dans le monde du vivant, inventant ainsi le concept de **chimie bioorthogonale**.

---

<sup>1</sup> H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40/11 (2001), 2004–21.

## 1.1 Concepts et définitions

Idéalement, les réactifs impliqués dans une réaction bioorthogonale doivent être inertes biologiquement, compatibles avec le pH et la température physiologique et de préférence de petites tailles pour ne pas modifier le comportement de la biomolécule d'intérêt dans l'organisme.

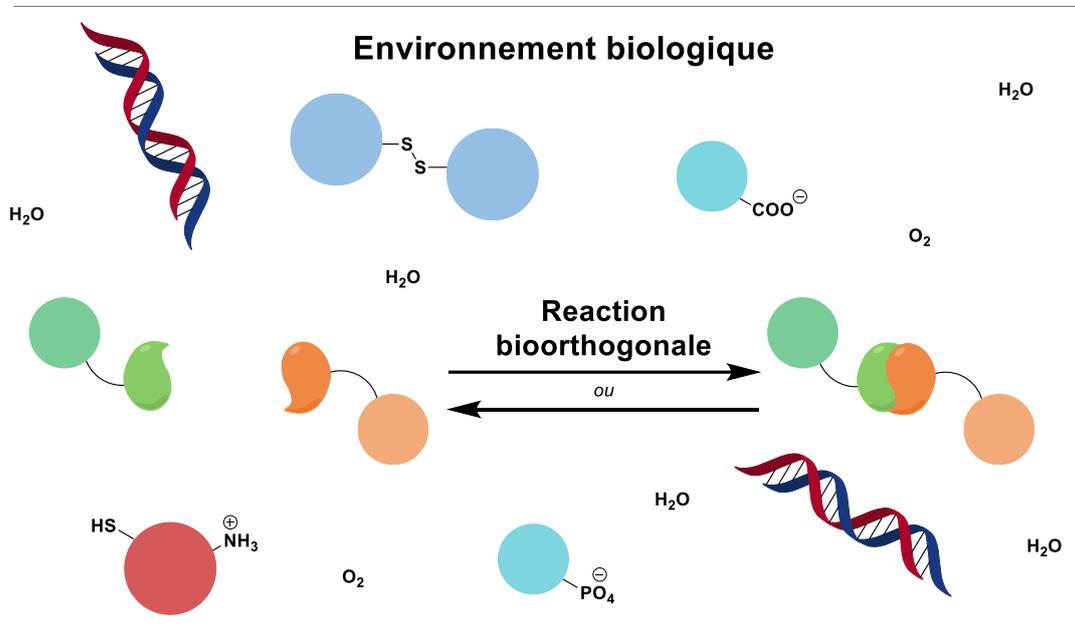


Schéma 1. Représentation schématique d'une réaction bioorthogonale

Le défi des réactions bioorthogonales est de lier de façon covalente deux partenaires réactionnels ou au contraire de couper un composé en deux parties dans les milieux biologiques les plus complexes (Schéma 1). Cependant, peu de réactions répondent parfaitement aux différentes contraintes imposées par de tels milieux. Outre la bio-inertie, la non-toxicité, et la stabilité des réactifs et des produits, la cinétique est également un paramètre à prendre en compte pour développer des réactions bioorthogonales efficaces. En général, celles-ci possèdent une cinétique d'ordre 2 dont la valeur de la constante de vitesse de réaction donne une bonne indication du temps nécessaire à une bonne conversion des deux partenaires réactionnels A et B en fonction de leur concentration (Schéma 2).

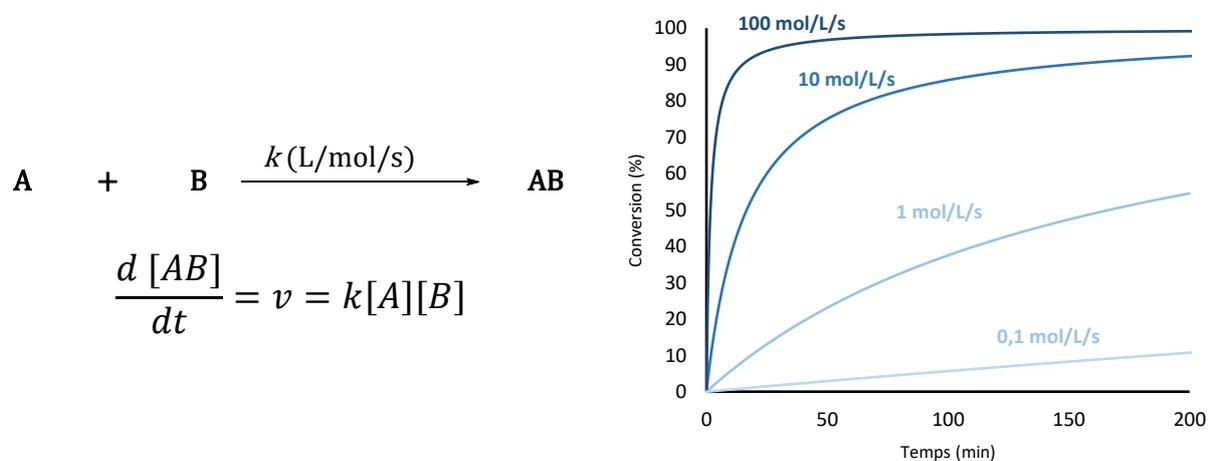


Schéma 2. Conversion simulée en fonction du temps à différentes constantes de vitesse ( $C = 100 \mu\text{M}$ )

En considérant que les concentrations des réactifs sont souvent basses dans les milieux biologiques (typiquement  $< 10^{-5}$  mol/L), la constante de vitesse  $k$  doit être assez élevée pour permettre la formation du produit en un temps raisonnable. Il est communément admis que la constante  $k$  doit être d'environ 1 L/mol/s pour envisager des applications en bioconjugaison et au-delà de 100 L/mol/s pour des applications *in vivo*. Le choix d'une réaction bioorthogonale pour une application donnée se fera en fonction de la concentration de la biomolécule dans le milieu. Plus la cible est diluée, plus la réaction sélectionnée doit être rapide. Pour ce faire plusieurs équipes ont développé ces vingt dernières années différents types de réactions avec des constantes de vitesse allant de  $10^{-3}$  à près de  $10^6$  L/mol/s.

La prochaine partie de cette introduction se focalisera sur la présentation des différentes réactions bioorthogonales qui nous semble avoir eu un impact significatif en chémobiologie.<sup>2</sup>

## 1.2 Les réactions de ligation

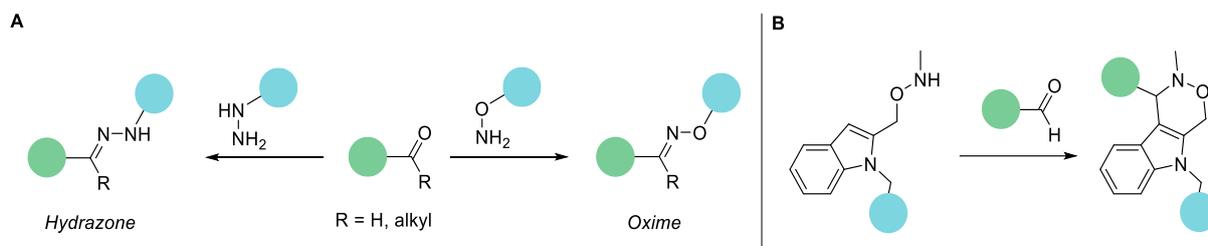
Les réactions dites de ligation regroupent principalement les réactions de condensation et les réactions de cycloaddition (**Schéma 3**). Cette partie ne décrit pas de façon exhaustive l'état de l'art de toutes les réactions de ligations, nous ne présenterons que celles qui nous semblent les plus significatives en chimie bioorthogonale.



**Schéma 3.** Représentation schématique d'une réaction de ligation

### 1.2.i Condensation aldéhyde-cétone

Une des premières réactions bioorthogonales à avoir été décrite est la condensation d'une amine nucléophile sur des dérivés carbonyles (**Schéma 4. A**).<sup>3</sup> L'effet  $\alpha$  des hydroxylamines ou des hydrazines est utilisé pour accroître la nucléophilie (en comparaison avec une amine).



**Schéma 4. A.** Réaction de ligation entre cétone/aldéhyde avec hydrazine/hydroxylamine. **B.** Version de Pictet-Spengler

La cinétique de ce type de réaction est extrêmement lente ( $10^{-3}$  L/mol/s). Ces réactions ont été utilisées principalement pour des applications en bioconjugaison, comme par exemple la modification de protéines. A noter que les oximes et les hydrazones sont sensibles à l'hydrolyse dans les conditions physiologiques, c'est pour cela que l'équipe de Bertozzi a développé une variante de la réaction en utilisant un dérivé aminoxy-tryptamine pour piéger intramoléculairement l'intermédiaire iminium formé (version Pictet-Spengler, **Schéma 4. B**).<sup>4</sup> Le produit tricyclique résultant de cette condensation est beaucoup plus stable qu'une oxime ou qu'une hydrazone dans les conditions physiologiques. De

<sup>2</sup> K. Porte, M. Riberaud, R. Châtre, D. Audisio, S. Papot, and F. Taran, *ChemBioChem*, 22/1 (2021), 100–113.

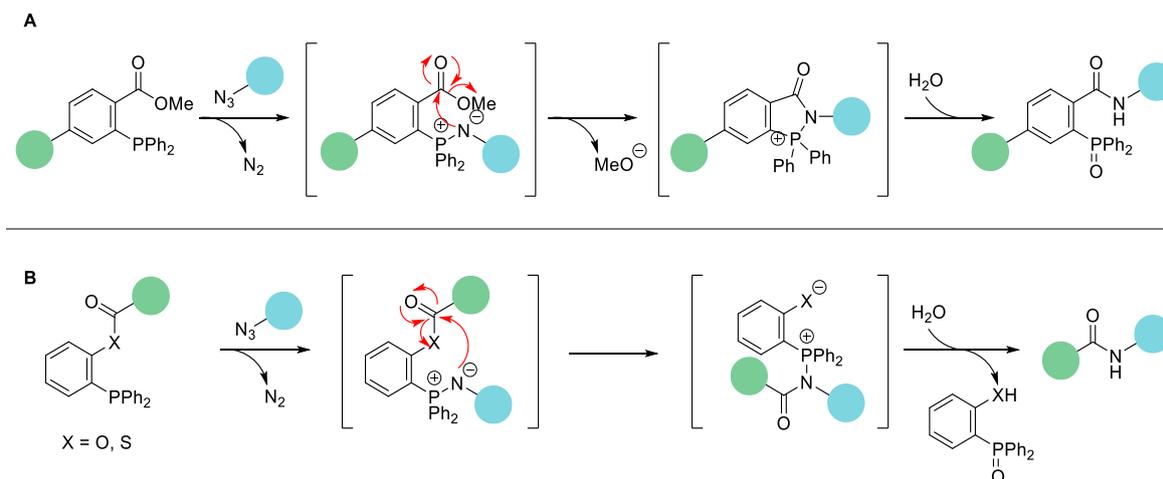
<sup>3</sup> E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48/38 (2009), 6974–98.

<sup>4</sup> P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, and C. R. Bertozzi, *PNAS*, 110/1 (2013), 46–51.

plus, cette modification entraîne une augmentation significative de la cinétique réactionnelle qui passe à près de 0,26 L/mol/s.

### 1.2.ii Ligation de Staudinger

Le groupe de Bertozzi décrit pour la première fois au début des années 2000 la ligation de Staudinger, première réaction bioorthogonale faisant intervenir deux fonctions totalement exogènes : un azoture et une phosphine (**Schéma 5. A**).<sup>5</sup> L'azoture utilisé dans ce type de réaction possède une orthogonalité quasi parfaite tout en étant très stable dans les conditions physiologiques.



**Schéma 5. A.** Ligation de Staudinger. **B.** Ligation de Staudinger "Traceless"

Ce dipôle [1,3] est facilement incorporable sur une large gamme de molécules par simple substitution nucléophile à partir de NaN<sub>3</sub>. De plus, sa petite taille ne modifie que très légèrement le comportement *in vivo* d'une molécule. Bertozzi et ses collègues ont ensuite conçu une sonde possédant une fonction ester en position *ortho* de l'atome de phosphore sur un des aromatiques de la phosphine pour piéger l'intermédiaire aza-ylure afin de former une liaison amide stable après réarrangement intramoléculaire.

Par la suite, la même équipe a amélioré cette réaction en développant une version dite « traceless » en positionnant la biomolécule à coupler sur la partie ester plutôt que sur la partie aromatique (**Schéma 5. B**).<sup>6,7</sup> Ainsi cette réaction permet d'obtenir un produit de ligation ne possédant plus de motif oxyde de phosphine. La ligation de Staudinger a été l'une des réactions bioorthogonales les plus utilisées dans les années 2000 à 2010 pour de nombreuses applications en biologie et en bioconjugaison.<sup>8</sup> Malheureusement, cette ligation présente de nombreux inconvénients principalement liés à l'utilisation de phosphines qui peuvent s'oxyder en conditions physiologiques. De plus, les phosphines ont tendance à couper les ponts disulfures présents dans de nombreuses protéines altérant ainsi leur intégrité structurale. Le manque de biocompatibilité de la phosphine allié à une cinétique réactionnelle lente (0,003 L/mol/s) rend cette réaction complexe à mettre en œuvre pour des applications *in vivo*.

<sup>5</sup> E. Saxon and C. R. Bertozzi, *Science*, 287/5460 (2000), 2007–10.

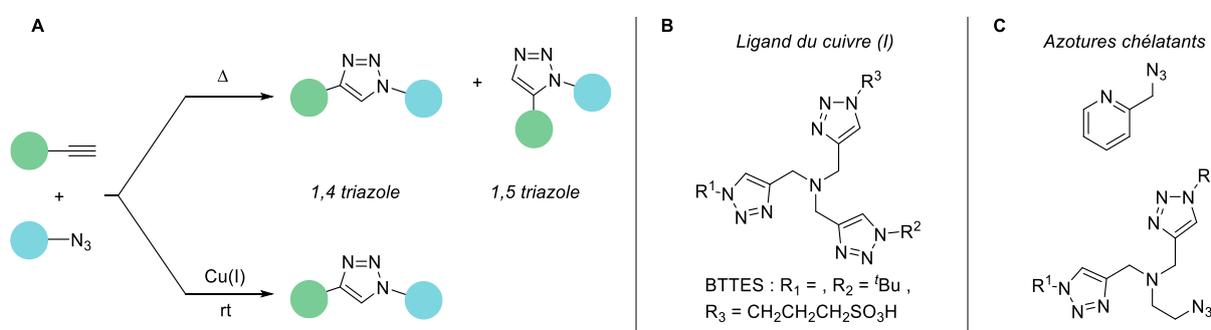
<sup>6</sup> B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, and R. T. Raines, *Org. Lett.*, 2/13 (2000), 1939–41.

<sup>7</sup> E. Saxon, J. I. Armstrong, and C. R. Bertozzi, *Org. Lett.*, 2/14 (2000), 2141–43.

<sup>8</sup> C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, and S. Bräse, *Chem. Soc. Rev.*, 40/9 (2011), 4840–71.

### 1.2.iii CuAAC

La cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azoture a été étudiée dans sa version thermique au début des années 1960 par Huisgen (**Schéma 6. A**).<sup>9</sup> Elle a cependant longtemps été délaissée compte tenu de son manque de régiosélectivité (formation des régioisomères triazoles 1,4 et 1,5 en mélange) et de conditions réactionnelles trop drastiques (chauffage prolongé). En 2002, deux groupes<sup>10,11</sup> reportent simultanément que des sels de cuivre (I) augmentent d'un facteur  $10^7$  la cinétique réactionnelle. De plus, la catalyse au cuivre permet la formation exclusive du régioisomère 1,4 à température ambiante, inscrivant ainsi cette cycloaddition dans les critères de la « chimie click » définis par K. Barry Sharpless. Le cycle triazole ainsi formé possède un moment dipolaire important<sup>12</sup> ce qui permet de participer à la formation de liaisons hydrogène ainsi qu'à des interactions de type dipôle-dipôle.<sup>13</sup> C'est également un groupement exogène relativement stable vis-à-vis de la dégradation métabolique. De ce fait, la stabilité du cycloadduit, les conditions douces de réaction, ainsi que la régiosélectivité induite par la catalyse au cuivre rendent la réaction de CuAAC efficace pour de potentielles applications *in vivo*.



**Schéma 6. A.** Cycloaddition thermique et catalysée au cuivre (I). **B.** Ligand du cuivre (I). **C.** Azotures chélatants.

Cependant, le cuivre induit un certain nombre de limitations, particulièrement dans le cadre d'applications biologiques. En effet, il contribue à la formation de ROS « espèces réactives de l'oxygène » capables d'oxyder et de dénaturer les constituants du milieu biologique (ADN, acides aminés, bases nucléiques...).<sup>14</sup> Dans l'optique de minimiser ce phénomène, des ligands spécifiques du cuivre ont été développés afin de diminuer considérablement la charge catalytique nécessaire à la réaction (**Schéma 6. B**).<sup>15,16</sup> Ting et son équipe<sup>17</sup> ont utilisé une stratégie élégante pour améliorer la vitesse de la réaction de click en liant directement la fonction azoture à un complexant du cuivre (ligands bidentates de type 2-azidométhylpyridine) (**Schéma 6. C**). Ainsi, l'azoture et le cuivre sont spatialement proche, ce qui augmente la probabilité de rencontre entre l'azoture, l'atome de cuivre et l'alcyne.

Cette modification augmente nettement la vitesse de réaction, tout en diminuant considérablement la charge catalytique en cuivre nécessaire. Cette stratégie leur a permis de marquer des sites

<sup>9</sup> R. Huisgen, G. Szeimies, and L. Möbius, *Chemische Berichte*, 100/8 (1967), 2494–2507.

<sup>10</sup> V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41/14 (2002), 2596–99.

<sup>11</sup> C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, *JOC*, 67/9 (2002), 3057–64.

<sup>12</sup> Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor, and P. Marchot, *PNAS*, 101/6 (2004), 1449–54.

<sup>13</sup> M. Whiting, J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, and V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45/9 (2006), 1435–39.

<sup>14</sup> V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, and M. G. Finn, *Bioconjug. Chem.*, 21/10 (2010), 1912–16.

<sup>15</sup> V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, and M. G. Finn, *JACS*, 129/42 (2007), 12705–12.

<sup>16</sup> T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin, *Org. Lett.*, 6/17 (2004), 2853–55.

<sup>17</sup> C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, and A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51/24 (2012), 5852–56.

spécifiques d'une protéine présente à la surface de cellules vivantes à l'aide de 2-azidométhyl-pyridine. Cette technique se limite cependant au biomarquage extracellulaire. Au sein de notre équipe, V. Bevilacqua et al.<sup>18</sup> ont développé en 2014 des azotures chélatants qui sont eux capables de franchir la paroi cellulaire afin de réaliser des réactions de marquage à l'intérieur de la cellule. Les auteurs ont synthétisé et testé une large gamme d'azotures chélatants inédits comportant dans leur structure interne des hétérocycles azotés. Ils ont ainsi identifié un azoture chélatant comportant deux triazoles (**Schéma 6. C**) permettant d'accélérer la réaction par un facteur de plus de  $4.10^4$ . Ce composé a permis de localiser un dérivé alcyne du Taxol dans des cellules humaines HuH-7 du carcinome du foie.

À notre connaissance, très peu de réactions de CuAAC ont prouvé leur intérêt dans des applications *in vivo*. Un des rares exemples dans la littérature est l'étude de Wu qui utilise une réaction de CuAAC pour imager les glycanes d'embryons de zebrafish *via* une approche de glycoingénierie cellulaire.<sup>19</sup> Un sucre non naturel comportant une fonction alcyne est incorporé dans le milieu biologique lors du développement embryonnaire. Celui-ci est alors pris en charge par les voies métaboliques et les différentes réactions impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides permettent d'incorporer des fonctions alcynes à la surface des cellules. Ces fonctions chimiques non naturelles réagissent *via* une réaction de CuAAC en présence d'un azoture fluorescent (Alexa Fluor 448) grâce au complexe BTES-Cu(I). Après seulement 3 minutes, les glycanes des embryons peuvent être observés par fluorescence. Cependant, la mise en évidence de malformations des zebrafish suggère une légère toxicité induite certainement par la présence de cuivre (I).

Une version photoinduite de la réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne a été décrite par l'équipe de Yi Pan en 2020.<sup>20</sup> Il n'est plus nécessaire d'ajouter une source de cuivre (I) dans le milieu réactionnel. Les auteurs décrivent d'excellents rendements chimiques en utilisant de la lumière blanche et un photoactivateur à base d'iridium. Cependant, cette nouvelle version de la réaction ne pourra probablement pas être utilisée *in vivo*, en raison de la mauvaise pénétration des photons dans les tissus. La longueur d'onde maximal d'absorption du photo-catalyseur se trouve aux alentours de 300 nm et à cette longueur d'onde les photons ne traversent les tissus que sur quelques centaines de  $\mu\text{m}$ .<sup>21</sup>

#### 1.2.iv SPAAC

En 1961 Wittig et Krebs découvrent pour la première fois la cycloaddition entre un cycloalcyne et un azoture et la décrivent comme une réaction explosive.<sup>22</sup> En s'inspirant de ces travaux, l'équipe de Bertozzi, pionnière dans le domaine de la chimie bioorthogonale, exploite cette réactivité particulière des alcynes cycliques pour des applications en bioconjugaison et développe une nouvelle réaction : la SPAAC (« Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition », **Schéma 7. A**). En raison de la tension de cycle imposée sur la fonction alcyne, les cyclooctynes réagissent à température ambiante avec les azotures sans avoir besoin de catalyseur.

En utilisant un cyclooctyne, conjugué à une biotine, l'équipe de Bertozzi a notamment pu prouver l'efficacité de la réaction de marquage d'azidosucres préalablement incorporés par biosynthèse aux

---

<sup>18</sup> V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, and F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53/23 (2014), 5872–76.

<sup>19</sup> H. Jiang, T. Zheng, A. Lopez-Aguilar, L. Feng, F. Kopp, F. L. Marlow, and P. Wu, *Bioconjug. Chem.*, 25/4 (2014), 698–706.

<sup>20</sup> Z.-G. Wu, X.-J. Liao, L. Yuan, Y. Wang, Y.-X. Zheng, J.-L. Zuo, and Y. Pan, *Chem. Eur. J.*, 26/25 (2020), 5694–5700.

<sup>21</sup> D. Barolet, 'Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology', *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 27/4 (2008), 227–38.

<sup>22</sup> G. Wittig and A. Krebs, *Chemische Berichte*, 94/12 (1961), 3260–75.

glycanes présents à la surface des cellules.<sup>23</sup> Même si la constante de vitesse reste faible en comparaison avec celle de la CuAAC, cette réaction n'en reste pas moins bioorthogonale. C'est l'une des premières réactions à utiliser des partenaires abiotiques et relativement stables aux conditions physiologiques.

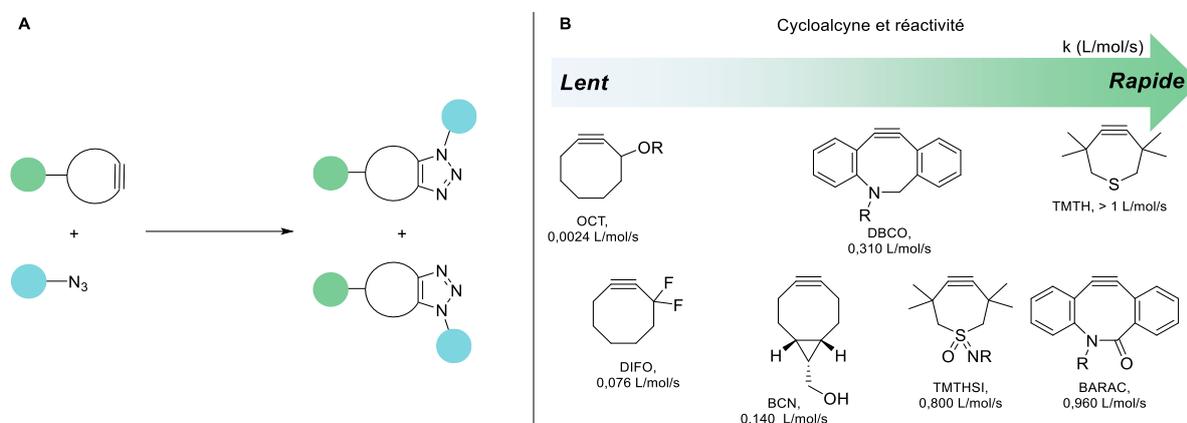


Schéma 7. A. Réaction SPAAC. B. Réactivité des cyclooctynes avec  $\text{BnN}_3$  ou similaire

Pour augmenter la cinétique réactionnelle, de nombreuses équipes ont travaillé sur la structure des cyclooctynes (Schéma 7. B). La présence de groupements électroattracteurs en  $\alpha$  de l'alcyne permet de diminuer l'énergie de la LUMO, les cycloalcyynes sont alors plus réactifs (DIFO).<sup>24</sup> Même si les modifications électroniques des différents cyclooctynes ont porté leurs fruits, une seconde stratégie a été développée en jouant cette fois-ci sur la tension de cycle pour essayer d'augmenter la réactivité du dipolarophile. L'ajout de deux cycles aromatiques de part et d'autre de l'alcyne a permis d'augmenter considérablement la tension de cycle et donc la réactivité du composé (cas du DBCO ou du BARAC).<sup>25</sup> Les constantes de vitesse obtenues restent toutefois encore trop faibles pour pouvoir envisager des applications *in vivo* ( $k =$  de 0,31 à 0,96 L/mol/s). Toujours dans le but d'augmenter la tension de cycle, Van Delft et son équipe ont synthétisé un composé bicyclique comportant un cyclopropane.<sup>26</sup> Ce cyclooctyne (BCN) possède une cinétique plus faible que le DBCO ( $k = 0,14$  L/mol/s) mais il est largement utilisé du fait de son faible coût et de sa meilleure solubilité dans les milieux aqueux. Des versions encore plus tendues comme le TMTH ont vu le jour mais sont peu stables et difficiles à isoler sous forme pure.<sup>27</sup> Récemment, une équipe a développé un dérivé sulfoximine du TMTH ce qui permet notamment de le fonctionnaliser pour éventuellement l'accrocher sur des molécules ou des protéines d'intérêt pour des applications en bioconjugaison. Malheureusement, les auteurs ne décrivent pas d'études de stabilité dans les milieux biologiques.<sup>28</sup> La réaction SPAAC a été intensément utilisée par différentes équipes pour des applications *in vivo*.<sup>2</sup>

<sup>23</sup> N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, *JACS*, 126/46 (2004), 15046–47.

<sup>24</sup> J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, and C. R. Bertozzi, *PNAS*, 104/43 (2007), 16793–97.

<sup>25</sup> X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, and G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47/12 (2008), 2253–55.

<sup>26</sup> J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, and F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49/49 (2010), 9422–25.

<sup>27</sup> G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51/10 (2012), 2443–47.

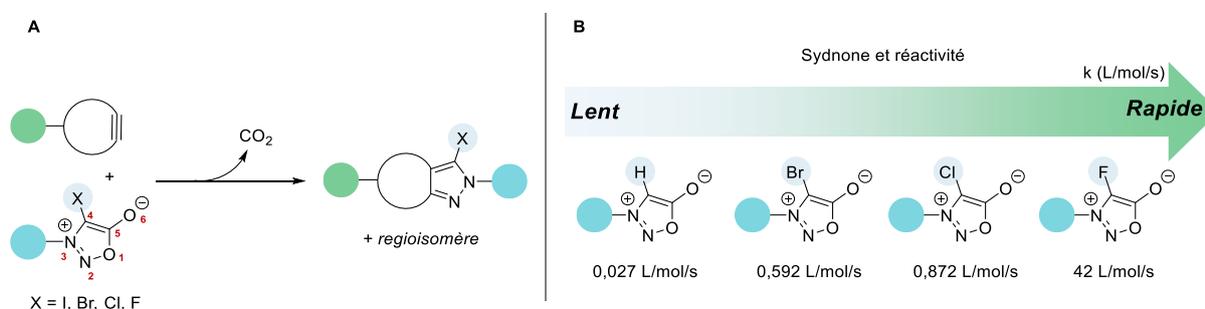
<sup>28</sup> J. Weterings, C. J. F. Rijcken, H. Veldhuis, T. Meulemans, D. Hadavi, M. Timmers, M. Honing, H. Ippel, and R. M. J. Liskamp, *Chem. Sci.*, 11/33 (2020), 9011–16.

## 1.2.v SPSAC

L'équipe de Chin publie en 2014 une version similaire de la réaction SPAAC mais utilisant cette fois-ci une sydnone à la place de la fonction azoture. Ce premier exemple de SPSAC (« Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition ») décrit la réaction entre un dérivé de *N*-phénylsydnone et le BCN (**Schéma 8**).<sup>29</sup> Cette réaction est légèrement plus lente que la réaction SPAAC avec le même cycloalcyne.

La même année notre équipe publie une étude réalisée sur plusieurs sydnones permettant de rationaliser les principaux facteurs structuraux accélérant la SPSAC.<sup>30</sup>

Nous avons notamment mis en évidence que l'ajout de substituants électroattracteurs sur l'aryl de la position N<sup>3</sup> de la sydnone ainsi que l'introduction d'halogènes en position C<sup>4</sup> accélère nettement la cinétique réactionnelle. Cet effet a ensuite été expliqué par Houk et Liang grâce à des études de modélisation. Ces études ont montré que la substitution en C<sup>4</sup> de l'hydrogène par un halogène diminue la barrière d'activation nécessaire à la distorsion de la sydnone pour atteindre l'état de transition.<sup>31</sup>



**Schéma 8.** A. Réaction SPSAC. B. Réactivité des sydnones avec BCN.

Les C<sup>4</sup>-fluoro-sydnones sont de loin les plus réactives des sydnones. En présence de groupements électroattracteurs en position N<sup>3</sup>, les fluorosydnones peuvent réagir à près de 12 000 L/mol/s en présence de TMTH (cyclooctyne le plus réactif à ce jour). Cependant, elles présentent une stabilité relative ce qui limite leur utilisation *in vivo*. Un bon compromis entre réactivité et stabilité se trouve être les chlorosydnones. Ces composés réagissent environ 50 fois plus vite que les sydnones et, lorsqu'ils possèdent un groupement électroattracteur en position N<sup>3</sup>, la réaction peut dépasser 300 L/mol/s en présence de DBCO.

## 1.2.vi iEDDA

Vers la fin des années 50 Lindsey et son équipe décrivent pour la première fois la réactivité particulière des tétrazines (Tz) avec différents composés insaturés (**Schéma 9**).<sup>32</sup> Ils observent à l'époque que cette cycloaddition [4+2] peut être classée comme une réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA). Autrement dit c'est l'orbitale HOMO du diénophile qui réagit avec la LUMO du diène (le contraire étant observé dans les réactions de Diels-Alder classiques).

<sup>29</sup> S. Wallace and J. W. Chin, *Chem. Sci.*, 5/5 (2014), 1742–44.

<sup>30</sup> L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuyper, C. Créminon, D.-A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Chem. Comm.*, 50/66 (2014), 9376–78.

<sup>31</sup> H. Tao, F. Liu, R. Zeng, Z. Shao, L. Zou, Y. Cao, J. M. Murphy, K. N. Houk, and Y. Liang, *Chem. Comm.*, 54/40 (2018), 5082–85.

<sup>32</sup> R. A. Carboni and R. V. Lindsey, *JACS*, 81/16 (1959), 4342–46.

En 2008, Fox et ses collègues étendent les travaux de Lindsey au domaine de la chimie bioorthogonale en utilisant un alcène cyclique tendu le trans-cyclooctène (TCO).<sup>33</sup> Le TCO réagit dans un premier temps avec la tétrazine selon une cycloaddition [4+2] pour former un intermédiaire tricycle qui, après une réaction de rétro Diels-Alder suivie d'un transfert d'électron et d'une oxydation, forme une pyridazine.

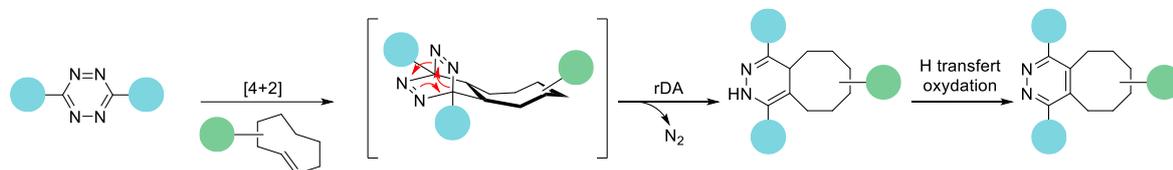


Schéma 9. Réaction Tz/TCO IEDDA

Contrairement aux réactions précédentes, cette réaction possède des cinétiques très élevées ( $k = 210$  à  $2\,800\,000$  L/mol/s) ce qui en fait l'une des réactions les plus utilisées à ce jour en chimie bioorthogonale pour des applications allant de la bioconjugaison aux réactions *in vivo*.

Cependant, le TCO n'est pas totalement stable en conditions physiologiques en raison de sa tension de cycle et peut s'isomériser en sa forme *cis* inactive (mais plus stable), le CCO. Certaines études suggèrent que les thiols endogènes sont à l'origine de l'isomérisation de cet alcène cyclique *via* des processus radicalaires.<sup>34</sup> Des études ont donc été menées pour améliorer la stabilité et le temps de vie *in vivo* du TCO.<sup>35</sup> On peut notamment citer les travaux de Fox qui reporte en 2014 la modification de la conformation spatiale du cyclooctène pour augmenter sa stabilité, sa réactivité et même sa solubilité en milieu aqueux.

Très récemment l'équipe de Mizukami reporte que la distorsion du dipôle tétrazine induite par la présence d'un pont entre les positions 2 et 4 empêche la cycloaddition [4+2] de se faire (Schéma 10).<sup>36</sup> Le clivage du pont entraîne la réaromatisation du système et la cycloaddition peut alors se produire. Ce système est à notre connaissance l'un des premiers à proposer une version activable de la réaction de ligation Tz/TCO. Cette technologie pourrait avoir des applications importantes dans les années à venir en bioconjugaison.

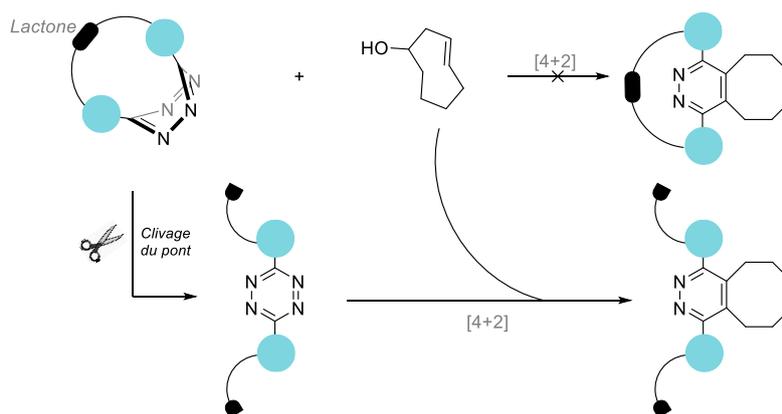


Schéma 10. Conception de Tz activables pour un contrôle on/off de la réaction iEDDA

<sup>33</sup> M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, *JACS*, 130/41 (2008), 13518–19.

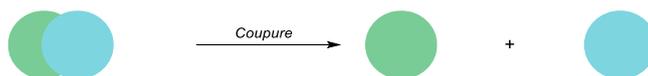
<sup>34</sup> Y. Fang, J. C. Judkins, S. J. Boyd, C. W. am Ende, K. Rohlifing, Z. Huang, Y. Xie, D. S. Johnson, and J. M. Fox, *Tetrahedron*, 75/32 (2019), 4307–17.

<sup>35</sup> A. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin, and J. M. Fox, *Chem. sci.*, 5/10 (2014), 3770–76.

<sup>36</sup> I. Novianti, T. Kowada, and S. Mizukami, *Org. Lett.*, 24/17 (2022), 3223–26.

### 1.3 Les réactions de coupure

Les réactions de coupure ont été développées pour implémenter les réactions bioorthogonales existantes en introduisant la notion de coupure sélective de liaisons covalentes et donc celle de relargage contrôlé de molécules.<sup>37</sup> Basé sur le concept déjà existant de déprotection ou « decaging », largement utilisé pour le développement de prodrogues activables par voie enzymatique, cette stratégie a été étendue aux stimulus externes photoinduits ou catalysé par des métaux pour permettre la déprotection de fonctions biologiquement actives (**Schéma 11**). Cette partie ne décrit pas de façon exhaustive l'état de l'art de toutes les réactions de coupure, nous ne présenterons que celles qui, selon nous, sont les plus significatives en chimie bioorthogonale.

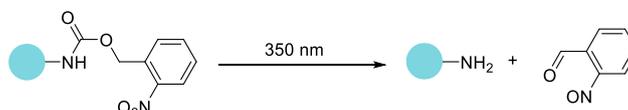


**Schéma 11.** Représentation schématique d'une réaction de coupure

#### 1.3.i Les réactions de coupures photoactivables

La déprotection photoinduite la plus couramment utilisée est le clivage sélectif d'une liaison éther d'orthonitrobenzyle *via* une irradiation ultraviolette à 350 nm (**Schéma 12**).<sup>38</sup>

Malheureusement, l'utilisation de rayons UV induit aussi une toxicité non négligeable ce qui, allié à la faible pénétration des UV dans les tissus biologiques, limite considérablement les applications. En outre, le dérivé nitroso-aldéhyde généré au cours de la réaction est également fortement toxique ce qui ne représente qu'un problème mineur si le but est de libérer un agent cytotoxique pour tuer des cellules mais peut être problématique pour d'autres types d'applications.



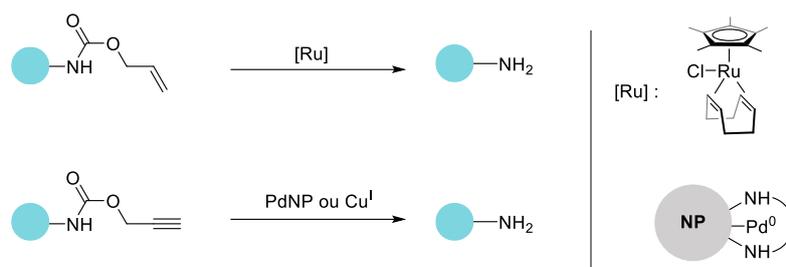
**Schéma 12.** Coupure photoinduite d'un éther d'orthonitrobenzyle carbamate

#### 1.3.ii Les réactions de coupures induites par des métaux de transition

Certaines réactions classiquement utilisées en chimie organique ont été adaptées en version bioorthogonale pour décager sélectivement une molécule en déprotégeant une fonction chimique essentielle à son activité biologique (**Schéma 13**). C'est le cas par exemple de la déprotection de groupement Alloc par une réaction de type Tsuji-Trost catalysée par des complexes de ruthénium. Pour adapter ces réactions aux conditions physiologiques, il a fallu principalement jouer sur la compatibilité biologique des ligands métalliques.

<sup>37</sup> J. Li and P. R. Chen, *Nat. Chem. Biol.*, 12/3 (2016), 129–37.

<sup>38</sup> P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, and J. Wirz, *Chem. Rev.*, 113/1 (2013), 119–91.

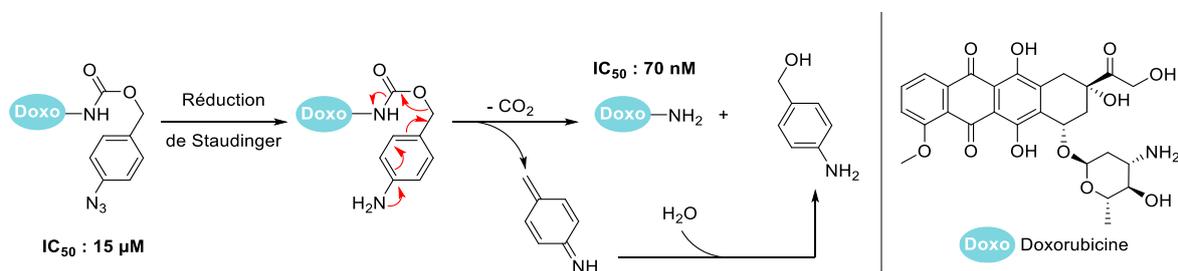


**Schéma 13.** Réactions de coupures induites par des métaux

Par exemple, Streu et Meggers ont mis au point un catalyseur à base de ruthénium pour sélectivement déprotéger une rhodamine par un groupement Alloc à l'intérieur de cellules.<sup>39</sup> La déprotection de groupement Ynoc (propargyle carbamate) par des complexes de cuivre (I) ou des nanoparticules de palladium ont également été investiguée dans diverses applications biologiques.<sup>40,41,42,43</sup> Cette méthode a notamment permis de réaliser des études *in vivo* sur des embryons de poisson zèbre pour le décajing de rhodamine à l'aide de nanoparticules de palladium ou d'or.<sup>44,45</sup>

### 1.3.iii Coupures induites par la réaction de Staudinger

En 2008, Robillard décrit pour la première fois la libération de médicaments en utilisant la réaction de Staudinger. La réduction d'une fonction azoture habilement placée sur un précurseur de bras auto-immolable entraîne la formation d'un intermédiaire capable de subir une élimination 1,6 pour libérer le principe actif (**Schéma 14**).<sup>46</sup> Les auteurs ont étudié la libération contrôlée de doxorubicine par cette réaction.



**Schéma 14.** Coupure de Staudinger

Ils ont notamment constaté que la doxorubicine cagée par le précurseur du bras auto-immolable présente une  $IC_{50}$  de presque  $15 \mu M$  alors qu'en présence de phosphine, cette valeur diminue à presque  $0,07 \mu M$ .

<sup>39</sup> C. Streu and E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45/34 (2006), 5645–48.

<sup>40</sup> X. Wang, Y. Liu, X. Fan, J. Wang, W. S. C. Ngai, H. Zhang, J. Li, G. Zhang, J. Lin, and P. R. Chen, *JACS*, 141/43 (2019), 17133–41.

<sup>41</sup> A. A. Kislukhin, V. P. Hong, K. E. Breitenkamp, and M. G. Finn, *Bioconjug. Chem.*, 24/4 (2013), 684–89.

<sup>42</sup> R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Sánchez-Martín, and M. Bradley, *Nat. Chem.*, 3/3 (2011), 239–43.

<sup>43</sup> C. Vidal, M. Tomás-Gamasa, A. Gutiérrez-González, and J. L. Mascareñas, *JACS*, 141/13 (2019), 5125–29.

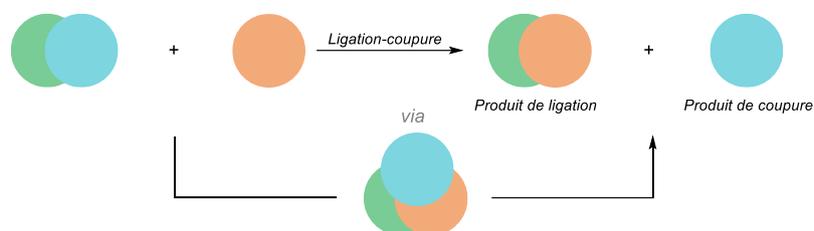
<sup>44</sup> J. T. Weiss, J. C. Dawson, K. G. Macleod, W. Rybski, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E. E. Patton, M. Bradley, N. O. Carragher, and A. Unciti-Broceta, *Nat. Comm.*, 5/1 (2014), 3277.

<sup>45</sup> A. M. Pérez-López, B. Rubio-Ruiz, V. Sebastián, L. Hamilton, C. Adam, T. L. Bray, S. Irusta, P. M. Brennan, G. C. Lloyd-Jones, D. Sieger, J. Santamaría, and A. Unciti-Broceta, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56/41 (2017), 12548–52.

<sup>46</sup> R. van Brakel, R. C. M. Vuldres, R. J. Bokdam, H. Grüll, and M. S. Robillard, *Bioconjug. Chem.*, 19/3 (2008), 714–18.

## 1.4 Les réactions de ligation-coupure

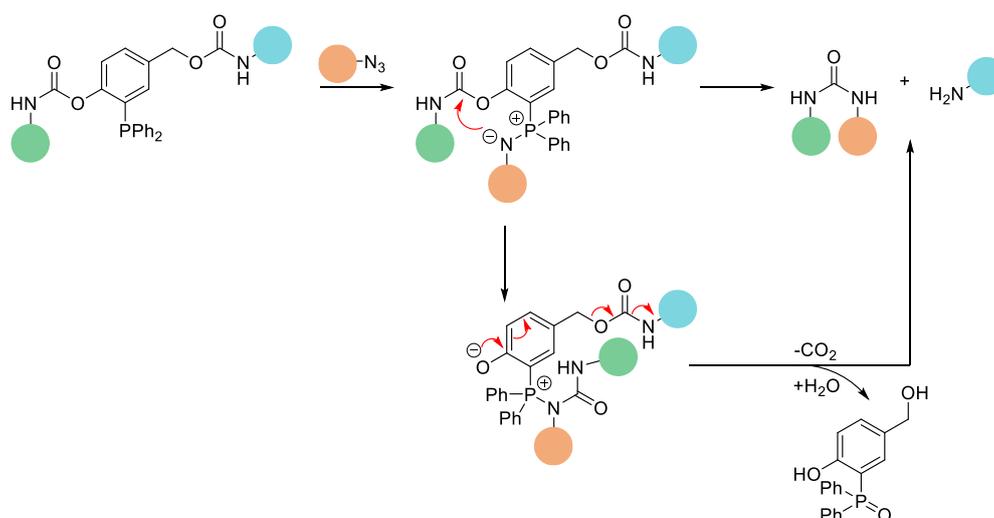
Une réaction de ligation-coupure (**Schéma 15**) se déroule généralement en deux étapes, la première réaction permet la ligation covalente de deux partenaires réactionnels pour former un intermédiaire instable. Cet intermédiaire est ensuite capable de se réarranger pour libérer une partie de sa structure. Ces réactions résultent principalement de modifications de réactions déjà existantes.<sup>47</sup>



**Schéma 15.** Représentation schématique d'une réaction de ligation-coupure

### 1.4.i Ligation-coupure de Staudinger

La ligation de Staudinger a été adaptée pour lier de façon covalente deux cibles biologiques en plus de libérer sélectivement un principe actif. Florent et son équipe ont été les premiers à élaborer une sonde capable de libérer de la doxorubicine et une urée issues de la ligation des deux partenaires (**Schéma 16**).<sup>48</sup>



**Schéma 16.** Réaction de ligation coupure de Staudinger

Malheureusement la cinétique est très faible puisque pour atteindre 90% de relargage du médicament il faut attendre 3 heures même à une concentration de 2,8 mM. Cette technologie n'en reste pas moins intéressante et pourrait par exemple être utilisée pour le relargage contrôlé de deux médicaments en simultané permettant des effets synergiques.

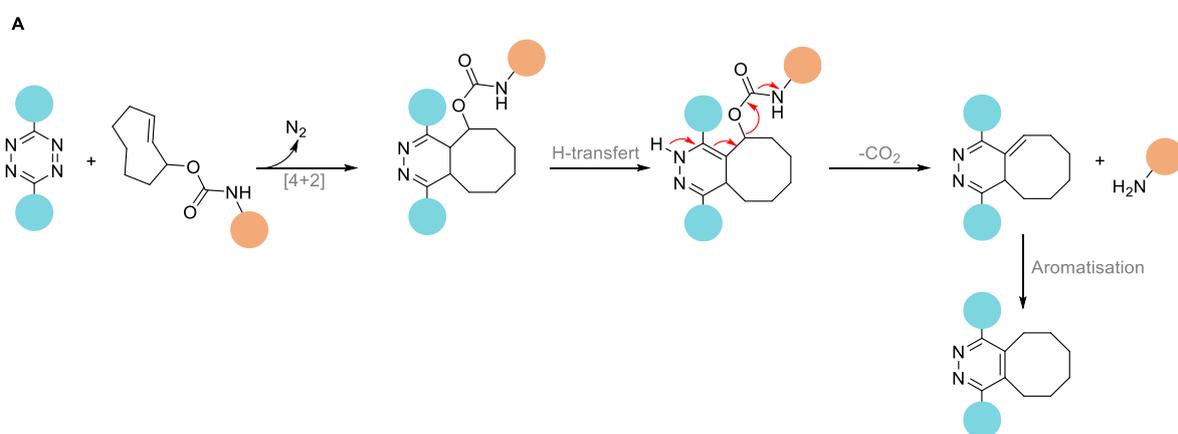
<sup>47</sup> X. Ji, Z. Pan, B. Yu, L. K. D. L. Cruz, Y. Zheng, B. Ke, and B. Wang, *Chem. Soc. Rev.*, 48/4 (2019), 1077–94.

<sup>48</sup> M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, and J.-C. Florent, *Bio. Med. Chem. Lett.*, 16/12 (2006), 3147–49.

## I.4.ii IEDDA

L'une des réactions les plus performantes reste la réaction Diels-Alder à demande inverse en électrons entre les tétrazines et les trans-cyclooctènes (**Schéma 17. A**). Cette cycloaddition a été adaptée pour permettre la libération contrôlée de principes actifs en modifiant notamment la structure d'un des deux partenaires réactionnels. En effet, Robillard et ses collègues ont introduit une fonction carbamate en position allylique du TCO capable de se réarranger et de libérer une amine lors de la réaromatisation du système en pyridazine.<sup>49</sup> Si les deux premières étapes de cette réaction restent les mêmes que dans la version classique, c'est la dernière qui change permettant l'élimination de CO<sub>2</sub> et de l'amine du principe actif (**Schéma 17. A**).

Cependant, en faisant varier les groupements en position 1 et 4 du motif tétrazine l'équipe de Robillard s'est aperçue que ces modifications avaient un impact majeur sur le pourcentage de relargage de la molécule souhaitée.<sup>50</sup> Chen, a quant à lui montré 3 ans plus tard que la présence de groupements électroattracteurs favorables pour la cinétique était préjudiciable pour le relargage de principe actif (**Schéma 17. B**).<sup>51</sup>



**Schéma 17. A.** Réaction IEDDA **B.** Tétrazines utilisées et taux de libération

Récemment l'équipe de Weissleder a identifié dans une étude remarquable les limites de la réaction le ligation coupure Tz/TCO (**Schéma 18**).<sup>52</sup> Si la première réaction de ligation est efficace et rapide, la réaction de coupure semble être quant à elle très dépendante du pH, du tampon et plus généralement

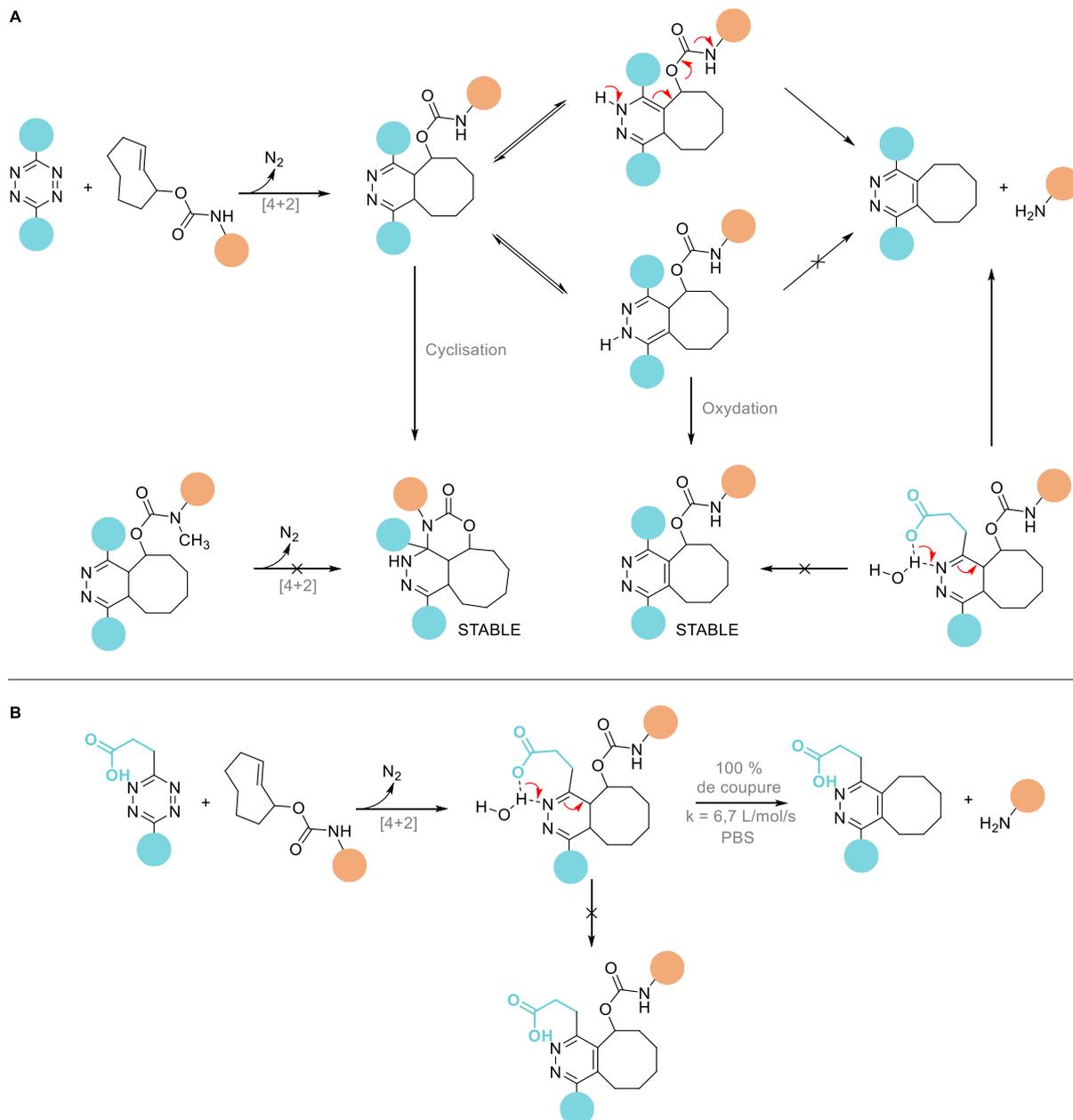
<sup>49</sup> R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, and M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52/52 (2013), 14112–16.

<sup>50</sup> R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen, and M. S. Robillard, *Bioconjug. Chem.*, 27/7 (2016), 1697–1706.

<sup>51</sup> X. Fan, Y. Ge, F. Lin, Y. Yang, G. Zhang, W. S. C. Ngai, Z. Lin, S. Zheng, J. Wang, J. Zhao, J. Li, and P. R. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55/45 (2016), 14046–50.

<sup>52</sup> J. C. T. Carlson, H. Mikula, and R. Weissleder, *JACS*, 140/10 (2018), 3603–12.

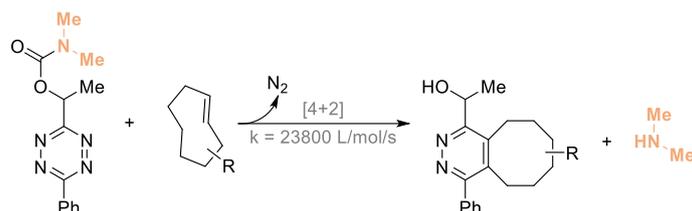
de son environnement proche. La première limitation mise en lumière dans l'article est la réaction d'oxydation de l'intermédiaire dihydropyrazine pour former une pyrazine totalement stable ne permettant pas la libération du composé. Pour contourner cela, cette équipe a brillamment démontré qu'en introduisant une fonction acide sur la tétrazine, un transfert de proton intramoléculaire permettait d'éviter l'oxydation tout en accélérant la libération de l'amine.



**Schéma 18. A.** Réactions parasites à la réaction de coupure TCO/Tz. **B.** Mécanisme avec la tétrazine acide.

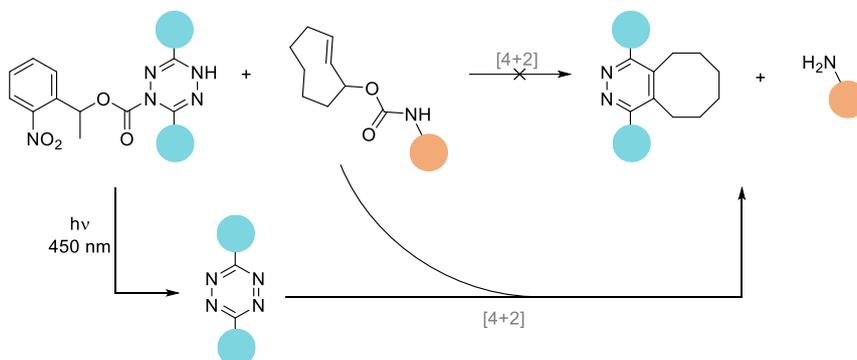
Le second problème, est lui lié à l'attaque intramoléculaire de l'azote de la fonction carbamate sur la partie 1,4-dihydrodiazine pour former un intermédiaire tricyclique lui aussi totalement stable et ne permettant pas la libération du composé actif. Pour limiter ce problème Weissleder indique que le *N*-méthyl carbamate permet d'éviter totalement la réaction de cyclisation intramoléculaire. En alliant ces deux nouvelles modifications il est alors possible de libérer relativement rapidement et quasi quantitativement une amine.

Plus récemment, l'équipe de Robillard reporte l'utilisation de tétrazines carbamates pour la libération d'amines. Dans cette étude les auteurs montrent que ce système est efficace (à l'aide d'une réaction modèle, **Schéma 19**). Ils ont ensuite adapté ce système pour la libération de mono-méthyle Auristatine E, un composé anticancéreux très utilisé, les cinétiques de libérations semblent être cependant bien plus lentes qu'avec la réaction modèle.<sup>53</sup>



**Schéma 19.** Réaction modèle : libération de diméthylamine à partir d'une tétrazine-carbamate

En 2022, l'équipe de Devaraj a élaboré une version photoactivable de la réaction Tz/TCO en développant une dihydrotétrazine liée à un groupement photo-labile qui, sous irradiation UV, induit la formation de la tétrazine active pour la réaction IEDDA (**Schéma 20**).<sup>54</sup>



**Schéma 20.** Version photoactivable de la réaction Tz/TCO

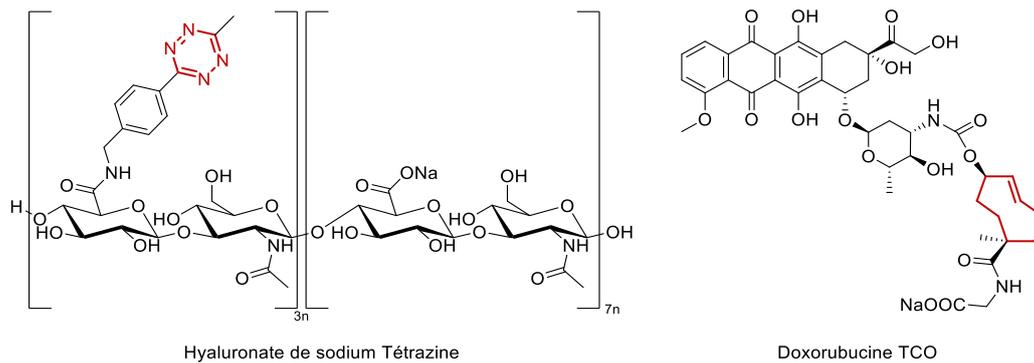
Cette méthode leur a notamment permis de libérer de la doxorubicine dans des cellules vivantes mettant en lumière son intérêt pour un contrôle spatio-temporel de la libération de composés actifs.

La ligation Tz/TCO est l'une des réactions plus utilisées en bioconjugaison que ce soit pour des applications *in vitro* ou même *in vivo* si bien qu'un essai clinique est rentré en phase I pour la libération contrôlée de doxorubicine dans la tumeur (**Figure 1**).<sup>55</sup>

<sup>53</sup> A. H. A. M. van Onzen, R. M. Versteegen, F. J. M. Hoeben, I. A. W. Filot, R. Rossin, T. Zhu, J. Wu, P. J. Hudson, H. M. Janssen, W. ten Hoeve, and M. S. Robillard, *JACS*, 142/25 (2020), 10955–63.

<sup>54</sup> L. Liu, D. Zhang, M. Johnson, and N. K. Devaraj, *Nat. Chem.*, (2022), 1–8.

<sup>55</sup> K. Wu, N. A. Yee, S. Srinivasan, A. Mahmoodi, M. Zakharian, J. M. M. Oneto, and M. Royzen, *Chem. Sci.*, 12/4 (2021), 1259–71.



**Figure 1.** Essai clinique en cours pour le relargage de doxorubicine par un système bioorthogonal Tz/TCO.

Le principe est assez simple, du Hyaluronate de sodium Tz (sous forme de gel) est injecté en intratumorale, puis le patient reçoit 5 fois par jour en i.v une solution contenant la doxorubicine dont la fonction amine est protégée sous forme de carbamate de TCO. Ce dérivé est 80 fois moins toxique que la doxorubicine libre ce qui augmente la fenêtre thérapeutique. Lorsque cette prodrogue arrive dans la tumeur celle-ci est déprotégée grâce à la réaction de click-release avec les Tz implantées dans la tumeur. A l'heure actuelle les résultats de l'essai clinique chez l'Homme ne sont pas encore publiés mais les résultats sur souris sont très prometteurs.<sup>55</sup> Cette étude met en lumière tout l'intérêt porté à la réaction Tz/TCO et plus généralement aux réactions bioorthogonales. C'est un domaine en pleine expansion qui trouve des applications dans des domaines variés.

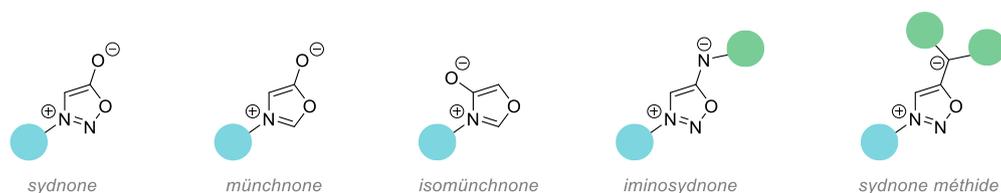
Dans notre laboratoire nous nous intéresserons particulièrement aux réactions bioorthogonales impliquant les iminosydones. La prochaine partie sera donc consacrée aux iminosydones en commençant par l'historique de leur découverte pour terminer par les dernières avancées sur le sujet.

## II Les iminosydnone

Ma thèse est axée sur l'utilisation des iminosydnone pour diverses applications biologiques et notamment en exploitant leur capacité à réagir avec des alcynes sous contrainte stérique. Cette réaction sera appelée par la suite par son acronyme : SPICC pour Strain-Promoted Iminosydnone Cyclooctyne Cycloaddition). Cette partie s'attardera donc sur une présentation générale des iminosydnone en passant par une présentation des travaux antérieurs à cette thèse.

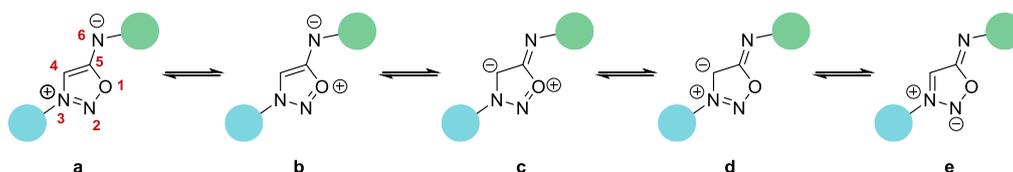
### II.1 Généralités sur les mésoioniques et les iminosydnone

Le mot « mésoionique » a été évoqué pour la première fois à la fin des années 40 par Baker et Ollis et découle de la contraction des mots « mésomérique » et « ionique ». <sup>56</sup> Ce terme regroupe une famille de dipôles hétérocycliques à 5 chaînons ne pouvant pas être représentée par une unique structure chargée. Plusieurs dipôles hétérocycliques de ce type ont été décrits au fil des années par différents groupes. Il est possible de citer notamment les sydnones, les sydnone-méthides, les (iso)münchnone ou encore les iminosydnone (**Figure 2**). Notre équipe s'intéresse plus particulièrement aux iminosydnone, qui contrairement aux sydnones avec un oxygène en position 6 possèdent un azote.



**Figure 2.** Structure des mésoioniques les plus courants

Les iminosydnone et plus généralement les composés mésoioniques sont des zwitterions qui peuvent s'écrire avec plusieurs formes limites en équilibre plus ou moins déplacé suivant les substituants en N<sup>3</sup> et N<sup>6</sup> (**Figure 3**).



**Figure 3.** Formes mésomères des iminosydnone

Deux formes d'écriture seront plébiscitées dans ce manuscrit, les formes **a** et **e** qui tendent à représenter au mieux la localisation de la densité électronique du dipôle. Les formes limites nous indiquent que le carbone en C<sup>4</sup> et l'azote N<sup>6</sup> sont plutôt nucléophiles alors que le carbone C<sup>5</sup> et l'azote N<sup>3</sup> sont plutôt électrophiles. Ces informations sont essentielles pour mieux anticiper la réactivité du dipôle.

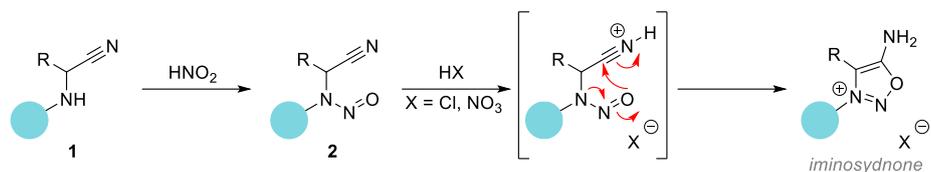
### II.2 Historique

C'est en 1957 que les premières iminosydnone ont été synthétisées par le groupe de Walker et le groupe de Ohta.<sup>57</sup> Leur première idée a été de traiter le *N*-nitroso-*N*-méthylaminoacétonitrile **2** avec de l'anhydride acétique, à l'instar de la synthèse des sydnones. Malheureusement, aucun produit n'a

<sup>56</sup> W. Baker, W. D. Ollis, and V. D. Poole, *JACS*, 0 (1949), 307–14.

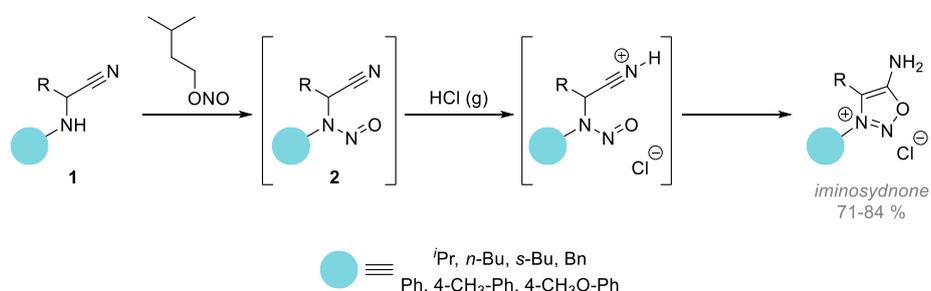
<sup>57</sup> H. Kato, M. Hashimoto, M. Ohta, *Nippon Kagaku zasshi*, (1957), 78, 707–13

été observé, ils utilisèrent alors un acide de Brønsted, l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique, et observèrent pour la première fois la formation du sel de chlorure ou de nitrate d'iminosydnone protonée (**Schéma 21**).



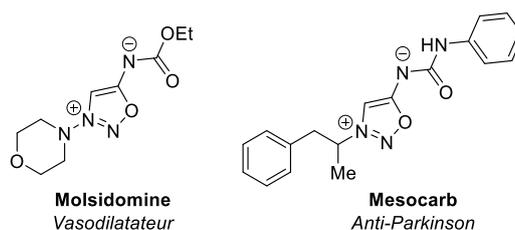
**Schéma 21.** Synthèse des iminosydnones

Pour éviter le plus possible la manipulation de *N*-nitrosamines cancérigènes, Turnbull et Beal ont mis au point en 1992 une synthèse monotope faisant intervenir l'isoamyl nitrile comme donneur de nitroso. Par la suite, un bullage de HCl dans la solution permet d'induire la cyclisation pour former le chlorhydrate d'iminosydnone correspondant.<sup>58</sup> Cette synthèse a également l'avantage d'éviter l'utilisation d'acide nitreux (**Schéma 22**).



**Schéma 22.** Synthèse monotope développée par Turnbull et Beal

Les premières iminosydnones synthétisées à l'époque étaient principalement substituées par des groupements aryliques ou alkyls sur l'azote N<sup>3</sup>.<sup>59</sup> Mais au fur et à mesure, les groupes travaillant sur ces dipôles ont introduit en position N<sup>3</sup> des groupements plus exotiques comme des fonctions *N*-oxides ou hydrazines pour évaluer leurs propriétés biologiques.



**Figure 4.** Médicaments ayant un squelette iminosydnone

Plusieurs médicaments ont été développés à partir des années 70 dont les plus connus sont la Molsidomine et le Mesocarb (**Figure 4**). Ces médicaments sont des donneurs de monoxyde d'azote, très utiles pour la modulation des capacités cardiovasculaires par exemple.<sup>60,61</sup> Outre les propriétés biologiques, un groupe a récemment utilisé les iminosydnones pour la synthèse d'explosifs.<sup>62</sup>

<sup>58</sup> E. N. Beal, K. Tumbull, *synth. commun.*, (1992), 22, 673–76

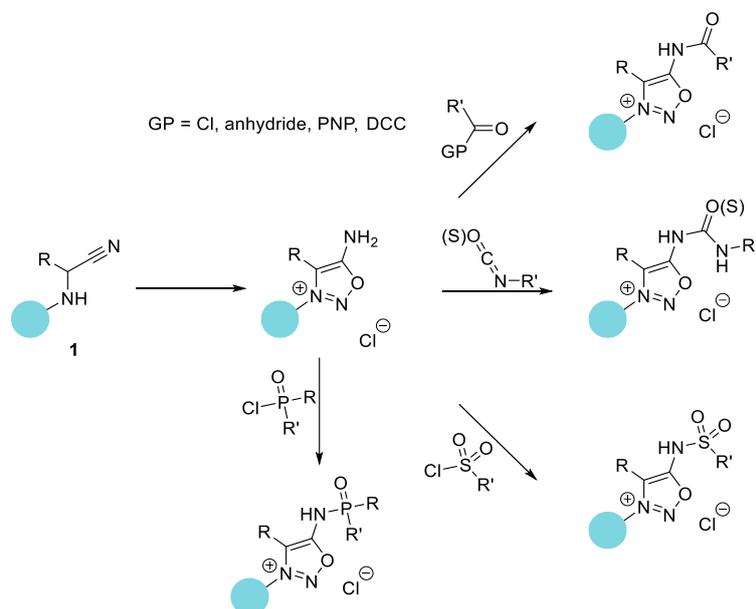
<sup>59</sup> K. Masuda, Y. Imashiro, T. Kaneko, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 18/1 (1970), 128–32.

<sup>60</sup> L. J. Ignarro, C. Napoli, and J. Loscalzo, *Circulation Research*, 90/1 (2002), 21–28.

<sup>61</sup> L. Soullère, P. Hoffmann, and F. Bringaud, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 40/5 (2003), 943–47.

<sup>62</sup> M. L. Gettings, E. F. C. Byrd, M. Zeller, and D. Piercey, *New Journal of Chemistry*, 45/4 (2021), 2228–36.

La synthèse des iminosydnones se fait généralement en deux parties distinctes. Tout d'abord, le cycle iminosydnone est formé par étape de nitrosylation-cyclisation comme décrit précédemment, ensuite la diversité fonctionnelle est apportée sur N<sup>6</sup> *via* des post-fonctionnalisations avec des électrophiles (**Schéma 23**).

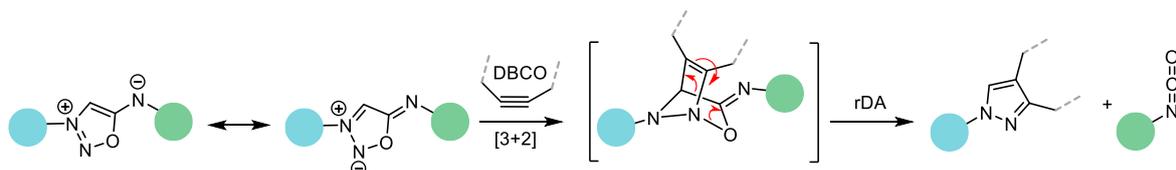


**Schéma 23.** Synthèse d'iminosydnones fonctionnalisées. GP : groupe partant

Ainsi, en fonction de l'électrophile utilisé (acyle activé, iso(thio)cyanate, chlorure de sulfonyle ou de phosphore) cinq classes d'iminosydnones peuvent être obtenues : celles ayant des fonctions amides, (thio)urées, phosphoramides et sulfoamides en position N<sup>6</sup>.

### II.3 Travaux antérieurs du laboratoire

La réactivité des iminosydnones vis-à-vis des cycloalcynes a été découverte par notre équipe en 2017 lors d'une étude de criblage visant à découvrir de nouvelles réactions de cycloaddition.<sup>63</sup> La réaction de ligation coupure des iminosydnones avec les cyclooctynes, tel que le DBCO, est un processus en deux étapes impliquant une cycloaddition [3+2] suivie d'une réaction de rétro Diels-Alder générant un produit de ligation (pyrazole) et un produit de coupure (isocyanate) (**Schéma 24**).



**Schéma 24.** Réaction de ligation coupure entre une iminosydnone et un cyclooctyne. rDA : rétro-Diels-Alder

Suite à cette découverte, notre laboratoire s'est particulièrement intéressé à la synthèse et à la fonctionnalisation des iminosydnones. Dans cette optique, des méthodes plus générales ont été développées en passant notamment par un intermédiaire imidazolium pour l'introduction d'une variété de nucléophiles (**Schéma 25**).<sup>64</sup> Nous avons concentré notre attention sur la synthèse de N<sup>3</sup>-aryl

<sup>63</sup> S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. N. Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition*, 56/49 (2017), 15612–16.

<sup>64</sup> M. Riomet, E. Decuypere, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, and F. Taran, *Chemistry – A European Journal*, 24/34 (2018), 8535–41.

iminosydnone décrites comme étant plus stables, grâce à une meilleure stabilisation de l'hétérocycle.<sup>65,66</sup>

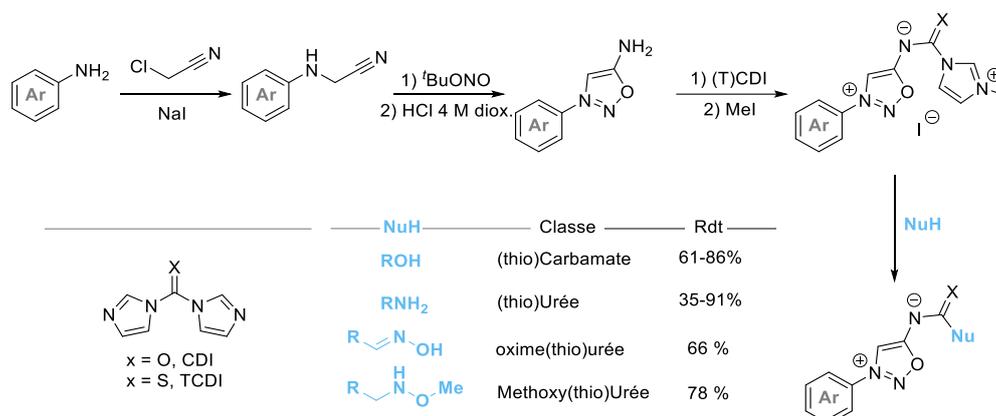


Schéma 25. Synthèse d'iminosydnone fonctionnalisées en N<sup>6</sup>

Dans cette synthèse, l'aniline choisie peut être alkylée dans les conditions de Finkelstein en présence de chloroacétonitrile. Ensuite une réaction de nitrosylation/cyclisation donne accès à l'iminosydnone correspondante. Une réaction avec le (thio)carbonyldiimidazole suivie d'une méthylation de l'imidazole permet d'obtenir l'iminosydnone imidoazolium correspondante qui peut être ensuite traitée avec une variété de nucléophiles pour obtenir la fonctionnalisation souhaitée.

La position C<sup>4</sup> peut également être fonctionnalisée par des électrophiles comme le dibrome ou encore les dérivés *N*-halogéno-succinimides NXS (Schéma 26).<sup>67</sup>

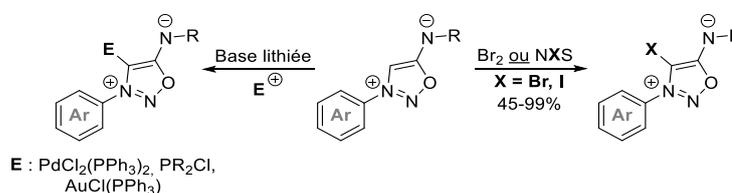


Schéma 26. Halogénéation des iminosydnone

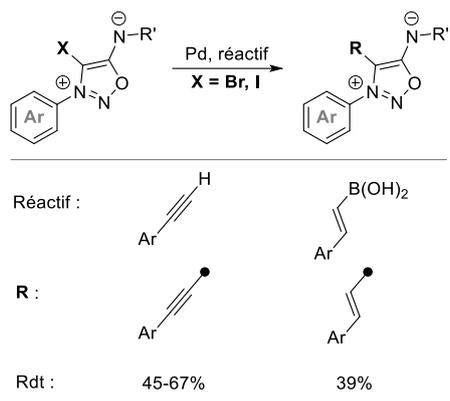
La proton en position C<sup>4</sup> est relativement acide (pKa = 18-20) et peut être déprotoné par une base lithinée puis *in situ* fonctionnalisé avec une diversité de nucléophiles.

Ces dérivés C<sup>4</sup> halogénés peuvent à leur tour être fonctionnalisés à l'aide de réactions pallado-catalysées pour introduire facilement de la diversité fonctionnelle (Schéma 27).

<sup>65</sup> L. E. Kholodov, E. V. Borisov, and V. G. Yashunskii, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 4/4 (1971), 514–16.

<sup>66</sup> L. E. Kholodov, E. V. Borisov, and V. G. Yashunskii, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 1/1, (1966), 215–18.

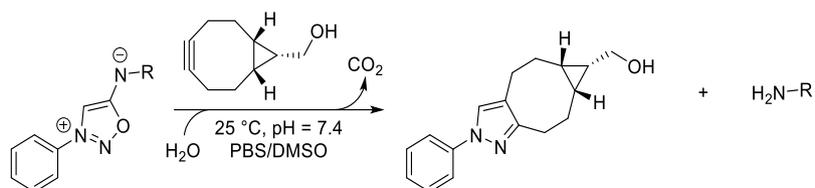
<sup>67</sup> M. Goetz, K. Grozinger, and J. T. Oliver, *J. Med. Chem.*, 16/6 (1973), 671–73.



**Schéma 27.** Fonctionnalisation palladocatalysée

Avec toutes ces modifications possibles, le laboratoire a synthétisé une série d'iminosydnone et a effectué une étude systématique de la vitesse de réaction en fonction des substituants, ce qui a permis de rationaliser les effets électroniques favorisant la réaction de cycloaddition SPICC.<sup>57</sup> Il est à noter que toutes ces réactions génèrent un isocyanate activé par un groupement électro attracteur. Celui-ci est donc spontanément hydrolysé dans le milieu en amide, sulfonamide ou encore urée.

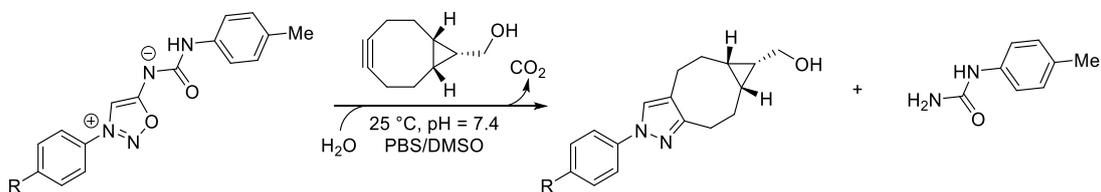
**Tableau 1.** Influence de la substitution en position N<sup>6</sup> sur la vitesse de cycloaddition



Entrée	R	k (L/mol/s)
1		0,01
2		0,006
3		0,032
4		0,018
5		0,061
6		0,047
7		< 0,001

L'enrichissement électronique de l'azote en position 6 a un impact sur la vitesse de cycloaddition. L'introduction d'un groupement benzyle urée plutôt qu'un groupement acétyle augmente la cinétique d'un facteur 6 par exemple (**Tableau 1**).

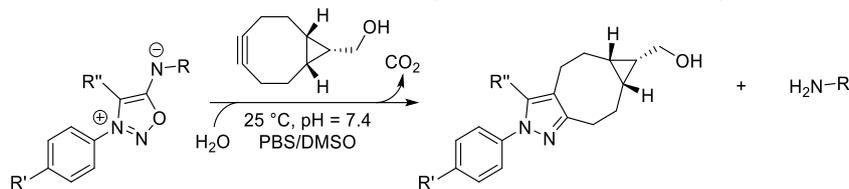
**Tableau 2.** Influence de la substitution en position N<sup>3</sup> sur la vitesse de cycloaddition



Entrée	R	k (L/mol/s)
1	H	0,047
2	OH	0,008
3	CH <sub>2</sub> OH	0,024
4	COOEt	0,181

A l'inverse plus la position N<sup>3</sup> est pauvre électroniquement plus la cinétique est rapide. Ainsi, l'introduction d'un motif électroattracteur, tel qu'une fonction ester, sur le noyau aromatique situé en N<sup>3</sup> augmente la cinétique d'un facteur 4 (**Tableau 2**).

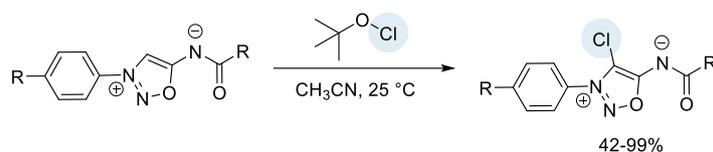
**Tableau 3.** Influence de la substitution en position C<sup>4</sup> sur la vitesse de cycloaddition



Entrée	R	R'	R''	k (L/mol/s)
1		H	H	0,018
2		H	I	0,111
3		H	Br	0,457
4		H	H	0,061
5		Me	Br	0,936
6		COOEt	H	0,181
7		COOEt	Br	0,686

L'effet induit par la présence d'un halogène en position 4 est spectaculaire puisque l'introduction d'un brome augmente en moyenne la vitesse d'un facteur 14 (**Tableau 3**).

Plus récemment notre équipe a publié une méthodologie pour chlorer la position C<sup>4</sup> des iminosydones et a évalué l'influence de cette modification sur la vitesse de cycloaddition (**Schéma 28**).<sup>68</sup> La réaction de chloration se fait en présence d'hypochlorite de *tert*-butyle dans l'acétonitrile. Avec cette méthodologie en main, notre laboratoire a montré qu'il était possible de chlorer différentes classes d'iminosydones (urée, sulfonyl, amide et carbamate) ainsi que des iminosydones conçues comme prodrogues de substances actives.

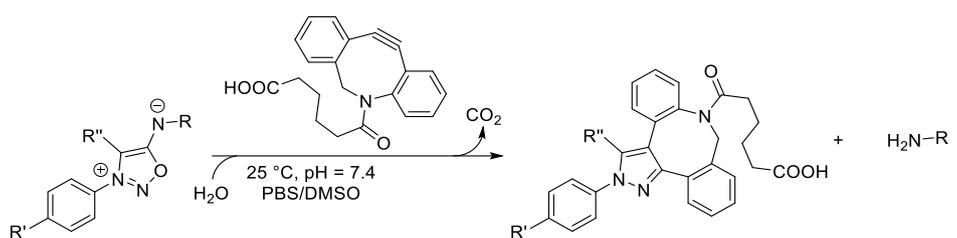


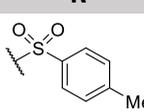
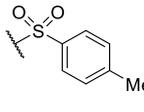
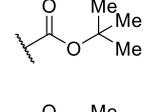
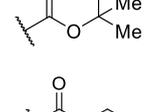
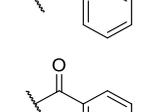
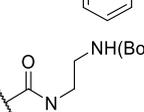
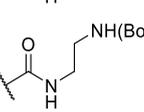
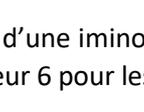
**Schéma 28.** Réaction de chloration électrophile des iminosydones

Ensuite une évaluation de l'effet du chlore en position C<sup>4</sup> a mis en évidence son effet bénéfique sur la vitesse de réaction (**Tableau 4**).

<sup>68</sup> M. Feng, L. Madegard, M. Riomet, M. Louis, P. A. Champagne, G. Pieters, D. Audisio, and F. Taran, *Chem. Comm.*, (2022), 58, 8500 – 8503.

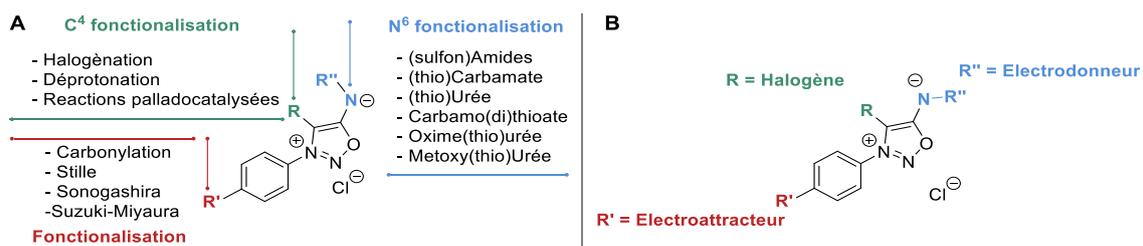
**Tableau 4.** Influence de la chloration sur la vitesse de cycloaddition



Entrée	R	R'	R''	k (L/mol/s)
1		H	H	0,032
2		H	Cl	15,3
3		Me	H	0,001
4		Me	Cl	3,0
5		COOEt	H	< 0,01
6		COOEt	Cl	2,3
7		COOEt	H	2,8
8		COOEt	Cl	17,8

Par exemple, la chloration d'une iminosynone sulfonamide augmente d'un facteur 500 la vitesse de cycloaddition, et d'un facteur 6 pour les iminosynones urée. L'augmentation de la réactivité est donc substrat-dépendant.

En résumé, pour augmenter la vitesse de cycloaddition il faut introduire des groupements électrodonneurs en position N<sup>6</sup>, des groupements électroattracteurs en N<sup>3</sup> et des halogènes sur le carbone 4 (**Figure 5**).

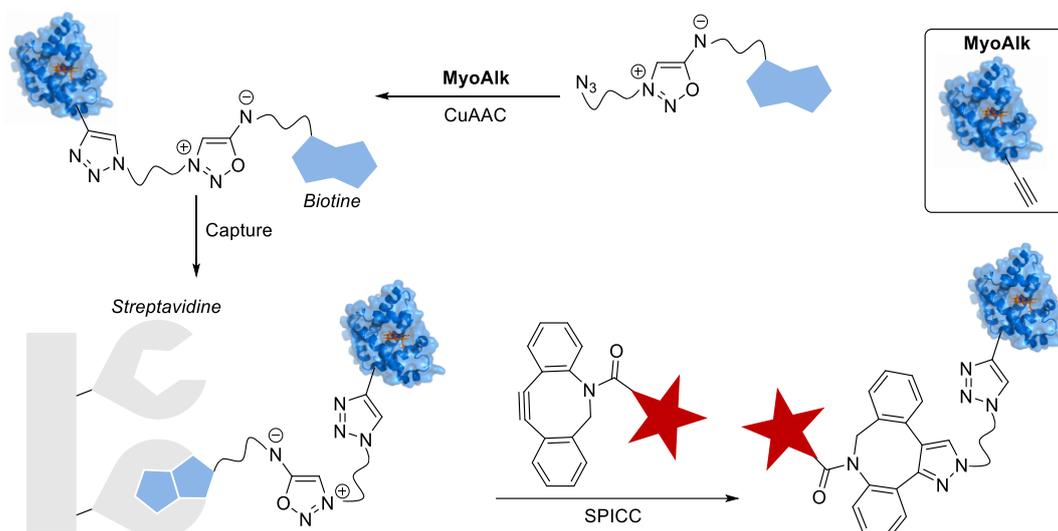


**Figure 5.** A. Modifications structurales des iminosynones. B. Groupements favorisant la cinétique réactionnelle

L'étude de la structure et de la réactivité des iminosydnones a permis de rationaliser l'influence de la structure électronique sur leur réactivité. Ces informations ont permis d'envisager des applications *in vitro* et *in vivo*.

#### II.4 Utilisation des iminosydnones *in vitro* et *in vivo*.

Les iminosydnones ont été utilisées dans plusieurs études *in vitro*. Une des premières à avoir été envisagée par notre laboratoire est leur utilisation comme espaceur clivable pour la modification sélective de protéines (**Schéma 29**).<sup>56</sup> Le laboratoire a montré dans cette étude que les iminosydnones pouvaient être utilisées pour la purification d'une protéine modèle, la myoglobine-alcyne (**MyoAlk**), d'un extrait de foie. Pour cela, une iminosydnone biotine azoture a été accrochée par CuAAC à **MyoAlk** directement dans l'extrait de foie. Ensuite, une capture sur billes de streptavidine permet de purifier et de concentrer la protéine, qui peut ensuite être décrochée des billes par réaction SPICC. Cette technologie permet à la fois de s'affranchir des conditions drastiques normalement requises pour décrocher une protéine biotinyllée de billes de streptavidine mais également d'introduire simultanément un groupement prosthétique choisi comme par exemple un médicament ou un fluorophore.



**Schéma 29.** Stratégie de capture-échange d'étiquettes de **MyoAlk**

Les iminosydnones ont été également utilisées pour la modification sélective et contrôlée d'anticorps basée sur une technologie d'échange d'étiquettes (**Schéma 30**).<sup>69</sup> Cette technologie a notamment été développée par la start-up Syndivia en collaboration avec notre laboratoire. Le principe est basé là aussi sur l'interaction biotine-streptavidine et sur l'utilisation d'espaceurs iminosydnones.

<sup>69</sup> I. Dövgan, A. Hentz, O. Koniev, A. Ehkirch, S. Hessmann, S. Ursuegui, S. Delacroix, M. Riomet, F. Taran, S. Cianféran, S. Kolodych, and A. Wagner, *Chem. Sci.*, 11/5 (2020), 1210–15.

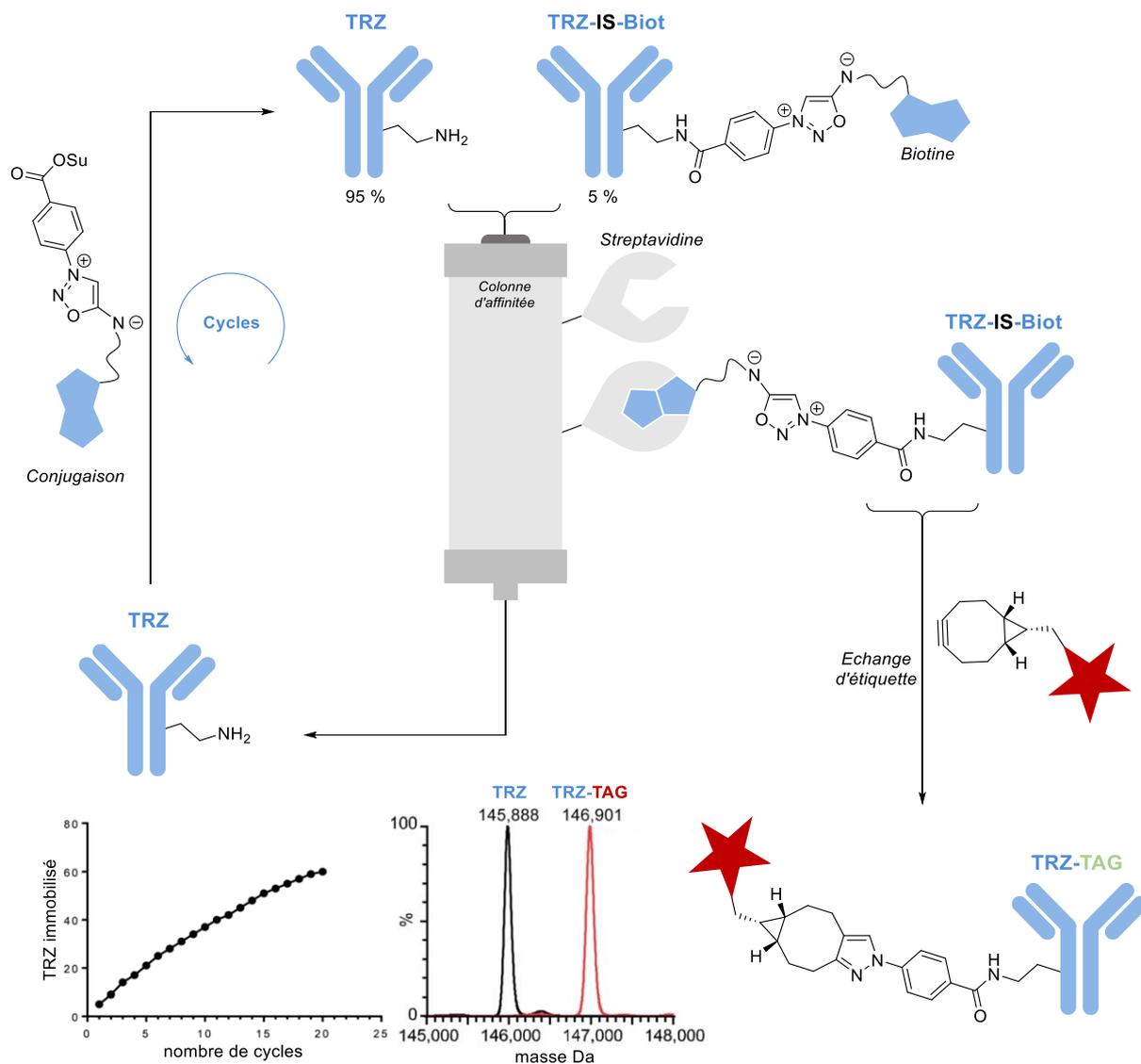
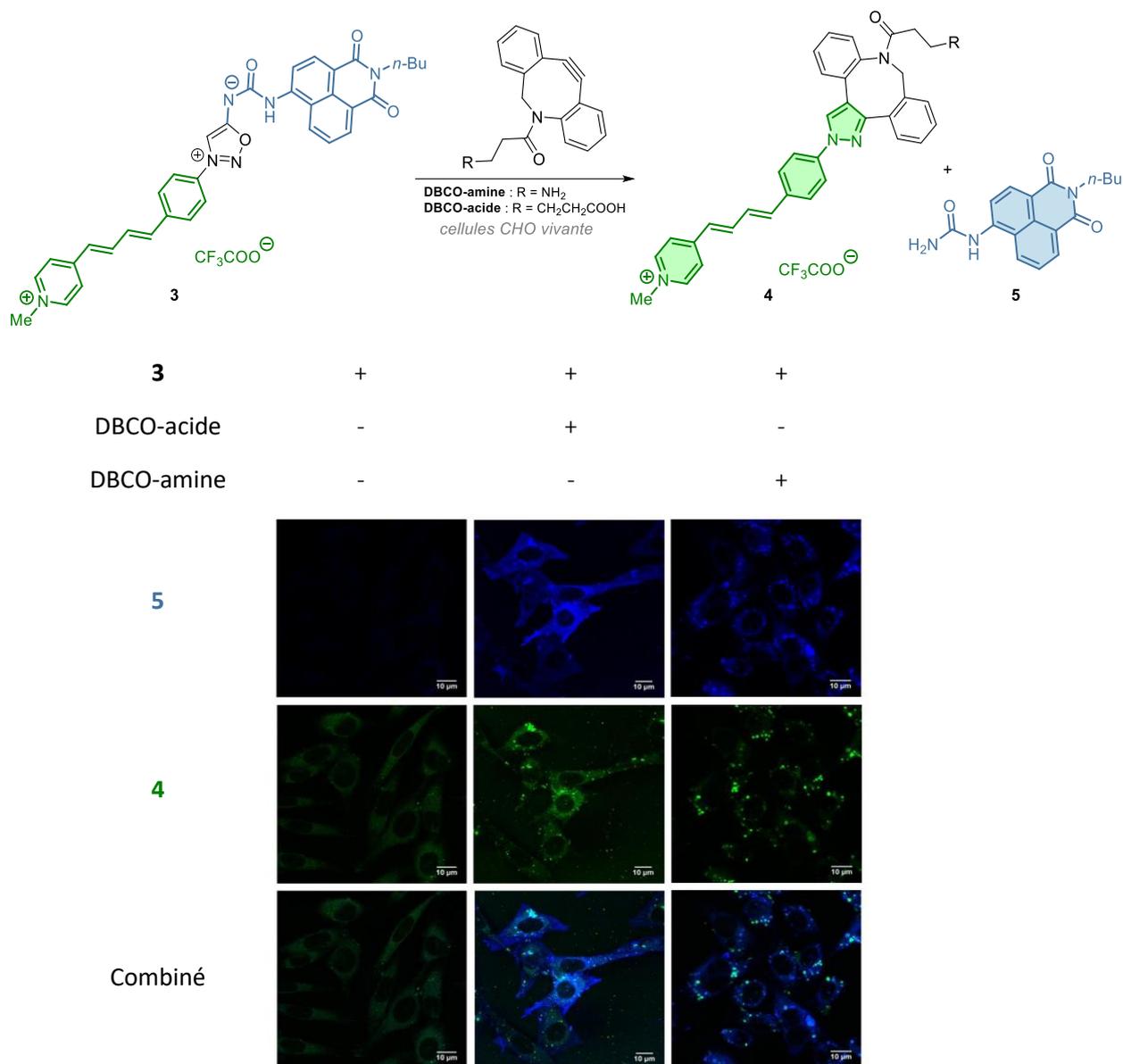


Schéma 30. Technologie ENACT

La modification d'anticorps (ou de protéines en général) est un défi en bioconjugaison et le contrôle du DAR (Drug Antibody Ratio) l'est encore plus. Généralement plusieurs molécules sont introduites lors de la modification d'un anticorps et ceci de façon anarchique. L'introduction d'une quantité trop importante de petites molécules sur une protéine peut induire une perte d'affinité avec sa cible. Pour contourner ce problème, l'équipe de Wagner a mis au point une technique ingénieuse de capture d'anticorps modifiés par un espaceur iminosydone biotine sur une colonne de streptavidine. La conjugaison de la petite molécule s'effectue à très basse conversion de façon à favoriser exclusivement la mono-fonctionnalisation de l'anticorps. Ainsi, seuls les anticorps fonctionnalisés sont retenus sur la colonne de streptavidine et les anticorps non modifiés et donc non retenus sont réinjectés dans la boucle pour être modifiés à nouveau. De cette façon les auteurs décrivent une immobilisation d'environ 60% de l'anticorps engagé au bout d'une vingtaine de cycles. Pour finir, les anticorps sont décrochés de la colonne de streptavidine par réaction SPICC avec un cyclooctyne comportant dans sa structure une molécule d'intérêt (drogue, fluorophore, séquence nucléique). Cette technologie offre un contrôle total du DAR et permet également de fonctionnaliser l'anticorps par des cytotoxiques différents si cela est nécessaire.

Par la suite, toujours dans notre laboratoire, les iminosydnonnes ont été utilisées pour le relargage contrôlé de fluorophores dans des cellules CHO vivantes.<sup>70</sup> Dans cette étude les auteurs utilisent une sonde clickable permettant la libération simultanée de deux fluorophores TurnOn, l'un situé sur le produit de ligation et l'autre sur le produit de coupure (**Schéma 31**). Cette sonde fluorogénique est constituée de deux fluorophores partiellement éteints : un noyau styryl-pyridinium par effet ITC et un naphtralimide par effet PeT. Une fois la réaction de SPICC réalisée les deux fluorophores retrouvent leurs propriétés de fluorescence et s'allument à l'intérieur des cellules.



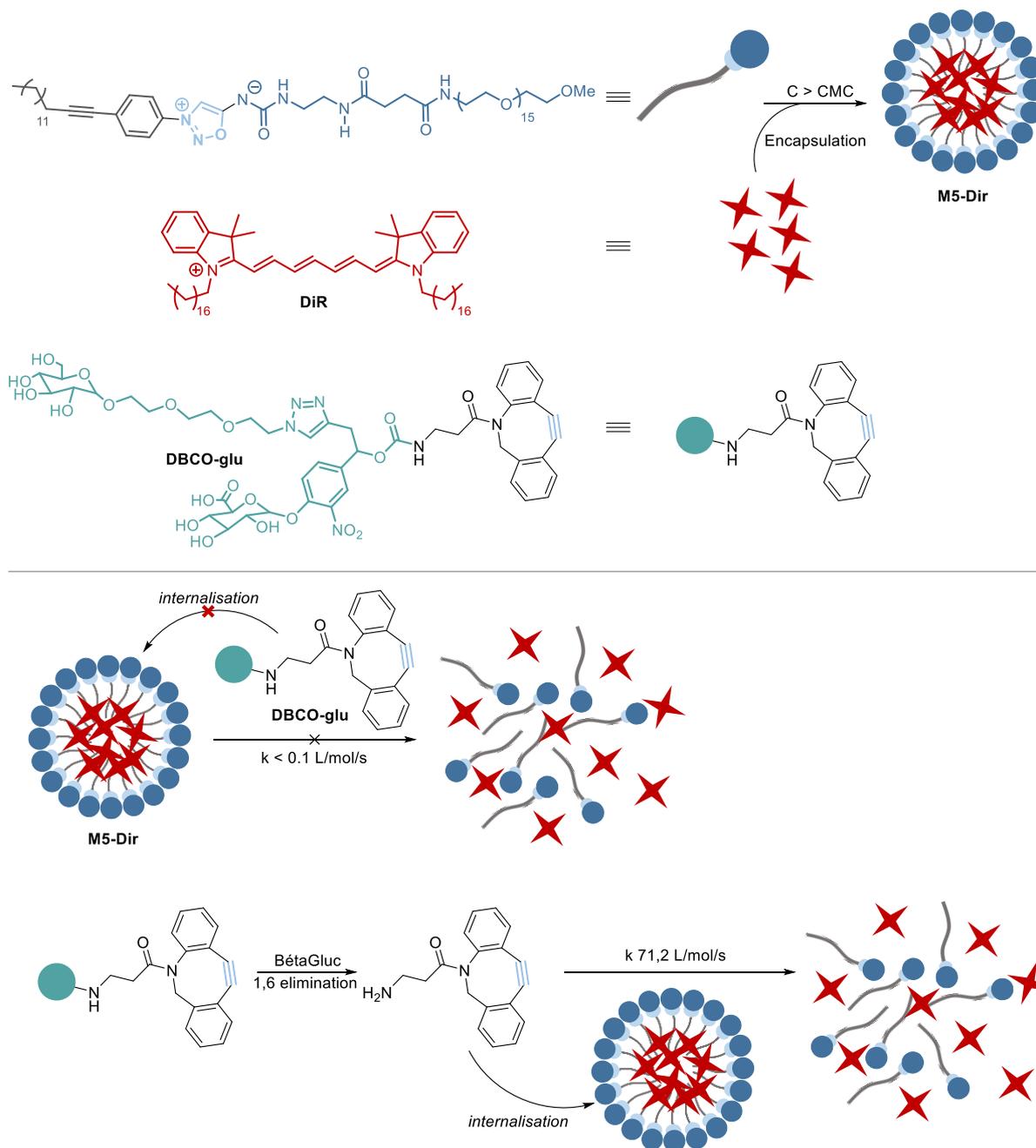
**Schéma 31.** Ligation coupure SPICC sur cellules CHO vivantes

Cette étude a permis de confirmer par imagerie confocale que la réaction de ligation coupure a bien lieu dans des systèmes complexes, tels que l'intérieur de cellules vivantes.

A notre connaissance une seule étude fait état de l'utilisation d'iminosydnonnes *in vivo* pour des applications de diagnostic. Dans cette étude publiée par notre laboratoire en collaboration avec l'équipe du Prof. Sébastien Papot de l'université de Poitiers, les auteurs explorent l'utilisation de

<sup>70</sup> M. Riomet, K. Porte, A. Wijkhuisen, D. Audisio, and F. Taran, *Chem. Comm.*, 56/52 (2020), 7183–86.

micelles immolables par réaction SPICC pour la libération contrôlée d'un fluorophore dans la zone tumorale (**Schéma 32**).<sup>71</sup> Cette stratégie élégante est basée sur un double ciblage par effet EPR, et utilisant la surexpression de  $\beta$ -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral.

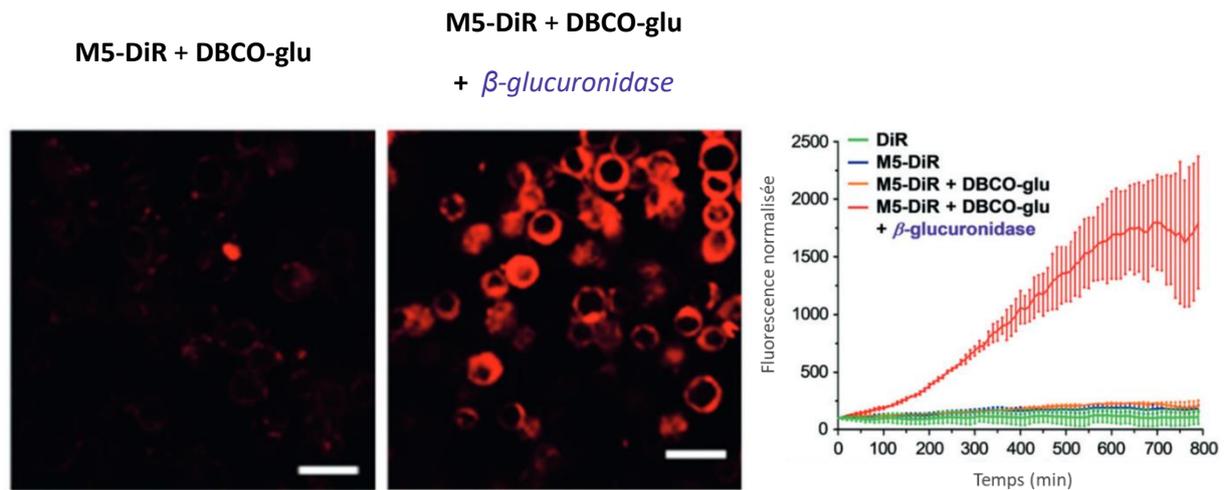


**Schéma 32.** Micelles clivables par SPICC

Les micelles utilisées dans cette étude sont construites à partir d'un amphiphile composé d'une iminosydnone reliant une partie polaire à une partie apolaire. Dans l'eau, l'amphiphile s'auto-assemble en micelles en encapsulant des molécules apolaires contenues dans le milieu, telle que la cyanine DiR comportant de longues chaînes aliphatiques hydrophobes. La DiR a l'avantage de posséder des propriétés d'auto-quenching de fluorescence à forte concentration ce qui est typiquement le cas au sein de la micelle. Ces micelles peuvent alors réagir avec un cyclooctyne par réaction SPICC entraînant

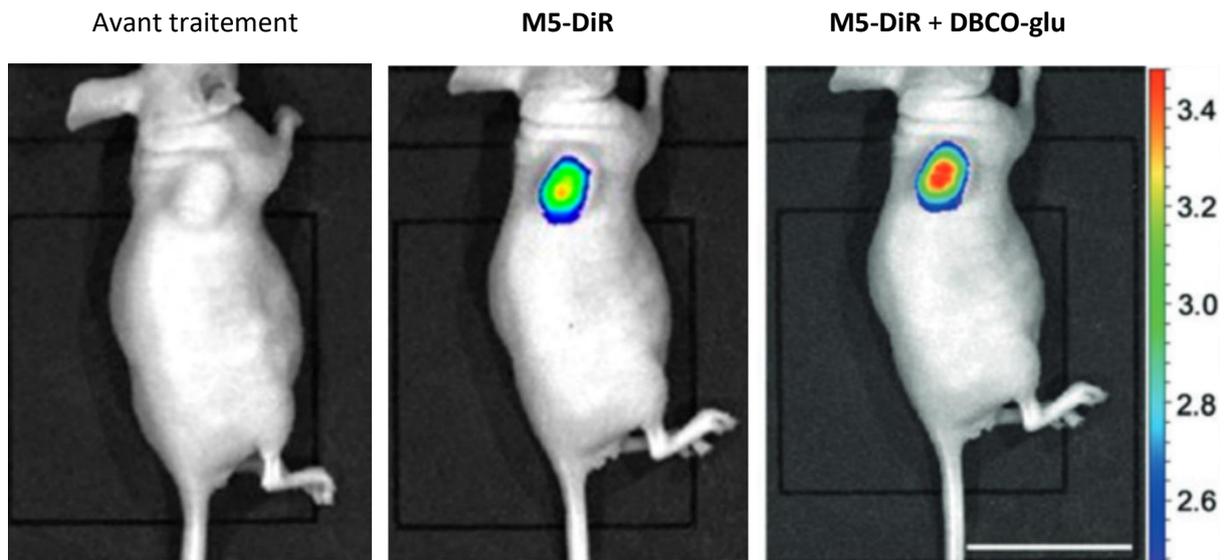
<sup>71</sup> K. Porte, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, B. Eddhif, P. Poinot, E. Gravel, E. Doris, A. Wijkhuisen, D. Audisio, S. Papot, and F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58/19 (2019), 6366–70.

la destruction de la micelle et la libération du fluorophore. Néanmoins, seuls les cyclooctynes apolaires peuvent pénétrer la micelle et entraîner leur destruction par SPICC. Par exemple le **DBCO-glu** ne peut pas pénétrer la micelle pour la détruire, en raison de la présence de nombreux groupements polaires. Il faut que la glucuronidase clive la liaison osidique pour libérer le DBCO-amine qui lui va être capable d'être internalisé dans la micelle et de libérer la DiR par SPICC. La glucuronidase est sur-exprimée dans le microenvironnement tumoral, ainsi les micelles peuvent être clivées seulement dans la masse tumorale comportant de la glucuronidase. L'étude a d'abord été menée sur cellules vivantes et les résultats indiquent que la réaction n'a lieu que dans le cas où les micelles sont mises en présence de DBCO-glu sur des cellules contenant de la glucuronidase (**Figure 6**).



**Figure 6.** Destruction de micelles à l'intérieur de cellules vivantes suite à l'addition de DBCO-Glu et en présence de ou non de glucuronidase.

Ensuite la même étude a été menée sur des souris comportant une tumeur sous cutanéé xéno greffée KB. Les micelles **M5-DiR** comportant le fluorophore sont injectées en i.v et suivies 24 heures après l'injection i.v du **DBCO-glu** (**Figure 7**).



**Figure 7.** Destruction de micelles chez la souris suite à l'injection i.v. de DBCO-Glu

Le suivi de la fluorescence indique une augmentation du signal, après injection de **DBCO-glu**.

Une analyse par spectrométrie de masse de la tumeur a permis également de confirmer la présence du produit de ligation (pyrazole) dans la masse tumorale prouvant l'efficacité de la SPICC *in vivo*.

Trois projets principaux seront développés dans ce manuscrit, le premier relate l'utilisation d'iminosydones pour la détection et la quantification d'épitopes antigéniques tumoraux *in vitro* et *in vivo* à des fins de diagnostic. Le second porte quant à lui sur l'utilisation de chlorosydones pour le développement d'une technologie de préciblage au  $^{18}\text{F}$  assistée par reconnaissance moléculaire. Enfin, la troisième partie traitera de la découverte et du développement de deux nouvelles classes d'iminosydones pour le relargage ultra-rapide et contrôlé d'isocyanates.

# Chapitre 1 : Développement d'une méthode de détection multiplexée de récepteurs tumoraux

## I Introduction

### 1.1 Généralités sur le cancer

Le cancer est, dans les pays occidentaux, la seconde cause de décès après les maladies cardiovasculaires. Cette pathologie est principalement causée par l'acquisition de mutations déclenchées par des facteurs extérieurs (chimiques, physiques ou biologiques) ou par des prédispositions génétiques.<sup>72</sup> Le cancer est extrêmement complexe, multifactoriel et il varie selon les personnes. Les efforts de la recherche se dirigent depuis plusieurs années vers des traitements de plus en plus ciblés et adaptés à chaque patient, on parle de médecine personnalisée. En conséquence, le nombre de thérapies ciblées actuellement sur le marché, ou en essais cliniques, évolue de façon exponentielle. Ce nombre toujours grandissant posera à terme le problème du choix thérapeutique qui nécessite de prédire quel sera le meilleur traitement pour un patient donné.

Pour mieux comprendre ce qu'est un cancer et à quel point ce type de pathologie est complexe, il faut d'abord bien comprendre le fonctionnement du corps humain. En temps normal, les cellules communiquent entre elles. Leur survie dépend du bon fonctionnement de chacun de leurs organes. Si une cellule présente une altération de son génome à un temps donné de sa vie, des processus biologiques sont mis en place par notre corps pour l'éliminer. C'est l'apoptose cellulaire. En revanche, si une cellule ne répond plus à ces processus de régulation et prolifère de façon invasive, on parle alors de cancer. Dans les cas les plus graves, la survie du patient est menacée, en particulier lorsque la maladie en est à un stade avancé. Le patient est alors condamné à mourir des conséquences directes ou indirectes de son cancer plus ou moins rapidement.

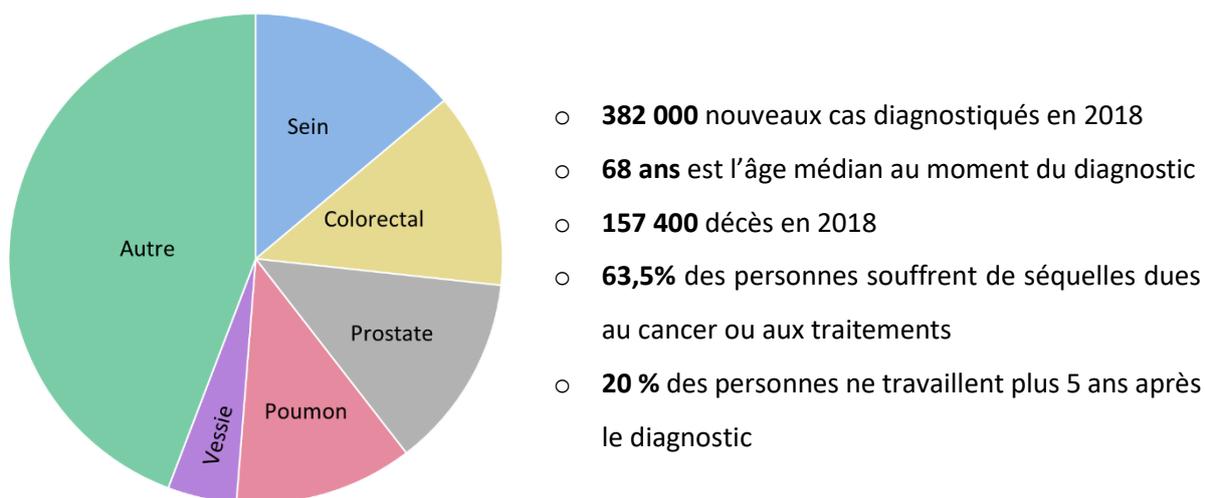


Figure 8. Répartition des différents cancers (chiffres de 2018) Chiffre INCa

<sup>72</sup> Jean-Christophe FRICAIN, Oncologie, (2016).

En 2018, plus de 380 000 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués avec un âge médian de 68 ans. 157 000 personnes sont mortes des suites de la maladie ou des traitements (**Figure 8**, chiffres de l'institut national du cancer). La répartition des types de cancer est assez hétérogène et dépend du sexe, du niveau de vie et de nombreux autres paramètres. Face à cette hétérogénéité, il devient important de développer des technologies pour diagnostiquer le cancer plus efficacement et plus rapidement. En pratique, pour déterminer si un patient est atteint d'un cancer, le médecin procède à un dosage des marqueurs tumoraux. La suite de l'introduction décrira brièvement les techniques utilisées dans les laboratoires biomédicaux pour déterminer la présence de marqueurs tumoraux chez un patient. Ensuite, nous verrons les techniques décrites dans la littérature pour effectuer ce type d'analyse.

## 1.2 Analyses cliniques des marqueurs tumoraux

Les marqueurs tumoraux, souvent des protéines, sont produits par le tissu cancéreux ou par le corps en réponse à la croissance d'un cancer. Certaines de ces substances peuvent être détectées dans les fluides biologiques (sang, urine...) et sont généralement, en complément de l'imagerie médicale, une aide essentielle pour détecter et diagnostiquer certains cancers. Plus récemment, de nouveaux types de tests ont été développés pour rechercher des changements dans le matériel génétique (ADN, ARN). En effet, des modifications génétiques se sont révélées être associées à certains cancers et leur détection peut être utilisée pour guider le clinicien dans le choix du traitement.<sup>73</sup>

### 1.2.i Analyse des marqueurs du cancer dans les fluides biologiques

L'analyse des fluides biologiques (sang, urine), apparentée à une biopsie liquide, est facile à mettre en œuvre, indolore et très peu coûteuse.<sup>74</sup> Le dosage sanguin des marqueurs tumoraux est une technique très sensible, qui permet de détecter la présence de tumeurs, même de petite taille.<sup>73</sup> Cet examen permet également de suivre l'évolution d'une lésion cancéreuse au cours du traitement. La présence de certains marqueurs est simplement un indice pour le diagnostic, car elle peut également signaler des pathologies non malignes. Lors d'examens routiniers, on dose par exemple le taux d'Antigène spécifique de la prostate (ASP), dans le cas du cancer de la prostate ou alors le taux d'antigène carcino-embryonnaire (ACE), une protéine qui intervient dans le mécanisme d'adhésion cellulaire, principalement pour le cancer du côlon, du sein, du poumon ou du pancréas. Ces dosages sont en général réalisés à l'aide d'anticorps spécifiques.

### 1.2.ii Analyse des marqueurs du cancer par biopsie tumorale

La biopsie est un examen indispensable pour correctement diagnostiquer un cancer et, à elle seule, permet de préciser la nature de la lésion cancéreuse.<sup>75</sup> En pratique, la biopsie consiste à prélever un échantillon de tissu pour ensuite l'examiner par microscopie. Selon la localisation de la lésion tumorale, la biopsie est réalisée par ponction, ou lors d'une intervention chirurgicale où le praticien retire une partie des tissus suspects.

Après l'intervention chirurgicale, l'anatomo-pathologiste récupère les tissus cancéreux pour les examiner à l'œil nu afin de déterminer le potentiel évolutif de la tumeur ainsi que la présence éventuelle de nécrose. À l'issue de cette analyse macroscopique, le pathologiste passe ensuite à des

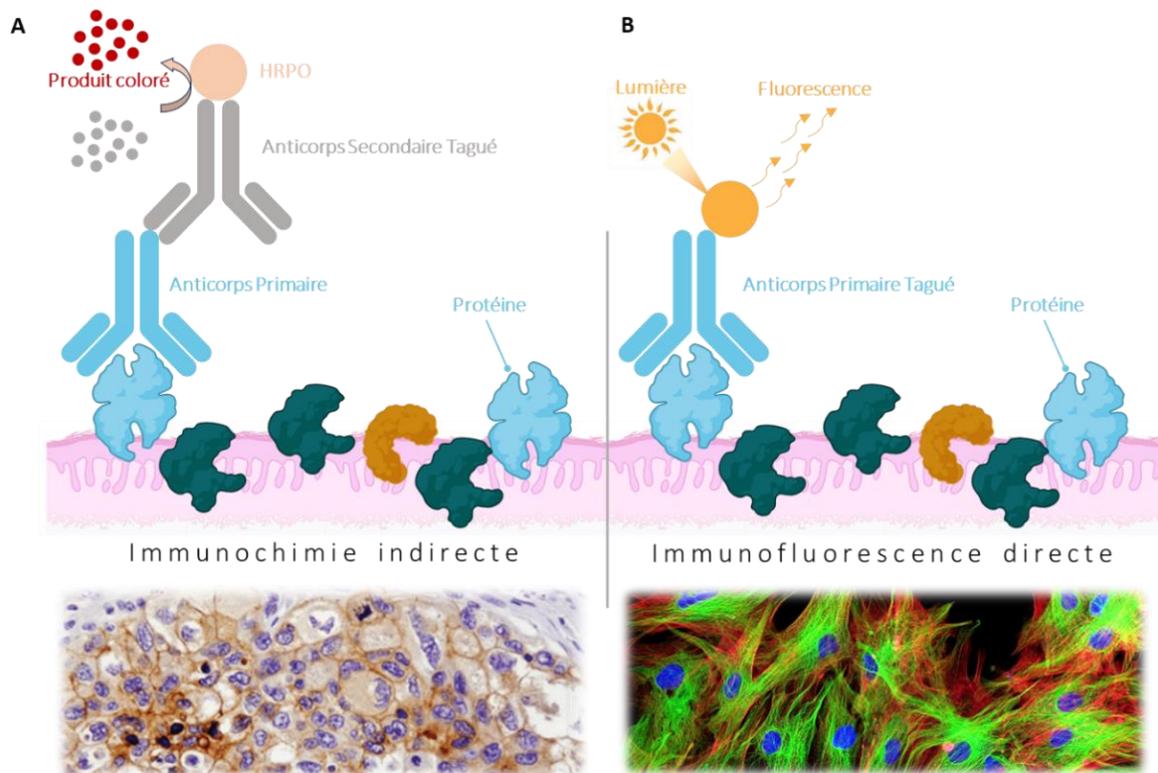
---

<sup>73</sup> M. Ignatiadis, G. W. Sledge, and S. S. Jeffrey, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18/5 (2021), 297–312.

<sup>74</sup> NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI, (2011).

<sup>75</sup> S. Kim, J. C.-Sik Park, *Journal of Pathology and Translational Medicine*, (2016) 50(6): 411-418.

analyses histologiques des fragments récupérés par le chirurgien, afin de déterminer la nature des cellules composant la lésion. Dans la quasi-totalité des cas, l'analyse histologique est complétée par une analyse immunohistochimique, qui permet d'identifier les protéines exprimées au sein du tissu. L'immunohistochimie exploite la capacité d'un anticorps à se lier spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques (**Figure 9**).<sup>75</sup> La plupart du temps, des anticorps monoclonaux sont utilisés. Deux processus sensiblement similaires ont été développés : l'immunohistochimie indirecte et directe. (**Figure 9. A**) Le principe de l'immunohistochimie est simple : un premier anticorps (anticorps primaire) est ajouté sur la coupe tissulaire pour se fixer spécifiquement sur l'antigène à mettre en évidence. Ensuite, un second anticorps (anticorps secondaire) capable de reconnaître la partie constante des anticorps, et donc de se fixer à l'anticorps primaire, est ajouté. Dans la plupart des cas, l'anticorps secondaire est conjugué à une enzyme (souvent peroxydase de Raifort HRPO) capable de catalyser la formation d'un produit coloré ou fluorescent et donc d'amplifier le signal. Les anticorps peuvent aussi être marqués par un fluorophore, comme des rhodamines pour des tests d'immunofluorescence. Dans le cas de l'immunohistochimie directe (**Figure 9. B**), l'anticorps est directement marqué avec un rapporteur coloré ou fluorescent et permet la visualisation directe de sa cible.



**Figure 9. A.** Immunohistochimie indirecte **B.** Immunofluorescence directe

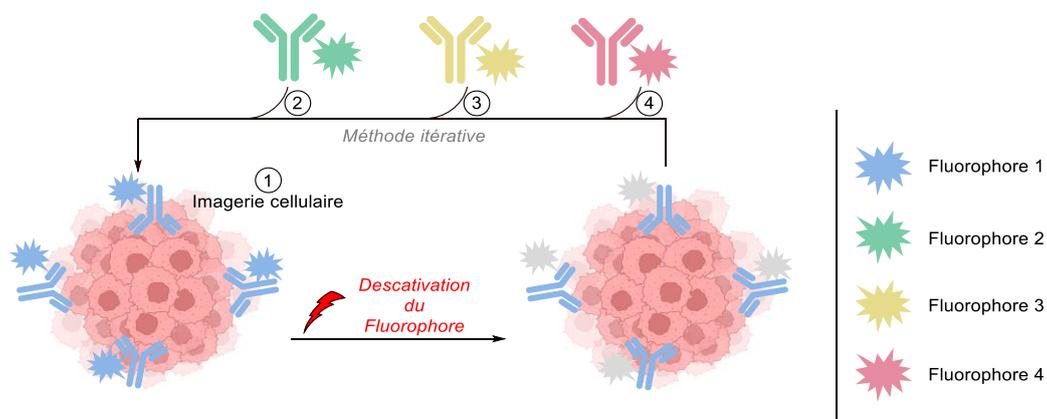
### 1.2.iii Analyse génétique et moléculaire des tumeurs

Pour compléter les examens, des analyses du patrimoine génétique de la tumeur peuvent être effectuées, en s'intéressant à l'ADN et aux ARN messagers. On recherche alors des anomalies qui peuvent prendre la forme de translocations (échange réciproque de matériel chromosomique entre des chromosomes non homologues), d'amplifications (augmentation du nombre de copies d'un gène) ou de mutations (modification de la séquence nucléotidique d'un gène).<sup>76</sup>

<sup>76</sup> G. Buono, L. Gerratana, M. Bulfoni, N. Provinciali, D. Basile, M. Giuliano, C. Corvaja, G. Arpino, L. Del Mastro, S. De Placido, M. De Laurentiis, M. Cristofanilli, and F. Puglisi, *Cancer Treatment Reviews*, 73 (2019), 73–83.

Bien que les marqueurs tumoraux fournissent de précieuses informations sur la biologie d'une tumeur, celles-ci ne sont pas toujours faciles à interpréter. En raison de nombreux facteurs, les marqueurs tumoraux ne sont pas toujours spécifiques. Par exemple, certains marqueurs tumoraux peuvent être élevés chez des patients ayant d'autres types de maladies ; d'autres marqueurs sont, quant à eux, très peu spécifiques d'un cancer donné. A titre d'exemple le marqueur Antigène carbohydrate 19-9 (CA19-9) peut être associé à des cancers du pancréas, des voies biliaires, de la vessie, de l'estomac ou même du côlon.<sup>77</sup> Le taux d'un marqueur donné peut également être très différent d'un patient à un autre pour un même cancer. Par conséquent, les marqueurs tumoraux ne permettent pas à eux seuls de faire un diagnostic fiable. Ils doivent être impérativement associés à d'autres méthodes d'analyses et notamment à de l'imagerie médicale.

Ces dernières années, de plus en plus de méthodes ont été développées dans la littérature pour améliorer la détection des marqueurs tumoraux en multiplexant les analyses histologiques, telle que l'immunohistochimie cyclique par fluorescence (**Figure 10**).



**Figure 10.** Immunohistochimie cyclique par fluorescence

Un premier immunoconjugué permet de visualiser une première cible, ensuite l'inactivation du fluorophore par stimulus externe permet d'inhiber sa fluorescence. L'ajout d'un second immunoconjugué ciblant un autre récepteur permet de visualiser un autre antigène et ainsi de suite. Cependant, la principale limitation de ce type d'histochimie cyclique reste l'utilisation de conditions réactionnelles assez dures (NaOH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, photoblanchiment) pour inactiver la fluorescence, conditions pouvant être délétères pour le matériel biologique.<sup>78,79,80</sup>

C'est pourquoi d'autres méthodes ont été développées en se basant sur l'imagerie multiplexée par faisceau d'ions par exemple, mais ces techniques restent très gourmandes en temps et peuvent présenter un manque de compatibilité avec le matériel biologique.<sup>81</sup>

La solution apportée par les chemobiologistes a été d'utiliser avantageusement les réactions bioorthogonales pour développer des technologies pouvant pallier les problèmes rencontrés. En combinaison avec des réactions bioorthogonales de plus en plus performantes, les analyses

<sup>77</sup> T. Lee, T. Z. J. Teng, and V. G. Shelat, *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12/12 (2020), 468–90.

<sup>78</sup> M. J. Gerdes, C. J. Sevinsky, A. Sood, S. Adak, M. O. Bello, A. Bordwell, A. Can, A. Corwin, S. Dinn, R. J. Filkins, D. Hollman, V. Kamath, S. Kaanumalle, K. Kenny, M. Larsen, M. Lazare, Q. Li, C. Lowes, C. C. McCulloch, E. McDonough, M. C. Montalto, Z. Pang, J. Rittscher, A. Santamaria-Pang, B. D. Sarachan, M. L. Seel, A. Seppo, K. Shaikh, Y. Sui, J. Zhang, and F. Ginty, *PNAS*, 110/29 (2013), 11982–87.

<sup>79</sup> J.-R. Lin, M. Fallahi-Sichani, and P. K. Sorger, *Nat. Comm.*, 6/1 (2015), 8390.

<sup>80</sup> W. Schubert, B. Bonnekoh, A. J. Pommer, L. Philipsen, R. Böckelmann, Y. Malykh, H. Gollnick, M. Friedenberger, M. Bode, and A. W. M. Dress, *Nat. Biotech.*, 24/10 (2006), 1270–78.

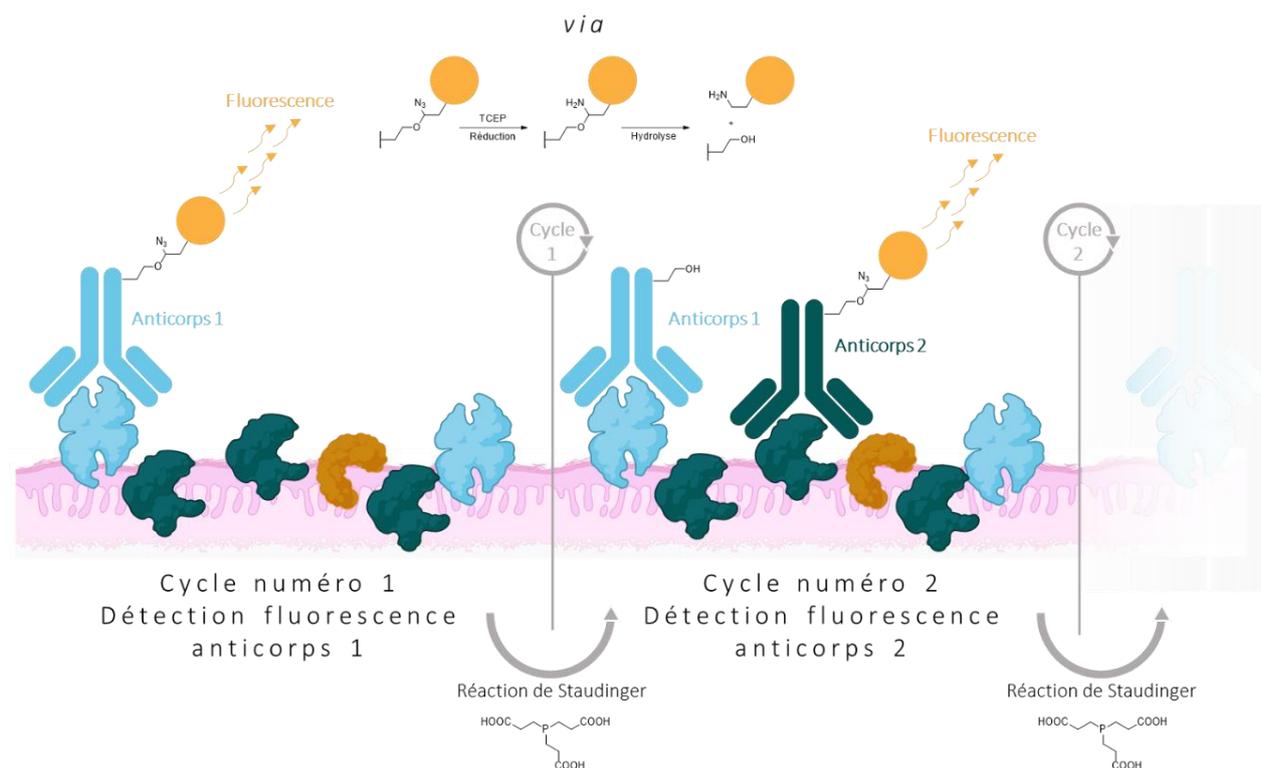
<sup>81</sup> M. Angelo, S. C. Bendall, R. Finck, M. B. Hale, C. Hitzman, A. D. Borowsky, R. M. Levenson, J. B. Lowe, S. D. Liu, S. Zhao, Y. Natkunam, and G. P. Nolan, *Nat. Med.*, 20/4 (2014), 436–42.

histologiques deviennent alors plus efficaces et plus précises. Les paragraphes suivants seront focalisés sur ces techniques.

### 1.3 Méthodes chemobiologiques d'analyses des marqueurs tumoraux décrites dans la littérature

La détection multiplexée d'épitopes antigéniques a un intérêt grandissant en médecine pour accéder plus rapidement à plus d'informations sur la nature du cancer. Le développement de telles technologies permet de réduire le temps de diagnostic et inévitablement le temps de prise en charge des patients atteints de maladies. Ces dernières années, plusieurs exemples ont été rapportés dans la littérature en s'appuyant sur différentes méthodes (cytométrie en flux, spectrométrie de masse...).<sup>82,83</sup> Dans cette introduction nous concentrerons notre attention sur les méthodes basées sur la chimie bioorthogonale.

Deux groupes ont récemment décrit l'utilisation de la chimie bioorthogonale pour la détection multiplexée ultra rapide de récepteurs tumoraux et ce de façon itérative. En 2017, Guo et ses collaborateurs ont décrit l'utilisation d'immunoconjugués fluorescents pour la détection cyclique d'épitopes tumoraux.<sup>84</sup> La technologie repose sur l'inactivation de la fluorescence d'anticorps fluorescents par une réaction de Staudinger, suivie d'une hydrolyse de la fonction hémiaminale (**Figure 11**).



**Figure 11.** Technologie développée par Guo et son équipe

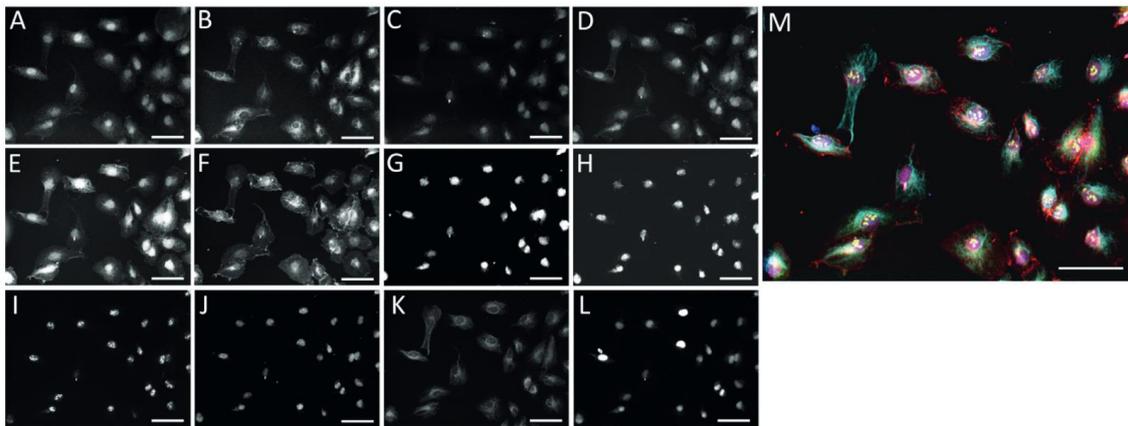
Une première incubation des anticorps fluorescents permet d'accéder aux analyses histochimiques. Ensuite, une phosphine est ajoutée dans le milieu pour détacher les fluorophores des anticorps. Après

<sup>82</sup> S. K. Saka, Y. Wang, J. Y. Kishi, A. Zhu, Y. Zeng, W. Xie, K. Kirli, C. Yapp, M. Cicconet, B. J. Beliveau, S. W. Lapan, S. Yin, M. Lin, E. S. Boyden, P. S. Kaeser, G. Pihan, G. M. Church, and P. Yin, *Nat. Biotechnol.*, 37/9 (2019), 1080–90.

<sup>83</sup> F. J. Hartmann and S. C. Bendall, *Nature Reviews. Rheumatology*, 16/2 (2020), 87–99.

<sup>84</sup> M. Mondal, R. Liao, L. Xiao, T. Eno, and J. Guo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56/10 (2017), 2636–39.

lavage, un autre anticorps est utilisé pour accéder cette fois-ci à la visualisation d'un autre récepteur et ainsi de suite.



**Figure 12.** Imagerie par microscopie fluorescente cyclique par réaction de Staudinger. Marqueurs tumoraux détectés : **A.** p-4E-BP1 **B.** pan cytokeratin **C.** p-Akt (T308) **D.** p-Akt(S473) **E.** p-p44/42MAPK **F.** EGFR, **G.** c-erbB2 **H.** p53 **I.** Ki67 **J.** Ezh2 **K.** vimentin **L.** histone H4 **M.** Superposition des image (A)–(L).

Guo décrit une des premières analyses par immunohistochimie itérative de récepteurs tumoraux, cette nouvelle méthode a permis aux auteurs de détecter 12 récepteurs différents (avec 12 immunoconjugés), sur une même lignée cellulaire et ainsi de connaître la répartition spatiale de chaque récepteur avec une très bonne résolution (**Figure 12**). Le groupe de Guo pose alors les bases d'un nouveau type d'analyse histologique en cycle par fluorescence pour l'étude des récepteurs tumoraux assisté par chimie bioorthogonale. La principale limitation de cette méthode reste l'utilisation de tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) à de très fortes concentrations (100 mM), pendant un temps assez long (30 min) pour assurer un taux de coupure des fluorophores acceptable. Ces conditions drastiques ne peuvent être utilisées qu'avec des cellules fixées puisqu'une concentration aussi élevée en TCEP tuerait les cellules.

Le groupe de Weissleider a publié en 2020 une méthode élégante basée sur la réaction de ligation Tz/TCO.<sup>85</sup> Dans cette méthode les auteurs décrivent la synthèse d'anticorps fluorescents comportant dans leurs structures un motif *trans*-cyclooctène. L'addition d'un quencheur de fluorescence tetrazine (BHQ-Tz) permet alors d'éteindre quasiment totalement la fluorescence de l'anticorps en se fixant sur celui-ci par réaction IEDDA (**Figure 13**).

<sup>85</sup> J. Ko, J. Oh, M. S. Ahmed, J. C. T. Carlson, and R. Weissleider, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59/17 (2020), 6839–46.

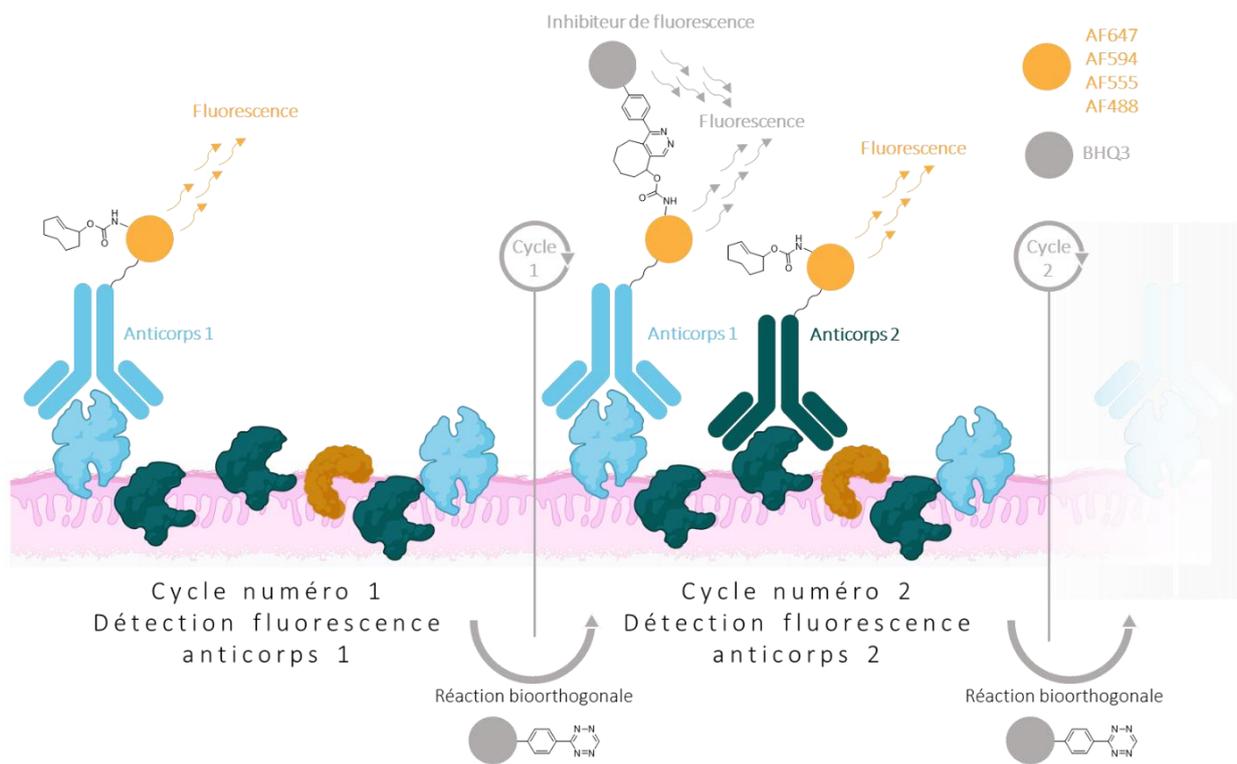


Figure 13. Technologie développée par Weissleider et son équipe en 2020

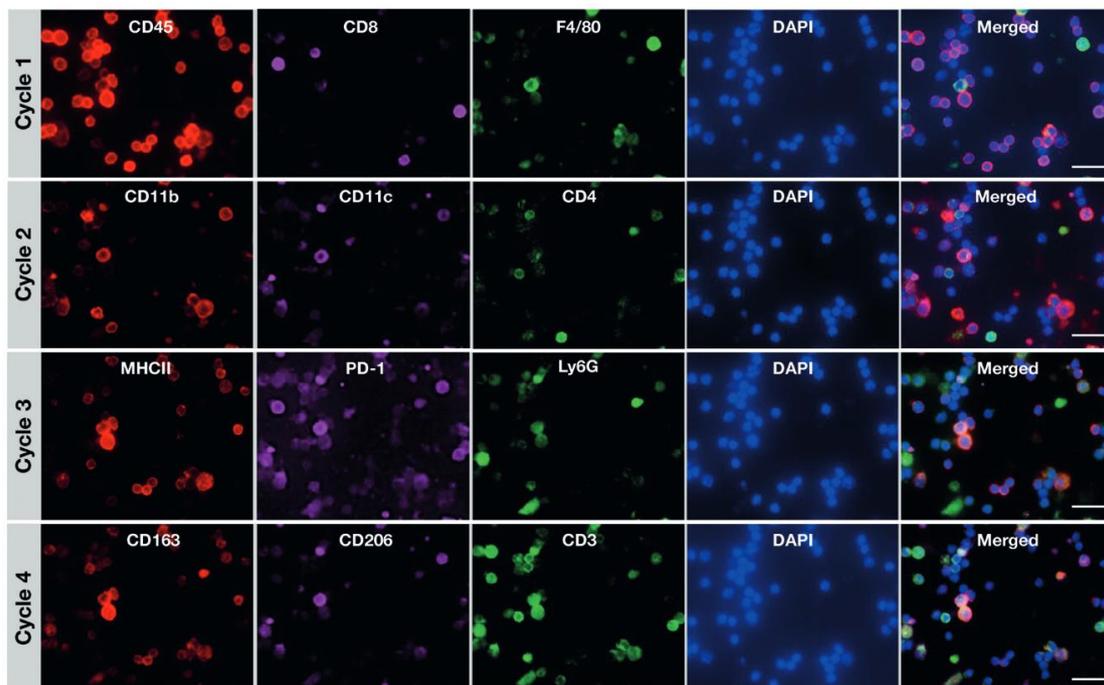
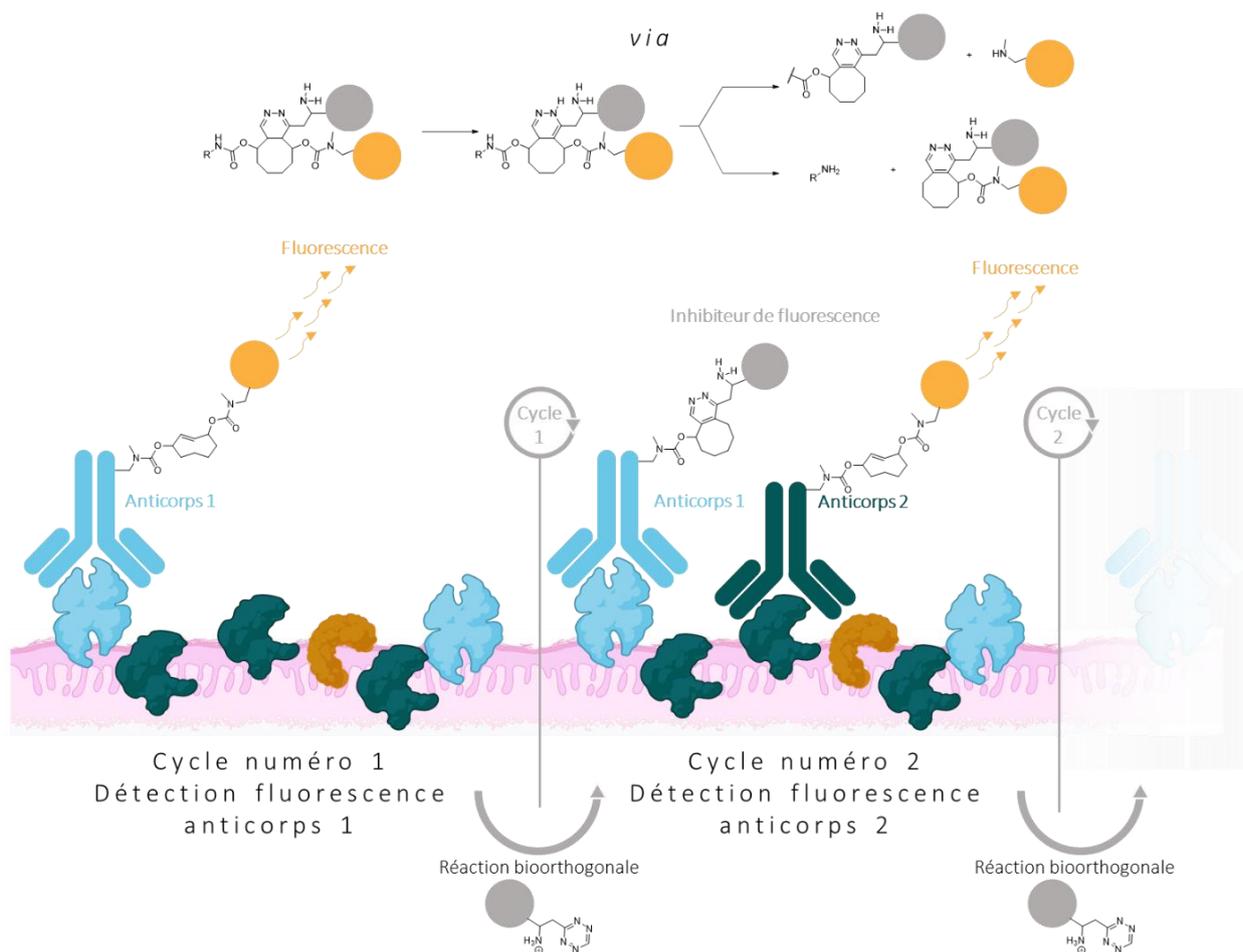


Figure 14. Détection de marqueurs par immunohistochimie cyclique à l'aide de la réaction IEDDA sur cellules cancéreuses de souris.

Avec cette méthode, les auteurs ont détecté de façon itérative 12 marqueurs différents en effectuant 4 cycles successifs (ce qui revient à détecter 3 marqueurs par cycle avec 12 anticorps différents) (Figure 14). De plus, les réactions de ligation observées sont extrêmement rapides, en moins de 10 secondes la quasi-totalité de la fluorescence de l'anticorps est inhibée même à des concentrations faibles (20  $\mu\text{M}$ ). Les auteurs ont également travaillé sur cellules fixées pour effectuer leurs études.

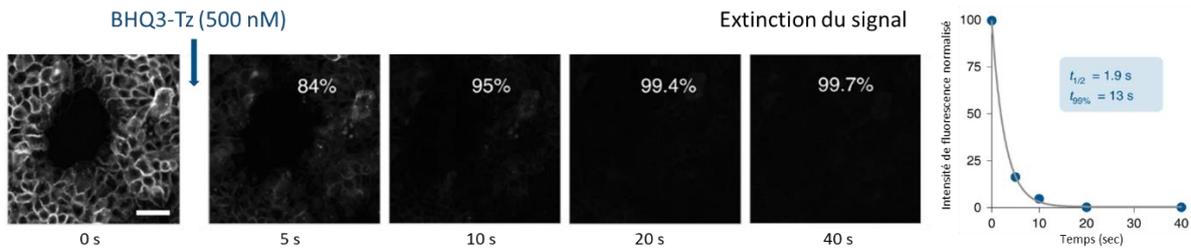
A la suite de cette étude le même groupe a publié un travail similaire basé sur un échange rapide de fluorophores par réaction IEDDA Tz/TCO (méthode SAFE : Scission-Accelerated-Fluorophore-Exchange) (**Schéma 33**).<sup>86</sup> Dans cet article les auteurs décrivent l'utilisation de tétrazine-BHQ comportant une amine dans sa structure. Cette modification permet notamment de faciliter l'élimination du fluorophore éteint par le BHQ.



**Schéma 33.** Technologie développée par Weissleder et son équipe en 2022

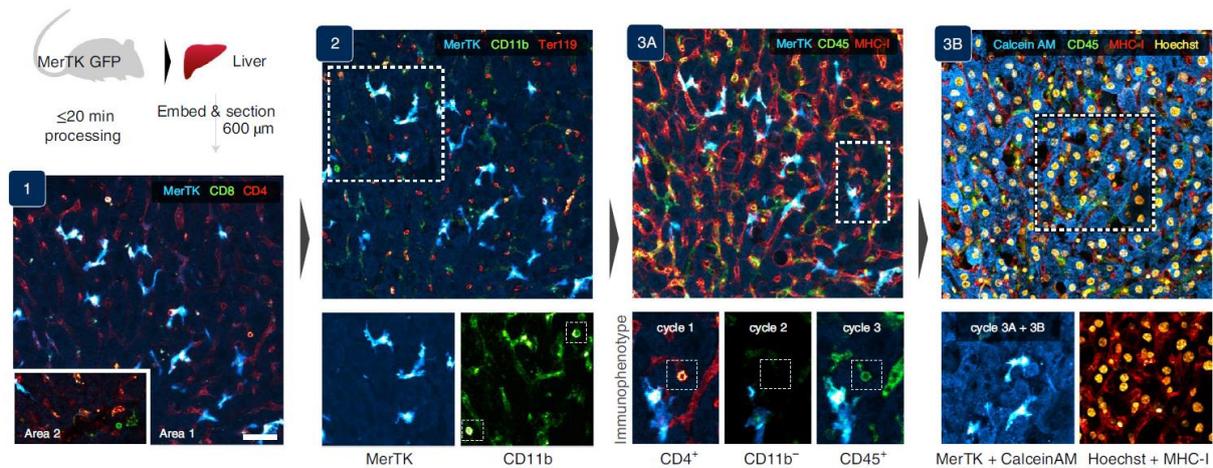
Il ont également constaté que cette méthode présentait des constantes de vitesses d'extinction de fluorescence de près de  $10^6$  L/mol/s. Cette valeur est près de 3000 fois plus élevée que les constantes de vitesse de cycloaddition normalement atteintes avec ce type de tétrazines et de TCO. Cette accélération permet de travailler à des concentrations de l'ordre du micro-molaire voire de la centaine de nano-molaire, tout en ayant des temps de réaction de l'ordre de la dizaine de secondes (**Figure 15**). Les auteurs ont vérifié leur méthode sur cellules A431 traitées avec du cétuximab *trans*-cyclooctène AlexaFluor 647 (image à 0 s **Figure 15**). Ensuite, 500 mM de BHQ3-Tz sont ajoutés et près de 84% de la fluorescence est perdue 5 s seulement après l'ajout. Le temps de demi réaction est de seulement 1,9 s.

<sup>86</sup> J. Ko, M. Wilkovitsch, J. Oh, R. H. Kohler, E. Bolli, M. J. Pittet, C. Vinegoni, D. B. Sykes, H. Mikula, R. Weissleder, and J. C. T. Carlson, *Nat. Biotechnol.*, (2022), 1–9.



**Figure 15.** Extinction de la fluorescence sur cellules A431 traitées avec du cétuximab trans-cyclooctène AF647 et après ajout de BHQ3-TZ (bar de mesure 50  $\mu\text{M}$ )

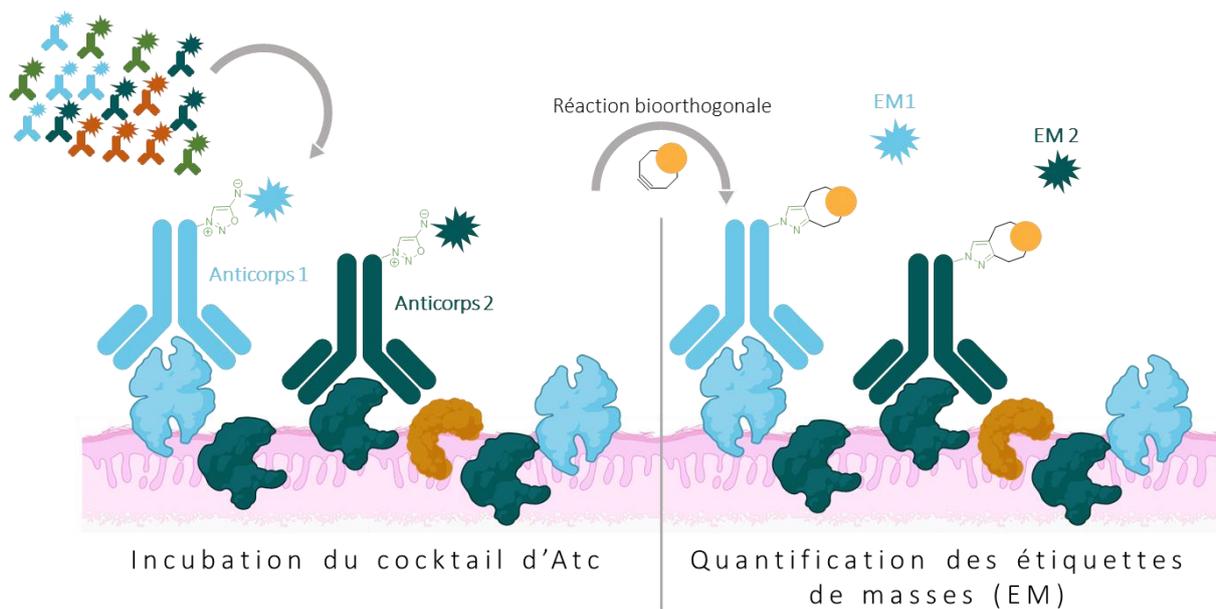
Les auteurs ont testé leur système optimisé sur plusieurs cas d'étude et sont allés jusqu'à utiliser leur méthode sur coupe tissulaire hépatique vivante (**Figure 16**). Ce test a permis de localiser près de 6 récepteurs différents avec 6 anticorps en 3 cycles sans tuer les cellules.



**Figure 16.** Images de tissus hépatiques de souris avec la méthode SAFE (Scission-Accelerated-fluorophore-Exchange) (Tissu récolté sur des souris (MerTK)GFP ; Cycle 1 : identification des récepteurs CD4+ et CD8+ (image 1); Cycle 2 : identification des récepteurs CD11b+ et Ter119+ (image 2); Cycle 3 : identification des récepteurs CD45+ et MHC-I+ (image 3A) ; image 3B : Identification des récepteurs CD45 et MHC-1 avec marquage Calcein AM et Hoechst. Calcein AM est un marqueur de cellules vivantes et Hoechst est un marqueur de noyaux).

Ces technologies présentent des caractéristiques assez impressionnantes et ont de bonnes chances d'être utilisées un jour, en routine dans des laboratoires d'analyse biomédicale.

Malheureusement, les méthodes développées jusqu'à présent permettent uniquement d'effectuer des analyses *ex vivo*. Dans le cadre de cette thèse, la technologie que nous voulons développer est sensiblement différente et pourrait permettre d'obtenir un grand nombre d'informations en une seule analyse. Notre approche repose sur l'utilisation de la chimie bioorthogonale et de la spectrométrie de masse des fluides biologiques comme technique de caractérisation des biomarqueurs. Cette approche pourrait permettre la quantification des récepteurs les uns par rapport aux autres (**Figure 17**), sur des coupes tissulaires issues de biopsies, mais aussi potentiellement *in vivo*, un aspect qui semble plus complexe à obtenir avec les méthodes actuelles.



**Figure 17.** Technologie envisagée dans notre projet (EM = Etiquette de masse)

Mon projet de thèse s'inscrit dans cette thématique de détection multiplexée de récepteurs tumoraux par réactions bioorthogonales. La prochaine partie sera dédiée à la présentation du projet en contextualisant ses enjeux.

## II Présentation du projet

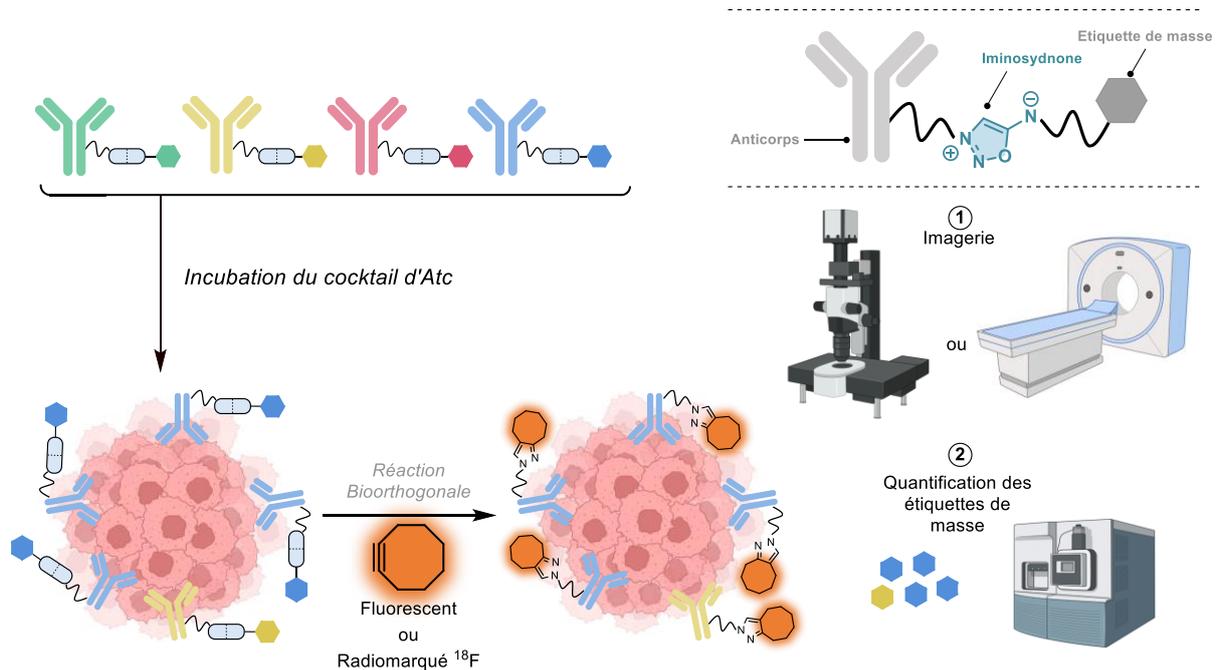
La détection d'un cancer à une phase précoce de son développement est essentielle pour augmenter les chances de survie des patients.<sup>87</sup> Malheureusement, chaque patient est unique et présente des spécificités tumorales qui lui sont propres. En effet, deux patients présentant le même cancer peuvent répondre très différemment à un même traitement. A la vue du nombre grandissant de cancers dans le monde, il devient essentiel d'élaborer des méthodes d'analyse personnalisées, qui permettraient d'accéder rapidement aux spécificités biologiques d'un malade. Il s'agirait alors d'anticiper la réponse d'un patient à un traitement donné, pour trouver le traitement le plus approprié.

L'approche que nous souhaitons suivre repose sur l'alliance de deux grandes techniques importantes en oncologie : l'imagerie médicale et la spectrométrie de masse. Cette combinaison permettrait à la fois de localiser la tumeur et d'analyser sa biologie et ce en un seul test. Cette approche multiplexée et combinée permettrait de réduire considérablement la lourdeur des analyses médicales et surtout apporterait des informations sur la nature de la tumeur *in vivo*.

Basé sur les récentes découvertes de nos laboratoires dans le domaine de la chemobiologie, mon projet de thèse vise à développer une méthode de caractérisation *in vitro* et *in vivo* de différents marqueurs biologiques en combinant la chimie bioorthogonale et l'analyse par spectrométrie de masse des fluides biologiques (**Schéma 34**). Cette technologie impliquerait l'injection d'un mélange d'anticorps, liés (*via* une iminosydone) à des étiquettes de masse (EM). Après accumulation des anticorps dans la zone tumorale, un dérivé cyclooctyne serait injecté pour induire une réaction de ligation coupure SPICC. Ainsi, cette réaction entrainerait la libération des étiquettes de masse dans les fluides biologiques (sang, urine). La quantification de l'abondance de chaque étiquette permettrait alors de connaître la répartition de chaque récepteur tumoral au sein de la lésion. Cette analyse

<sup>87</sup> Diane Damotte, Karen Leroy, *livre*, IMMUNITÉ ANTI-TUMORALE (2019).

permettrait de déterminer quel récepteur est le plus abondant et donc de déterminer quel anticorps peut être utilisé pour soigner le patient.



**Schéma 34.** Principe général du projet de thèse

L'utilisation d'étiquettes de masse comme rapporteurs a l'avantage de permettre le transfert de la technologie pour une potentielle utilisation *in vivo*. En effet, le cyclooctyne pourrait être injecté plusieurs jours après injection du cocktail d'anticorps et réagir avec le lien iminosydnone pour libérer les étiquettes qui leur sont accrochés. Une analyse par spectrométrie de masse des liquides biologiques (sang, urines ...) pourrait alors permettre d'identifier les biomarqueurs les plus exprimés dans la tumeur. Le principal intérêt de cette approche *in vivo* est lié à l'hétérogénéité des tumeurs, qui n'est pas représentée lors d'une biopsie, puisque juste un morceau de la tumeur est prélevé. Dans l'approche proposée, le cyclooctyne pourrait en principe réagir sur la totalité des anticorps liés à la tumeur, ce qui donnerait une représentation plus fidèle de l'abondance relative des biomarqueurs tumoraux. Evidemment, cette approche *in vivo* est extrêmement risquée et présente un nombre incalculable d'obstacles à surmonter parmi lesquels nous pouvons citer : la cinétique de réaction iminosydnone/cyclooctyne ; la biodistribution du cyclooctyne ; la présence d'anticorps hors site tumoral ; la pharmacocinétique des étiquettes de masse etc...

C'est la raison pour laquelle, dans un premier temps la méthode devra être validée *in vitro* sur cellules cancéreuses, puis *ex vivo* sur biopsie tumorale.

Au cours de ce travail de thèse, l'objectif premier a été de valider le concept de cette technique. Nous avons donc opté pour l'utilisation de 4 anticorps différents permettant la détection de 4 biomarqueurs tumoraux différents. Les étiquettes de masse que nous avons choisies sont des isotopologues, c'est-à-dire des composés de même structure mais de masse différente en raison de la présence d'atomes de deutérium ( $^2\text{H}$ ) en plus ou moins grand nombre. Parce qu'elles sont de même structure, ces étiquettes devraient répondre de manière similaire en spectrométrie de masse, ce qui permettra une quantification relative des biomarqueurs les uns par rapport aux autres.

La suite de ce chapitre sera dédiée à la présentation des résultats obtenus lors du développement du projet, en commençant par la synthèse des immunoconjugués et leurs caractérisations, suivi des résultats des expériences *in vitro* et *ex vivo*.

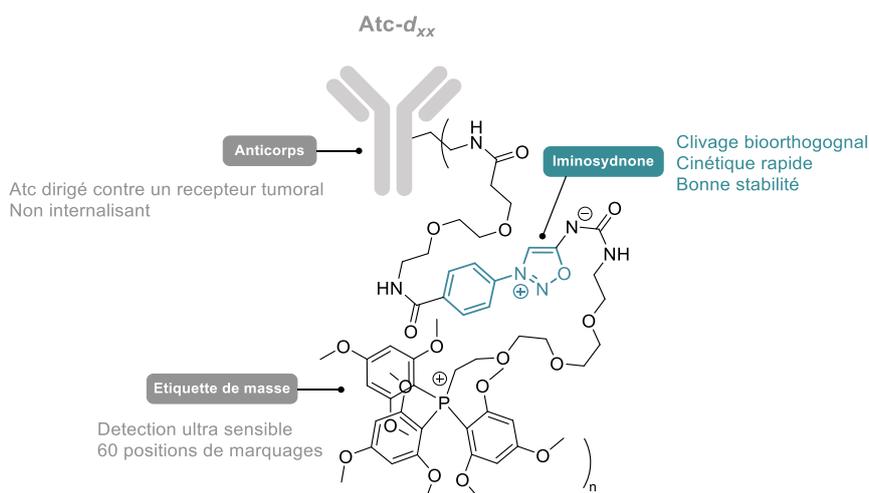
### III Résultats

#### III.1 Conception et synthèse de l'immunoconjugué TRZ-d<sub>0</sub>

Les immunoconjugués conçus pour ce projet comportent trois grandes parties : la partie anticorps qui assurera la liaison avec le récepteur tumoral recherché, la partie iminosydnone qui jouera le rôle de déclencheur bioorthogonal permettant de libérer la troisième partie, l'étiquette de masse (**Figure 18**). Cette dernière servira à détecter de manière extrêmement sensible la présence d'un récepteur tumoral après réaction de ligation coupure SPICC. Ainsi, les étiquettes de masse (EM) seront la signature de chaque anticorps et donc de chaque récepteur tumoral.

Les étiquettes de masse qui seront libérées des anticorps par la réaction SPICC doivent impérativement être stables dans les conditions physiologiques, pour permettre une détection multiplexée sensible et spécifique, par analyse UPLC-MS/MS. Nous prévoyons d'utiliser des isotopologues (structures identiques mais marquées par des isotopes lourds) du tris(2,4,6,-triméthoxyphényl)-phosphonium (**TMPP**) qui sera utilisé comme étiquette de masse. Théoriquement il est possible d'accéder à 70 isotopologues de la **TMPP** en marquant avec du <sup>13</sup>C et du <sup>2</sup>H chaque atome, mais en pratique seul 9 d'entre deux sont facilement accessibles. Ces étiquettes sont connues pour être d'excellents marqueurs pour la protéomique.<sup>88</sup> Notre stratégie consistera donc à tirer parti de la présence des 9 groupes méthoxy de la structure du TMPP, pour synthétiser une série d'isotopologues TMPP marqués au deutérium.

Pour que la stabilité de l'immunoconjugué soit optimale, nous avons décidé d'utiliser les iminosydnone urée, connues pour être stables dans le temps, et qui présentent des cinétiques réactionnelles assez intéressantes pour être utilisées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (**Figure 18**).



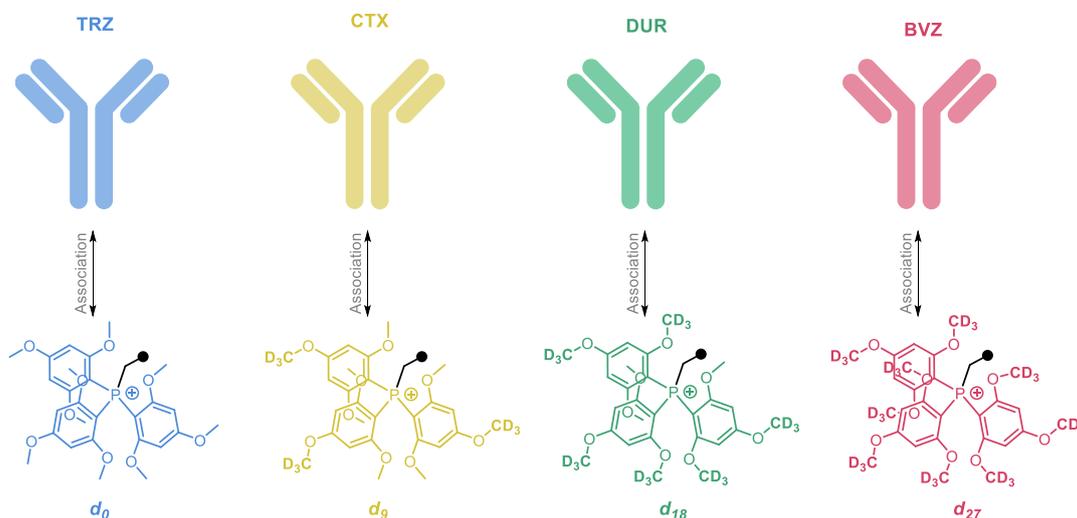
**Figure 18.** Conception des immunoconjugués

Les anticorps ont été choisis dans l'optique de cibler les récepteurs les plus abondants dans la plupart des cancers. Ainsi le Trastuzumab (TRZ), le Durvalumab (DUR), le Cétuximab (CTX) et le Bevacizumab (BVZ) ont été sélectionnés pour cibler respectivement HER2, PD-L1, EGFR et VEGF. HER2 est une

<sup>88</sup> J. Deng, G. Zhang, F.-K. Huang, and T. A. Neubert, *Proteomic Profiling: Methods and Protocols*, (2015), pp. 249–58.

glycoprotéine membranaire associée au facteur de croissance épidermique. Elle module les mécanismes de signalisation intracellulaire (croissance, survie, adhésion, différenciation) et peut être à l'origine de la prolifération cellulaire.<sup>89</sup> Cette protéine est par exemple amplifiée chez 20 à 30% des patients atteints de cancer du sein. PD-L1 est elle aussi une protéine membranaire exprimée en temps normal à la surface des macrophages. Cependant, elle est surexprimée à la surface des cellules cancéreuses et empêche l'apoptose des cellules qui la portent.<sup>90</sup> Pour ce qui est d'EGFR il s'agit d'une protéine transmembranaire, qui lorsqu'elle est mutée, est caractéristique de cancers comme celui du sein et du poumon. Enfin, VEGF est elle aussi une protéine qui elle, module l'angiogenèse nécessaire à la croissance de tissus cancéreux. Les cellules cancéreuses ont tendance, lorsqu'elles sont en conditions hypoxiques, à sécréter VEGF pour entraîner une hyper-vascularisation de la tumeur.<sup>91</sup> Toutes ces protéines sont donc des marqueurs de choix pour détecter différents types de lésions cancéreuses.

Chaque anticorps a ensuite été associé à une étiquette de masse spécifique. **TRZ** a été associé à l'étiquette **EM-d<sub>0</sub>** (étiquette de masse non deutéré), **CTX** à **EM-d<sub>9</sub>** (Etiquette de masse 9 fois deutéré), **DUR** à **EM-d<sub>18</sub>** (Etiquette de masse 18 fois deutéré) et **BVZ** à **EM-d<sub>27</sub>** (Etiquette de masse 27 fois deutéré) (**Figure 19**).



**Figure 19.** Anticorps sélectionnés et association à leur étiquette de masse

Pour commencer, la synthèse du premier immunoconjugué non deutéré **TRZ-d<sub>0</sub>** a été investiguée. Ainsi, **TRZ-d<sub>0</sub>** pourrait être synthétisé en 14 étapes à partir de la 4-iodoaniline (**Schéma 35**).

<sup>89</sup> U. Krishnamurti and J. F. Silverman, *Advances in Anatomic Pathology*, 21/2 (2014), 100–107.

<sup>90</sup> Y. Han, D. Liu, and L. Li, *American Journal of Cancer Research*, 10/3 (2020), 727–42.

<sup>91</sup> R. S. Apte, D. S. Chen, and N. Ferrara, *Cell*, 176/6 (2019), 1248–64.

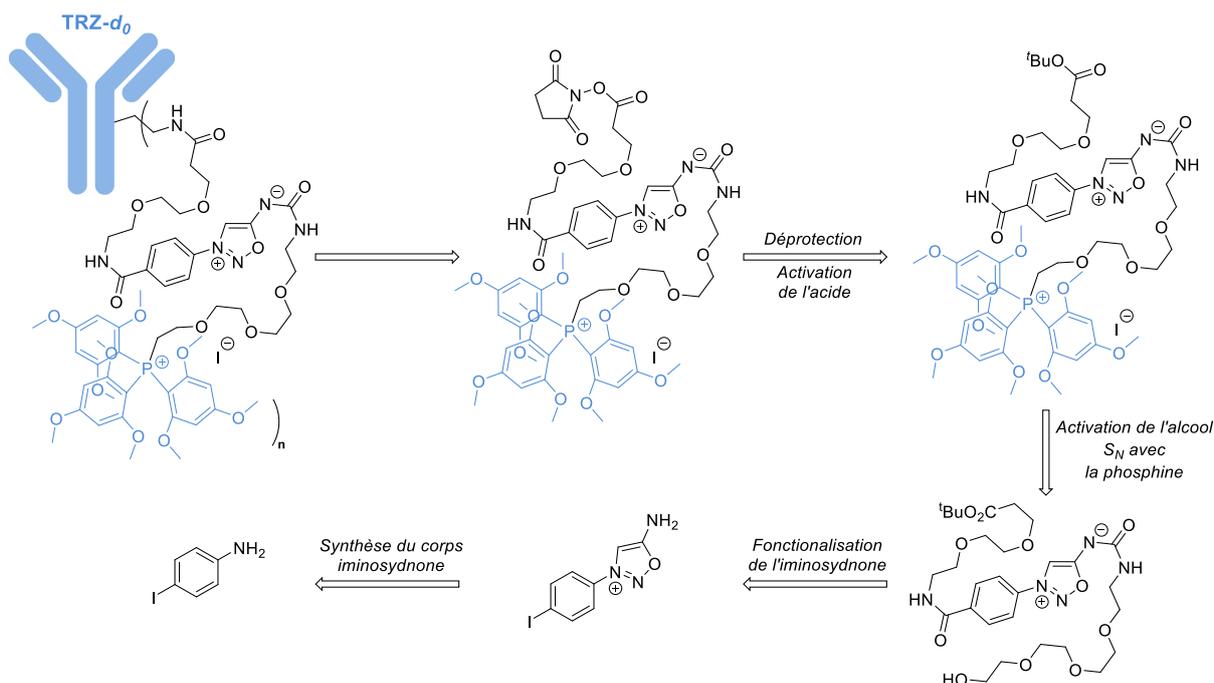


Schéma 35. Schéma rétrosynthétique de l'immunoconjugué TRZ-d<sub>0</sub>

La synthèse a été élaborée de façon à introduire le motif phosphonium le plus tard possible, pour à la fois rendre la synthèse plus convergente et pour faciliter les purifications. Chaque étape fera l'objet d'une sous-partie.

### III.1.i Synthèse de l'iminosydnone I-4

Les premières étapes consistent à synthétiser le corps iminosydnone.

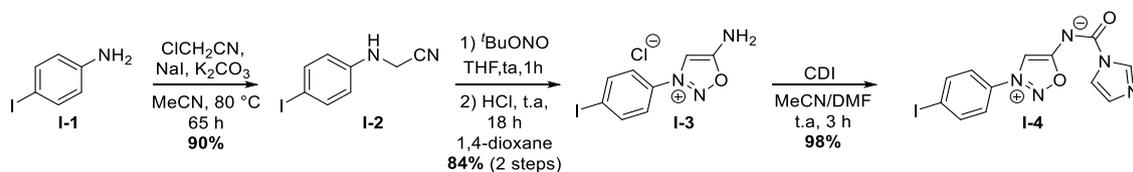


Schéma 36. Synthèse du composé I-4

En partant de la 4-iodoaniline, le composé I-4 a pu être synthétisé avec un bon rendement de 68% en quatre étapes sur une grosse échelle (40 g).<sup>92</sup> Une première étape d'alkylation de l'aniline I-1 permet d'obtenir l'aminonitrile I-2, qui peut ensuite être converti en iminosydnone I-3 par réaction de nitrosylation, puis cyclisation intramoléculaire. Le sel I-3 est ensuite converti en iminosydnone urée en présence de CDI dans un mélange MeCN/DMF (Schéma 36).

<sup>92</sup> S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. N. Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56/49 (2017), 15612–16.

### III.1.ii Carbonylation palladocatalysée du composé I-4

Pour pouvoir introduire une fonction ester éthylique en position *para* de l'aromatique en position N<sup>3</sup> de I-4, une réaction d'alcoycarbonylation palladocatalysée a été réalisée. Cette étape possède le double avantage de rendre l'intermédiaire facilement fonctionnalisable par couplage peptidique, mais également d'introduire un groupement électroattracteur rendant le dipôle plus réactif (Schéma 37).

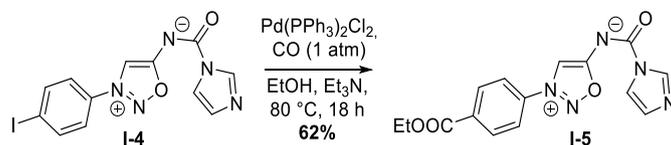


Schéma 37. Synthèse du composé I-5

Cependant, cette réaction n'est ni robuste ni reproductible sur ce type de substrat. Elle ne tolère pas non plus de montée en échelle. La carbonylation a donc été réalisée plusieurs fois sur petite quantité. De cette façon presque 1 g de produit a pu être obtenu après purifications.

### III.1.iii Synthèse de l'alcool primaire I-7

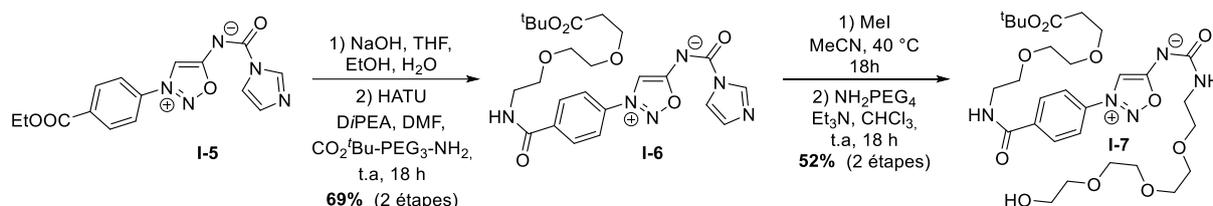


Schéma 38. Synthèse du composé I-7

Une fois l'ester I-5 obtenu, une réaction de saponification en conditions basiques aqueuses suivie d'un couplage peptidique en présence de HATU et de l'amine pégylée permet d'obtenir l'amide I-6. L'imidazole de I-6 est ensuite activé en présence d'un excès de MeI, pour former le méthyl imidazolium correspondant. L'intermédiaire méthylé est ensuite directement mis à réagir avec l'amino-alcool pégylé pour obtenir le composé I-7 avec un rendement acceptable de 52% sur deux étapes (Schéma 38). Plus de 700 mg de composé I-7 ont ainsi pu être obtenus. Cet intermédiaire est assez important dans la synthèse, puisqu'il va permettre d'introduire le motif phosphonium *via* l'activation de l'alcool primaire.

### III.1.iv Activation de l'alcool primaire I-7

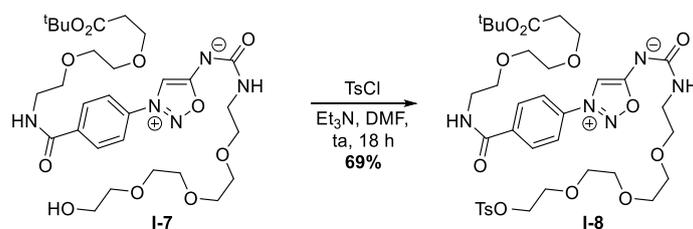


Schéma 39. Synthèse du composé I-8

L'alcool primaire est ensuite activé sous forme de tosylate en présence de chlorure de tosyl dans le DMF avec un rendement acceptable de 69% (Schéma 39).

### III.1.v Substitution nucléophile sur l'alcool activé I-8

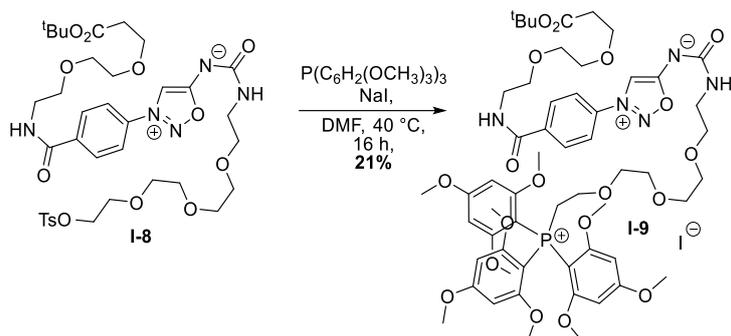


Schéma 40. Synthèse du composé I-9

Le dérivé tosylate **I-8** est ensuite substitué par de la tris(2,4,6-triméthoxyphényl)-phosphine (**TMPP**) dans le DMF à 40 °C pendant 16 heures (**Schéma 40**). La présence de NaI en quantité stœchiométrique permet de précipiter le tosylate de sodium en remplaçant le tosylate par un iodure plus prompt à subir une attaque par la phosphine. Le rendement de cette étape est faible, la purification reste difficile et entraîne une perte considérable de produit. En effet **I-9** est polaire et des impuretés sont entraînées avec l'éluant nécessaire à l'élution du produit. Seules les fractions pures sont récoltées, ce qui entraîne une perte non négligeable de produit.

### III.1.vi Déprotection de l'acide et activation

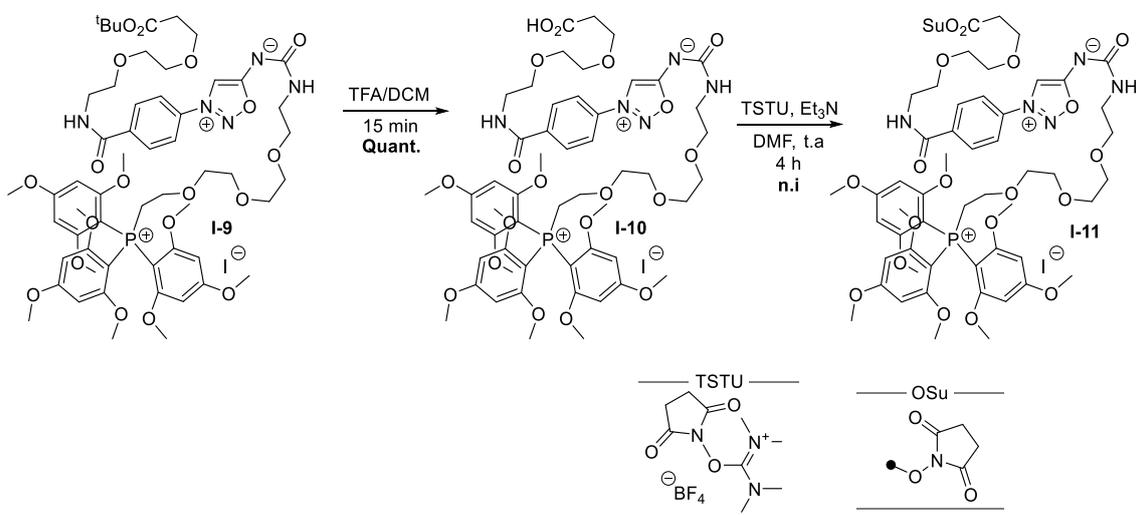


Schéma 41. Synthèse du composé I-10 et I-11 (n.i : non isolé)

La fonction ester *tert*-butylique est ensuite clivée en présence de TFA pendant 15 min dans le DCM à température ambiante pour former l'acide correspondant. La réaction de déprotection est quantitative (**Schéma 41**).

Pour greffer une petite molécule sur un anticorps ou plus généralement sur une protéine plusieurs méthodes ont été développées. Parmi les plus utilisées, le couplage peptidique permet d'assurer un bon taux de greffage. Par convention, les protéines ne sont pas dissoutes dans plus de 5 % de solvant organique pour éviter toute dénaturation. Le couplage peptidique doit donc impérativement fonctionner dans un milieu aqueux tamponné à pH = 8,3. De plus, les solvants organiques (DMF, DMSO)

sont assez toxiques pour les cellules et des quantités trop importantes dans les solutions d'immunoconjugués pourraient entraîner une mortalité cellulaire importante. Pour cela l'utilisation d'ester de NHS est plutôt adaptée.<sup>93</sup> Le composé **I-10** a donc été converti en son analogue activé sous forme d'ester de NHS. Dans un premier temps, des conditions classiques en présence de NHS et de DCC à température ambiante dans le DMF n'ont pas permis d'activer l'acide. En utilisant du O-(N-succinimidyl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TSTU), en présence de triéthylamine, dans le DMF, l'ester de NHS **I-11** est quantitativement obtenu. La solution d'ester activé est ensuite utilisée directement pour fonctionnaliser l'anticorps choisi.

### III.1.vii Synthèse de l'immunoconjugué TRZ-d<sub>0</sub>

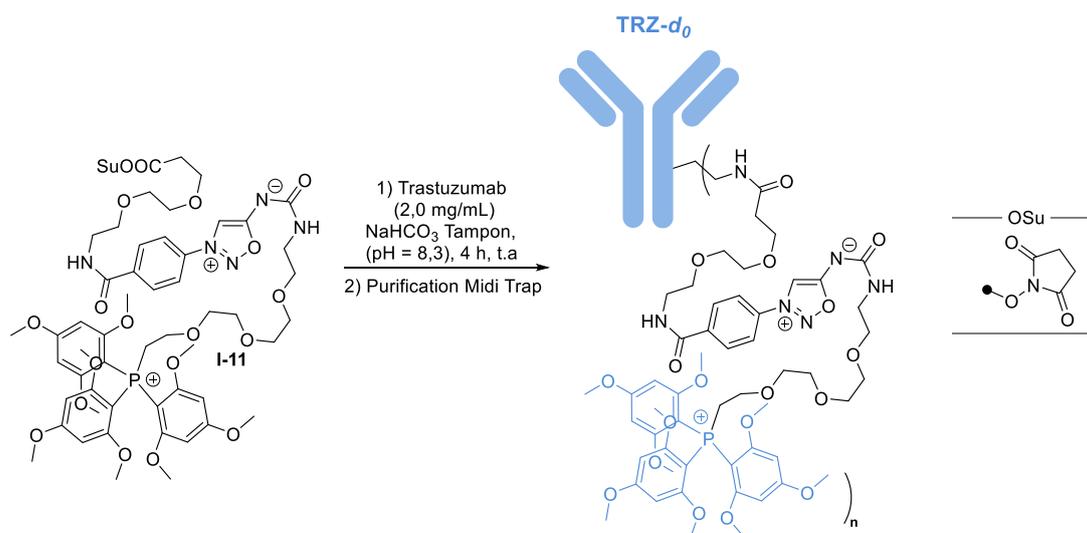
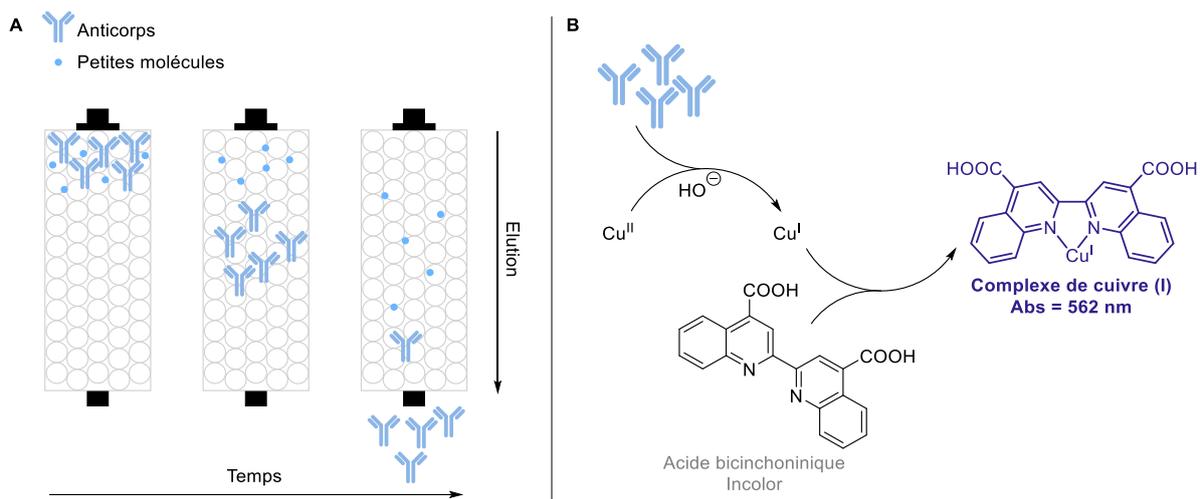


Schéma 42. Synthèse de l'immunoconjugué TRZ-d<sub>0</sub>

Le Trastuzumab (**TRZ**) peut être fonctionnalisé dans les mêmes conditions réactionnelles que celles utilisées précédemment dans notre laboratoire.<sup>94</sup> Dans cette étude, les auteurs utilisent 100 équivalents d'ester activé par rapport à l'anticorps dans un tampon hydrogencarbonate (pH = 8,3). Après 4 heures d'incubation à température ambiante, la solution est directement purifiée par exclusion stérique. La colonne d'exclusion permet de séparer les hauts poids moléculaires (> 5000 Da) des plus bas et, en particulier, l'excès d'ester activé (en mélange avec le produit d'hydrolyse après réaction) qu'il est essentiel de retirer du milieu (**Figure 20. A**).

<sup>93</sup> K. Tsuchikama and Z. An, *Protein & Cell*, 9/1 (2018), 33–46.

<sup>94</sup> M. Richard, C. Truillet, V. L. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jégo, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran, and S. Specklin, *Chem. Comm.*, 55/70 (2019), 10400–403.



**Figure 20.** A. Principe général de la purification par exclusion stérique. B. Principe général du dosage des protéines BCA.

Une fois l'immunoconjugué purifié, une quantification de la concentration en protéines est effectuée par test BCA. Le test BCA est une méthode de dosage colorimétrique basé sur la capacité des protéines à réduire les ions cuivre (II) en cuivre (I). L'ajout d'une solution de cuivre (II) contenant de l'acide bicinchoninique permet de calculer la concentration en protéine par absorbance à 562 nm. En effet l'acide bicinchoninique a la particularité de former un complexe coloré absorbant à 562 nm en présence de cuivre (I) (**Figure 20. B**).

Malheureusement, une très faible quantité d'anticorps (moins de 0,1 mg/mL) est récupérée après purification, ce qui correspond à un rendement inférieur à 10 %. Il semblerait que 100 équivalents entraînent une perfonctionnalisation de la protéine induisant sa précipitation. La quantité d'ester activé a donc été progressivement diminuée pour évaluer son impact sur le taux de récupération de la protéine modifiée (**Tableau 5**).

**Tableau 5.** Résultats obtenus à différentes concentrations de I-11

Entrée	Qté I-11	Atc <sup>(a)</sup>	Conc. de TRZ-d <sub>0</sub>	Conc. théorique <sup>(b)</sup>	Rdt.
1	100 éq	TRZ	< 0,1 mg/L		< 10%
2	50 éq	TRZ	< 0,1 mg/L		<10%
3	20 éq	TRZ	0,8 mg/L	1,33 mg/mL	60%
4	20 éq <sup>(c)</sup>	TRZ	1,26 mg/L		95 %

<sup>(a)</sup> Concentration de TRZ de départ : 2,0 mg/mL

<sup>(b)</sup> Concentration théorique obtenu dans la fraction pure d'immunoconjugué (fraction 1.0 mL sur 1.5 mL d'élution)

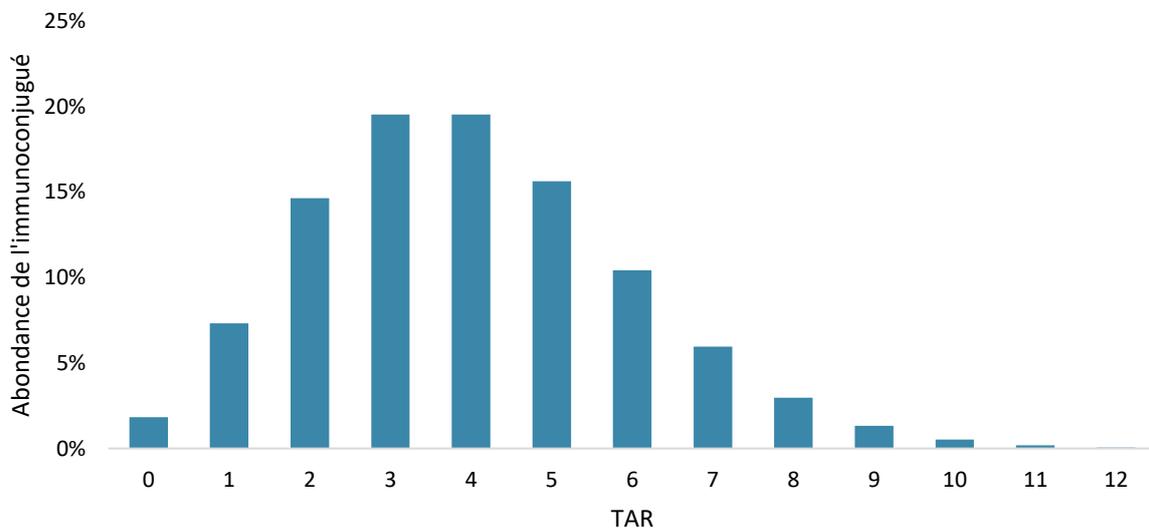
<sup>(c)</sup> Addition 10 équivalents par 10 équivalents de l'ester activé

Passer de 100 à 50 équivalents ne semble pas avoir un impact bénéfique sur le rendement en immunoconjugué, alors que lorsque 20 équivalents seulement d'ester activé sont utilisés le rendement monte à 60%. Avec 20 équivalents, beaucoup moins de précipitation est observée lors de la conjugaison. Lorsque l'ajout de l'ester activé est fractionné de 10 équivalents en 10 équivalents, aucune précipitation n'est alors observée, et le rendement est quasi quantitatif (**Tableau 5**, Entrée 4).

Une fois le premier immunoconjugué obtenu dans les conditions de couplages optimales (**Tableau 5**, Entrée 4), nous avons voulu le caractériser.

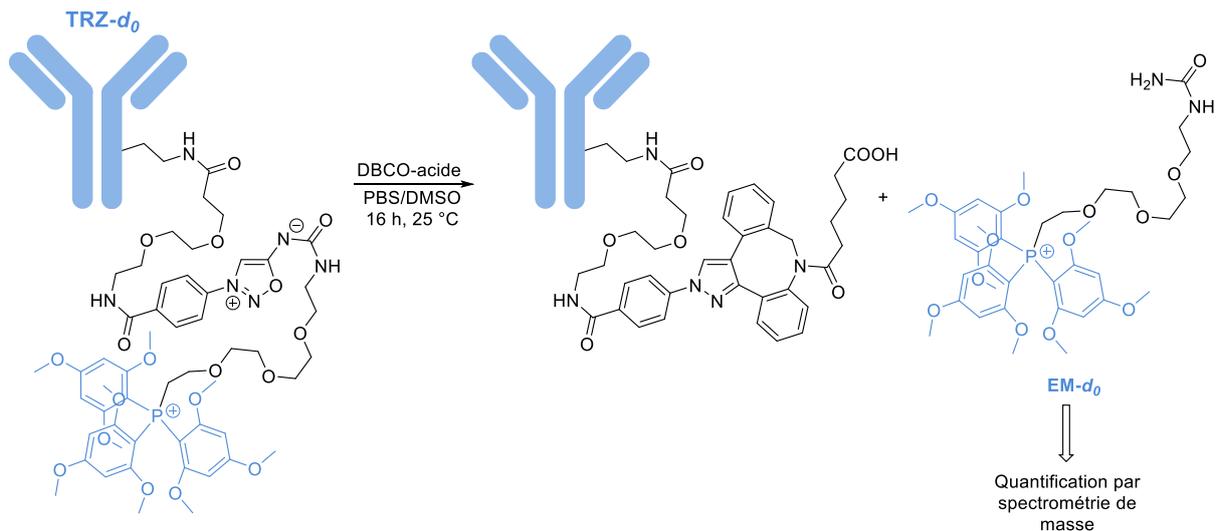
### III.2 Caractérisation de TRZ-d<sub>0</sub>

Le nombre d'étiquettes de masse par anticorps (TAR pour Tag Antibody Ratio) a dû être déterminé de façon précise. Pour cela, la spectrométrie de masse MALDI est couramment utilisée pour déterminer ce type de paramètre. Malheureusement, aucune analyse concluante n'a été obtenue. L'explication la plus probable est que chaque étiquette de masse introduit une charge permanente sur l'anticorps ce qui a pour conséquence de diviser par deux la masse. Par exemple, si l'anticorps non dérivatisé fait 150 kDa, la masse visible sera de 75,5 kDa si une étiquette de masse I-11 (1 kDa) est couplée à l'anticorps. Cependant, le nombre d'EM incorporées par anticorps est variable, généralement compris entre 0 et plus de 10, la masse sera donc répartie entre 16 kDa et 150 kDa fragmentant ainsi le signal sur plus de 134 000 m/z. La modification d'un anticorps par couplage peptidique induit également une répartition des EM par anticorps selon une loi de Poisson  $p(k) = (\lambda^k/k!) \exp(-\lambda)$  centrée sur le TAR moyen (**Figure 21**)



**Figure 21.** Répartition selon la loi de poisson  $p(k) = (\lambda^k/k!) \exp(-\lambda)$  des EM par anticorps avec TAR centré sur 4 ( $\lambda = 4$ )

La combinaison de ces deux propriétés rend donc impossible l'analyse par spectrométrie de masse MALDI, puisque chaque immunoconjugué réparti sur plus de 134 000 m/z doit être multiplié par son abondance relative. Nous avons donc décidé de changer d'approche. Au lieu de déterminer le nombre d'EM qu'il pourrait y avoir sur l'anticorps, nous avons décidé de quantifier la quantité exacte d'EM libérées après la réaction de ligation coupure sur l'immunoconjugué (**Schéma 43**). Connaissant la concentration exacte d'anticorps en solution et celle des EM libérées par réaction SPICC il est possible de déterminer le TAR en divisant simplement la quantité de matière de l'EM par celle de l'anticorps. Ainsi en utilisant 20 équivalents d'ester activé, le TAR est de 4,16. La méthode de quantification sera détaillée dans la partie III.6. *Quantification des étiquettes de masse* page 70.

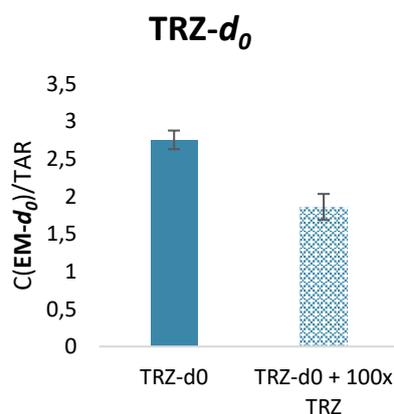


**Schéma 43.** Détermination du TAR par quantification d'EM après ligation coupure (25 °C, PBS/DMSO, DBCO acide).

Le TAR est une valeur importante dans ce projet. En effet, une valeur insuffisante induirait un manque de sensibilité, alors qu'une valeur trop élevée pourrait entraîner une perte partielle voire totale des propriétés de liaison de l'anticorps.

Pour vérifier que les propriétés de liaison avec sa cible n'aient pas été modifiées par d'éventuelles modifications du paratope (partie variable de l'anticorps permettant la reconnaissance à la cible), la constante d'affinité de l'immunoconjugué a été déterminée. Pour cela un test de liaison compétitive est réalisé avec **TRZ-d<sub>0</sub>**. **TRZ-d<sub>0</sub>** est incubé avec ou sans un excès (100X) de **TRZ** non dérivatisé sur cellule SkBr3 (HER2+), puis après lavage des anticorps non liés à la cellule, une solution de DBCO est ajoutée. Cette expérience est réalisée à faible concentration de d'anticorps, environ 10% d'anticorps par rapport à la quantité de récepteurs présents et accessibles à la surface des cellules.

La quantification d'**EM-d<sub>0</sub>** dans le surnageant cellulaire est alors déterminée. La quantité d'EM relarguée dépend du TAR de chaque immunoconjugés, pour s'affranchir de cette variable la concentration en EM est donc divisée par le TAR (**Figure 22**).



**Figure 22.** Test de liaison de **TZR-d<sub>0</sub>** au récepteurs HER2 sur cellule SkBr3

Le test de déplacement semble montrer que **TRZ-d<sub>0</sub>** n'a pas perdu d'affinité puisque le signal détecté dans l'expérience de blocage (**TRZ-d<sub>0</sub>** + 100X TRZ) est en dessous de la valeur de détection de l'expérience référence (**TRZ-d<sub>0</sub>**). De plus, la valeur p, qui traduit la significativité statistique, est en

dessous de 0,05. Si l'immunoconjugué **TRZ-d<sub>0</sub>** avait perdu ses propriétés de liaison, aucun signal n'aurait été détecté.

Les propriétés de liaison n'étant pas modifiées dans les conditions optimales de couplage (20 equiv.), nous avons entamé la synthèse des trois autres immunoconjugués.

Pour cela il faut donc synthétiser les trois différents isotopologues de l'ester *tert*-butylique **I-9**. Il a d'abord fallu mettre en place une méthode de synthèse permettant d'accéder aux phosphines marquées **TMPP-d<sub>9</sub>**, **TMPP-d<sub>18</sub>**, **TMPP-d<sub>27</sub>** précurseurs de la réaction de substitution nucléophile sur le tosylate **I-8** (Cf : **Schéma 35**, page 56).

### III.3 Synthèse des phosphines **TMPP-d<sub>9</sub>**, **TMPP-d<sub>18</sub>**, **TMPP-d<sub>27</sub>**.

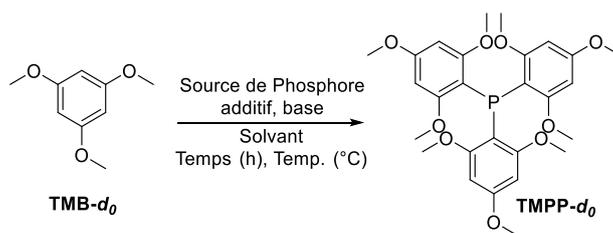
Afin de multiplexer l'analyse, il est nécessaire d'avoir accès à d'autres phosphines isotopologues de la **TMPP**. Pour cela nous avons choisi le marquage au deutérium qui assure un marquage stable. Les positions les plus facilement accessibles pour le marquage sont les trois positions méthoxy aromatiques de la **TMPP**. En plus de la **TMPP** non marquée, le nombre d'isotopologues serait alors de 4 avec des écarts de masse assez conséquents pour pouvoir aisément être discernés en spectrométrie de masse. A noter également qu'un enrichissement isotopique le plus élevé possible est essentiel pour avoir une meilleure efficacité de détection.

Plusieurs articles font état de la synthèse de **TMPP** à partir de dérivés de triméthoxybenzènes. L'optimisation de la synthèse de la phosphine **TMPP** a été effectuée sur le précurseur non marqué commercial, le triméthoxybenzène **TMB** pour limiter les coûts. Dans un premier temps, les conditions décrites dans la littérature, utilisant une base organique forte et une source de phosphore électrophile, ont été testées.<sup>95</sup> Seule l'utilisation de triphénylphosphite comme source de phosphore a donné un résultat encourageant (**Tableau 6**, Entrée 5). L'augmentation du nombre d'équivalents de **TMB** ne semble pas exercer une influence importante sur cette réaction. Un article du début des années 60 décrit la synthèse de **TMPP** en utilisant un acide de Lewis et une autre source de phosphore électrophile.<sup>96</sup> Les auteurs montrent qu'il est possible de synthétiser la **TMPP** avec de très bons rendements, en utilisant un mélange de **TMB** et de chlorure de zinc anhydre dans un reflux de PCl<sub>3</sub> pendant 16 heures (**Tableau 6**, Entrée 7). Ces conditions ont été testées plusieurs fois et le meilleur rendement a été obtenu en utilisant du chlorure de zinc stocké en boîte à gant. Ainsi, la phosphine a pu être obtenue pure avec un rendement de 22% (**Tableau 6**, Entrée 7) contrairement à la publication où les auteurs obtenaient 80%. La principale limitation de la réaction réside dans la manière de purification. En effet, les auteurs ont synthétisé une grande quantité de phosphine, la purification par précipitation/recristallisation était donc facilement réalisable. Dans notre cas la réaction a été effectuée sur une centaine de milligrammes (en raison du coût des TMB deutérés) ce qui complexifie la purification par recristallisation. Malheureusement, la recristallisation semble être la seule méthode efficace puisque des tests de purification sur colonne de silice n'ont pas permis d'isoler le produit. Le PCl<sub>3</sub> reste une source de phosphore III extrêmement réactive et son utilisation nécessite des conditions inertes, le PBr<sub>3</sub> plus facile d'utilisation a été testé dans les mêmes conditions que celles décrites par Protopopov mais aucune formation du produit désiré n'a été observé (**Tableau 6**, Entrée 8).

<sup>95</sup> W. M, H. S, and T. A, *Journal of Chemical Research*, 2 (1985), 38–39.

<sup>96</sup> Protopopov, I. S.; Kraft, M. Y. *Zh. Obshch. Khim.* (1963), 33, 3050–3052.

Tableau 6. synthèse de **TMPP-d<sub>0</sub>**



Entrée	source de phosphore	<i>n</i> -BuLi (éq)	TMB- <i>d<sub>0</sub></i> (éq)	Solvant	Temps	Temp. (°C)	Add.	Rdt <sup>(a)</sup>
1	PBr <sub>3</sub>	3,2	3,0	pyr	5 h	0 °C à t.a	-	0 %
2	P(NEt)Cl <sub>2</sub>	3,2	3,0	THF	5 h	0 °C à t.a	-	_(b)
3	P(OEt) <sub>3</sub>	3,2	3,0	THF	5 h	0 °C à t.a	-	0%
4	P(OPh) <sub>3</sub>	3,2	3,0	THF	18 h	-78 °C à t.a	-	12 %
5	P(OPh) <sub>3</sub>	4,2	4,0	THF	18 h	0 °C à t.a	-	15 %
6	PCl <sub>3</sub>	3.2	3,0	THF	5 h	0 °C à t.a	-	_(b)
7	<b>PCl<sub>3</sub></b>	-	<b>3,0</b>	-	<b>18 h</b>	<b>70 °C</b>	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>22 %</b>
8	PBr <sub>3</sub>	-	3,0	-	18 h	70 °C	ZnCl <sub>2</sub>	0 %

<sup>(a)</sup> Rendement isolé en **TMPP-d<sub>0</sub>**

<sup>(b)</sup> Mixture complexe

Une fois les conditions optimales déterminées (**Tableau 6**, Entrée 7), la synthèse des phosphines marquées a pu être effectuée en partant non pas de **TMB** mais de **TMB-d<sub>3</sub>**, **TMB-d<sub>6</sub>** ou encore de **TMB-d<sub>9</sub>** (**Schéma 44**), préalablement synthétisés en présence de dimethylSulfate-d<sub>6</sub> (**Schéma 44**).

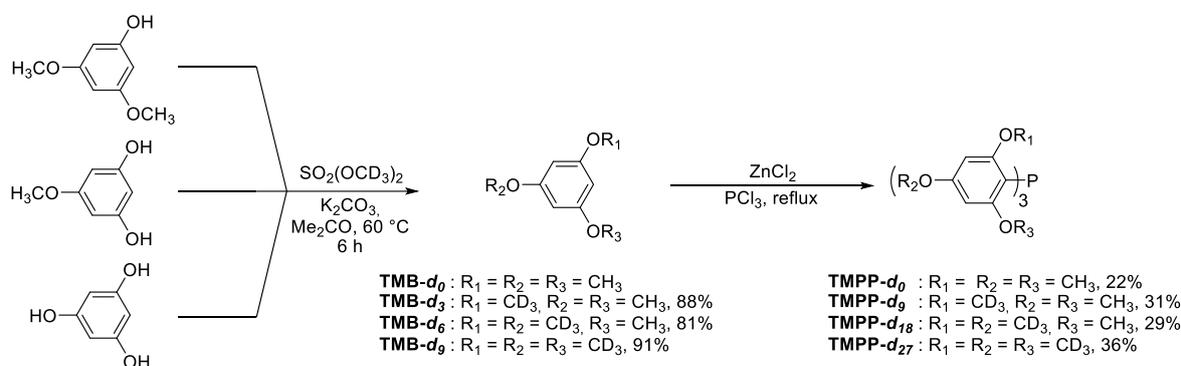
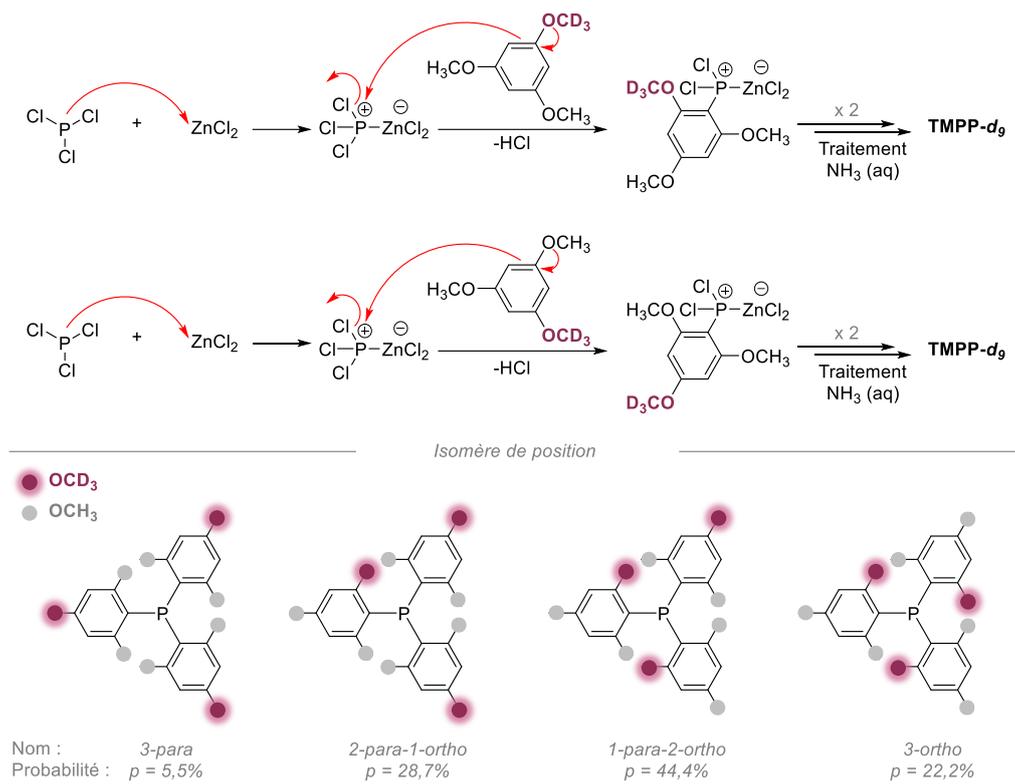


Schéma 44. Synthèse des phosphines marquées

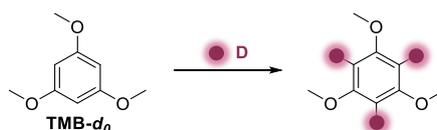
Les phosphines **TMPP-d<sub>9</sub>** -**d<sub>18</sub>** et -**d<sub>27</sub>** ont ainsi pu être synthétisées avec des rendements allant de 22% à 36% (**Schéma 44**). Dans cette synthèse, le mécanisme de la réaction est important pour la suite de l'étude, puisqu'aucune régiosélectivité n'est possible et un mélange d'isomères de position est obtenu dans le cas des phosphines **TMPP-d<sub>9</sub>** et **TMPP-d<sub>18</sub>** (**Figure 23**).



**Figure 23.** Mécanisme de la synthèse de **TMPP- $d_9$**  envisagé

Le mécanisme proposé en **Figure 23** suggère que l'activation du  $\text{PCl}_3$  se fait à l'aide du chlorure de zinc. Le **TMB- $d_3$**  peut réagir sur ce complexe en s'additionnant sur le phosphore pour entraîner le départ d'un ion chlorure qui après réaromatation forme l'intermédiaire phosphonium mono-arylique. Deux étapes similaires successives permettent d'accéder à la phosphine après un traitement à l'ammoniaque. Ainsi quatre isomères de position peuvent être obtenus en proportions différentes suivant quelle position du **TMB- $d_3$**  attaque le complexe de zinc activé. Ces isomères de position ne sont pas visibles en RMN  $^1\text{H}$ , puisque les déplacements chimiques se moyennent et un seul pic est observé pour chaque groupe de protons magnétiquement différents. Il est néanmoins possible de calculer les probabilités théoriques d'apparition des 4 régioisomères. **1-para-2-ortho** serait majoritaire dans le mélange suivi de **3-ortho** de **2-para-1-ortho** et enfin de **3-para**.

Pour augmenter le nombre d'isotopologues et donc le nombre de récepteurs détectés, des tests de deutération de la position *ortho* ont été menés (**Tableau 7**).

**Tableau 7.** Deutération du TMB en position *ortho*

Entrée	Source de Deutérium	Additif	Temp. (°C)	Temps	E.I. <sup>(a)</sup>
1	D <sub>2</sub> O	HClO <sub>4</sub> (5 mol%)	40 °C	6 h	56%
2	D <sub>2</sub> O	B(C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> (10 mol%)	80 °C	24 h	80%
3	D <sub>2</sub> O	B(C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> (10 mol%)	80 °C	48 h	81%
4	D <sub>2</sub> O	B(C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> (10 mol%)	80 °C	48 h	80% <sup>(b)</sup>
5	D <sub>2</sub> (2 bar)/D <sub>2</sub> O	Ni/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (10%w)	50 °C	6 h	0%

<sup>(a)</sup> Enrichissement isotopique

<sup>(b)</sup> E.I obtenu après deux cycles

En s'inspirant des travaux de la littérature, des réactions de deutération de la position *ortho* du TMB ont été effectuées dans D<sub>2</sub>O avec différents acides. En présence d'acide perchlorique dans le D<sub>2</sub>O un enrichissement isotopique (E.I) de 56% est obtenu après 6 heures de réaction (**Tableau 7**, Entrée 1).<sup>97</sup> Lorsque HClO<sub>4</sub> est remplacé par un borane, cet enrichissement monte à 80% (**Tableau 7**, Entrée 2). Cependant, l'enrichissement semble plafonner à 80% puisque même après 48 heures aucune évolution n'a pu être observée (**Tableau 7**, Entrée 2-3).<sup>98</sup> Une deuxième réaction de deutération dans les mêmes conditions que celles de l'entrée 2 a été effectuée mais cette fois-ci en partant de TMB déjà enrichi à 80% (**Tableau 7**, Entrée 4). L'enrichissement est resté à 80%, ces résultats sont sans doute dus à un équilibre entre deutération et protonation limitant l'enrichissement isotopique.

En s'inspirant du procédé de deutération du benzène par l'entreprise Eurisotop, une expérience en présence de nickel sur alumine sous deux bars de dihydrogène deutéré a été testée mais aucun enrichissement n'a été détecté (**Tableau 7**, Entrée 5).

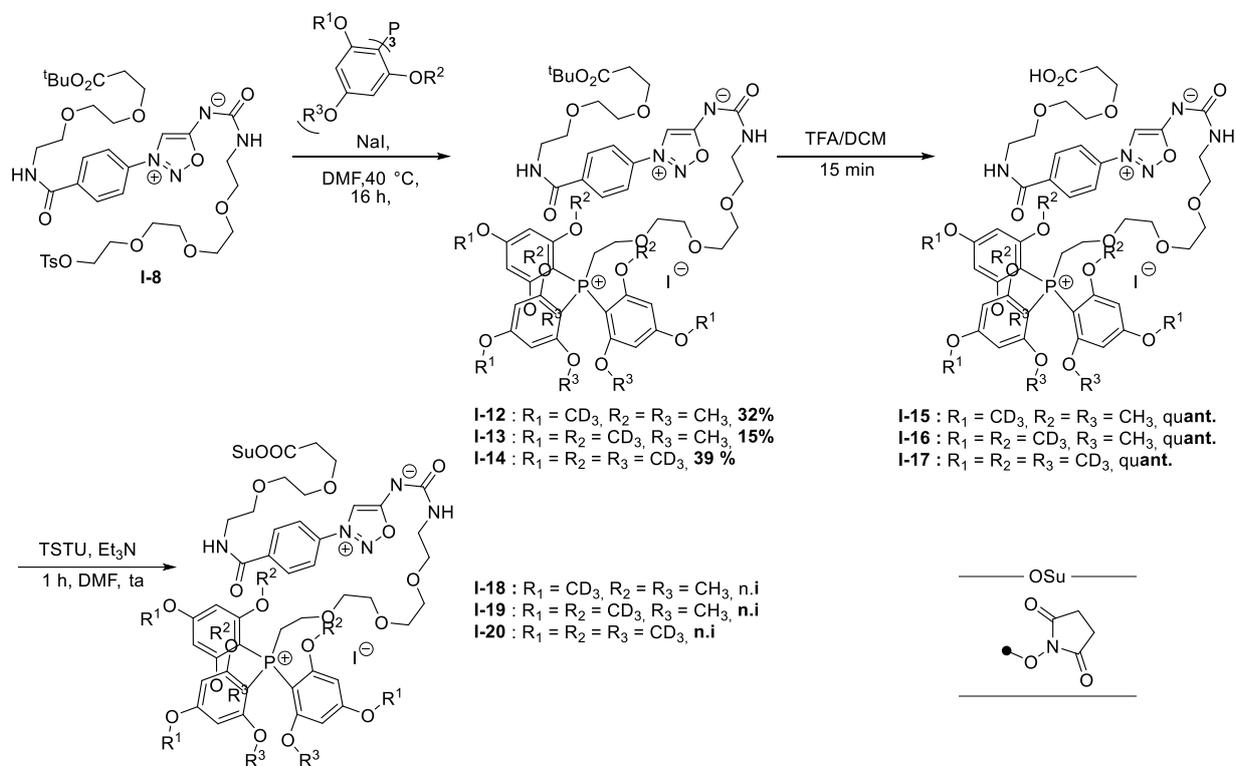
Malheureusement, aucune réaction testée n'a permis d'obtenir un enrichissement suffisant (> 95%) pour être exploité dans la suite de l'étude. Seules quatre **TMPP** ont donc été sélectionnées pour la suite.

<sup>97</sup> O. Fischer, A. Hubert, and M. R. Heinrich, *JOC*, 85/18 (2020), 11856–66.

<sup>98</sup> W. Li, M.-M. Wang, Y. Hu, and T. Werner, *Org. Lett.*, 19/21 (2017), 5768–71.

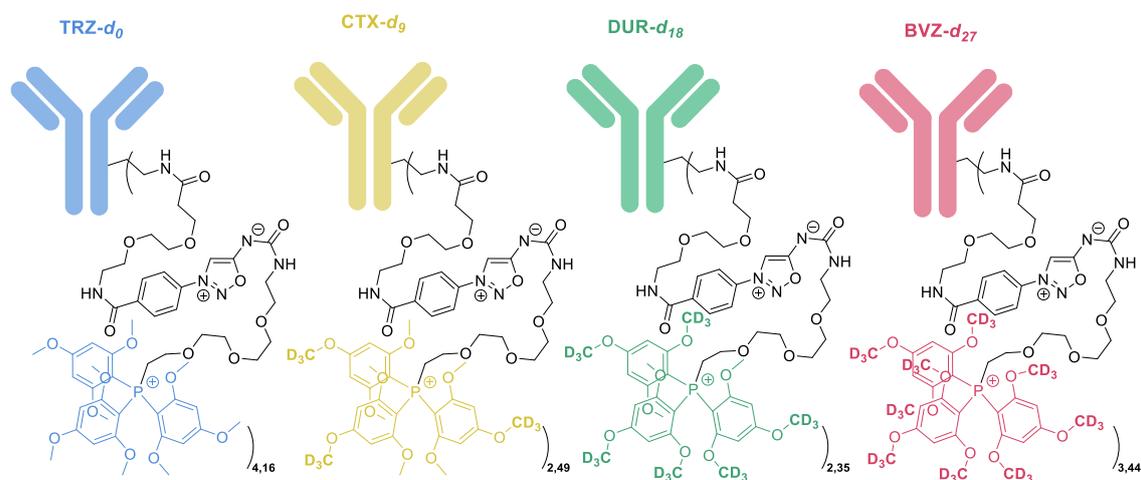
### III.4 Synthèse des immunoconjugués CTX-d<sub>9</sub>, DUR-d<sub>18</sub>, BVZ-d<sub>27</sub>

Une fois les phosphines deutérées synthétisées, les réactions de substitutions nucléophiles ont permis d'obtenir les esters **I12**, **I13** et **I14** avec des rendements respectifs de 32%, 15% et 39% (**Schéma 45**).



**Schéma 45.** Synthèse des acides actifs **I-18**, **I-19** et **I-20** (n.i : non isolé)

Les esters *tert*-butyliques **I-12**, **I-13**, **I-14** ont ensuite été quantitativement clivés pour former les acides correspondant en présence de TFA dans le DCM. Les acides ont enfin été activés dans les mêmes conditions que celles développées pour le composé **I-11** (Cf **Schéma 41** page 58) et chaque acide activé **I-18**, **I-19**, **I-20** obtenu a été mis à réagir avec respectivement CTX, DUR, BVZ pour obtenir les immunoconjugués correspondants **CTX-d<sub>9</sub>**, **DUR-d<sub>18</sub>** et le **BVZ-d<sub>27</sub>** (**Figure 24**).



**Figure 24.** Immunoconjugués obtenus.

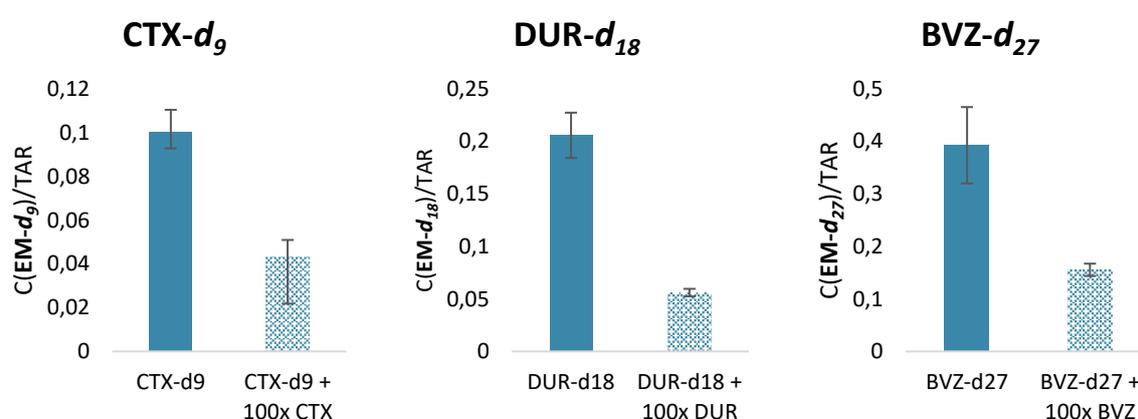
Les TAR des trois nouveaux anticorps ont été caractérisés de la même façon que pour **TRZ-d<sub>0</sub>**, les résultats sont condensés dans le tableau suivant (**Tableau 8**).

**Tableau 8.** Résultats obtenus pour les différents immunoconjugués.

Entrée	Immunoconjugué	Cible	acide activé (éq)	TAR	Conc.	Rdt
1	<b>TRZ-d<sub>0</sub></b>	HER2	<b>I-9</b> (20 éq)	4,16	1,26 mg/mL	95%
2	<b>CTX-d<sub>9</sub></b>	EGFR	<b>I-12</b> (20 éq)	2,49	1,06 mg/mL	80%
3	<b>DUR-d<sub>18</sub></b>	PD-L1	<b>I-13</b> (10 éq)	2,35	1,28 mg/mL	96%
4	<b>BVZ-d<sub>27</sub></b>	VEGF	<b>I-14</b> (20 éq)	3,44	0,84 mg/mL	63%

A noté que dans le cas du Durvalumab seuls 10 équivalents ont dû être utilisés pour conserver les propriétés de l'anticorps. L'immunoconjugué **DUR-d<sub>18</sub>** obtenu en utilisant 20 équivalents avait perdu toute affinité pour sa cible et n'était donc pas utilisable pour les expériences sur cellules. Le TAR fluctue en fonction de l'anticorps utilisé allant de 2,35 à près de 4,16 pour **TRZ-d<sub>0</sub>**. Les rendements varient eux aussi, ce qui semble logique puisque chaque anticorps possède un nombre de résidus nucléophiles susceptibles de réagir avec l'ester activé qui lui est propre. Ainsi, un anticorps qui possède un nombre important de Lysines accessibles sera plus facilement perfonctionnalisée. Ceci peut entraîner la précipitation de la protéine qui sera perdue lors de la purification.

Ensuite les propriétés de liaison de chaque immunoconjugué avec sa cible ont été vérifiées. Comme dans le cas de **TZR-d<sub>0</sub>**, les tests de déplacement sont concluants, montrant que les immunoconjugués n'ont pas perdu leur propriétés biologiques (**Figure 25**).



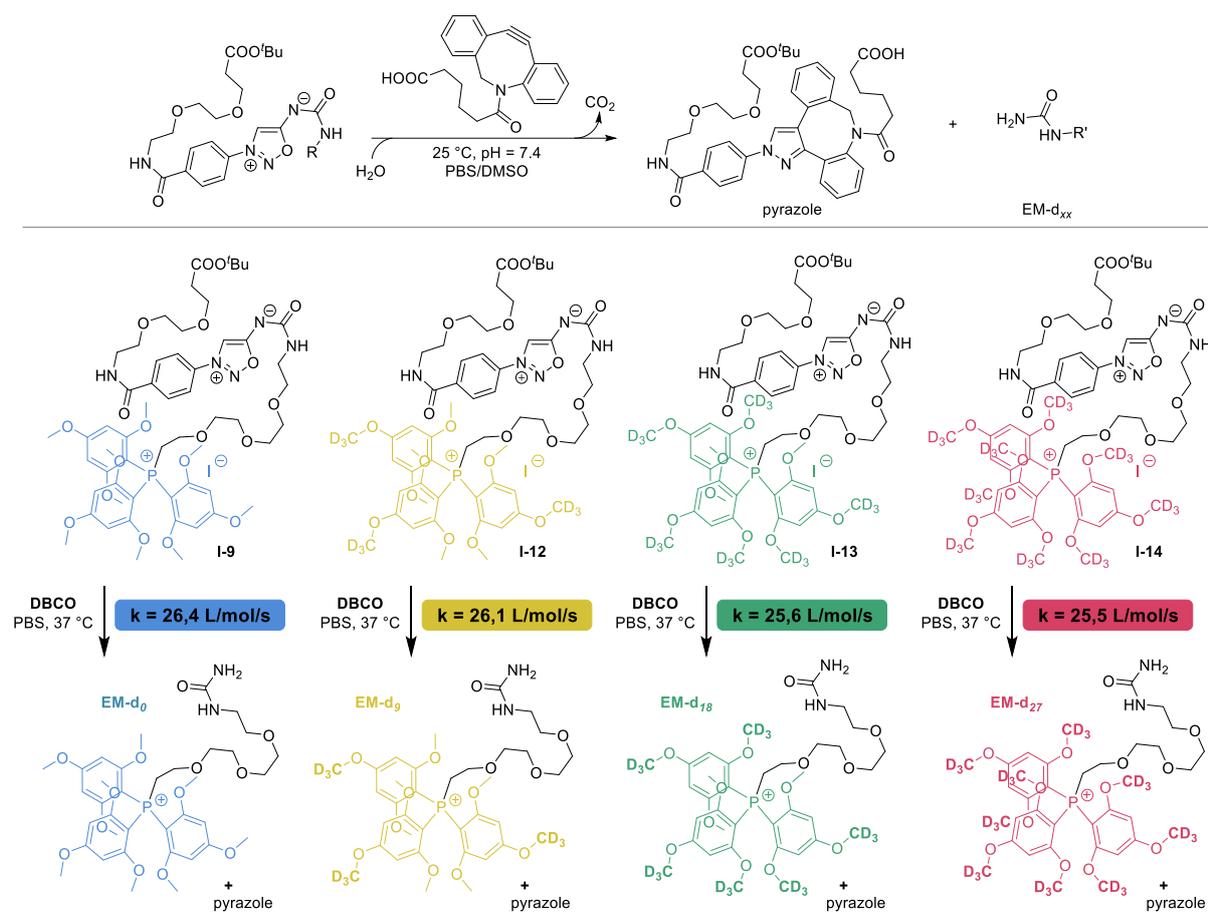
**Figure 25.** Test de liaison de **CTX-d<sub>9</sub>** à EGFR sur cellules A431, Test de liaison de **DUR-d<sub>18</sub>** à PD-L1 sur cellules H1975, Test de liaison de **BVZ-d<sub>27</sub>** à VEGF sur cellules U87

Une fois les 4 immunoconjugués obtenus, nous nous sommes tournés vers l'étude cinétique de la réaction de ligation coupure pour libérer les étiquettes de masse.

### III.5 Etudes de la cinétique de relargage des étiquettes de masse **EM-d<sub>0</sub>**, **EM-d<sub>9</sub>**, **EM-d<sub>18</sub>**, **EM-d<sub>27</sub>**.

Une première étude de relargage des étiquettes de masse, à partir des esters *tert*-butyliques a permis de déterminer la constante de vitesse de ligation coupure pour les quatre composés **I-9**, **I-12**, **I-13** et

**I-14 (Schéma 46).** Cette première étude permet de s'affranchir de l'utilisation des anticorps, délicats à utiliser, et qui sont à des concentrations inexploitable pour des mesures de cinétique classique. Les valeurs des constantes de vitesse de la réaction de ligation coupure ont été déterminées en suivant la décroissance de l'absorbance au maximum d'absorption caractéristique du motif iminosydone dans le PBS. Les mesures ont été effectuées à des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  en iminosydone et à 37 °C. L'utilisation d'un spectromètre UV-Visible, équipé d'une cellule d'addition *in situ* permet l'ajout de la solution de cyclooctyne directement dans la solution en cours d'analyse. Cet équipement permet d'enregistrer de façon très précise des cinétiques relativement rapides. Les droites d'étalonnage permettant d'avoir accès à la réponse UV en fonction de la concentration ont été réalisées. Ces informations permettent, une fois le spectre UV en fonction du temps enregistré, de recalculer la concentration et donc la conversion en fonction du temps.



**Schéma 46.** Détermination des cinétiques réactionnelles avec le DBCO-acide (37 °C, PBS/DMSO, 100  $\mu\text{M}$ )

Les cinétiques obtenues à 37 °C dans le PBS sont relativement bonnes et oscillent entre 25,5 et 26,4 L/mol/s. A cette vitesse et à cette concentration, le temps de demi-réaction se situe aux alentours de 6 min soit une conversion totale (conv. > 95%) en presque 2 heures. Pour maintenant valider que la quantification des étiquettes de masses est toujours possible dans les milieux biologiques, des tests de détection ont été menés en partenariat avec la plateforme SmartMS du SPI, au CEA Paris Saclay et seront expliqués dans la partie suivante. Une expérience de détermination des constantes de vitesse de ligation coupure à partir cette fois ci des immunoconjugué est en cours au laboratoire. Cependant cette expérience est difficile à mettre en place, puisque les concentrations de travail sont faibles, empêchant toute détermination de la cinétique par UV. La quantification des EM en fonction du temps après ajout de DBCO par spectrométrie de masse est donc nécessaire.

Les EM sont relarguées relativement rapidement et quantitativement dans le PBS, il est maintenant nécessaire de déterminer leur limite de détection dans différents milieux pour valider la méthode. Ces résultats feront l'objet de la sous-partie suivante.

### III.6 Quantification des étiquettes de masse

Les coefficients de réponse des étiquettes de masse ont été systématiquement déterminés dans des milieux biologiques (DMEM), pour vérifier que la détection soit possible. Ces analyses ont été effectuées par UPLC-MS/MS (ACQUITY I-Class UPLC®) équipé d'un spectromètre de masse Waters XEVO™ TQ-S, en electrospray positif par l'équipe Smart-MS de notre institue. Les limites de quantification varient de 74,5 pM à près de 65 pM ce qui traduit une assez bonne sensibilité de ce type d'étiquettes de masse qui peuvent être détectées à partir de 20 pM (**Tableau 9**).

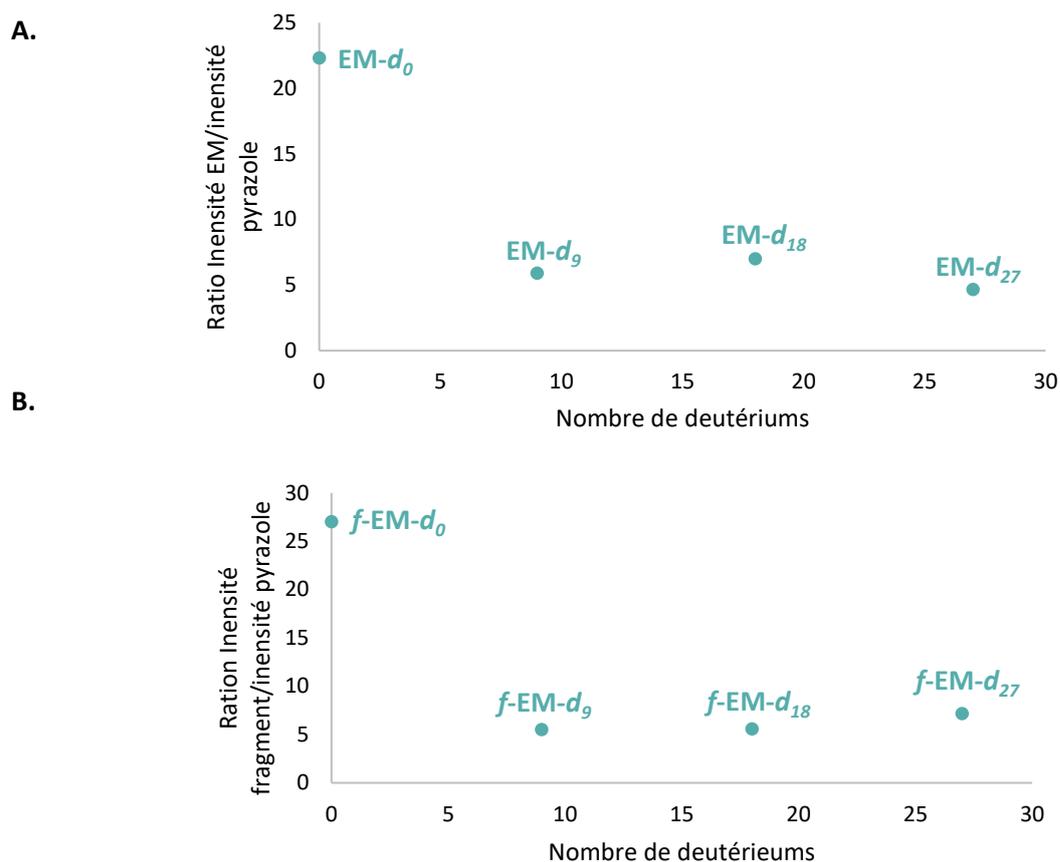
**Tableau 9.** Limites de quantification et de détection pour les quatre étiquettes de masse.

Entrée	EM	Limite de détection	Limite de quantification	m/z détecté
1	<b>EM-d<sub>0</sub></b>	20 pmol/L	65,3 pmol/L	180,0 <sup>(a)</sup>
2	<b>EM-d<sub>9</sub></b>	25 pmol/L	73,6 pmol/L	184,1 <sup>(a)</sup> ; 186,1
3	<b>EM-d<sub>18</sub></b>	20 pmol/L	66,3 pmol/L	187,1 <sup>(a)</sup> ; 189,1
4	<b>EM-d<sub>27</sub></b>	25 pmol/L	74,5 pmol/L	191,9 <sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup> ion suivi pour la quantification.

La quantification des EM va de pair avec une calibration précise de la masse, et des solutions étalons ont donc dues être utilisées. Pour se rapprocher au plus près des conditions qui seront utilisées dans les expériences *vitro* et *vivo*, les EM ont été libérées des esters *tert*-butyliques correspondants **I-9**, **I-12**, **I-13**, et **I-14**. En pratique, une quantité très précise de l'ester est suspendue dans un volume de DMSO, 10 équivalents de DBCO sont alors ajoutés pour quantitativement libérer l'EM voulu, permettant de faire une solution à 1 M d'EM dans le DMSO. Cette solution est alors utilisée pour calibrer le spectromètre de masse.

Les limites de quantifications sont bonnes, puisque qu'elles oscillent aux alentours de la soixantaine de picomolaire. Si, par approximation, le volume sanguin d'une souris est de 1,8 mL, cela revient à détecter une quantité d'EM de 18 femtomoles, soit 12 attogrammes d'anticorps. Les limites de détection varient légèrement en fonction des EM utilisées, alors que celles-ci ne se différencient que par la présence d'atomes de deutérium (**Figure 26**). Ce résultat a déjà été observé par nos collaborateurs du SPI lors d'études antérieures. En effet les rendements d'ionisation peuvent être sensiblement différents en fonction du nombre de deutériums présents sur une molécule.



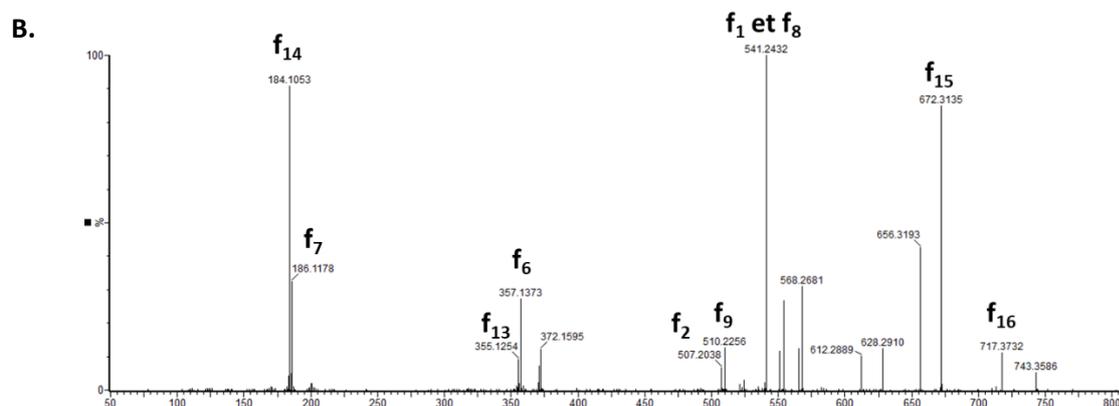
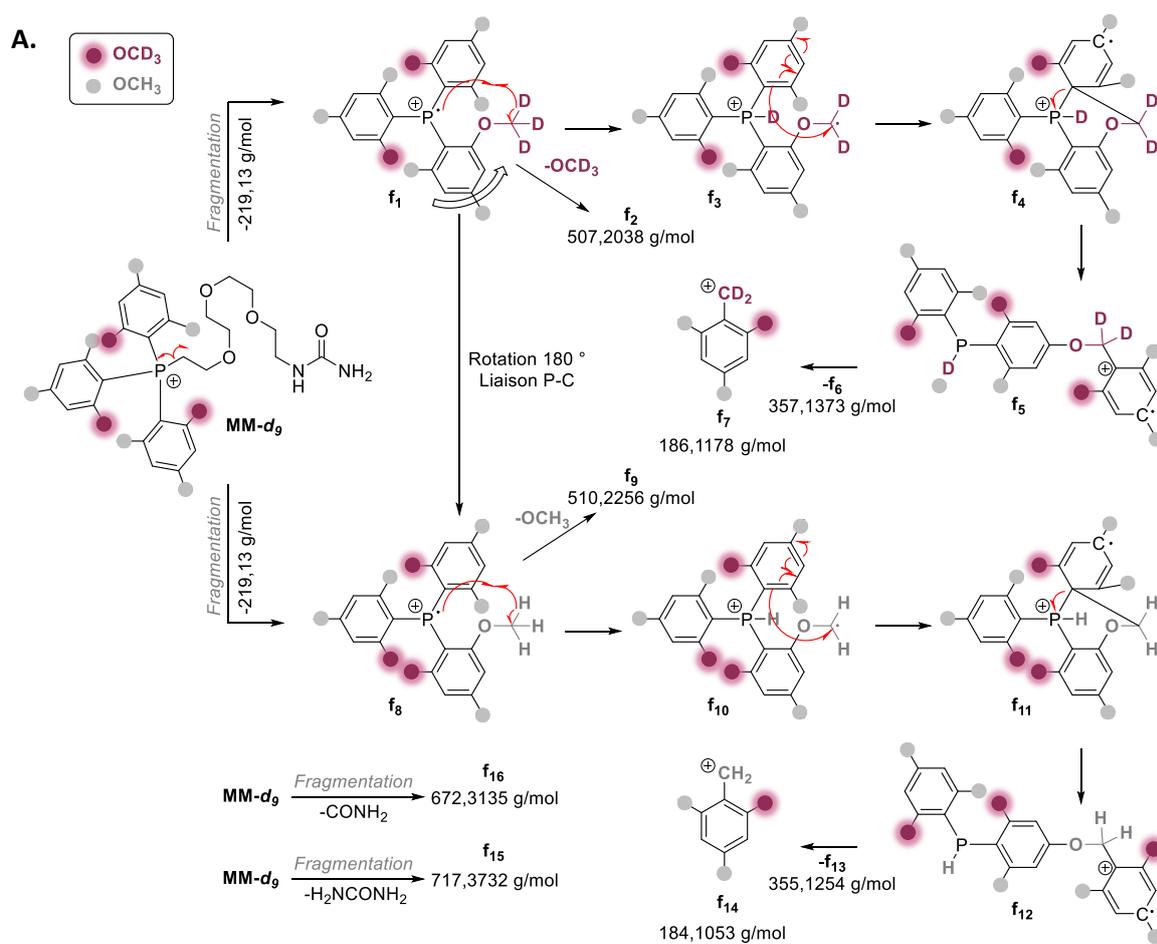
**Figure 26.** A. Evolution de l'intensité du signal en infusion ES<sup>+</sup> en fonction du nombre de deutériums sur les ions parents (MS1). L'intensité du signal est normalisé sur l'intensité du signal du pyrazole (m/z = 711) B. Evolution de l'intensité du signal en infusion ES<sup>+</sup> en fonction du nombre de deutériums sur les ions fils (MS2), f-EM : fragment de l'étiquette de masse détecté. L'intensité du signal est normalisé sur l'intensité du signal de la fragmentation principale du pyrazole (711>655). (20 ng/mL, H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 0,1% HCOOH à 5µL/min)

Malheureusement, la différence en rendement d'ionisation entre les EM n'est pas proportionnelle au nombre de deutériums (**Figure 26 A**), il en va de même pour les ions fils suivis en MS2 (**Figure 26 B**). A noter, que les résultats de la **Figure 26** sont représentés en intensités de signal normalisées par l'intensité de signal du pyrazole présent dans la solution (en quantité équimolaire à l'EM dans la solution) pour limiter toute imprécision liée à la concentration des solutions.

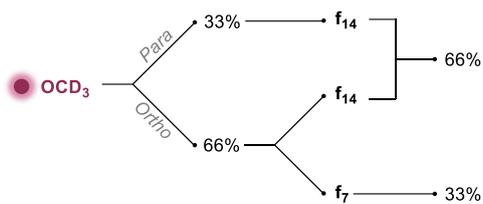
Une autre explication est donc nécessaire pour mieux comprendre cette différence. De plus, dans le cas d'EM- $d_9$  et d'EM- $d_{18}$  deux ions sont détectés avec un incrément de masse de deux. Le mécanisme de fragmentation des EM pourrait aider à comprendre ce résultat. Une étude plus poussée est nécessaire et notre attention s'est portée sur les ions fils issus de la fragmentation de l'ion parent. Ces investigations ont été réalisées en collaboration avec Timothée D'Anfray du groupe d'analyse de notre service. Ces ions fils sont détectables à des concentrations plus faibles que celle de l'ion parent. Pour mieux comprendre à quoi correspond la masse de l'ion fils, de chaque EM, une étude de fragmentation en HRMS/MS a été effectuée dans notre laboratoire. La fragmentation n'est pas triviale puisque la masse des ions observés n'est pas proportionnelle à la masse de l'ion parent. En se basant sur la publication de Miller qui décrit la fragmentation de composés phosphorés, il est possible d'imaginer un mécanisme (**Figure 27. A**).<sup>99</sup> Dans la **Figure 27** l'exemple d'EM- $d_9$  a été choisi mais les mécanismes de fragmentation sont exactement les mêmes pour les trois autres étiquettes de masse. Une première

<sup>99</sup> T. R. B. Jones, J. M. Miller, J. L. Peterson, and D. W. Meek, *Canadian Journal of Chemistry*, 54/9 (1976), 1478–86.

fragmentation du **EM-d<sub>9</sub>** génère le radical cation phosphonium **f<sub>1</sub>** après perte d'une molécule neutre de masse molaire de 219,13. Cette perte correspondant à la partie aliphatique de l'étiquette. **f<sub>1</sub>** peut ensuite se réarranger pour porter le radical sur un méthyle d'un des triméthoxybenzènes. Deux cas sont alors possibles à cette étape : le radical peut se former sur un méthyle protoné ou sur un deutéré. C'est cette étape qui pourrait expliquer l'observation de deux ions fils en MS/MS pour les **EM-d<sub>9</sub>** et **EM-d<sub>18</sub>**. Ensuite, les radicaux méthyliques **f<sub>3</sub>** ou **f<sub>10</sub>** pourraient alors se réarranger pour former les intermédiaires **f<sub>4</sub>** ou **f<sub>11</sub>** qui aboutiraient, après une série de fragmentations aux deux ions observés **f<sub>7</sub>** et **f<sub>14</sub>**. En pratique, les mécanismes sont bien plus complexes comme expliqué dans la partie III.3 *Synthèse des phosphines TMPP-d<sub>9</sub>, TMPP-d<sub>18</sub>, TMPP-d<sub>27</sub>*. les étiquettes de masse sont composées d'une série de quatre isomères de position, impliquant donc la formation de trois isomères de **f<sub>7</sub>** et trois isomères de **f<sub>14</sub>** possédant tous la même masse.



C.

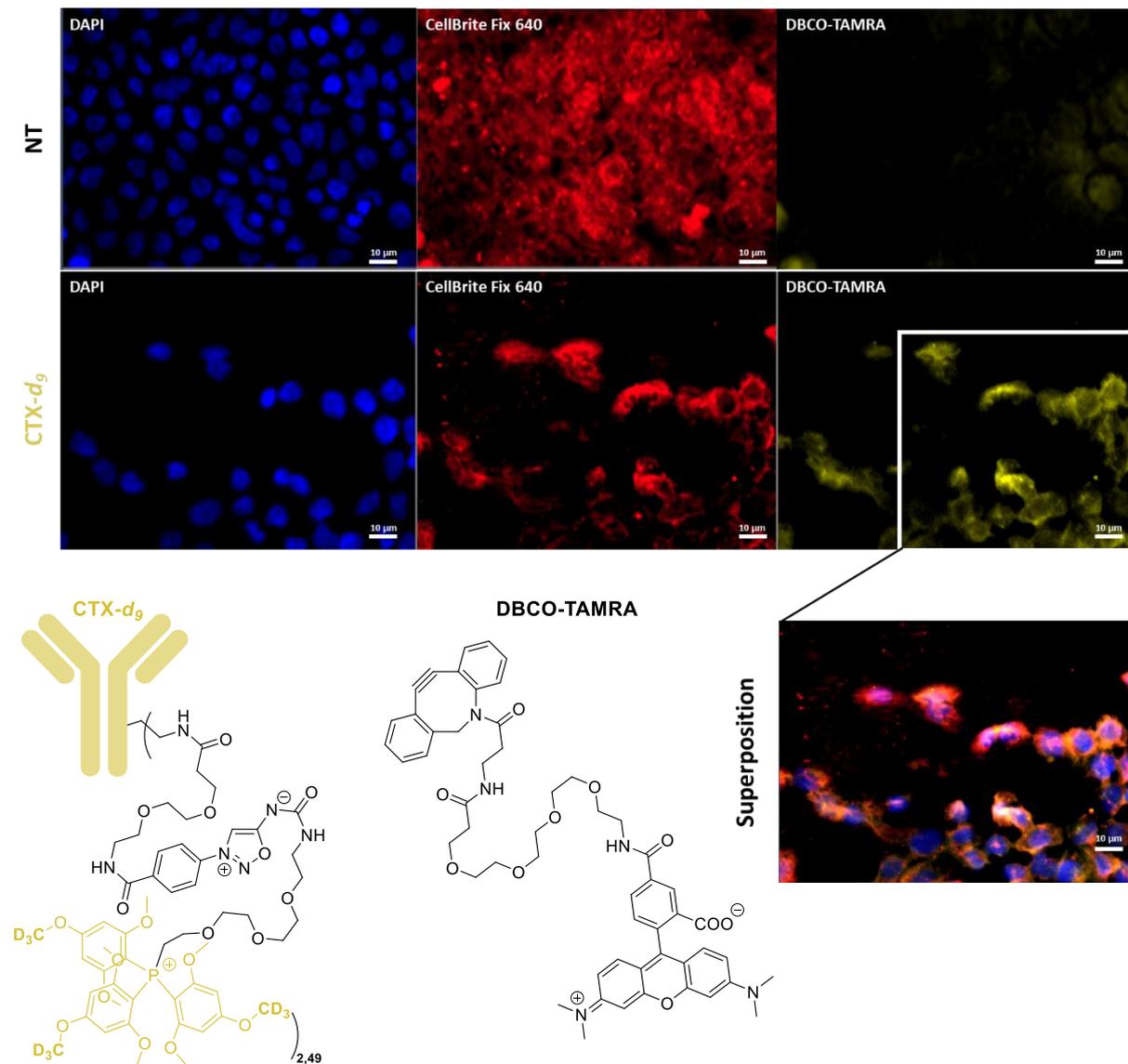


**Figure 27.** A. Mécanisme de fragmentation des étiquettes, exemple d'EM- $d_9$  B. Spectre HRMS/MS C. Probabilité de fragmentation  $f_7$  et  $f_{14}$ .

L'intensité des pics montre un rapport 66 % en préférence de  $f_{14}$  et de 33 % pour  $f_7$ . Lorsque le  $OCD_3$  est en *para* du cycle la fragmentation entraînera forcément l'ion  $f_{14}$  alors que quand il est en *ortho* il a 50% de chance de se fragmenter en  $f_{14}$  et 50% en  $f_7$  (**Figure 27**) entraînant alors 2 fois plus de chance de former  $f_{14}$  que  $f_7$ .

### III.7 Evaluation de la technologie *in vitro* et *ex vivo*

Le **CTX-d<sub>9</sub>** a alors été choisi comme immunoconjugué modèle pour la suite de l'étude, et des tests de ligation coupure sur cellules A431 en présence de **DBCO-TAMRA**, ont permis de vérifier par imagerie par fluorescence que l'anticorps se liait bien à la surface des cellules tumorales (**Figure 28**). Ce résultat est bien visible lorsque l'on compare les images en fluorescence du **DBCO-TAMRA** avec ou sans prétraitement au **CTX-d<sub>9</sub>**. La superposition des images de fluorescence du **DBCO-TAMRA** et du CellBrite 640 (marqueur membranaire), montre que l'internalisation **CTX-d<sub>9</sub>** semble être négligeable puisque la fluorescence est essentiellement détectée à la membrane cellulaire.



**Figure 28.** Image en immunofluorescence (plein champ) avec l'immunoconjugué **CTX-d<sub>9</sub>** et le DBCO-TAMRA sur cellules A431. (NT : non traité avec anticorps, DAPI : marqueur de noyaux, CellBrite : marqueur membranaire)

Pour valider le concept, un test de quantification des EM sur coupe tissulaire pathologique (tumeur A431 surexprimant EGFR), avec cette fois-ci le cocktail d'immunoconjugués a permis de déterminer l'abondance relative de chaque récepteurs au sein de la tumeur.

En pratique, la tumeur est découpée puis déposée sur une lame de microscopie, ensuite le cocktail d'anticorps est déposé sur la coupe puis, après incubation la coupe est lavée au PBS puis une solution de DBCO pour induire la réaction SPICC est déposée. Le surnageant est collecté puis analysé par spectrométrie de masse pour déterminer l'abondance de chaque EM. Les résultats sont condensés dans le tableau suivant (**Tableau 10**).

Le test semble être concluant puisque 85% de l'étiquette de masse détectée après réaction SPICC se trouve être **EM-d<sub>9</sub>** associé au cétuximab, qui détecte sélectivement la protéine EGFR. Pour corréler ces résultats, des expériences de Western Blot sont en cours pour détecter la présence des 4 protéines au seins de la tumeur. A noter que la quantité de chaque EM est divisée par le TAR de l'immunoconjugué utilisé pour normaliser les résultats. Ce résultat revient à la concentration d'anticorps et donc de récepteurs membranaires du milieu.

**Tableau 10.** Quantification des EM sur coupe tissulaire A431 (EGFR positif).

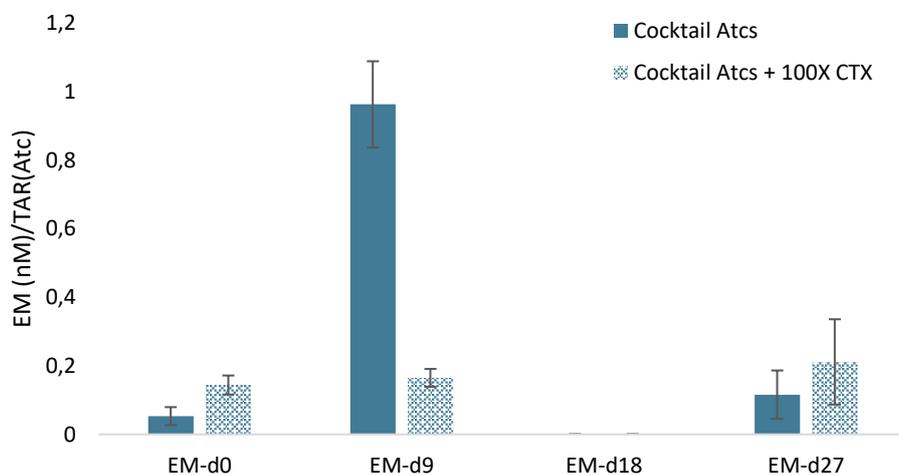
Entrée	EM	Récepteur correspondant	Conc. détecté <sup>(a)</sup>	Abondance relative
1	<b>EM-d<sub>0</sub></b>	HER2	71,0 pM	4,8 %
2	<b>EM-d<sub>9</sub></b>	EGFR	1265,9 pM	85,2 %
3	<b>EM-d<sub>18</sub></b>	PD-L1	< 66,3 pM <sup>(b)</sup>	n.d
4	<b>EM-d<sub>27</sub></b>	VEGF	148,7 pM	10,0 %

<sup>(a)</sup> Concentration de récepteur détecté divisé par le TAR de l'immunoconjugué.

<sup>(b)</sup> En dessous de la limite de quantification

n.d : non déterminé

Une expérience avec le cocktail et un excès de CTX non dérivatisé met en évidence un déplacement total du signal de **EM-d<sub>9</sub>** ce qui montre que le signal observé est bien celui de l'immunoconjugué **CTX-d<sub>9</sub>** fixé à ces récepteurs extracellulaires (**Figure 29**).



**Figure 29.** Quantité des chaque EM détectées lors de l'expérience sur coupe tissulaire. La quantité de chaque EM est divisée par le TAR de l'immunoconjugué utilisé pour normaliser les résultats.

Ces deux expériences mettent en évidence la faisabilité du projet, puisqu'il est possible de détecter et de quantifier 4 récepteurs différents sur coupe tissulaire. Pour aller plus loin, il serait intéressant de voir si notre technologie est applicable *in vivo*. La prochaine partie sera consacrée aux résultats préliminaires nécessaires à l'élaboration d'un protocole d'analyse des récepteurs tumoraux *in vivo*.

### III.8 Evaluation de la technologie *in vivo*

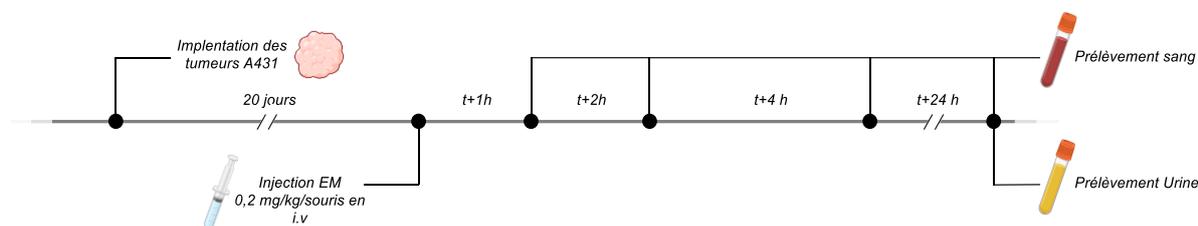
#### III.8.i Pharmacocinétique

Les expériences *in vivo* présentées dans ce paragraphe ont été réalisées exclusivement avec des souris « nude » athymiques femelles, possédant une tumeur xéno greffée, par nos collaborateurs du SHFJ et du SIMoS (Dr. Charles Truillet ; Dr. Mathilde Keck).

Pour évaluer l'efficacité de la technologie *in vivo*, il est essentiel de connaître la pharmacocinétique des EM au sein de l'organisme. Cette information nous permettra de déterminer quels liquides biologiques prélever (sang, urine) et surtout combien de temps attendre après la réaction de SPICC pour détecter au mieux les EM.

L'étude *in vivo* a donc commencé par l'évaluation de la pharmacocinétique des 4 EM (**EM-d<sub>0</sub>**, **EM-d<sub>9</sub>**, **EM-d<sub>18</sub>**, **EM-d<sub>27</sub>**) sur des souris pathologiques portant une tumeur (dans notre cas des cellules A431). Pour cela 12 souris ont été implantées avec 5 millions de cellules A451 sur les deux flans de sorte à avoir deux zones tumorales. 9 souris ont été allouées aux études de biodistribution et 3 autres ont servi de témoin négatif. 20 jours après l'implantation des tumeurs, un cocktail des 4 EM (200 µg/kg/EM soit 800 µg/kg pour les 4 EM) a été injecté. Ceci représente 40 µg/EM soit 160 µg de produits injectés pour une souris de 20 g.

Le sang des souris a ensuite été prélevé 1 heure, 2 heures, 4 heures et 24 heures après injection. Les urines ont quant à elles été prélevées à 24 heures post-injection (**Figure 30**).



**Figure 30.** Chronologie de l'expérience de pharmacocinétique

Tous les résultats obtenus lors de cette étude sont condensés dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11.** Quantification des EM dans le sang et les urines. Les résultats sont exprimés en abondance relative à la quantité d'étiquettes de masse injectées.

Entrée	EM	Quantité dans le Sang				Quantité dans les Urine
		t+1 h	t+2 h	t+4 h	t+24 h	t+24 h
1	<b>EM-d<sub>0</sub></b>	4,31 ng/mL	1,35 ng/mL	1,70 ng/mL	-( <sup>b</sup> )	45,5 ng/mL
2	<b>EM-d<sub>9</sub></b>	3,34 ng/mL	1,01 ng/mL	1,28 ng/mL	-( <sup>b</sup> )	37,2 ng/mL
3	<b>EM-d<sub>18</sub></b>	4,12 ng/mL	1,26 ng/mL	1,52 ng/mL	-( <sup>b</sup> )	43,0 ng/mL
4	<b>EM-d<sub>27</sub></b>	3,76 ng/mL	1,11 ng/mL	1,36 ng/mL	-( <sup>b</sup> )	38,5 ng/mL
5	-( <sup>a</sup> )	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

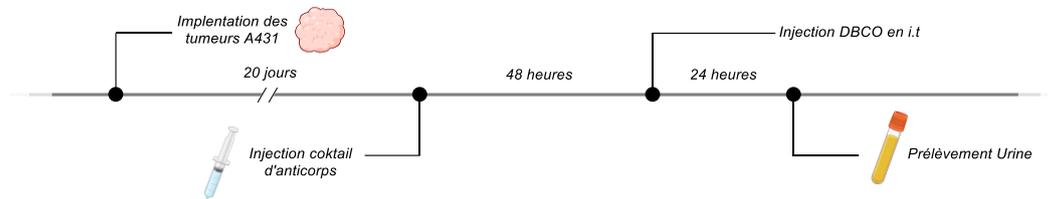
(<sup>a</sup>) témoins négatif (souris non traitée avec le cocktail d'EM)

(<sup>b</sup>) En dessous de la limite de quantification

n.d : non détecté

Les résultats montrent que les étiquettes de masses ne circulent que très peu de temps dans le sang (avec un temps de demi-vie d'environ 10 min). Une heure après l'injection seulement environ 1 ng/mL est détectée. Au bout de 24 heures la quantité d'étiquettes est en dessous du minimum requis pour

pouvoir les quantifier. Une quantification des EM dans les urines montre quant à elle une quantité importante (environ 41 ng/mL) au bout de 24 heures, cette valeur est 745 fois supérieur à la limite de quantification des EM. La quantification des EM pour l'expérience *in vivo* que nous envisageons pourrait alors se faire dans les urines 24 heures après l'injection du DBCO car une quantité suffisante d'EM devraient être retrouvée pour permettre une quantification fiable. La chronologie de l'expérience *in vivo* pourrait alors se dérouler de la façon suivante (**Figure 31**).



**Figure 31.** Chronologie de l'expérience *in vivo* de détection multiplexée

20 jours après implantation des tumeurs le cocktail d'immunoconjugués pourrait être injecté par voie intraveineuse, puis après 48 heures, le DBCO pourrait être à son tour injecté pour induire la réaction de ligation coupure SPICC. Pour limiter la réaction entre le DBCO et les anticorps circulant dans le sang, le DBCO pourrait être injecté en intratumorale. En plus de limiter les réactions parasites, une injection intratumorale aurait pour effet d'accélérer la vitesse de réaction SPICC puisque le DBCO serait en large excès. L'expérience de détection multiplexée sur souris athymiques xénogreffées est en cours au laboratoire.

## IV Conclusions et perspectives

Le but de ce projet était de concevoir une méthode de détection multiplexée de récepteurs tumoraux en alliant la chimie bioorthogonale, l'immunohistochimie et la spectrométrie de masse.

Une synthèse robuste en 14 étapes a été développée pour les 4 différents immunoconjugués nécessaires à ce projet. Ces immunoconjugués ont été caractérisés et utilisés pour la détection de 4 différents récepteurs sur cellules vivantes et sur coupes tissulaires pathologiques.

Des expériences *in vivo* sont en cours pour évaluer la viabilité de la méthode dans un contexte préclinique. Une approche sensiblement différente pourrait être utilisée dans le futur pour améliorer la détection sur coupe tissulaire. En s'inspirant des travaux de Weissleider et de son groupe, nous pourrions imaginer réitérer l'analyse de façon à détecter successivement 4 récepteurs différents à chaque cycle avec un lot de quatre autres anticorps. Les cycles pourraient alors être répétés autant de fois que nécessaire pour détecter la présence de 4 récepteurs par cycle (**Figure 32**).

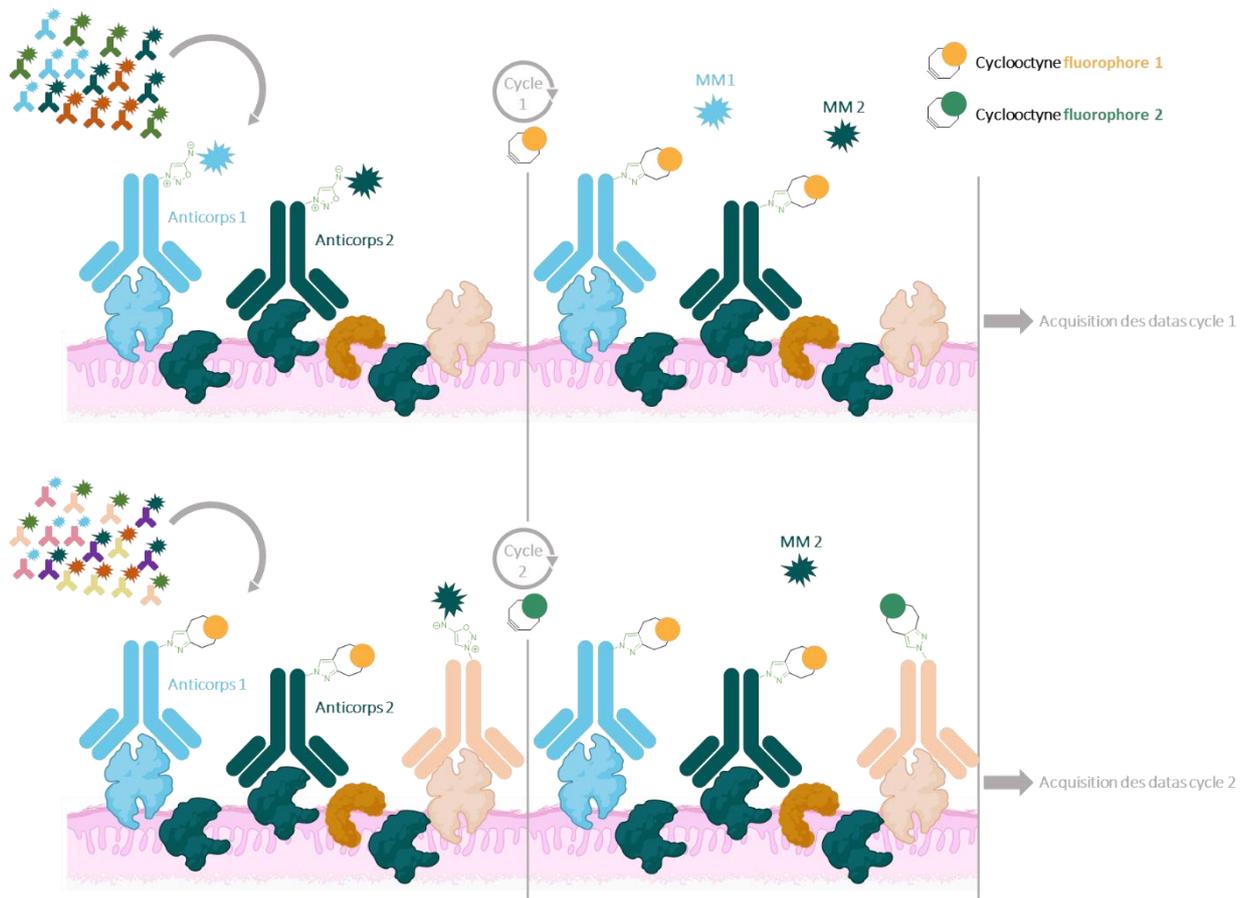


Figure 32. Détection multiplexée par cycles successifs

# Chapitre 2 : Développement d'une approche de préciblage au $^{18}\text{F}$ assistée par reconnaissance moléculaire pour la détection de tumeurs solides

---

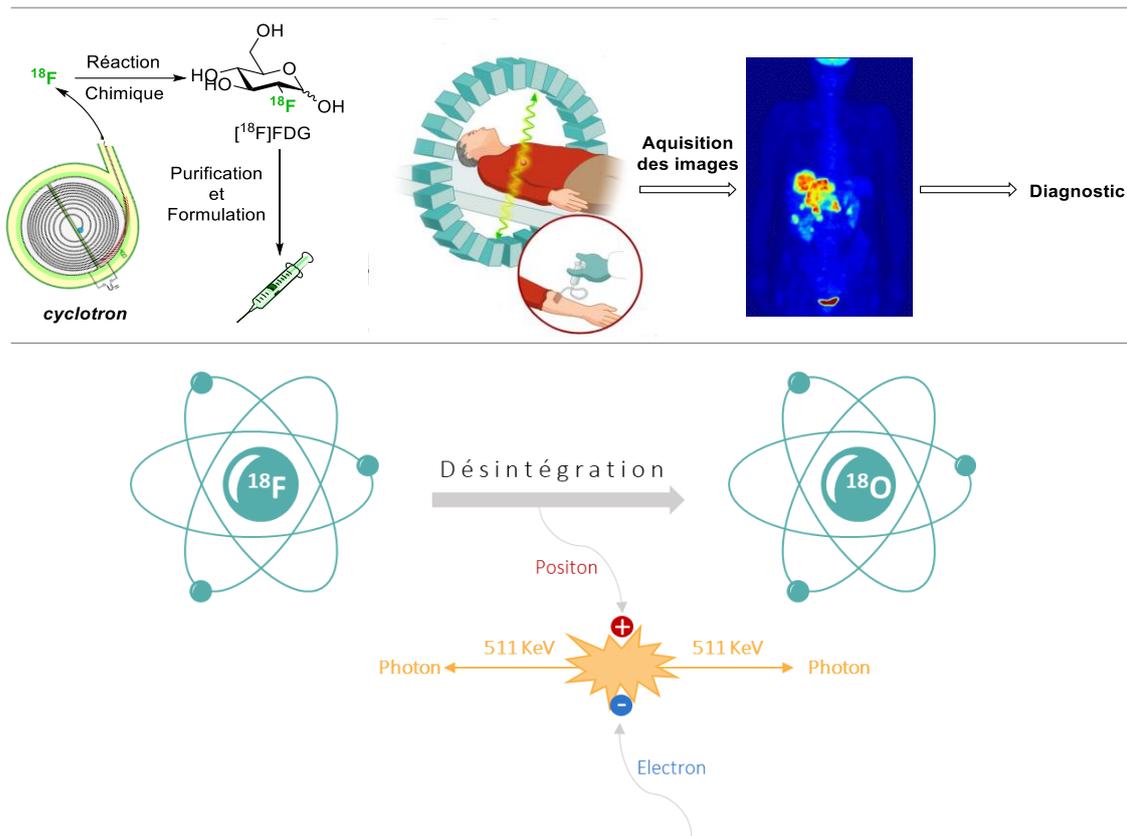
## I Introduction

Bien que les marqueurs tumoraux fournissent de précieuses informations sur la biologie d'une tumeur, ceux-ci ne sont pas toujours faciles à interpréter en raison de nombreux facteurs, le principal étant le manque de spécificité. Certains marqueurs peuvent notamment être élevés chez certains patients ayant d'autres types de maladies, en effet, de nombreux marqueurs ne sont que très peu spécifiques d'un cancer donné. Par exemple le marqueur CA 19.9 peut être associé à des cancers du pancréas, des voies biliaires, de la vessie, de l'estomac ou même du colon. Le taux d'un marqueur donné peut également être très différent d'un patient à un autre pour un même cancer. Par conséquent, les marqueurs tumoraux ne permettent pas à eux seuls un diagnostic fiable et doivent être impérativement associés à d'autres méthodes d'analyses et notamment à de l'imagerie médicale. De nombreux types d'imageries médicales existent (IRM, Radiographie scintigraphie...) et permettent d'obtenir de précieuses informations, elles restent essentielles pour aider le praticien à poser le bon diagnostic. Les méthodes les plus efficaces pour diagnostiquer un cancer restent la scintigraphie, et son développement va de pair avec l'efficacité du radiotracer. La chimie joue alors un rôle central.

La prochaine partie sera dédiée à une présentation de la scintigraphie sans entrer dans les détails physiques. Ensuite une sous partie sera consacrée aux techniques de préciblage dont le développement est en pleine essore.

### 1.1 La tomographie par émission de positons (TEP)

Parmi les techniques les plus utilisées pour imager des lésions cancéreuses, on retrouve la tomographie par émission de positons (TEP) ou encore la tomographie par émission monophotonique (TEMP). La TEP ainsi que la TEMP, sont des techniques d'imagerie fonctionnelle non-invasives qui permettent de visualiser *in vivo* le devenir d'une molécule injectée possédant soit un radio-isotope émetteur de positons pour la TEP, soit un émetteur de photon pour la TEMP. La TEP repose sur l'utilisation de radionucléides émetteurs de positons à vie courte comme le carbone-11 ( $\beta^+$ ,  $t_{1/2} = 20$  min,  $E_{\text{vmax}} = 1656$  KeV) ou encore le fluor-18 ( $\beta^+$ ,  $t_{1/2} = 110$  min,  $E_{\text{vmax}} = 960$  KeV). Cette technique fournit des informations sur les paramètres physiologiques du patient (débit et volume sanguin, pH intracellulaire ou même la consommation tissulaire en oxygène et en glucose). L'analyse clinique se déroule généralement en trois grandes étapes, la première consiste à générer artificiellement le radioélément (souvent à l'aide d'un cyclotron). Ensuite une ou plusieurs réactions chimiques permettent de synthétiser le radioligand à partir du radioélément. Après purification et formulation, l'administration du composé radiomarqué au patient se fait par voie intraveineuse. L'enregistrement et l'analyse des données permet l'obtention d'une image en trois dimensions de l'organe étudié (**Figure 33**).



**Figure 33.** Principe général de l'examen clinique par imagerie TEP

Le 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-désoxy-D-glucose ou  $^{18}\text{F}$ FDG est très largement utilisé en oncologie pour suivre la demande en glucose des tumeurs ou des lésions métastatiques. Comme les cellules cancéreuses ont besoin de plus d'énergie que les cellules saines, le  $^{18}\text{F}$ FDG s'accumule sans pouvoir être métabolisé, du fait de sa différence structurale en position 2 comparé au glucose naturel. Cette accumulation de  $^{18}\text{F}$ FDG entraîne une accumulation de radioactivité dans les zones tumorales qu'il est possible d'enregistrer *via* l'utilisation de caméras TEP. Le principal inconvénient de la TEP est l'exposition des patients au radionucléide pouvant entraîner des lésions de l'ADN, mais des techniques ont été développées pour limiter au maximum le temps de résidence du l'élément radiomarqué dans l'organisme.

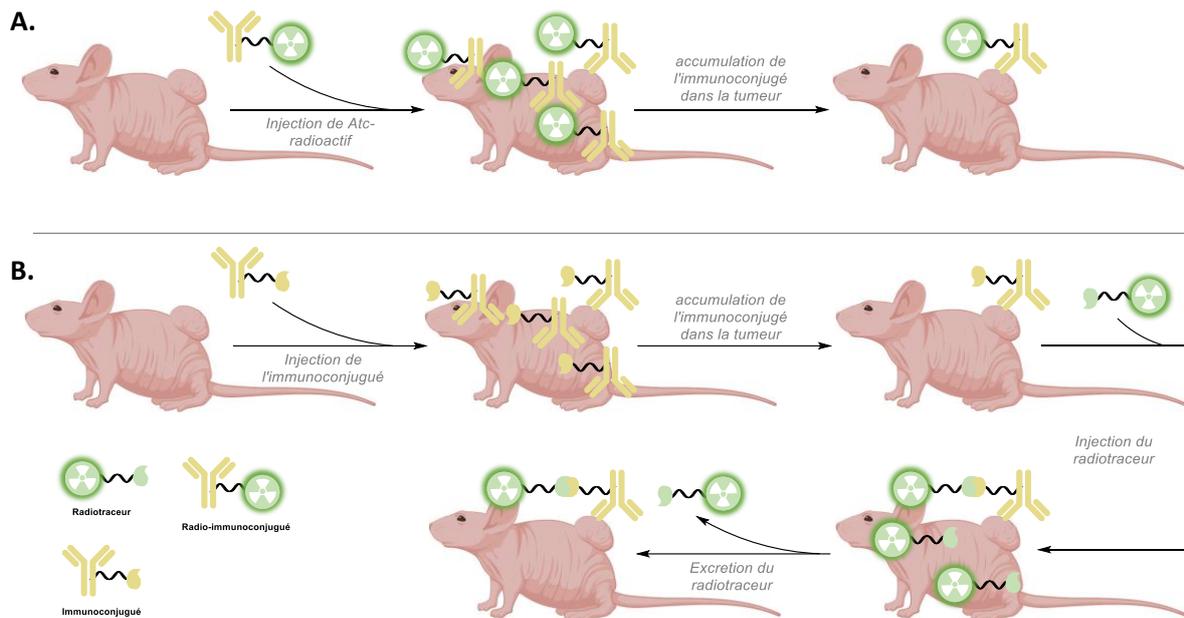
## 1.2 Préciblage par réaction bioorthogonale

Le préciblage est une technique relativement récente élaborée pour limiter le plus possible l'exposition des patients aux agents radiomarqués et pour limiter le bruit de fond dû au ciblage non spécifique dans le cas de l'imagerie TEP à l'aide d'agent de ciblage. Cette approche implique deux grandes étapes, la première consiste à injecter au patient un agent de ciblage (typiquement un anticorps) capable de se lier de façon spécifique à la tumeur, la seconde étape consiste quant à elle à injecter un agent de contraste capable de réagir spécifiquement avec l'agent de ciblage pour imager ou tuer les cellules ciblées (**Figure 34. B**).

Les premiers travaux reportant l'utilisation de préciblage ont été publiés en 1987 par l'équipe de Rusckowski.<sup>100</sup> Dans cet article, les auteurs décrivent l'utilisation de l'interaction hautement spécifique qui existe entre la biotine et la streptavidine. Cette interaction est l'une des plus fortes connues dans

<sup>100</sup> D. J. Hnatowich, F. Virzi, and M. Rusckowski, *J. of Nucl. Med.*, 28/8 (1987), 1294–1302.

la nature avec une constante de dissociation des deux partenaires comprises entre  $10^{-13}$  et  $10^{-15}$  mol/L. Les auteurs ont synthétisé des billes d'agar polyfonctionnalisées par des résidus biotine qui une fois injectées *in vivo* ont été marquées à l'aide de streptavidine radioactive. Ensuite un simple comptage de la radioactivité a permis d'évaluer la répartition de celle-ci dans les souris ayant reçu ou non un prétraitement aux billes d'agar et de déterminer si la réaction d'association des deux partenaires avait bien eu lieu *in vivo*. Toutefois, l'immunogénicité de la streptavidine ainsi que la toxicité induite par le risque de liaison avec la biotine endogène explique pourquoi les essais cliniques n'ont pas atteint la phase III même si d'autres équipes ont tenté d'améliorer l'approche. Par la suite, les chercheurs se sont tournés vers des méthodes plus biocompatibles et ces avancées vont de pair avec celles réalisées en chimie bioorthogonale.



**Figure 34.** A. Approche courante vs B. approche de préciblage pour la radioimmunothérapie

Les anticorps (Atc) sont des protéines naturelles, produites par le système immunitaire et utilisées par le corps pour déclencher une attaque ciblée contre un agent pathogène donné. Les chercheurs se sont rapidement rendu compte que, bien choisis, ils pouvaient être des armes redoutables pour traquer et détruire des cellules tumorales. Associer les anticorps à des stratégies de préciblage pour imager ou traiter les cellules tumorales s'est donc révélé être une approche élégante et très efficace pour être à la fois spécifique tout en minimisant la toxicité des agents thérapeutiques ou de contrastes. Le marquage direct d'anticorps au  $^{18}\text{F}$  n'est pas possible puisque les conditions de marquage requièrent des températures supérieures à  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Il est donc nécessaire d'utiliser une molécule prosthétique capable de porter le fluor 18 dans sa structure tout en étant facilement accrochable sur l'anticorps.

Une première étape vise à administrer l'anticorps monoclonal modifié pour cibler la tumeur. Ensuite, après une période d'incubation permettant à l'anticorps de se bioaccumuler sur le site tumoral, une petite molécule radiomarquée capable de réagir spécifiquement avec l'anticorps est injectée. Comparée à l'injection d'un anticorps directement radiomarqué cette technique limite l'exposition du patient au radionucléide puisque le radiomarqueur possède un temps de vie dans l'organisme beaucoup plus court que les anticorps. En choisissant bien le radio-isotope il est aussi possible de limiter l'exposition à la radioactivité en utilisant des noyaux radioactifs à faible temps de demi-vie. Le fluor-18 est alors un très bon candidat.

Pour lier de façon covalente le radioligand à l'entité tumeur-anticorps, les stratégies plébiscitées par les chercheurs s'appuient toutes sur des réactions de ligations biocompatibles. Historiquement c'est

la ligation de Staudinger qui pour la première fois a été utilisée dans le cadre d'une approche de préciblage avec des Atc par l'équipe de Dongen.<sup>101</sup> Malheureusement la cinétique réactionnelle assez lente et la faible stabilité de la phosphine ont limité l'utilisation de cette approche conduisant à des résultats peu concluants.

Les réactions bioorthogonales sont ensuite devenues de plus en plus performantes et les plus prometteuses ont été incluses dans des approches de préciblage pour évaluer leur efficacité.

### 1.2.i Préciblage par réaction SPAAC

Pour pallier les inconvénients de la ligation de Staudinger, les chercheurs se sont d'abord tournés vers la réaction SPAAC. À notre connaissance, il n'existe aujourd'hui que trois publications utilisant cette réaction dans une approche de préciblage soit pour l'imagerie soit pour la thérapie. La première étude, publiée en 2013 relate l'utilisation du rituximab (dirigé contre les récepteurs CD20) fonctionnalisé par des fonctions azotures comme agent de ciblage et de cyclooctynes radiomarqués avec du lutétium-177.<sup>102</sup> Malheureusement les auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence l'utilité de la SPAAC pour précibler des cellules tumorales.

Toujours dans une optique de préciblage assisté par réaction bioorthogonale, l'équipe de Kim a élaboré une stratégie légèrement différente basée sur l'utilisation de nanoparticules de silice mésoporeuse capables de s'accumuler dans les tumeurs par effet EPR.<sup>103</sup> En utilisant des nanoparticules décorées par des motifs DBCO, Kim et son équipe ont montré qu'il était possible d'imager une tumeur par imagerie TEP en utilisant la réaction de SPAAC *in vivo*. Un dérivé azoture <sup>18</sup>F a été injecté par voie intraveineuse, 24h après l'injection des nanoparticules DBCO. L'imagerie TEP indique une accumulation de la radioactivité au niveau de la tumeur.

Plus récemment, en 2018, Au et al.<sup>104</sup> ont finalement démontré l'efficacité de la SPAAC pour la radioimmunothérapie sur des souris porteuses de lymphomes non hodgkiniens. Ils ont démontré une amélioration de la survie médiane avec 67% du groupe de souris tests qui ne possédaient plus de tumeur après 30 jours et le reste du groupe où les tumeurs étaient à peine détectables.

### 1.2.ii Préciblage par réaction TCO/Tz

Enfin, la réaction de loin la plus utilisée est la réaction IEDDA entre le *trans*-cyclooctène et un dérivé tétrazine (TCO/Tz). En 2010, Robillard et son équipe ont brillamment démontré qu'il était possible de cibler des cellules tumorales LS174T *in vivo* en injectant un Atc non-internalisant CC49-PEG<sub>12</sub>-TCO dirigé contre l'antigène TAG-72 et qu'il était possible de localiser la tumeur par imagerie TEMP en injectant un dérivé tétrazine marqué par le l'indium-111.<sup>105</sup>

À la suite de cette découverte, de nombreuses autres équipes ont essayé d'améliorer le concept en modulant l'anticorps, le radioélément et les techniques d'imagerie.<sup>2</sup> Dans cette partie nous avons

---

<sup>101</sup> D. J. Vugts, A. Vervoort, M. Stigter-van Walsum, G. W. M. Visser, M. S. Robillard, R. M. Versteegen, R. C. M. Volders, J. (Koo) D. M. Herscheid, and G. A. M. S. van Dongen, *Bioconjug. Chem.*, 22/10 (2011), 2072–81.

<sup>102</sup> S. M. van den Bosch, R. Rossin, P. Renart Verkerk, W. Ten Hoeve, H. M. Janssen, J. Lub, and M. S. Robillard, *Nucl. Med. Bio.*, 40/3 (2013), 415–23.

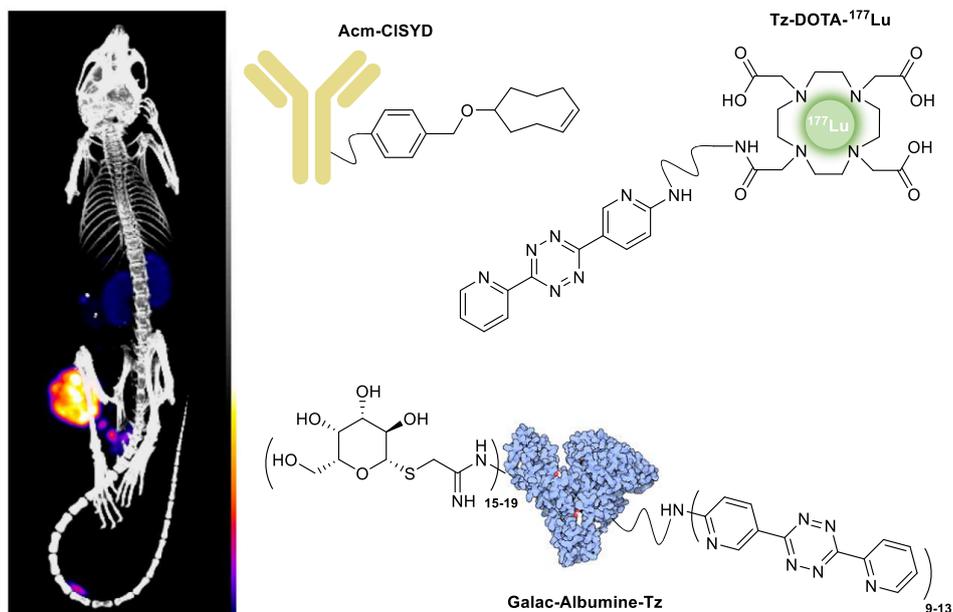
<sup>103</sup> S. B. Lee, H. L. Kim, H.-J. Jeong, S. T. Lim, M.-H. Sohn, and D. W. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52/40 (2013), 10549–52.

<sup>104</sup> K. M. Au, A. Tripathy, C. P.-I. Lin, K. Wagner, S. Hong, A. Z. Wang, and S. I. Park, *ACS Nano*, 12/2 (2018), 1544–63.

<sup>105</sup> R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Volders, I. Verel, J. Lub, and M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49/19 (2010), 3375–78.

choisi de présenter de façon non exhaustive les travaux effectués avec le couple réactionnel TCO/Tz depuis la première étude de Robillard.

En 2013 la même équipe publie un article décrivant l'utilisation d'agents de masquage (ou agent de clairance : AC) capable de réagir spécifiquement avec les anticorps circulant dans le flux sanguin pour les empêcher de réagir avec le radioligand <sup>106</sup> (**Figure 35**). L'équipe a élaboré un bioconjugué albumine-Tétrazine capable de circuler spécifiquement dans le flux sanguin pour masquer les fonctions réactives présent dans le sang.



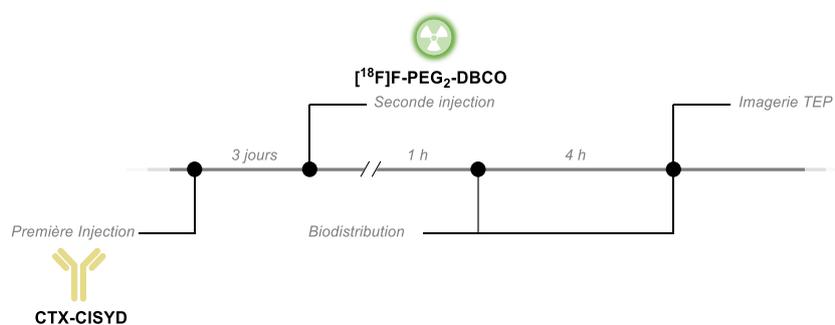
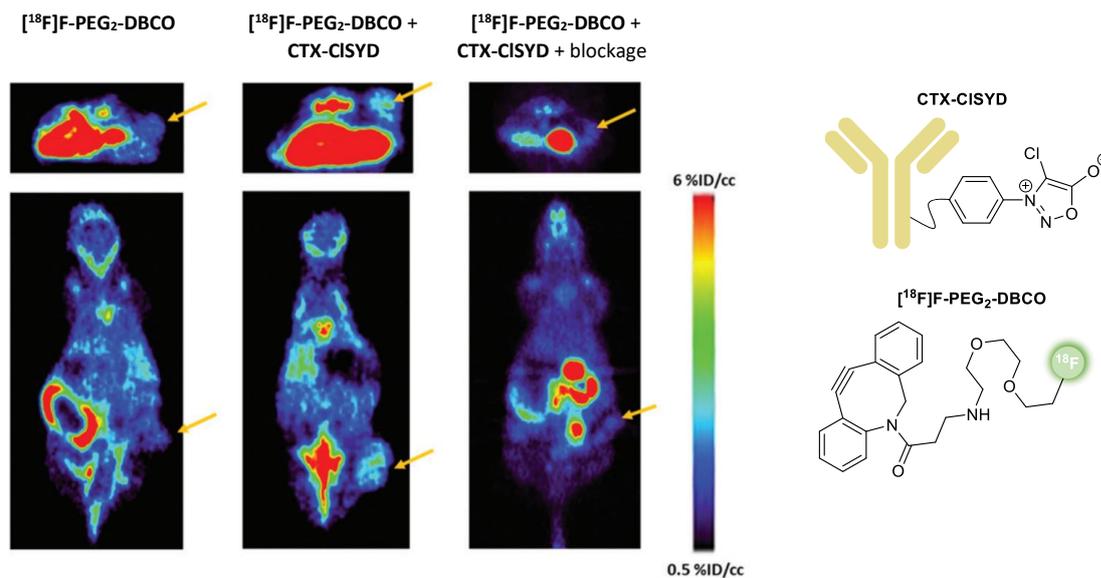
**Figure 35.** Approche de préciblage par IEDDA avec agent de clearance

L'utilisation d'un agent de clearance a permis d'améliorer le rapport tumeur/sang d'un facteur 125 trois heures après son injection. La dosimétrie de la souris a suggéré que cette approche permettrait d'injecter 8 fois plus de radioactivité que ce qui est possible avec une radiothérapie non ciblée.

### 1.2.iii Préciblage par réaction SPSAC

Outre les réactions décrites ci-dessus, notre équipe a récemment élaboré une méthode de préciblage impliquant une réaction SPSAC pour de l'imagerie TEP *in vivo* (**Figure 36**).<sup>94</sup> Nous avons démontré qu'il était possible d'utiliser un immunoconjugué possédant un motif chlorosydnone (**CTX-CISYD**) et de le faire réagir avec un DBCO radiomarqué au fluor-18 *in vivo*. L'imagerie TEP de souris portant des tumeurs issues de cellules A431 injecté en sous-cutané a montré accumulation de la radioactivité dans la tumeur mais l'élimination hépatobiliaire du [<sup>18</sup>F]F-PEG<sub>2</sub>-DBCO s'est révélée assez faible, ce qui a conduit à de faibles contrastes en imagerie. Nous avons également démontré que cette réaction pouvait se produire avec une bonne cinétique dans le sang à 37 °C ( $k = 350$  L/mol/s).

<sup>106</sup> R. Rossin, T. Lappchen, S. M. van den Bosch, R. Laforest, and M. S. Robillard, *J. Nucl. Med.*, 54/11 (2013), 1989–95.



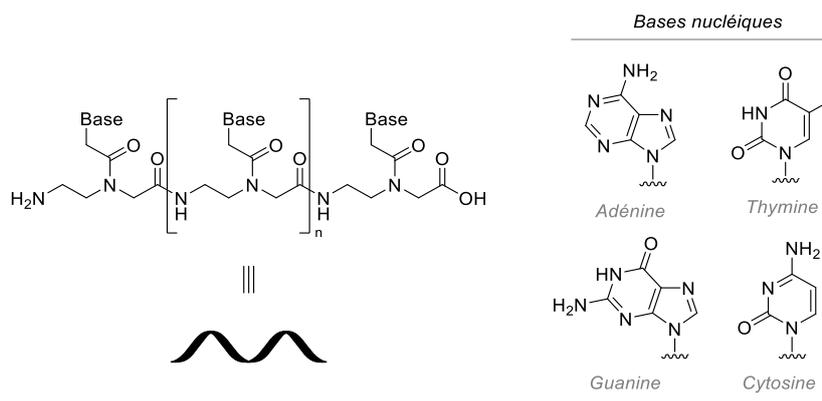
**Figure 36.** Approche de préciblage par SPSAC

Les réactions de ligation classiques suivent des cinétiques de deuxième ordre. Cela implique que l'efficacité du marquage radioactif dépend directement de la concentration de l'anticorps et du produit radioactif clickable dans la zone tumorale. Or, ces concentrations peuvent en réalité être extrêmement faibles puisqu'il est admis que seulement 10% au mieux des anticorps injectés atteignent la tumeur. De plus le radiotracer clickable est utilisé en quantité très faible. Pour contourner ce problème des chercheurs ont travaillé sur le développement de nouvelles techniques utilisant le principe de reconnaissance moléculaire, par exemple avec des PNAs, pour augmenter la concentration locale des réactifs.

#### 1.2.iv Utilisation des PNA pour des approches de préciblage

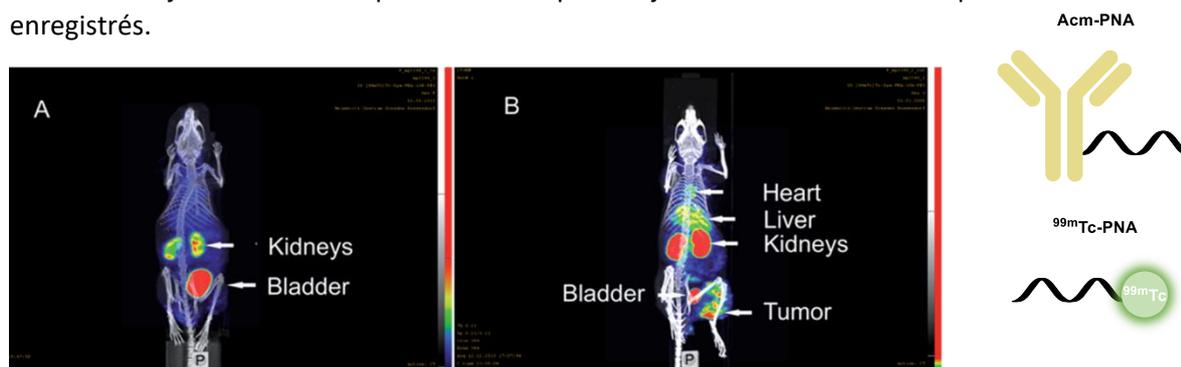
Les PNA, ou acides nucléiques peptidiques en français, sont composés d'enchaînements de bases nucléiques reliées par des liaisons peptidiques. Le squelette des PNAs possède le même nombre d'atomes ainsi que le même type de bases que l'ADN (**Figure 37**). Ces similarités structurales en font de parfaits analogues de l'ADN en plus d'être plus stables et plus facilement synthétisables. Les PNAs sont capables de s'apparier entre eux comme l'ADN pour former des duplex stables par des liaisons de Watson et Crick.<sup>107</sup>

<sup>107</sup> M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nat.* **1993**, 365, 566–568



**Figure 37.** Structure des PNAs

De nombreuses applications ont été développées pour tirer parti des particularités des PNAs et notamment pour des approches de préciblage. Parmi les études développées on peut notamment citer les travaux de Gasser et al. qui avec son équipe a développé une approche de préciblage avec un anticorps relié à un PNA [17 bases] et un PNA [17 bases] complémentaire radiomarqué au  $^{99m}\text{Tc}$  (**Figure 38**).<sup>108</sup> L'immunoconjugué Atc-PNA a été injecté par voie intraveineuse, puis un PNA radiomarqué au  $^{99m}\text{Tc}$  a été injecté 24 heures après. 1 heure après l'injection du PNA radiomarqué des clichés ont été enregistrés.

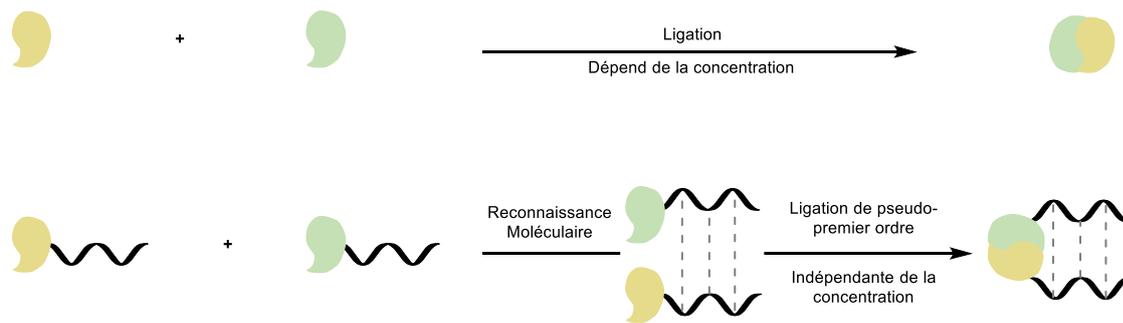


**Figure 38.** Préciblage assisté par PNA A. Sans Atc-PNA,  $^{99m}\text{Tc}$ -PNA injecté seul B. Avec Atc-PNA et  $^{99m}\text{Tc}$ -PNA

Les images montrent une accumulation de la radioactivité au sein de la tumeur, qu'il est possible de comparer au groupe témoin où l'Atc-PNA n'a pas été injecté. Cette image prouve que le préciblage à bien fonctionné.

Dans notre laboratoire nous avons montré dans le cadre de la thèse de Judith Baudet qu'il était possible d'utiliser les PNAs pour effectuer des réactions de ligation coupure entre des iminosydnones et des cyclooctynes. Cette modification entraîne notamment un changement de l'ordre de la réaction qui passe alors d'un ordre deux à un pseudo ordre un. Cela signifie que la vitesse de réaction ne dépend plus de la concentration des réactifs, contrairement à ce qui est habituellement observé dans les réactions bioorthogonales classiques (**Figure 39**). Cette propriété est très appréciable lorsque la concentration des réactifs est extrêmement faible.

<sup>108</sup> A. Leonidova, C. Foerster, K. Zarschler, M. Schubert, H.-J. Pietzsch, J. Steinbach, R. Bergmann, N. Metzler-Nolte, H. Stephan, and G. Gasser, *Chem. Sci.*, 6/10 (2015), 5601–16.



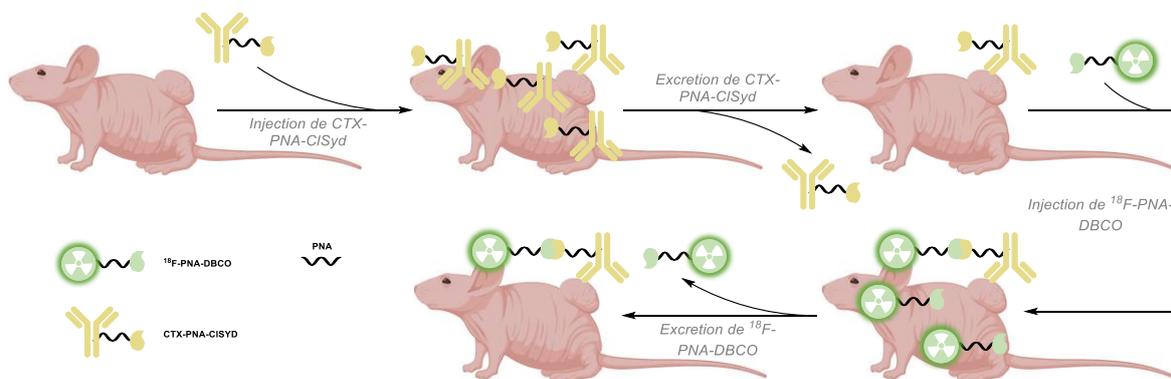
**Figure 39.** Travaux du laboratoire sur les PNAs pour la ligation

Le nombre de paires de bases ainsi que leur enchaînement ont été étudiés pour déterminer les conditions optimales jouant sur la cinétique de la cycloaddition. Il a été déterminé que les PNA à 6 paires de bases TTAGTG et son complémentaire AATCAC donnaient les meilleures cinétiques.

En s'inspirant de ces travaux nous avons voulu évaluer leur utilité dans une approche de préciblage.

### 1.3 Présentation du projet

Le projet vise à développer une approche de préciblage pour localiser une tumeur solide chez une souris par imagerie PET. L'originalité de ce projet repose sur la combinaison de l'utilisation d'une réaction bioorthogonale avec la reconnaissance moléculaire entre deux brins de PNAs. Dans cette approche les PNAs jouent un rôle important en permettant d'effectuer la réaction avec une très bonne vitesse réactionnelle même à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Le projet vise donc à évaluer la combinaison de la reconnaissance moléculaire par les PNAs avec une réaction bioorthogonale dans une approche de préciblage, en s'appuyant sur notre précédente étude avec les chlorosydones (**Figure 40**). De fait, il sera possible de comparer les deux études pour en tirer des conclusions sur l'utilité des PNAs.



**Figure 40.** Principe du projet de préciblage assisté par PNA

## II Résultats

### II.1 Synthèse de l'immunoconjugué CTX-PNA-CISYD

Une première réaction d'alkylation de l'acide 4-aminobenzoïque à l'aide d'acide chloroacétique permet d'obtenir le composé **II-1** avec un rendement acceptable de 64 %. Ensuite, une réaction de nitrosylation cyclodéshydratation permet d'obtenir la sydnone **II-2** avec un rendement de 44% (**Schéma 47**).

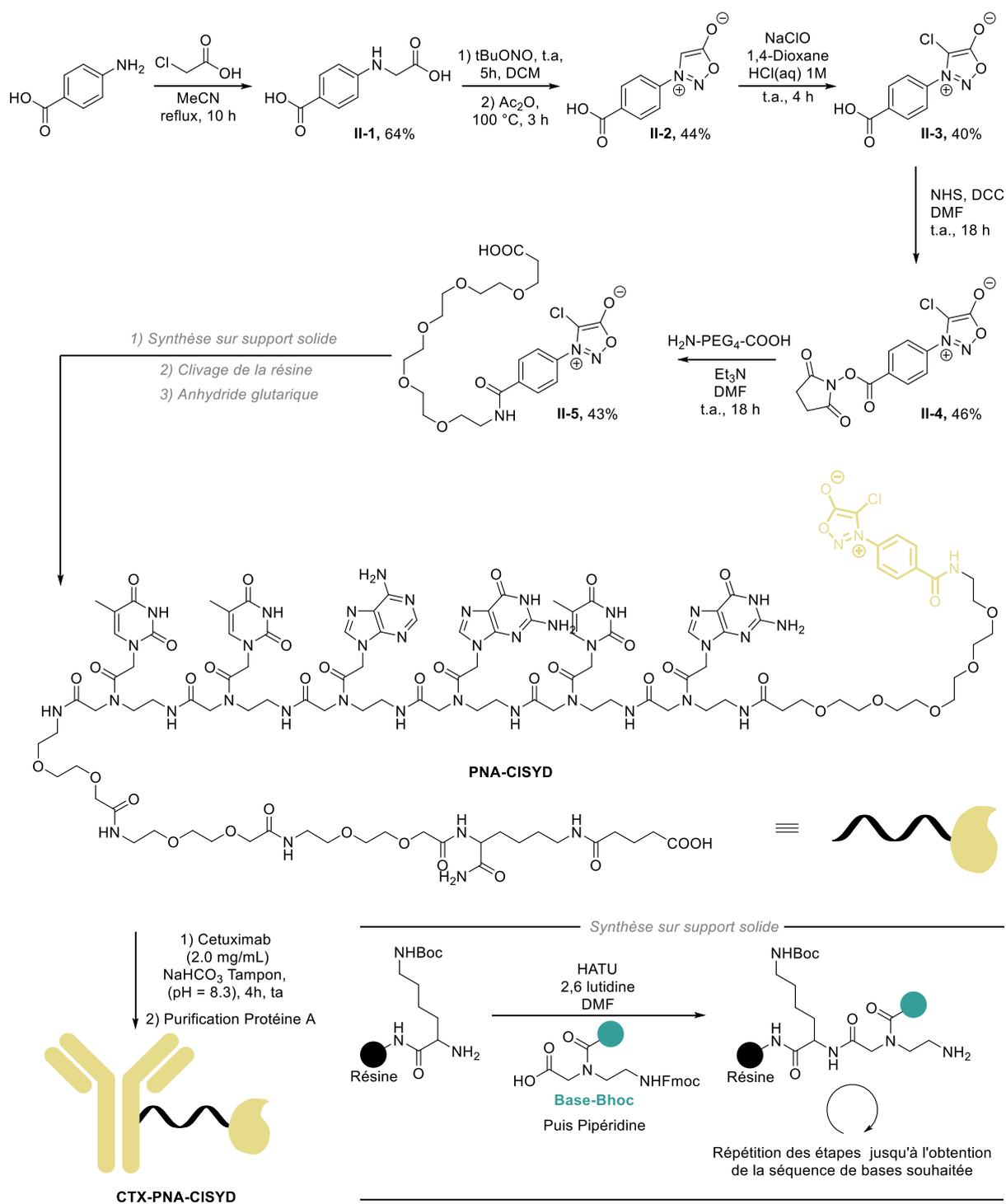
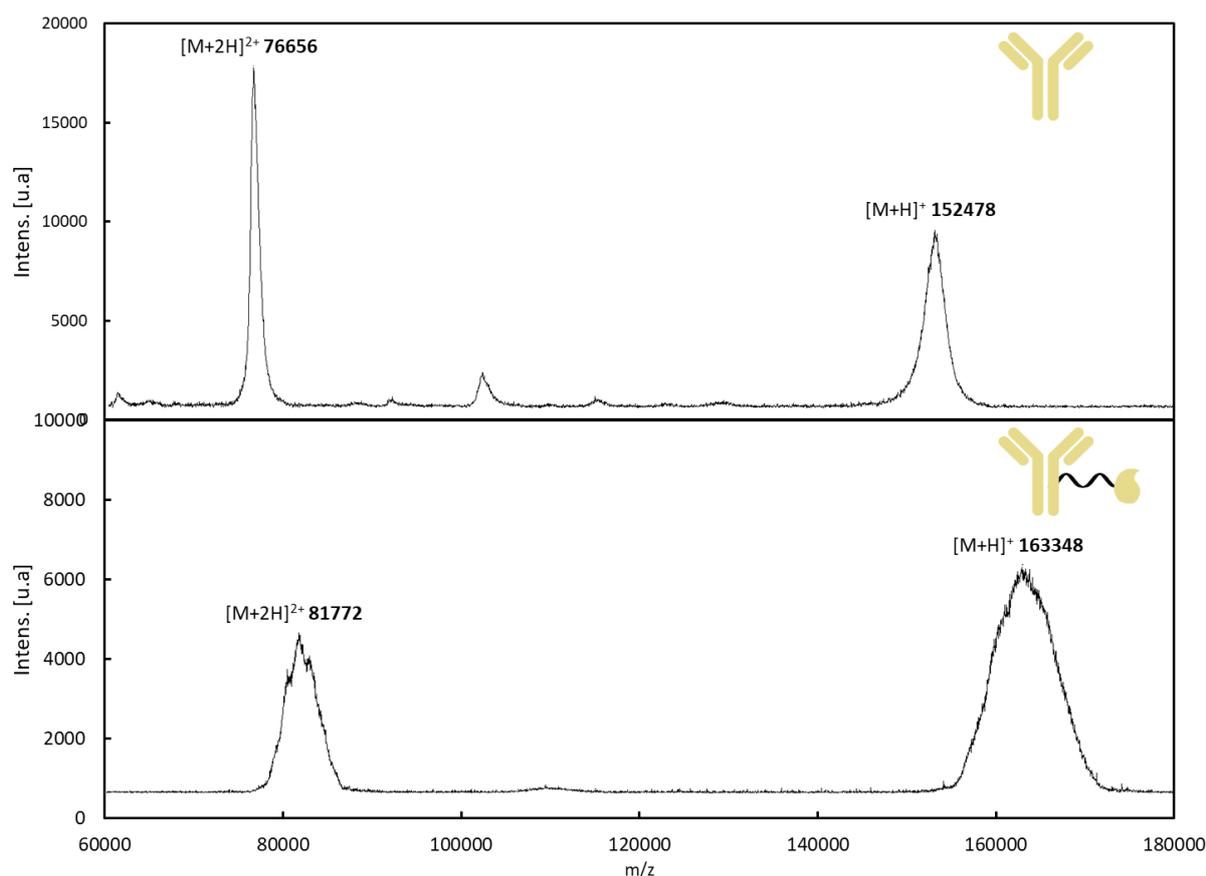


Schéma 47. Synthèse du PNA-CISYD.

La chloration en position C<sup>4</sup> de la sydnone **II-2** peut s'effectuer dans un mélange HCl hypochlorite de sodium avec un rendement de 40%. L'acide aromatique est ensuite activé à l'aide d'une mixture DCC NHS pour former l'ester de N-hydroxysuccinoyl correspondant **II-4** avec un rendement de 46% après purification. Cet ester est ensuite traité avec l'amine pegylée dans le DMF pour former le composé **II-5** avec un rendement de 43%. La suite de la synthèse se déroule sur support solide et a été effectuée par Judith Baudet dans le cadre de son doctorat. Le PNA encore sur support solide est fonctionnalisé par la chlorosydnone par couplage peptidique. Après clivage du PNA chlorosydnone de la résine en milieu acide et purification par HPLC semi préparative, le **PNA-CISYD** est traité avec 1,0 équivalent d'acide glutarique pour introduire une fonction acide. Cette fonction acide est ensuite activée sous forme d'ester de NHS par du TSTU dans le DMF. Cette solution d'ester activé **PNA-CISYD** est ensuite ajoutée à une solution de Cetuximab dans un tampon hydrogencarbonate (pH = 8,3) à température ambiante pendant 4 heures pour former l'immunoconjugué **CTX-PNA-CISYD** (**Schéma 47**). Dans un premier temps, l'immunoconjugué a été purifié par exclusion stérique sur colonne midiTrap®, mais il semblerait que le PNA en excès dans la réaction de couplage à l'anticorps s'accroche *via* des interactions non covalentes puisque même après deux purifications successives, du PNA libre est détecté dans la solution d'immunoconjugué par HPLC. Une purification sur protéine A avec une solution détergente permet de s'affranchir de ce problème et l'immunoconjugué est ainsi obtenu de façon pure. Une caractérisation par analyse MALDI permet de confirmer que l'anticorps a bien été fonctionnalisé, avec une incorporation moyenne de 4,0 PNA par anticorps (**Figure 41**).

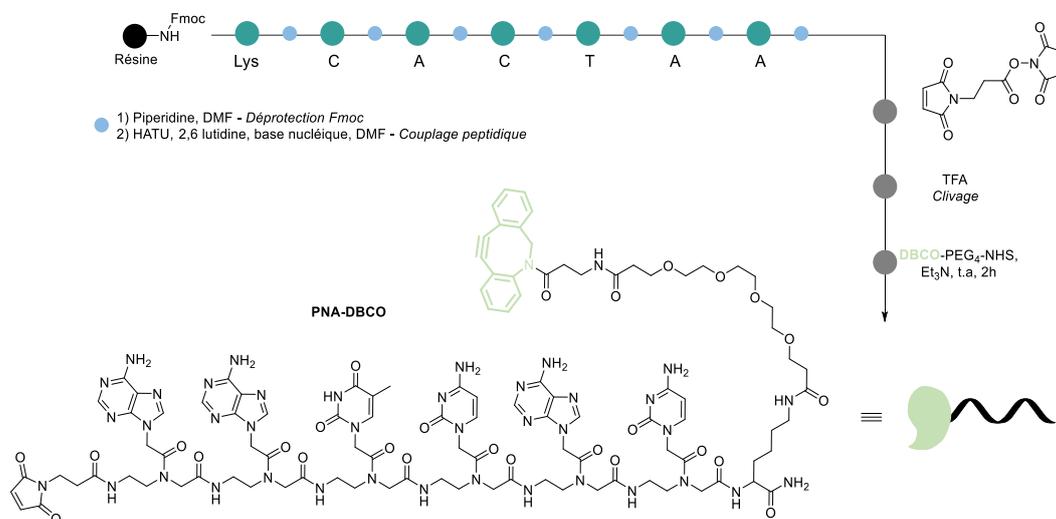


**Figure 41.** Analyse MALDI A. CTX, B. CTX-PNA-CISYD. Masse molaire PNA = 2865,29 g/mol

Une fois le premier partenaire réactionnel obtenu nous avons tourné notre attention sur la synthèse du PNA complémentaire comportant la fonction DBCO, puis nous avons développé une méthode de radio-marquage du **PNA-DBCO** au Fluor 18.

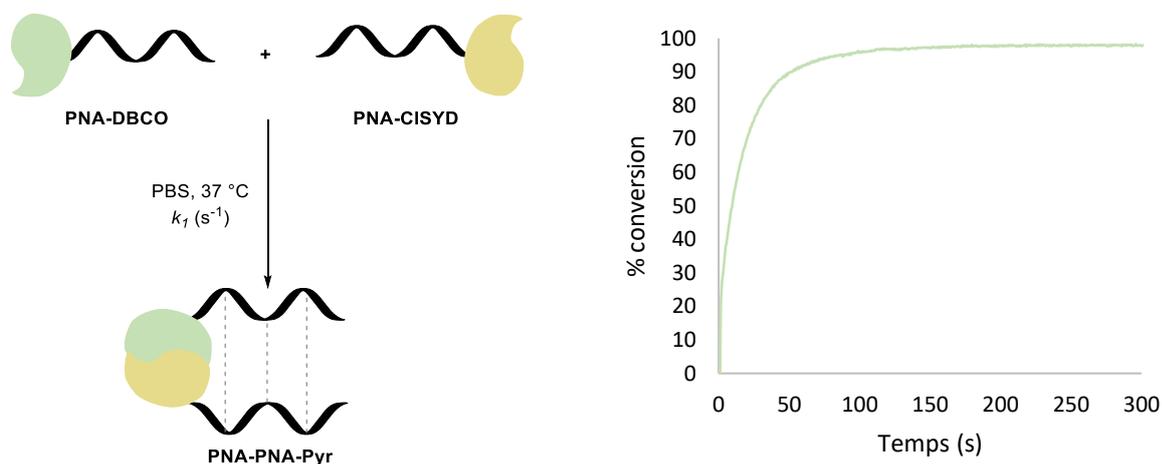
## II.2 Synthèse du PNA-DBCO et étude cinétique de la réaction de ligation

La synthèse du PNA-DBCO a été effectuée au laboratoire par Judith Baudet sur support solide (**Figure 42**).



**Figure 42.** Structure du PNA-DBCO

Une fois le composé obtenu des calculs de cinétique réactionnelle ont permis de déterminer une constante de vitesse apparente  $k_1 = 0,053 \text{ s}^{-1}$ . L'utilisation des PNAs pour des réactions de ligation tend à changer l'ordre de la réaction pour passer d'une réaction d'ordre deux à un pseudo ordre 1. La cinétique observée est très rapide puisque le temps de demi-réaction est de seulement 10 secondes (**Figure 43**).

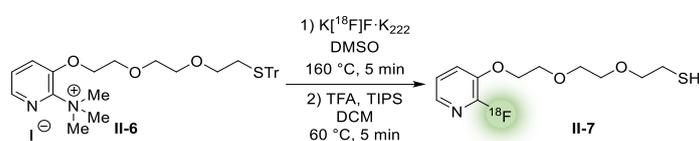


**Figure 43.** Cinétique de cycloaddition entre PNA-DBCO et PNA-CISYD, (C = 100  $\mu\text{M}$ , 37 °C, PBS).

La cinétique de cycloaddition entre une chlorosydnone et le DBCO est d'environ 300 L/mol/s ce qui représente un temps de demi-réaction de 3333 s pour une concentration de 1  $\mu\text{M}$ , or en utilisant des PNAs ce temps est divisé par 333 pour la même concentration. Cette évolution est encore plus spectaculaire lorsqu'on travaille à des concentrations encore plus faibles. Le temps de demi-réaction, est alors multiplié par 10 lorsque la concentration est divisée par 10, alors que pour un ordre 1 le temps de demi-réaction reste le même quelque soit la concentration de travail. Ce chiffre met en lumière tout l'intérêt des PNAs sur les cinétiques de cycloaddition.

### II.3 Marquage du PNA-CISYD

Ces travaux ont été réalisés par Dr. Simon Specklin du SHFJ. Pour marquer le PNA nous nous sommes inspirés des travaux de nos collaborateurs du Service Hospitalier Frédéric Joliot qui ont développé une méthode pour marquer des biomolécules avec un thiol pyridine radioactif.<sup>109</sup> Dans cet article, les auteurs proposent la synthèse de 2-<sup>18</sup>F]-fluoropyridine *via* une réaction de substitution nucléophile aromatique en partant d'un sel de 2-triméthylammonium pyridine. Après clivage de la fonction trityle, le thiol peut alors être utilisé pour marquer des molécules possédant un accepteur de Michael. Cette approche a permis aux auteurs de marquer des molécules comme le cyclo-RGDfC ou même des déhydroalanine. La synthèse radioactive se déroule en deux étapes, une première étape de  $S_NAr$  en présence du sel de triméthylammonium et de  $K[^{18}F]F\cdot K_{222}$  dans le DMSO à 160 °C pendant 5 min permet d'obtenir le thiol protégé radiomarqué. Ensuite une déprotection de la fonction thiol en présence de TFA et de TIPS dans le DCM à 60 °C permet d'obtenir **II-7** après une purification par HPLC-semi préparative radioactive (**Schéma 48**).

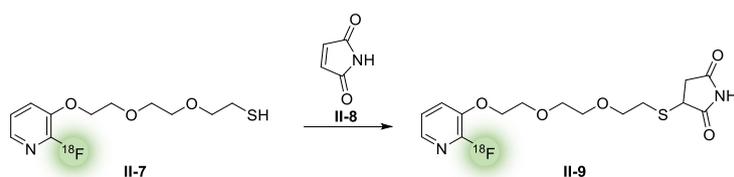


**Schéma 48.** Marquage de **II-6**

Le rendement radiochimique de cette synthèse est de 7% après 70 min, soit 50 mCi pour 600  $\mu$ L. L'activité spécifique obtenue lors de cette synthèse est suffisante pour effectuer le radio-marquage du **PNA-DBCO**.

Une optimisation de la réaction de Michael entre **II-7** et le maléimide **II-8** a été effectuée pour utiliser le moins possible de **PNA-DBCO** qui reste assez complexe à obtenir (**Tableau 12**).

**Tableau 12.** Optimisation de la réaction de Michael entre **II-7** et **II-8**



Entrée	Conc. en <b>II-8</b>	Solvant	TCEP	Temps	Temp.	Conversion
1	1 mM	DMSO	10 mM	20 min	40 °C	0%
2	10 mM	MeCN	10 mM	15 min	40 °C	0%
3	500 mM	MeCN	10 mM	15 min	40 °C	100%
4	10 mM	MeCN/PBS	10 mM	15 min	40 °C	11%
5	<b>10 mM</b>	<b>MeCN</b>	-	<b>10 min</b>	<b>40 °C</b>	<b>100%</b>

La réaction ne semble pas fonctionner dans le DMSO à 40 °C puisqu'aucune conversion n'a pu être observée (**Tableau 12**, Entré 1). Afin d'éviter la dimérisation du thiol sous forme de disulfure, l'ajout de TCEP à la réaction est nécessaire. En modifiant la concentration en maléimide et en remplaçant le DMSO par de l'acétonitrile la conversion est cette fois-ci totale (**Tableau 12**, Entré 3). Le produit

<sup>109</sup> M. Richard, F. Hinnen, and B. Kuhnast, *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 7/1 (2022), 7.

d'addition est observé par HPLC après décroissance radioactive. Une fois les conditions optimales déterminées des tests ont été effectués sur le **PNA-DBCO** (Schéma 49).

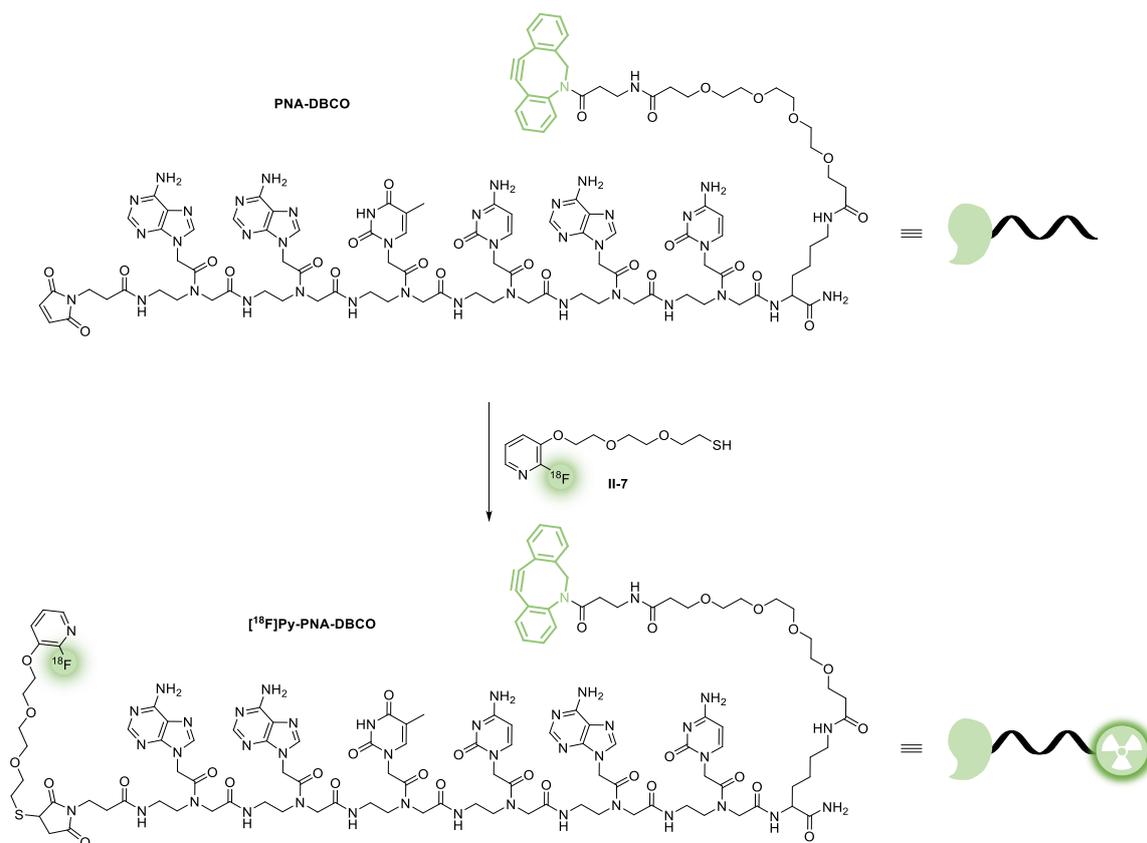


Schéma 49. Marquage du PNA-DBCO

Les conditions de l'entrée 5 du **Tableau 12** ont été utilisées pour marquer le PNA-DBCO. Le PNA-DBCO a été incubé pendant 45 min à 40 °C avec 2.2 équivalents de **II-7** dans l'acétonitrile. Ensuite **[<sup>18</sup>F]Py-PNA-DBCO** est purifié par exclusion stérique Minitrap G10 (cut-off 700 Da). La radioactivité a ensuite été corrigée par rapport à un temps de référence EOB (End Of Bombardment), qui normalise l'activité en fonction du temps écoulé depuis la fin de production de l'isotope radioactif. Ainsi le **[<sup>18</sup>F]Py-PNA-DBCO** est obtenu avec un rendement radiochimique de 38% (0,601 µCi). Ce résultat est assez encourageant puisque les RCY (rendement radiochimique) sont classiquement compris entre 1 et 10%. Pour caractériser le **[<sup>18</sup>F]Py-PNA-DBCO**, l'échantillon est simplement laissé 24 heures en enceinte blindée pour attendre la décroissance, le produit est alors injecté en HPLC puis caractérisé par spectrométrie de masse.

## II.4 Évaluation de la technologie sur cellules

L'approche de préciblage a directement été testée sur cellules vivantes (A431 surexprimant EGFR) par le Dr. Simon Specklin et la Dr. Estelle Porret du SHFJ. Dans un premier temps les cellules ont été incubées 2 heures avec 10 µg de **CTX-PNA-CISYD** (1 équivalent) à 37 °C. Après lavage, les cellules sont incubées avec 96 µCi (20 équivalents) de [<sup>18</sup>F]Py-PNA-DBCO pendant 20 minutes. Les cellules sont lavées une seconde fois et le comptage de la radioactivité permet de déterminer si la réaction de ligation a bien fonctionné (**Schéma 50**).

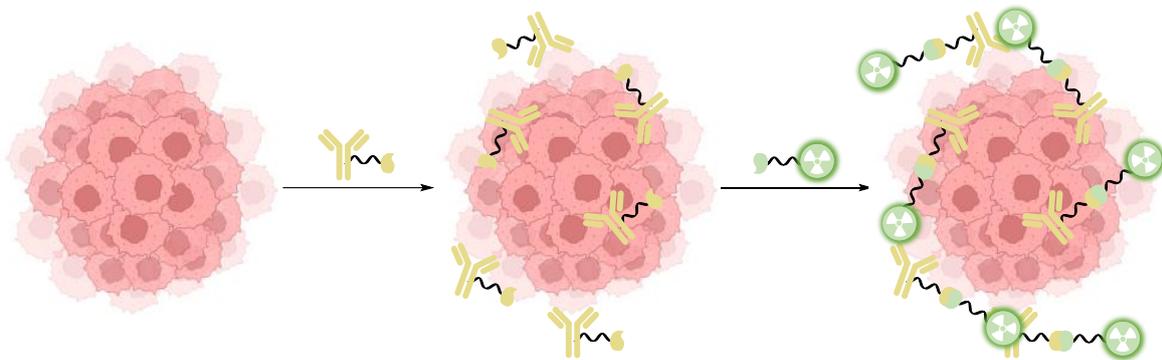


Schéma 50. Expérience sur cellules

Un test de déplacement a également été effectué pour vérifier si la réaction est bien spécifique. Ce test est réalisé dans les mêmes conditions si ce n'est que 100 équivalents de cétuximab non modifié sont ajoutés au **CTX-PNA-CISYD** avant incubation des cellules (**Figure 44**).

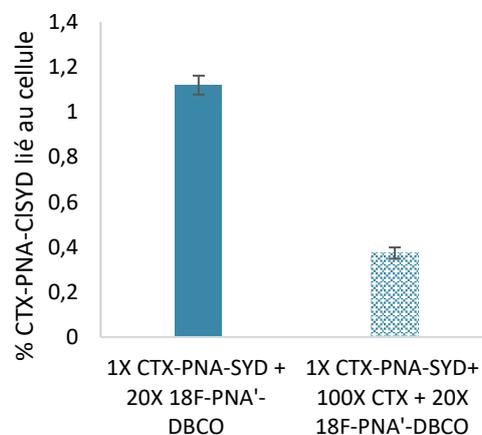


Figure 44. Résultat de l'expérience sur cellules. La quantification du CTX sur les cellules a été réalisée par mesure de radioactivité

Le test de déplacement est concluant puisqu'on observe une nette différence de radioactivité entre cette expérience et celle de blocage (100X CTX). Ces résultats encourageants nous ont conforté dans le choix des PNAs pour une approche de préciblage, et dans le fait qu'il fallait tester notre méthode *in vivo*.

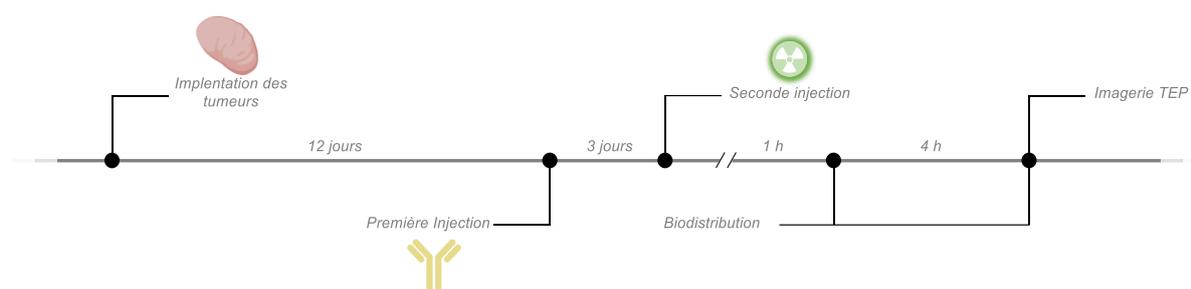
## II.5 Évaluation *in vivo* de la technologie

Les expériences *in vivo* présentées dans ce paragraphe ont été réalisées exclusivement avec des souris « nude » athymiques femelles, possédant une tumeur xéno greffe, par nos collaborateurs au SHFJ (Dr.

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

Dans un premier temps les cellules tumorales sont implantées en sous-cutané sur un groupe de 20 souris, après croissance tumorale (12 jours) les 20 souris sont séparées en trois sous-groupes G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et G<sub>3</sub>. Chaque sous-groupe a reçu une injection intraveineuse soit d'une solution physiologique pour le groupe contrôle G<sub>1</sub> (n=7), soit de **CTX-PNA-CISYD** à 66.4 µg/souris pour le groupe test (n=6) soit de **CTX-PNA-CISYD/CTX (30X)** à 66,4 µg/2mg pour le groupe blocage G<sub>3</sub> (n=6) (**Tableau 13**).

**Tableau 13.** Chronologie de l'expérience *in vivo*



Nbr de souris, Groupe	1 <sup>ère</sup> injection	2 <sup>ème</sup> injection	Biodistribution		Imagerie TEP
			1 h p.i	4 h p.i	4 h p.i
n = 7, G <sub>1</sub>	NaCl 0,9 %	[ <sup>18</sup> F]Py-PNA-DBCO	n = 3	n = 4	n = 1
n = 6, G <sub>2</sub>	<b>CTX-PNA-CISYD</b>	[ <sup>18</sup> F]Py-PNA-DBCO	n = 3	n = 3	n = 1
n = 6, G <sub>3</sub>	<b>CTX-PNA-CISYD</b> <b>CTX (30X)</b>	[ <sup>18</sup> F]Py-PNA-DBCO	n = 3	n = 3	n = 1

p.i post-injection

72 heures sont nécessaires pour que les anticorps s'accumulent dans la zone tumorale. Après ces 3 jours les 19 souris ont reçu une injection intraveineuse de [<sup>18</sup>F]Py-PNA-DBCO (7,7 µg, 105 µCi). Le groupe contrôle G<sub>1</sub> qui n'a pas reçu d'anticorps permet de déterminer la biodistribution du radiotracer. Le groupe de blocage G<sub>3</sub> permet quant à lui de déterminer si la réaction a bien eu lieu. Enfin le groupe G<sub>2</sub> représente le groupe test pour le préciblage. Trois souris de chaque groupe sont sacrifiées 1 heure après l'injection du radiotracer pour déterminer la biodistribution. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, les organes sont prélevés et la radioactivité est déterminée. Quatre heures après l'injection du radiomarqueur une souris de chaque groupe est imagée à l'aide d'un imageur TEP. Enfin, toutes les souris sont sacrifiées pour faire la biodistribution à 4 heures. Les résultats des biodistributions sont regroupés dans les graphiques présentés en **Figure 45** et **Figure 46** et sont représentés en fonction de la dose injectée par gramme (%DI/g). Cette valeur traduit le pourcentage de fluor 18 par rapport à la dose injectée dans l'organe étudié corrigé de la décroissance radioactive.

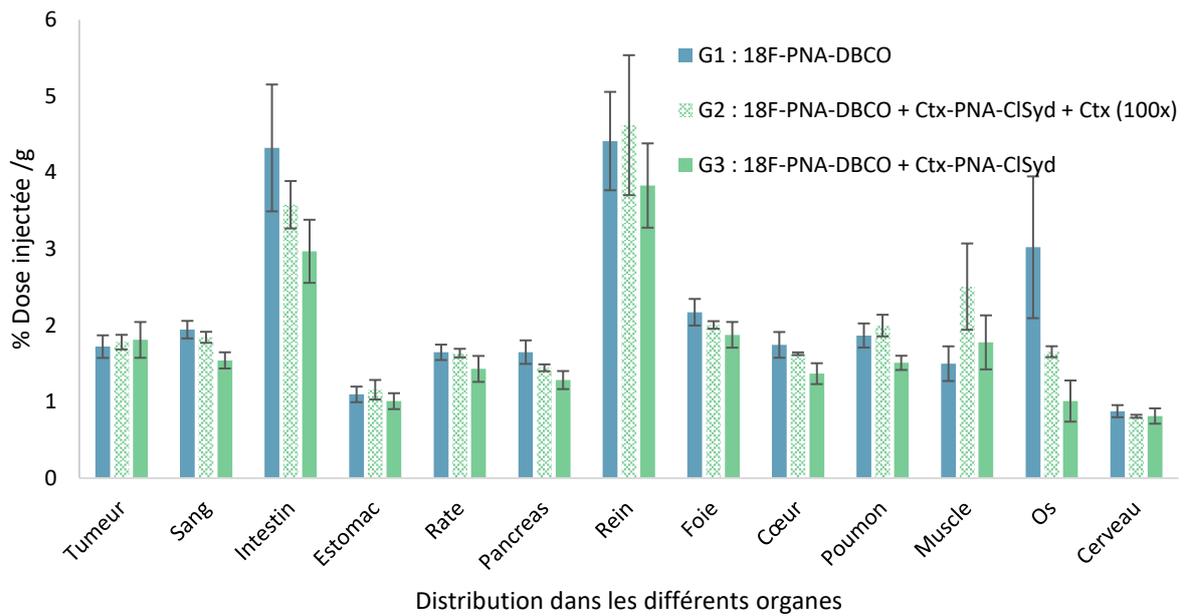


Figure 45. Biodistribution 1 h après injection du <sup>18</sup>F-PNA-DBCO

Après 1 heure, la répartition de la radioactivité semble être assez uniforme et ce quel que soit le groupe. Le radiotracer semble cependant avoir un tropisme particulier pour les reins et les intestins mettant en lumière une possible toxicité rénale et intestinale. Malheureusement, des résultats similaires sont observés pour le groupe test G<sub>2</sub>. Aucune accumulation préférentielle n'est détectée dans la tumeur. Ce résultat souligne l'inefficacité de la méthode une heure après l'injection. Après 4 heures, des résultats similaires ont été observés et le graphique montre une forte accumulation dans les reins et les os. L'accumulation osseuse semble indiquer qu'un problème est survenu lors de la radiosynthèse du PNA-DBCO. En effet le fait que la radioactivité s'accumule dans les os traduit souvent la présence d'ions fluorures dans la dose injectée. Les ions fluorures réagissent avec le calcium des os pour s'y fixer. Si la solution d'injection contenait des ions fluorures cela signifie que la réaction de S<sub>N</sub>Ar sur le substrat pyridine-ammonium ne s'est pas bien déroulée.

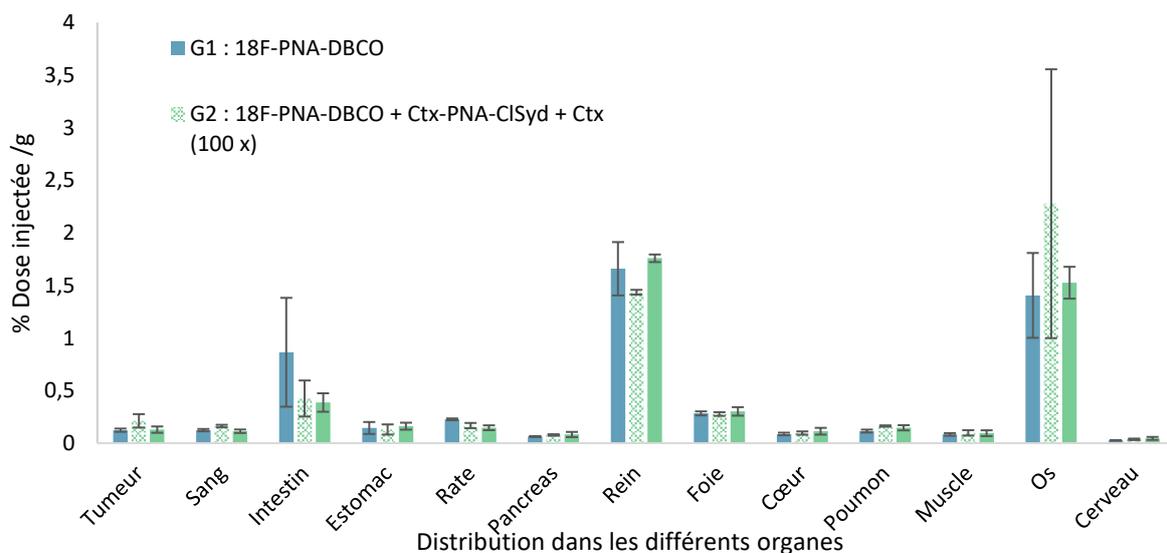
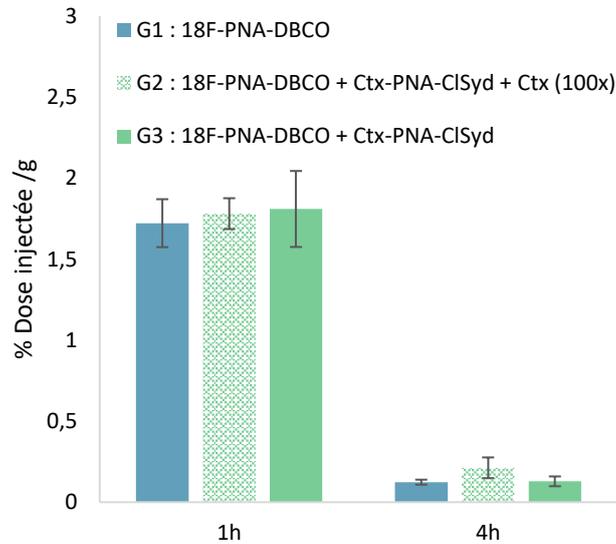


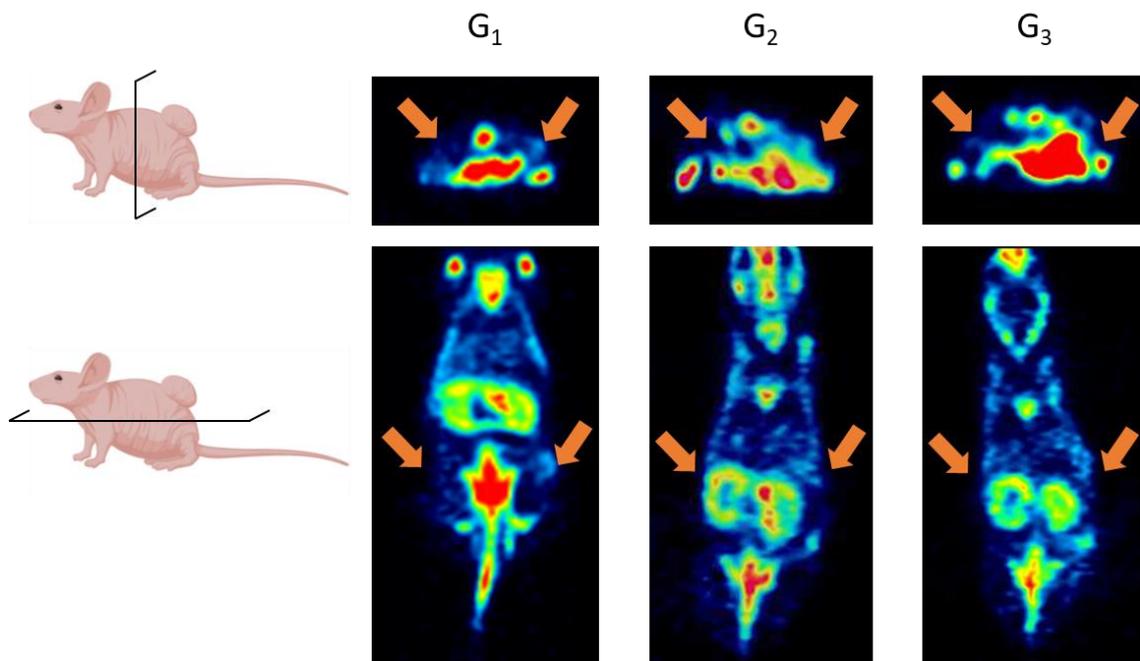
Figure 46. Biodistribution 4 h après injection du <sup>18</sup>F-PNA-DBCO

En s'intéressant plus particulièrement aux chiffres obtenus sur les tumeurs, il est possible de remarquer qu'aucune accumulation n'est observée dans l'expérience de préciblage (**Figure 47**).



**Figure 47.** Evolution de la radioactivité au niveau de la tumeur

En regardant de plus près les images enregistrées par imagerie TEP les résultats ne sont pas plus concluants. En effet, aucune radioactivité n'est détectée dans les zones tumorales et les tumeurs ne sont pas visibles (**Figure 48**).



**Figure 48.** Images TEP des souris après 4 heures (flèche orange : emplacement de la tumeur)

Trois cas de figure sont alors envisageables pour expliquer ces mauvais résultats. Une première hypothèse est que du fluor 18 libre était présent dans la dose injectée, expliquant la forte accumulation osseuse. Il est également possible que l'organisme ait métabolisé le motif fluoropyridine pour libérer l'ion fluorure. Cette hypothèse traduirait alors l'instabilité métabolique de cette fonction.

La troisième explication est tout simplement que l'approche de préciblage ne soit pas transférable *in vivo* et qu'elle ne soit pas viable soit à cause de problèmes de pharmacocinétique soit de biodistribution du **CTX-PNA-CISYD**.

Au vu des problèmes rencontrés le jour de la radiosynthèse il est également très probable que la dose injectée soit responsable de ces résultats inattendus. En effet, le cyclotron principal est tombé en panne et la dose a dû être obtenue avec le cyclotron de secours, ainsi une plus faible quantité de  $^{18}\text{F}$  a été obtenue complexifiant ainsi la radiosynthèse. Pour finir, la synthèse du thiol s'est révélée très complexe puisque sans aucune explication le produit **II-7** a été obtenu avec des impuretés radioactives non identifiées. Il est donc assez difficile de conclure sur cette expérience qui met en lumière toute la difficulté d'élaborer des expériences *in vivo*.

### III Conclusions et perspective

Dans ce chapitre nous avons développé une approche de préciblage au fluor 18 assistée par des PNAs. Dans un premier temps les objets moléculaires ont été construits, le cétuximab a été fonctionnalisé par un PNA chlorosydnone. Ensuite le PNA complémentaire (PNA-DBCO) a été synthétisé puis radiomarké à l'aide d'une molécule prosthétique radiomarkée. Des premiers tests sur cellules vivantes ont alors montré que la réaction de préciblage avait bien fonctionné, confirmant la viabilité du projet. Pour finir, une expérience *in vivo* sur un lot de 19 souris a donné des résultats n'étant pas en adéquation avec nos attentes et aucun marquage spécifique n'a pu être détecté dans les zones tumorales. Ce résultat non concluant est probablement dû aux problèmes matériels rencontrés lors de la radiosynthèse. Afin de tirer des conclusions plus pertinentes sur cette étude, une nouvelle expérience *in vivo* serait nécessaire, mais malheureusement ces expériences sont onéreuses, difficiles à organiser et très chronophages.

# Chapitre 3 : Synthèse et développement d'Alkyl et d'Aryl-iminosydnonnes pour des applications en bioconjugaison

Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré l'influence directe de l'enrichissement électronique de l'azote exocyclique sur la cinétique de la réaction de cycloaddition [3+2] entre les iminosydnonnes et les cycloalcynes.<sup>64</sup> En effet, la réaction est favorisée dans le cas où l'azote N<sup>6</sup> est enrichi électroniquement. Ces effets ont été théorisés en 2017 dans une étude menée par Champagne et Houk dans laquelle ils décrivent l'influence de l'enrichissement électronique de la position 6 de différents dipôles en fonction de leur réactivité.<sup>110</sup> D'après cette étude, l'introduction de groupements alkyls ou même aryls en position N<sup>6</sup> des iminosydnonnes permettrait à la fois d'accélérer la vitesse de réaction, tout en permettant la libération contrôlée d'un isocyanate cette fois-ci plus stable que les isocyanates activés par un groupement électroattracteur précédemment décrits dans la littérature (**Schéma 51**).<sup>111</sup> De tels composés ne sont pas décrits dans la littérature et les voies synthétiques habituelles des iminosydnonnes ne peuvent être utilisées pour les préparer. Ce dernier chapitre de thèse est consacré à ces nouveaux composés dont nous devons inventer un accès synthétique et confirmer (ou infirmer) leur haute réactivité pour la réaction SPICC.

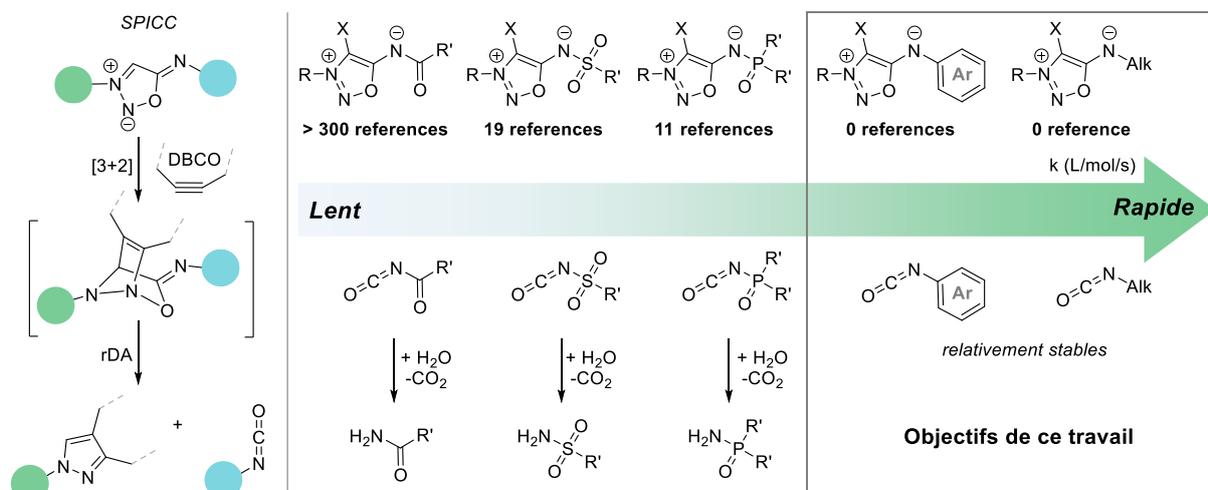


Schéma 51. Objectifs du projet

## I Synthèse et développement de 6-N-alkyl iminosydnonnes

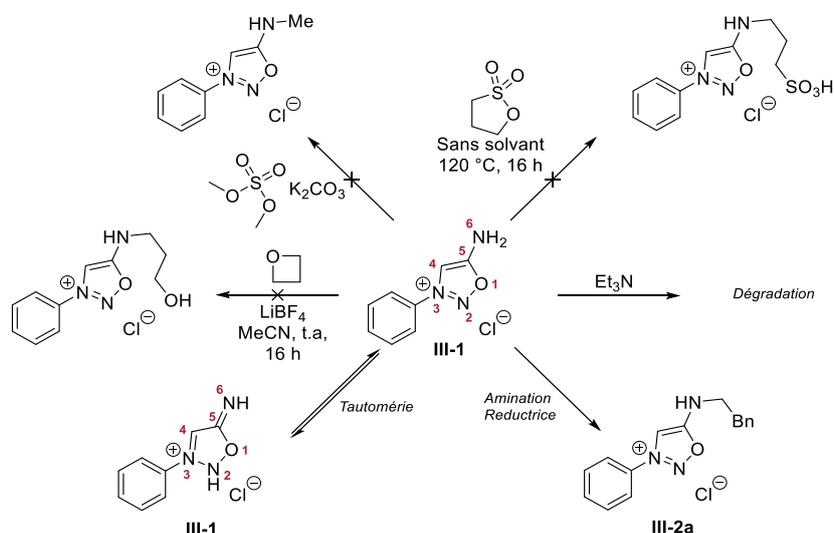
La vitesse de réaction est l'un des paramètres les plus importants pour évaluer l'efficacité d'une réaction bioorthogonale : plus la cinétique est rapide plus la réaction peut fonctionner à des concentrations faibles, ce qui est typiquement le cas dans des organismes vivants. Le projet qui sera développé dans cette partie s'inscrit dans cette démarche, qui est d'améliorer la cinétique réactionnelle en développant des outils plus performants.

<sup>110</sup> P. A. Champagne and K. N. Houk, *JOC*, 82/20 (2017), 10980–88.

<sup>111</sup> S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuyperre, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. N. Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56/49 (2017), 15612–16.

## I.1 Travaux antérieurs du laboratoire

Les travaux présentés ci-dessous (**Schéma 52**) ont été développés conjointement avec le Dr. Karine Porte et le Dr. Arnaud Chevalier dans le cadre de leur thèse et contrat post doctoral.



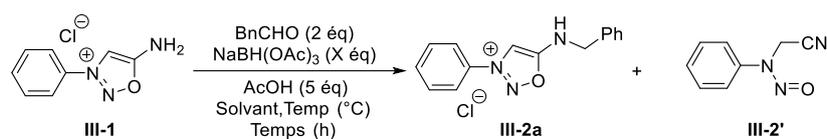
**Schéma 52.** Stratégie d'alkylation du sel d'iminosydnone **III-1**.

Des premiers tests d'alkylation directe du sel de iminosydnone **III-1** à l'aide d'électrophiles puissants (MeI, diméthylsulfate, sultone, oxethane) n'ont pas permis d'obtenir les produits désirés (**Schéma 52**). Ceci peut s'expliquer d'une part par la faible nucléophilie de l'azote N<sup>6</sup> et d'autre part par l'instabilité du sel **III-1** en conditions basiques. Ces problèmes réduisent considérablement les possibilités de fonctionnalisation de **III-1**.

Notre laboratoire s'est ensuite tourné vers l'amination réductrice qui permet la mono-alkylation d'amines en conditions acides. Les premiers tests menés en présence de paraformaldéhyde et **III-1** ont permis d'observer pour la première fois des traces du composé mono-méthylé par suivi LC/MS.

L'optimisation de la réaction a été effectuée sur une réaction modèle visant la benzoylation du sel d'iminosydnone **III-1** par réaction d'amination réductrice en présence de benzaldéhyde et de tétra-acétoxyborohydrure de sodium. Plusieurs paramètres ont été évalués (température, solvant, concentration, quantité d'agent réducteur, **Tableau 14**).

**Tableau 14.** Optimisation de la réaction d'amination réductrice entre le sel **III-1** et le benzaldéhyde



Entrées	Solvant	Temps	[ <b>III-1</b> ]	Temp.	$\text{NaBH(OAc)}_3$	<b>III-2a/III-2'</b> <sup>(a)</sup>	Conv. de <b>III-1</b> <sup>(a)</sup>	Rdt en <b>III-2a</b> <sup>(b)</sup>
1	1,2-DCE	24 h	0,2 M	t.a	1,05 éq.	-	< 10%	Traces
2	1,2-DCE	24 h	0,2 M	t.a	3,0 éq.	-	60%	41%
3	1,2-DCE	24 h	0,2 M	40 °C	3,0 éq.	-	> 99%	17%
<b>4</b>	<b>1,2-DCE</b>	<b>24 h</b>	<b>0,4 M</b>	<b>t.a</b>	<b>3,0 éq.</b>	<b>98/02</b>	<b>&gt; 99%</b>	<b>50%</b>
5	THF	24 h	0,4 M	t.a	3,0 éq.	98/02	> 99%	45%
6	MeCN	24 h	0,4 M	t.a	3,0 éq.	86/14	90%	51%
7	MeOH	24 h	0,4 M	t.a	3,0 éq.	02/98	90%	Traces

<sup>(a)</sup> Conversion calculée par UPLCMS ;

<sup>(b)</sup> Rendement isolé

La quantité d'agent réducteur et la concentration en produit de départ semblent avoir une forte influence sur la réaction. En effet, le passage de 1,05 équivalents à 3,0 équivalents de  $\text{NaBH(OAc)}_3$  permet de multiplier la conversion du produit de départ par plus de 6 (**Tableau 14**, Entrées 1-2). A noter que l'augmentation de la concentration de **III-1** permet d'obtenir une conversion totale.

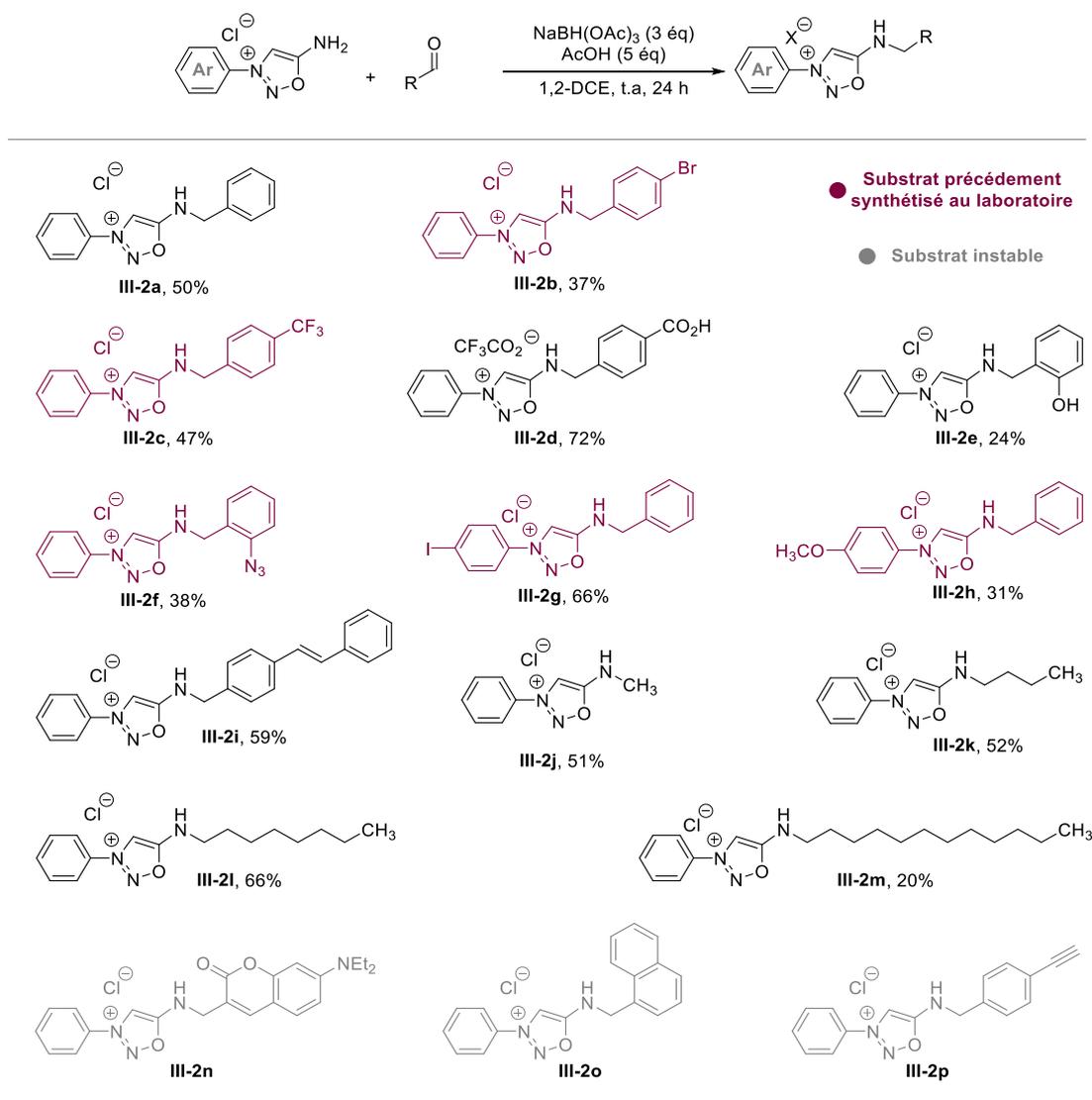
Les solvants protiques, tel que MeOH, sont à proscrire puisque seul le composé **III-2'** issu de l'ouverture de l'iminosynone **III-1** a pu être isolé dans ces conditions. L'absence de lumière pendant la réaction semble également améliorer les rendements.

Après avoir déterminé les conditions optimales de réaction (**Tableau 14**, Entrée 4), le composé **III-2a** a pu être isolé avec un rendement de 50%. Malgré un taux de conversion très élevé et l'absence de produits secondaires, le rendement isolé reste faible. Ceci s'explique par la sensibilité des alkyl-iminosynones, entraînant une dégradation partielle durant la purification. Une fois isolé, **III-2a** s'est néanmoins révélé être assez stable dans le temps. Les conditions basiques fortes sont néanmoins à proscrire avec ce type de substrat.

Une fois les conditions optimales établies, l'étendue de la réaction a été étudiée.

## 1.2 Etude de l'étendue de la réaction

A partir des sels d'iminosynones correspondants, la réaction d'amination réductrice a été effectuée avec une série de différents aldéhydes comportant une variété de fonctions chimiques dans les conditions réactionnelles optimisées (**Schéma 53**). Les 6-N-alkyl iminosynones sont isolées sous forme de sels de chlorhydrate ou de trifluoroacétate en fonction des méthodes de purification utilisées. Les travaux précédents effectués au laboratoire ont permis d'isoler 5 iminosynones différentes. Mon travail de thèse a donc d'abord consisté à compléter l'étude de l'étendue de cette réaction en préparant 8 nouvelles iminosynones.



**Schéma 53.** Exemplification structurale de la réaction d'amination réductrice pour la synthèse d'alkyl-iminosydnone

Cette étude montre une relative tolérance pour une variété de groupements fonctionnels comme les halogènes (**III-2b**), les acides carboxyliques (**III-2d**) ou encore plus étonnamment des fonctions réactives comme les azotures (**III-2f**). Néanmoins, les rendements obtenus sont faibles ou modérés. Certains composés se sont révélés être particulièrement instables à l'image des iminosydnone **III-2n**, **III-2o** et **III-2p** qui une fois isolées se sont dégradées pendant les analyses.

Afin d'élargir l'exemplification de la réaction, des premiers essais, en présence cette fois-ci de cétone, ont été menés (**Schéma 54**). Malgré les efforts déployés, aucune condition n'a permis d'isoler le produit souhaité. Seules des traces ont pu être observées en présence d'un équivalent de tris-pentafluorophénylborane. Pour aller plus loin, des réactions de type Petasis en présence de benzaldéhyde et d'acide phénylboronique ont été testées mais sans succès (**Schéma 54**).

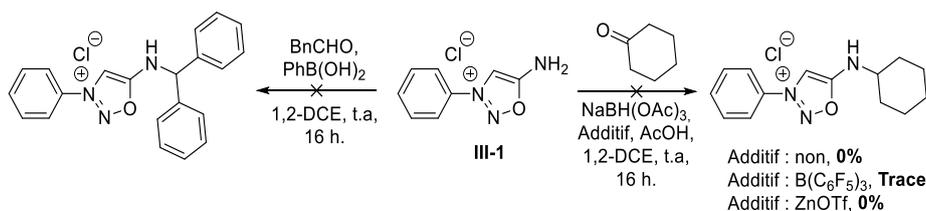


Schéma 54. Tentatives de synthèse d'iminosydnone alkyl alpha-N<sup>6</sup> disubstituée

Nous nous sommes alors intéressés à la synthèse des 6-N-aryl iminosydnones. Le paragraphe suivant décrit nos efforts de synthèse pour accéder à ces composés.

## II Synthèse et développement de 6-N-aryl-iminosydnones

### II.1 Voie de synthèse envisagée

Une première voie envisagée pour introduire un groupement aromatique sur l'azote exocyclique d'une iminosydnone a été d'utiliser des conditions classiques de couplage de type Ullmann ou Buchwald-Hartwig (Schéma 55). Malheureusement, aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir le composé désiré.

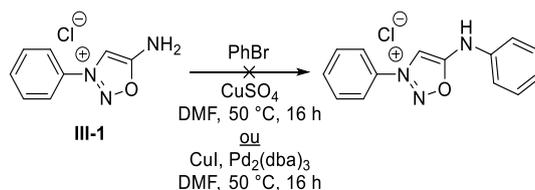


Schéma 55. Tentatives de synthèse 6-N-aryl-iminosydnones par couplage métallo-catalysé

Afin de contourner ces difficultés, nous avons décidé de changer complètement la façon d'aborder la synthèse de ce type de composés. Plutôt que d'essayer de post-fonctionnaliser un sel d'iminosydnone III-1, nous nous sommes orientés vers le développement d'une méthode de synthèse qui permettrait d'accéder au composé mésoionique déjà fonctionnalisé *via* des réactions simples à mettre en œuvre, plus robustes mais également plus versatiles.

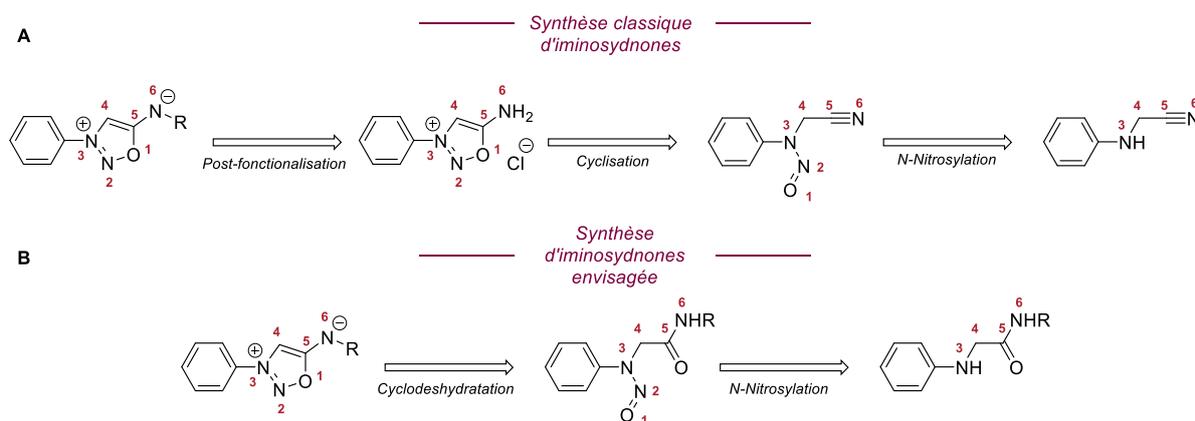


Schéma 56. A. Voie rétrosynthétique classique des iminosydnones B. Voie rétrosynthétique envisagée pour la synthèse directe des iminosydnones.

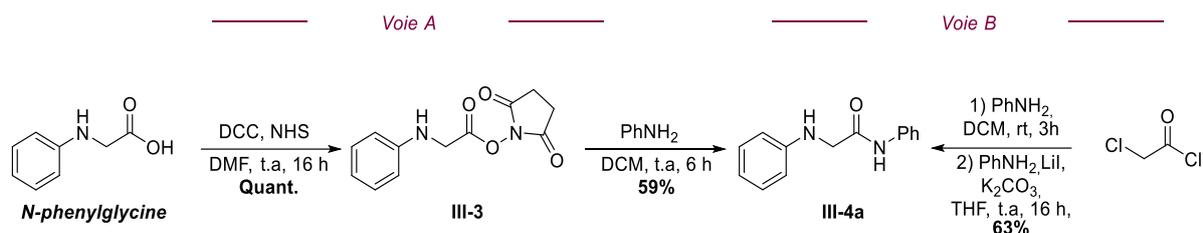
La synthèse des iminosydnones décrite pour la première fois par Walker et Ohta en 1957 implique la cyclisation d'aminonitrile N-Nitrosylé en conditions acides (Schéma 56. A).<sup>57</sup> Cette voie de synthèse

pourrait être adaptée en utilisant non plus des aminonitriles mais des aminoamides qui pourraient être nitrosylés puis cyclisés (**Schéma 56 B**). Cette méthode pourrait alors permettre d'avoir accès à une large gamme de composés inédits en faisant simplement varier le groupement R.

La prochaine partie sera donc consacrée à la mise au point d'une méthodologie de synthèse d'iminosydnone basée sur une synthèse directe du mésoionique fonctionnalisé *via* réaction de nitrosylation cyclodeshydratation.

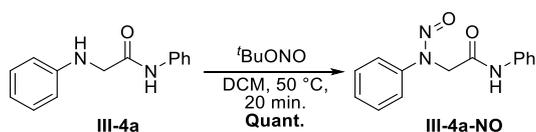
Pour valider notre approche il a d'abord fallu développer une réaction permettant d'accéder au *N*-nitroso-phenyl(phenylamino)acetamide qui sera utilisée comme substrat modèle pour étudier les réactions de nitrosylation et de cyclodeshydratation. Le couplage peptidique nous a semblé être une approche adéquate.

Dans un premier temps, la synthèse de l'ester de NHS de la *N*-phenylglycine en présence de DCC et d'un excès de NHS permet d'obtenir quantitativement l'ester activé **III-3** (**Schéma 57**). L'ester est ensuite traité avec un excès d'aniline dans le DCM pour former l'alpha-aminoamide **III-4a** avec un rendement de 59%. Une autre voie de synthèse a également été explorée en partant de chlorure de chloroacétyle et d'aniline dans le DCM pour former l'alpha-chloramide intermédiaire, qui est ensuite engagé directement dans une substitution nucléophile avec l'aniline pour former **III-4a**. Ces deux méthodes donnent des rendements comparables mais la méthode B a été privilégiée puisqu'elle ne nécessite qu'une seule purification.



**Schéma 57.** Synthèse de *N*-phenyl(phenylamino)acetamide

**III-4a** est alors quantitativement nitrosylé en présence de *tert*-Butyl nitrite dans le DCM à 50 °C pendant 20 minutes (**Schéma 58**) afin d'obtenir le substrat modèle de la réaction de cyclodeshydratation **III-4a-NO**.



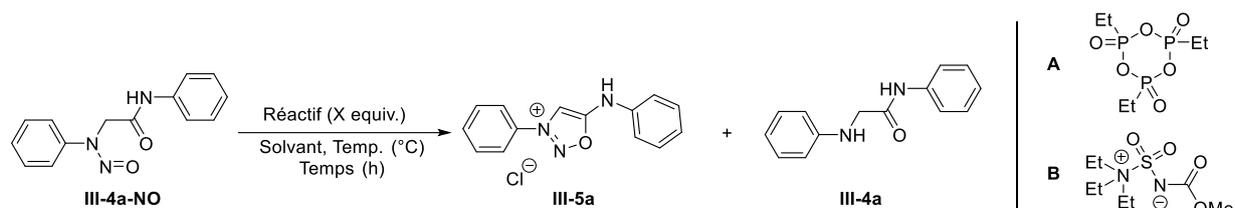
**Schéma 58.** Réaction de nitrosylation

Une fois le composé **III-4a-NO** en notre possession, la réaction de cyclodeshydratation a pu être étudiée.

## II.2 Mise au point de la réaction de cyclodeshydratation pour l'obtention de *N*-6-aryl-imosynones

Le but étant d'activer une fonction amide, plusieurs réactifs couramment utilisés pour cela ont été testés. POCl<sub>3</sub> ou encore SOCl<sub>2</sub> (**Tableau 15**, Entrées 1 et 2) n'ont pas permis d'obtenir le composé désiré et seule de la dégradation a été observée. En revanche, une faible conversion a pu être observée en présence de chlorure d'oxalyle. Des traces de produit ont été observées ainsi qu'une faible quantité du produit de protodénitrosylation **III-4a**. Des résultats sensiblement meilleurs ont été observés avec l'anhydride trifluoroacétique (**Tableau 15**, Entrée 5).

**Tableau 15.** Optimisation de la réaction de cyclodeshydratation du composé **III-4a-NO**



Entrée	solvant	Temps	Temp.	[ <b>III-4a-NO</b> ]	Réactif	<b>III-5a/III-4a</b>	Conv. <sup>(a)</sup> <b>III-4a-NO</b>	Rdt <sup>(b)</sup> <b>III-5a</b>
1	POCl <sub>3</sub>	1 h	40 °C	0,2 M	-	-	-	-
2	SOCl <sub>2</sub>	1 h	40 °C	0,2 M	-	-	-	-
3	AcCl	1 h	40 °C	0,2 M	-	99/01	0%	-
4	DCM	1 h	40 °C	0,2 M	COCl <sub>2</sub> (1,1 equiv.)	99/01	5%	Traces
5	DCM	1 h	40 °C	0,2 M	TFAA (1,1 equiv.)	98/02	10%	Traces
6	DCM	1 h	rt	0,2 M	<b>A</b> (1,1 equiv.)	-	0%	-
7	DCM	1 h	rt	0,2 M	<b>B</b> (1,1 equiv.)	-	0%	-
8	DCM	1 h	rt	0,2 M	PCl <sub>5</sub> (3,0 equiv.)	99/01	> 99%	93%
<b>9</b>	<b>DCM</b>	<b>1 h</b>	<b>rt</b>	<b>0,2 M</b>	<b>PCl<sub>5</sub> (1,1 equiv.)</b>	<b>99/01</b>	<b>&gt; 99%</b>	<b>95%</b>
10	DCM	1 h	rt	0,2 M	Tf <sub>2</sub> O (1,1 equiv.)	95/05	> 99%	82%

<sup>(a)</sup> Conversion calculée par UPLCMS ;

<sup>(b)</sup> Rendement isolé

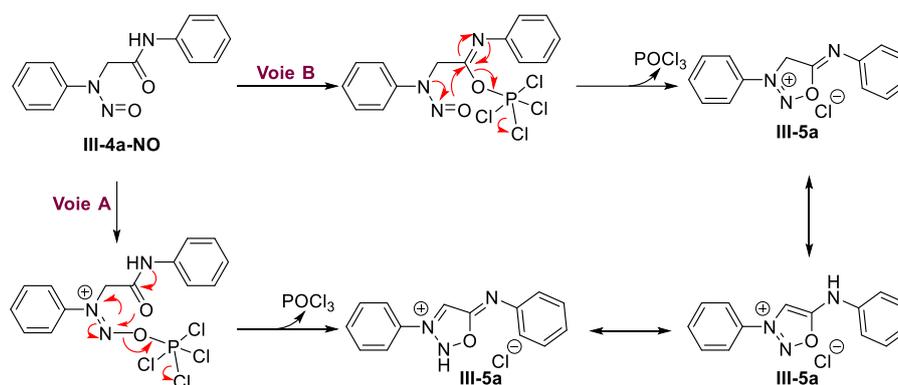
L'utilisation de 3,0 équivalents de PCl<sub>5</sub> permet d'obtenir **III-5a** de manière quantitative en moins d'une heure et à température ambiante (**Tableau 15**, Entrée 8). L'utilisation de seulement 1,1 équivalents donne les mêmes résultats (**Tableau 15**, Entrée 9). Le pentachlorure de phosphore possède une réactivité intrinsèque très forte et pour pallier au possible manque de compatibilité structurale, d'autres agents de déshydratation moins drastique ont été testés à l'image du T3P (**A**) ou encore du réactif de Burgess (**B**). Malheureusement, aucune conversion n'a été observée avec ces réactifs (**Tableau 15**, Entrées 6 et 7). A noter que l'anhydride trifluoré donne également de bons résultats avec un rendement isolé de plus de 80% (**Tableau 15**, Entrée 10). La purification de ce type de composé s'est révélée être impossible en phase normale, **III-5a** a donc été purifié par chromatographie en phase inverse sur colonne C18 (phase mobile : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA/MeCN + 0,1% TFA). Lors de la purification le contre ion chlore est échangé avec l'anion trifluoroacétate présent dans la phase mobile.

Pour limiter au maximum la manipulation de *N*-Nitrosamines toxiques, des essais de réaction monotope ont été effectués mais l'excès de <sup>t</sup>BuONO nécessaire à la réaction de nitrosylation n'est pas compatible avec le PCl<sub>5</sub> et la réaction ne fonctionne pas. En revanche, l'évaporation du brut réactionnel

après la nitrosylation permet l'élimination de l'excès de  $t\text{-BuONO}$  et du *tert*-Butanol issu de la réaction de nitrosylation. Ensuite, la resuspension dans le DCM distillé suivie de l'ajout de 1,1 équivalent de  $\text{PCl}_5$  donne le même rendement que présenté en Entrée 9. La voie de synthèse des iminosydnone est la même depuis plus de 60 ans,<sup>112</sup> or cette nouvelle réaction constitue une nouvelle voie d'accès à ces composés et permet d'obtenir des iminosydnone jamais décrites jusque-là.

### II.3 Etude mécanistique de la réaction de cyclodeshydratation.

Pour améliorer notre compréhension de la réaction nous avons voulu déterminer son mécanisme (**Schéma 59**). En effet, deux possibilités sont envisageables : soit l'activation du composé **III-4a-NO** par  $\text{PCl}_5$  se fait sur l'oxygène du groupement nitroso (Voie A) soit *via* l'activation de la fonction amide (voie B). Pour évaluer ces deux hypothèses, la synthèse d'un composé marqué sur l'oxygène de l'amide par un isotope de l'oxygène, [ $^{18}\text{O}$ ], nous permettrait de discriminer les deux mécanismes (voie A et voie B).



**Schéma 59.** Mécanismes possibles pour la réaction de cyclodeshydratation

La source la plus disponible d'oxygène 18 étant l'eau [ $^{18}\text{O}$ ] $\text{H}_2\text{O}$ , nous avons élaboré une voie de synthèse permettant d'introduire facilement l'oxygène 18 par simple hydratation d'un intermédiaire activé. Cet intermédiaire pourrait être une chlorimine formée par réaction d'une amide avec le pentachlorure de phosphore (**Schéma 59**).

<sup>112</sup> Greco, C. V.; Nyberg, W. H.; Cheng, C. C. J. Med. Chem. (1962), 5, 899.

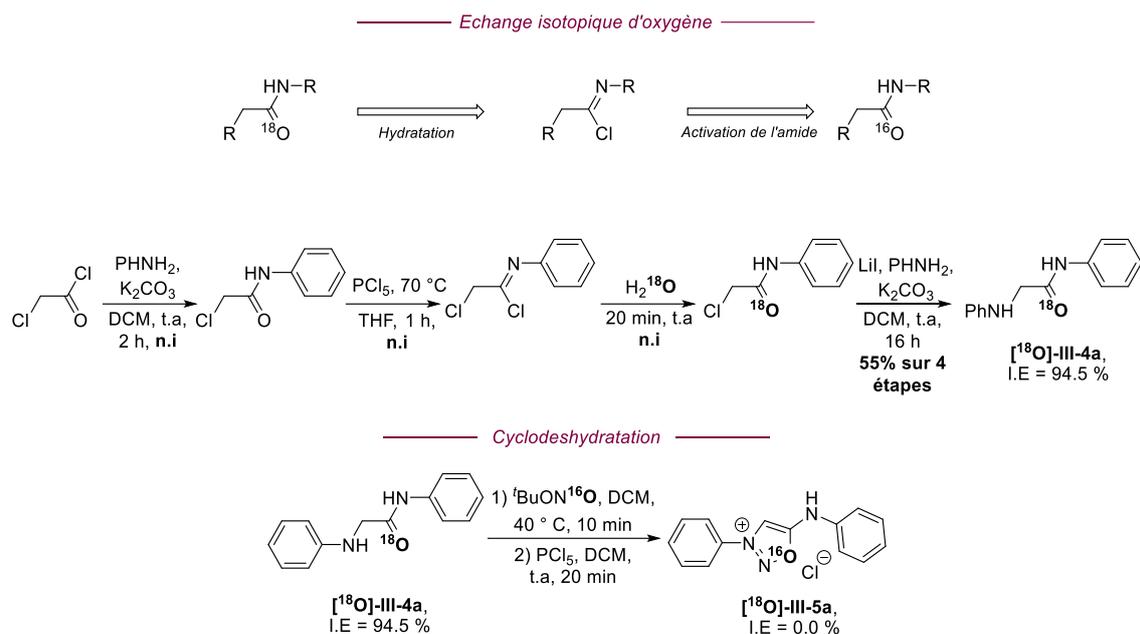


Schéma 60. Synthèse de  $[^{18}\text{O}]\text{-III-5a}$  et cyclodéshydratation de  $[^{18}\text{O}]\text{-III-5a}$

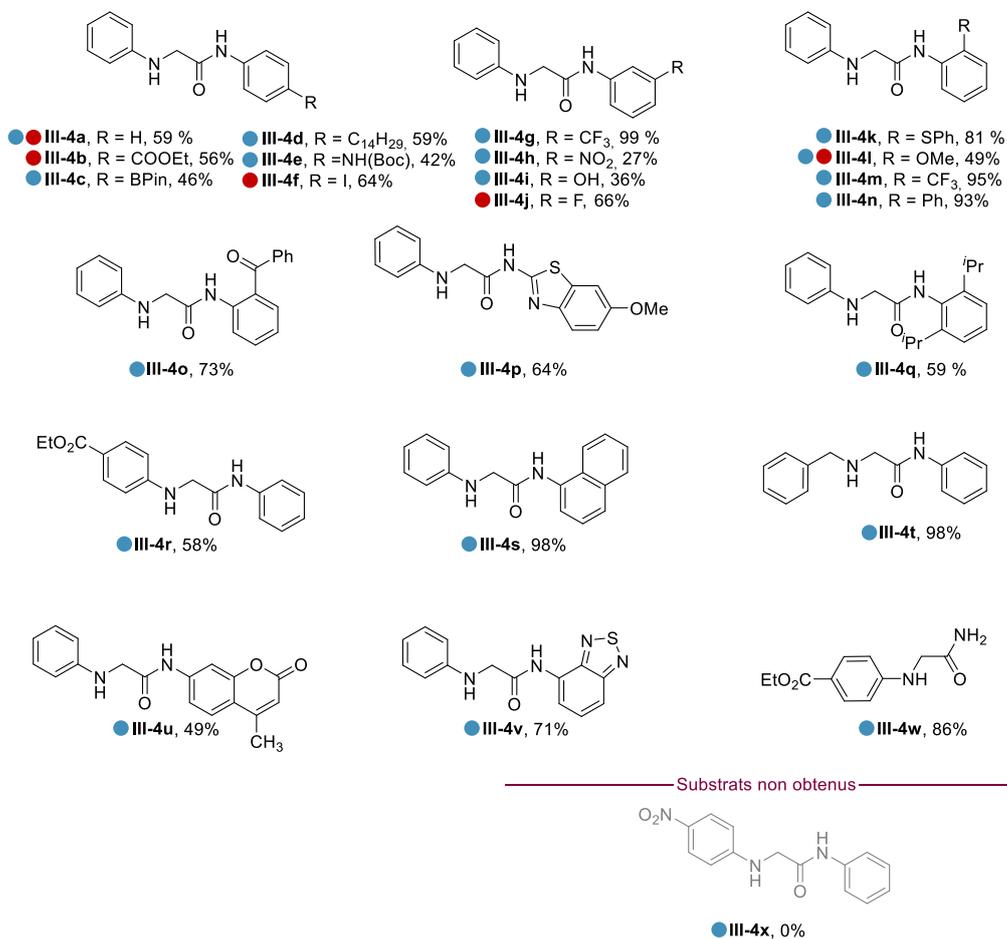
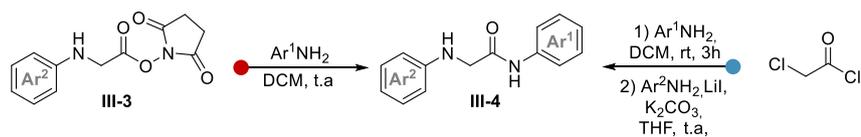
Le chlorure de chloroacétyle est traité avec 1,0 équivalent d'aniline pour former l' $\alpha$ -chloramide correspondant. Ensuite la fonction amide est activée en présence de  $\text{PCl}_5$  dans le THF à  $70^\circ\text{C}$ . Pour finir l'hydratation de l'intermédiaire chlorimine permet d'accéder à l' $\alpha$ -chloramide marquée.

Ensuite, une étape de substitution nucléophile permet d'accéder au composé  $[^{18}\text{O}]\text{-III-4a}$  avec un rendement de 55% en 4 étapes. Cette nouvelle méthode permet d'accéder à des amides marquées avec un enrichissement isotopique de 94,5%.

$[^{18}\text{O}]\text{-III-4a}$  est ensuite engagé dans les conditions optimisées de nitrosylation/cyclodéshydratation et un enrichissement isotopique du brut réactionnel montre que l'iminosydone formée ne présente aucun enrichissement isotopique sur son atome d'oxygène (Schéma 60). Cette expérience montre que c'est uniquement la voie B qui se déroule lors de la cyclodéshydratation. Cette information est assez essentielle pour mieux appréhender l'influence des substituants sur l'amide aromatique. Ainsi, une amide appauvrie aura tendance à réagir moins rapidement avec le pentachlorure de phosphore alors que l'intermédiaire formé sera quant à lui plus réactif, et la réaction de cyclisation se fera d'autant plus facilement. Les substituants de la *N*-aryl-nitrosamine auront eux aussi une influence directe sur la réaction puisqu'une aniline appauvrie réagira moins facilement avec l'intermédiaire chlorimine.

#### II.4 Etude de l'étendue de la réaction

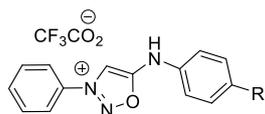
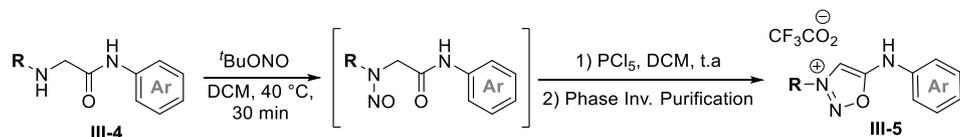
Pour déterminer la compatibilité fonctionnelle des réactions de nitrosylation et de cyclodéshydratation, une série de 23 *N*-aryl(arylamino)acetamide comportant une variété de fonctions chimiques et d'hétérocycles aromatiques a été synthétisée avec des rendements allant de 63% à 95% (Schéma 61). La seule limitation de cette méthode réside dans la seconde étape de substitution nucléophile qui, dans le cas des anilines appauvries, ne fonctionne pas du tout.



**Schéma 61.** Structures de *N*-aryl(arylamino)acetamides synthétisés (boule rouge : à partir d'ester de NHS, boule bleue : à partir de chlorure de chloroacétyle)

Les 23 aminoamides obtenues ont ensuite été testées dans la réaction de nitrosylation/cyclodéshydratation.

21 6-*N*-Aryl-iminosydnonnes ont ainsi pu être isolées et caractérisées comme indiqué dans le **Schéma 62**. Celles-ci sont isolées sous forme de sels de trifluoroacétate en raison de la purification en phase inverse utilisant 0,1% de TFA dans la phase mobile.



III-5a, R = H, 95%

III-5b, R = COOEt, 88%

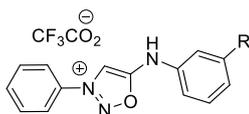
III-5c, R = BPin, 58%



III-5d, R = C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>, 21%

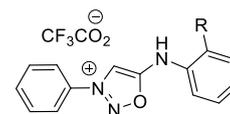
III-5e, R = NH(Boc), 23%

III-5f, R = I, 64%



III-5g, R = CF<sub>3</sub>, 42%

III-5h, R = F, 80%

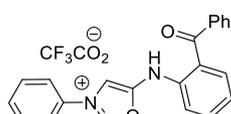


III-5i, R = SPh, 29%

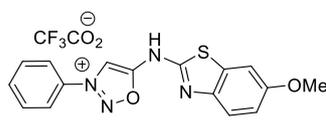
III-5j, R = OMe, 69%

III-5k, R = CF<sub>3</sub>, 80%

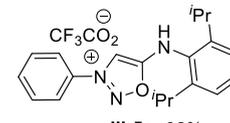
III-5l, R = Ph, 85%



III-5m, 10%



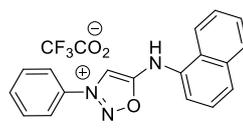
III-5n, 50%



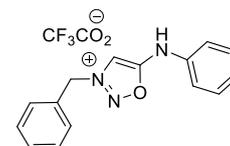
III-5o, 92%



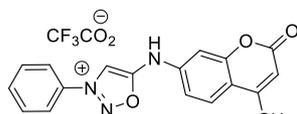
III-5p, 78%



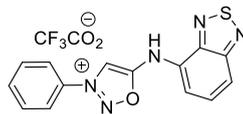
III-5q, 95%



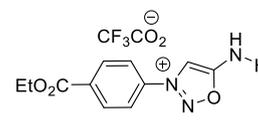
III-5r, 86%



III-5s, 51%

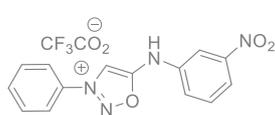


III-5t, R = H, 84%

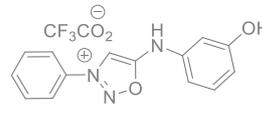


III-5u, 62%  
(Tf<sub>2</sub>O à été utilisé)

Substrats non obtenu



III-5v, 0%



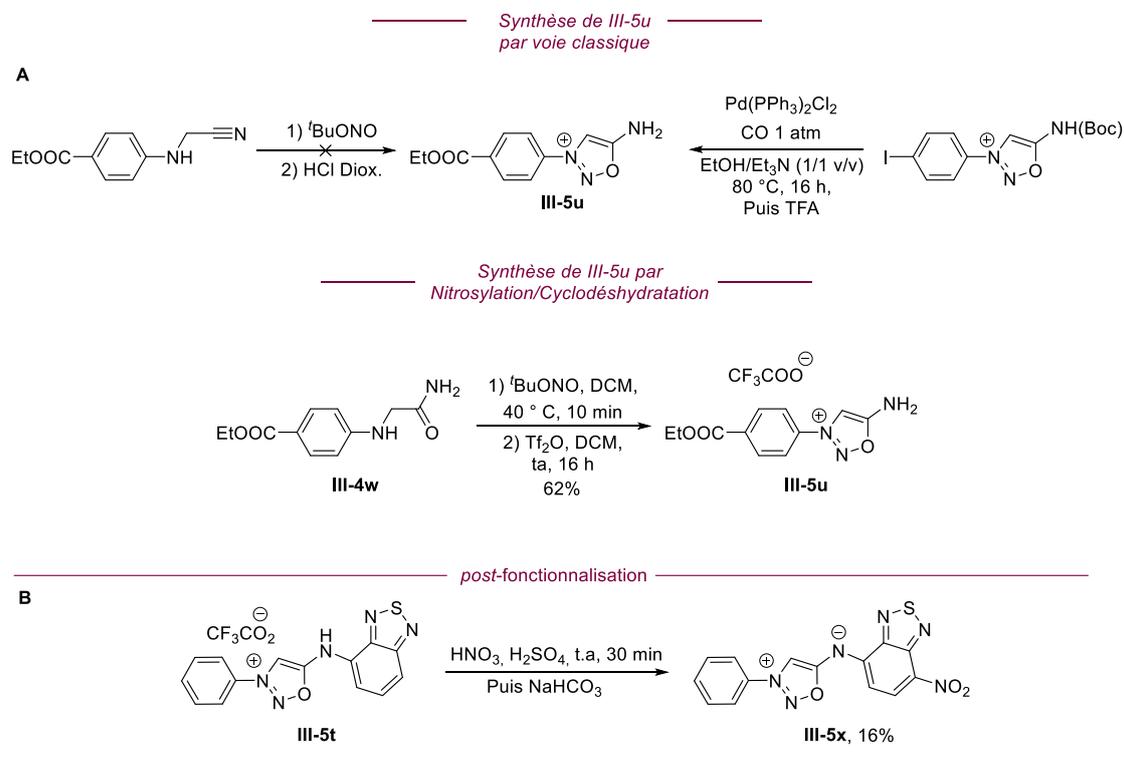
III-5w, 0%

**Schéma 62.** Etendue de la réaction de nitrosylation cyclodéshydratation.

La compatibilité fonctionnelle est assez remarquable compte tenu des réactifs utilisés (PCl<sub>5</sub> et Tf<sub>2</sub>O) puisque de nombreuses iminosydnonnes possédant des motifs hétéroaromatiques assez complexes ont pu être obtenus. Les fonctions protiques semblent être cependant incompatibles, ainsi que les substrats trop pauvres en électrons sur la fonction amide (**Schéma 62**). Le phénol peut sans doute réagir avec le PCl<sub>5</sub> (cas du composé **III-5w**). Quant aux amides pauvres en électrons le problème est probablement dû à la difficulté d'activer la fonction amide (cas de **III-5v**) par l'agent déshydratant. Des essais à plus hautes températures (70 °C) n'ont pas permis d'obtenir le produit et seule de la

dégradation a pu être observée dans ce cas. L'encombrement stérique n'influence pas particulièrement la réaction puisque **III-5o** a pu être isolé avec un très bon rendement de 92%. Pour ce qui est du composé **III-5u**, seule l'utilisation de  $\text{Tf}_2\text{O}$  a permis d'obtenir le produit désiré.

Cette nouvelle voie de synthèse pour ce type de composé est assez intéressante car elle donne accès à des sels d'iminosydnone ayant des groupements électroattracteurs en position  $\text{N}^3$  en une seule étape alors ce qui n'était pas possible avec la méthode classique.



**Schéma 63. A.** synthèse du composé **III-5u** **B.** Synthèse du composé **III-5x**

Le composé **III-5u** par exemple ne peut pas être obtenu directement à partir de l'aminonitrile correspondant. Ce composé nécessitait donc de former une iminosydnone iodée, puis une étape de carbonylation pallado-catalysée parfois difficile à mettre en œuvre et peu reproductible (**Schéma 63. A**) est nécessaire.

Une iminosydnone supplémentaire a pu être obtenue par post-fonctionnalisation (**Schéma 63. B**). Des tests de nitration du composé **III-5t** ont en effet permis d'obtenir un équivalent de thionitrobenzoxadiazole (TNBD) qui est un fluorophore décrit dans la littérature pour émettre à plus de 530 nm (**Schéma 63. B**). Le relargage contrôlé d'un isocyanate TNBD pourrait avoir des applications intéressantes en bioconjugaison par exemple.

Les 6-*N*-aryl et 6-*N*-alkyl-iminosydnone sont des composés totalement nouveaux, des études structurales poussées sont nécessaires afin de mieux apprécier leur réactivité vis-à-vis des dipolarophiles pour d'éventuelles réactions de ligation/coupage. Le troisième paragraphe sera donc consacré à la caractérisation structurale de ces composés ainsi qu'à l'étude de leurs propriétés physicochimiques et de réactivité vis-à-vis des dipolarophiles.

### III Etude des propriétés physicochimiques des 6-N-Alkyl/Aryl iminosydnones

#### III.1 Analyses structurales

La cristallographie est une des méthodes les plus efficaces pour visualiser la structure des molécules, chaque iminosydnone a donc été systématiquement mise dans des conditions de cristallisation lente dans un mélange eau/acétonitrile et 5 structures cristallographiques ont ainsi pu être obtenues.

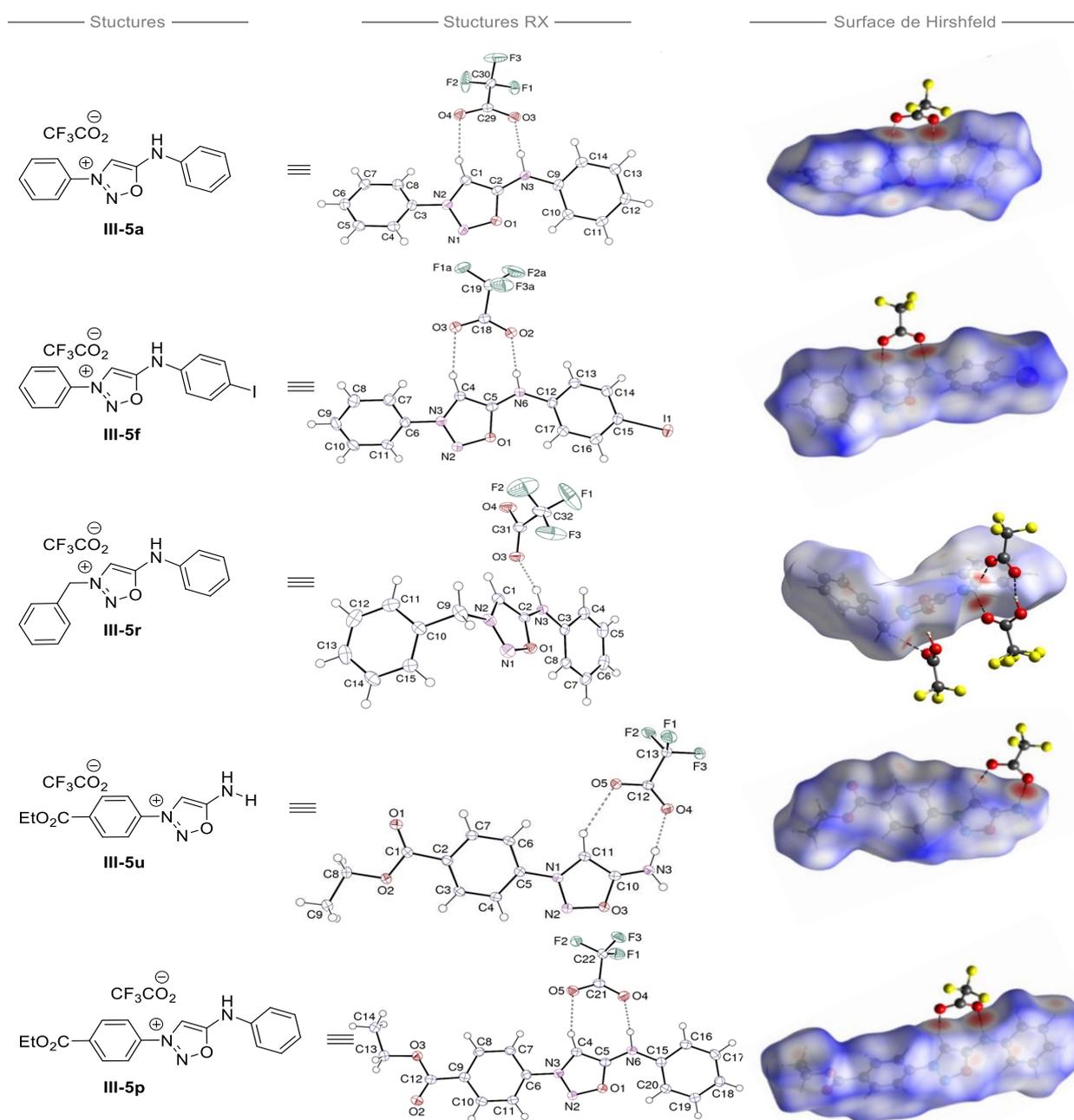
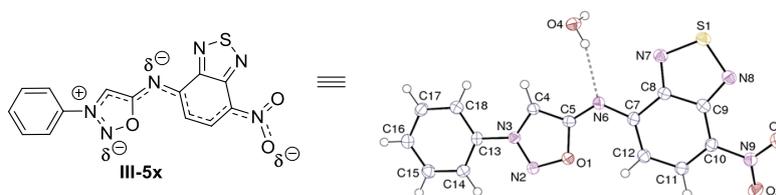


Figure 49. Structures cristallographiques et surfaces de Hirshfeld des composés III-5a, III-5f, III-5r, III-5u et III-5p

Plusieurs informations essentielles ont pu être dégagées des structures RX (**Figure 49**). Dans un premier temps il est possible de confirmer que les 6-*N*-aryl-iminosydnonnes sont obtenues sous forme de sel de trifluoroacetate. La surface de Hirshfeld modélisant les interactions au sein du cristal nous indique quant à elle que les deux oxygènes du contre ion font une liaison hydrogène avec le proton N<sup>6</sup>-H et celui du C<sup>4</sup>-H. Cela pourrait traduire la relative acidité de ses deux protons. A noter que le composé **III-5r** ne fait qu'une seule liaison hydrogène entre le N<sup>6</sup>-H et le trifluoroacétate ce qui pourrait traduire une plus faible acidité du proton C<sup>4</sup>-H de cette 3-*N*-alkyl-6-*N*-aryl-iminosydnone. Toutes ces données sont confirmées par la présence de taches d'interactions (en rouge sur la représentation de la surface de Hirshfeld). L'acidité du proton C<sup>4</sup>-H peut également être appréhendée par le fort déblindage en RMN du proton (environ 8,0 ppm). Le proton sur N<sup>6</sup> est quant à lui labile et n'est pas observable dû à son échange rapide avec le solvant deutéré (MeOD-*d*<sub>4</sub>).

De plus, des longueurs de liaisons C<sup>5</sup>-N<sup>6</sup> ont pu être calculées à l'état solide, elles indiquent que la liaison possède un fort caractère sp<sup>2</sup> puisque la valeur oscille entre 1,302 Å et 1,417 Å (longueur classique C=N 1,279 Å) alors que les iminosydnonnes ont été isolées ici sous forme protonée et non sous leur forme mésoionique. Cette information traduit la délocalisation du doublet de l'azote dans le cycle.

Pour ce qui est du composé **III-5x** la structure cristallographique indique que c'est la forme mésoionique qui a été obtenue (due au traitement basique suite à la réaction de nitration) (**Figure 50**). La longueur de la liaison C<sup>5</sup>-N<sup>6</sup> (1,305 Å) est également très proche d'une liaison double C=N. Ce résultat nous indique également l'acidité relative du N<sup>6</sup>-H qui peut être facilement déprotoné pour passer sous forme mésoionique.



**Figure 50.** Structure cristallographique du composé **III-5x**

La suite logique de l'étude a donc consisté à étudier l'acidité des protons présents sur ces sels d'iminosydnonnes. Trois composés modèles ont été sélectionnés pour la suite de l'étude, ils représentent les 3 types d'iminosydnonnes nouvellement synthétisées (**III-2a**, **III-5a**, **III-5r**).

### III.2 Détermination des pKa

La forme mésoionique et la forme protonée possèdent des maximums d'absorbance distincts, ce qui permet de corréler la présence d'une espèce au pH de la solution par mesure spectroscopique. Pour cela, une analyse d'absorbance des composés modèles à différents pH a été effectuée. Une solution de soude à 1,0 M est ajoutée progressivement à une solution d'iminosydnone dans de l'acide acétique à 0,1 M. Après chaque ajout, le pH est mesuré de façon précise à l'aide d'un pH-mètre et le spectre d'absorbance est mesuré. En traçant la mesure d'absorbance au maximum d'absorption en fonction du pH il est possible de déterminer le pKa du composé étudié (voir partie expérimentale).

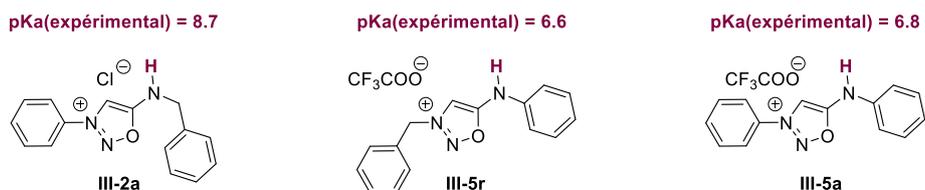


Figure 51. pKa des composés III-2a, III-5a et III-5r.

Les pKa se sont révélés être assez faibles : 8.7, 6.6 et 6.8 pour les composés III-2a, III-5r et III-5a, respectivement (Figure 51).

Des essais de suivi RMN de déprotonation en C<sup>4</sup> du composé III-5a n'ont pas permis de déterminer la valeur du pKa de cette position. Néanmoins, il est possible d'affirmer qu'en conditions basiques organiques (Et<sub>3</sub>N, 3,0 equiv.) l'abstraction du proton se fait rapidement puisque le singulet caractéristique du proton en position C<sup>4</sup> disparaît.

Connaissant maintenant les pKa des protons N<sup>6</sup>-H et donc le pH qu'il faut atteindre pour passer sous forme mésoionique, des études cinétiques ont été conduites et sont présentées dans le paragraphe suivant.

### III.3 Réactivité des 6-N-alkyl et 6-N-aryl iminosydrones

De façon similaire aux iminosydrones amide, urée ou sulfonyl, les iminosydrones aryl et alkyl se comportent comme des dipôles uniquement lorsqu'elles sont sous forme mésoionique. Elles peuvent alors réagir avec des dipolarophiles suivant un processus en deux étapes successives : une cycloaddition [3+2] suivie d'une rétro Diels-Alder (rDA) permettant la libération d'un isocyanate et d'un pyrazole (Schéma 64). Lorsque la position N<sup>6</sup> est substituée par une fonction amide, urée ou sulfonamide, les iminosydrones sont entièrement déprotonées à pH neutre et sont donc exclusivement sous forme mésoionique. En revanche, la situation est différente dans le cas d'iminosydrones ayant un groupement alkyl ou aryl. A un pH donné deux formes peuvent être présentes dans des proportions différentes en fonction du pKa du H-N<sup>6</sup> du composé étudié. Le pH devrait alors fortement influencer la vitesse de cycloaddition.

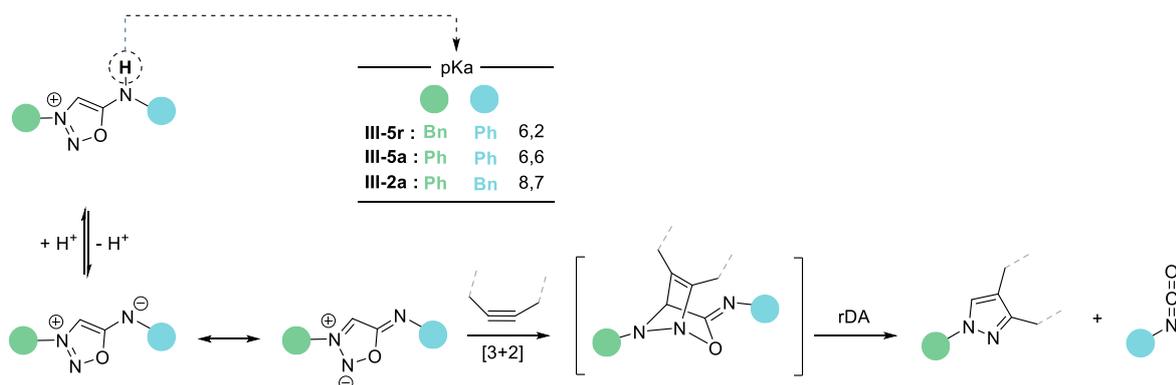


Schéma 64. Réaction entre une iminosydnone et un cyclooctyne

Les valeurs des constantes de vitesse de la réaction de ligation et coupure ont été déterminées par suivi de la décroissance de l'absorbance au maximum d'absorption de l'iminosydnone étudiée dans le milieu (Figure 52). Les mesures ont été effectuées à des concentrations de 100 μM en iminosydnone. L'utilisation d'un spectromètre UV-Visible équipé d'une cellule d'addition *in situ* permet l'ajout de la solution de cyclooctyne directement dans la solution en cours d'analyse. Cet équipement permet

d'enregistrer de façon très précise des cinétiques relativement rapides ( $\approx 1$  s). En fonction du pH du composé étudié et du milieu utilisé, la longueur d'onde d'observation est déterminée, ainsi que la droite d'étalonnage permettant d'avoir accès à la réponse UV en fonction de la concentration. Ces informations permettent, une fois le spectre UV en fonction du temps enregistré, de recalculer la concentration et donc la conversion en fonction du temps.

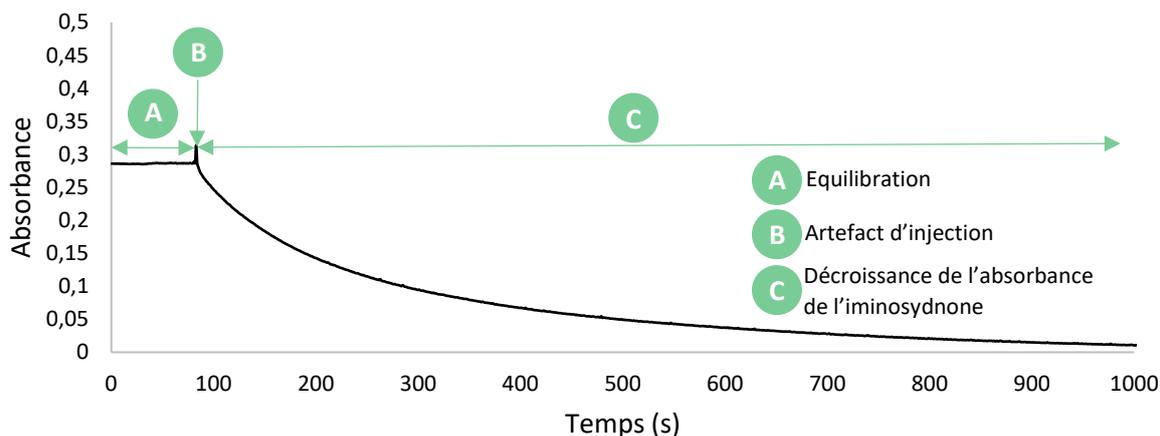


Figure 52. Exemple de cinétique

La valeur de la constante de vitesse est finalement calculée en déterminant la pente de la régression linéaire du tracé  $f(t) = (1-C) - (1/C^0)$  avec  $C^0$  la concentration initiale des réactifs et  $C$  la concentration à l'instant  $t$ .

Une première étude, a permis de déterminer les cinétiques de réaction des trois composés modèles (III-5r, III-5a, III-2a,) avec le DBCO à différent pH (5,0, 6,0, 7,4, 8,0, 8,8, 9,5) (Figure 53). Pour s'assurer de la reproductibilité des mesures, les expériences ont été effectuées en duplicata ce qui permet de calculer des déviations standards.

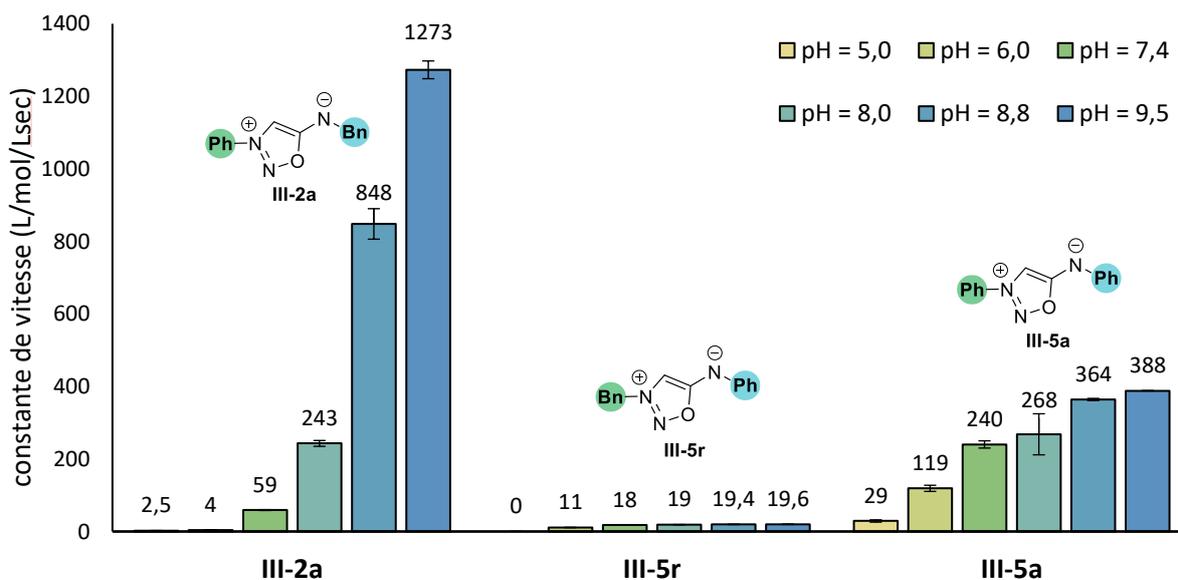
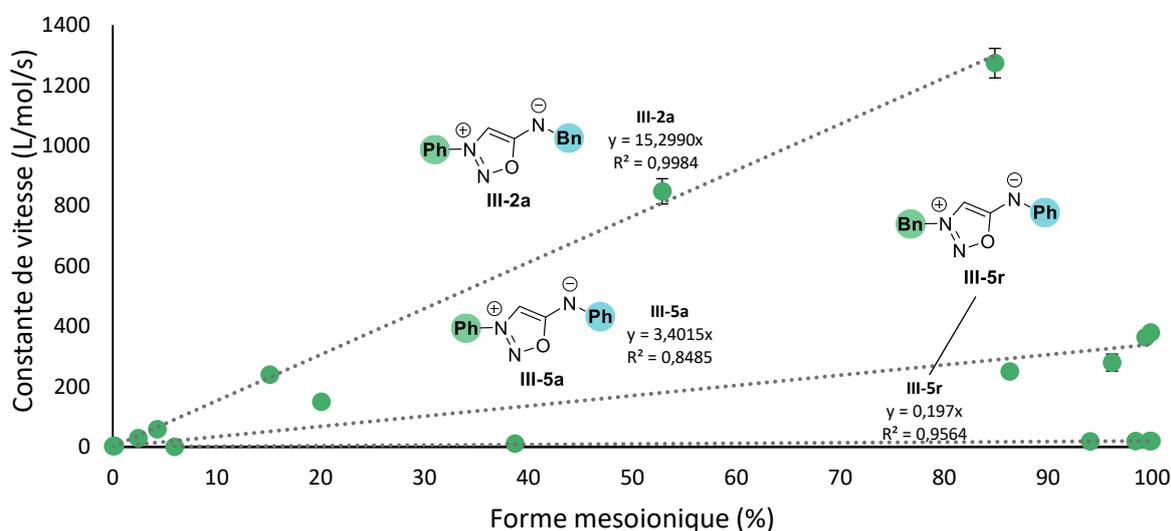


Figure 53. Influence du pH sur la constante de vitesse de la réaction SPICC avec le DBCO ( $C = 100 \mu\text{M}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $n = 2$ ).

Cette première étude montre tout d'abord la remarquable influence de la structure des iminosydnones sur leur réactivité : plus l'enrichissement électronique semble important sur N<sup>6</sup> plus l'iminosydnone est réactive (comparer **III-2a** avec **III-5a**) et plus l'enrichissement électronique est important sur N<sup>3</sup> moins l'iminosydnone est réactive (comparer **III-5a** avec **III-5r**). Cependant à pH physiologique 7,4 l'aryl iminosydnone **III-5a** est 4 fois plus réactive que l'alkyl-iminosydnone **III-2a** puisque la forme mésoionique est 20 fois plus présente. Le motif sur N<sup>3</sup> est également assez important puisqu'à pH physiologique **III-5r** reste le moins réactif des trois substrats étudiés. Toutes ces valeurs de constante de vitesse peuvent être corrélées en fonction du pourcentage de forme mésoionique dans la solution. Le pH a une remarquable influence sur la réaction, par exemple pour le composé **III-2a** la cinétique est 510 fois plus élevée à pH 9,5 qu'à pH 5,0.

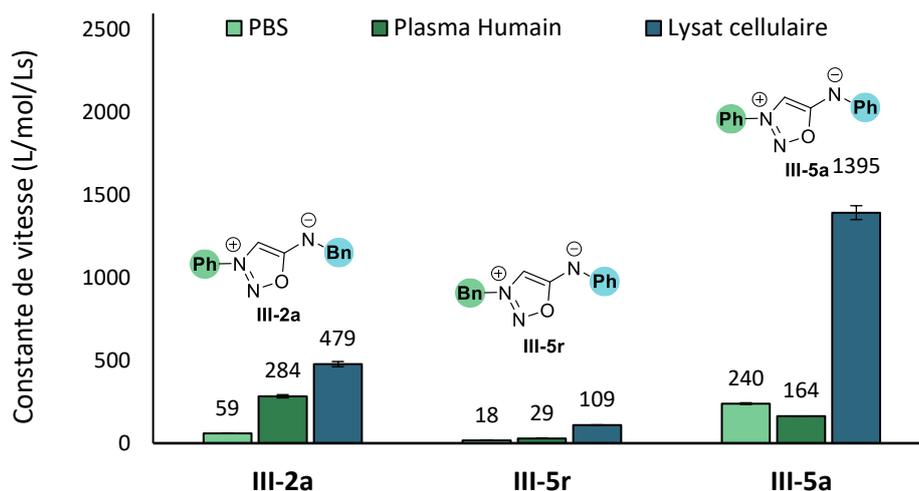
Le pKa étant connu il est aisé de déterminer le pourcentage de forme mésoionique pour chaque pH utilisé. Ainsi, avec un pKa de 8,7 l'iminosydnone **III-2a** est présente à hauteur de seulement 4,7% sous forme mésoionique à pH = 7,4. En représentant la constante de vitesse en fonction de la concentration de mésoionique il est possible d'obtenir des corrélations linéaires pour les trois composés étudiés (**Figure 54**).



**Figure 54.** Evolution de la constante de vitesse en fonction du pourcentage de forme mésoionique

La valeur de la pente traduit directement la réactivité intrinsèque du dipôle étudié, ainsi l'alkyl-iminosydnone **III-2a** est 4,5 fois plus réactive que **III-5a** et 78 fois plus réactive que **III-5r**. Ce graphique montre également que les droites passent par l'origine ce qui d'un point de vue chimique indique que la forme protonée ne cycloadditionne pas. Ce résultat était prédictible puisque sous forme protonées les iminosydnones ne sont pas des dipôles susceptibles de réagir avec des dipolarophiles.

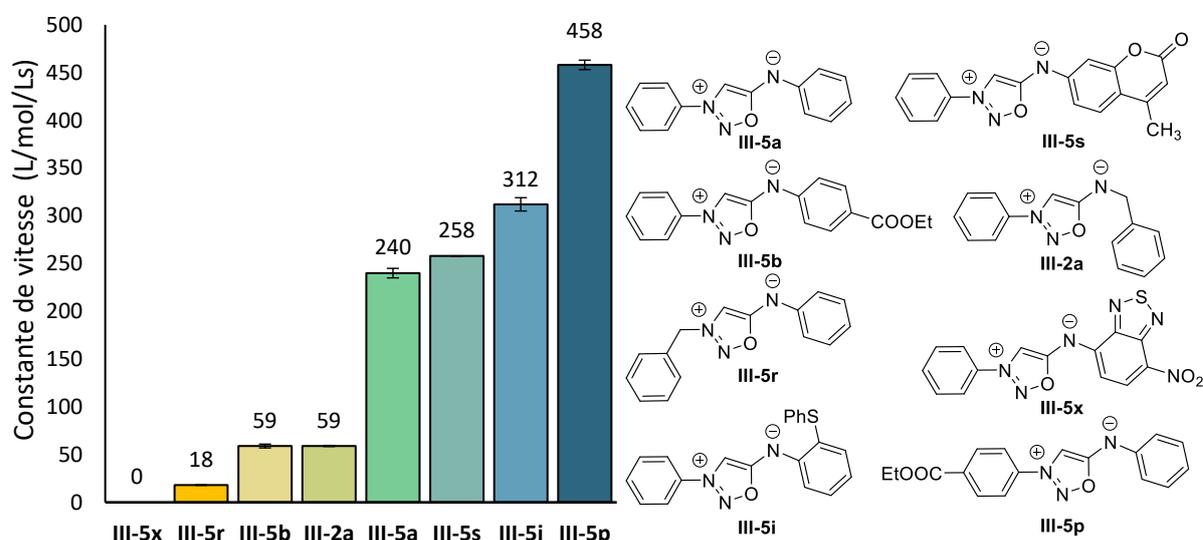
Afin d'envisager des applications dans des milieux complexes, des cinétiques ont également été réalisées dans du lysat cellulaire et dans du plasma humain (**Figure 55**).



**Figure 55.** Influence du milieu sur la constante de vitesse de la réaction SPICC avec le DBCO (C = 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, n = 2, pH = 7,4)

Les cinétiques ont tendance à être légèrement plus élevées dans les milieux complexes que dans le PBS. Ce résultat a déjà été observé par Wagner et son équipe.<sup>113</sup> Dans cette étude les auteurs ont mis en évidence que la présence de protéines dans le milieu accélère la réaction SPAAC. Des effets de concentration locale pourraient également être responsables de cette accélération. Dans notre cas la réaction SPICC est donc toujours aussi efficace et rapide malgré la complexité du milieu.

Ensuite, l'influence de la structure des iminosynones a été évaluée en calculant des cinétiques sur différents substrats modèles comportant une variété électronique sur les azotes N<sup>3</sup> et N<sup>6</sup> (**Figure 56**).



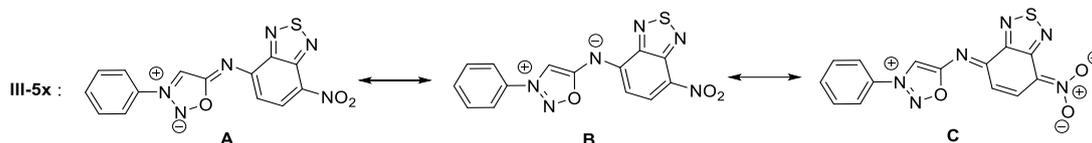
**Figure 56.** Influence de la structure de l'iminosynone sur la constante de vitesse de la réaction SPICC avec le DBCO (C = 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, n = 2, pH = 7,4)

Les résultats semblent montrer encore une fois que plus l'azote N<sup>6</sup> est riche et plus N<sup>3</sup> est pauvre en électrons, plus la cinétique est rapide. Mais ce résultat est à contrebalancer avec l'influence du pKa sur la cinétique de cycloaddition puisque plus l'azote N<sup>6</sup> est riche électroniquement et plus le pKa sera

<sup>113</sup> D. Warther, E. Dursun, M. Recher, S. Ursuegui, M. Mosser, J. Sobska, W. Krezel, G. Chaubet, and A. Wagner, *Org. Biomol. Chem.*, 19/23 (2021), 5063–67.

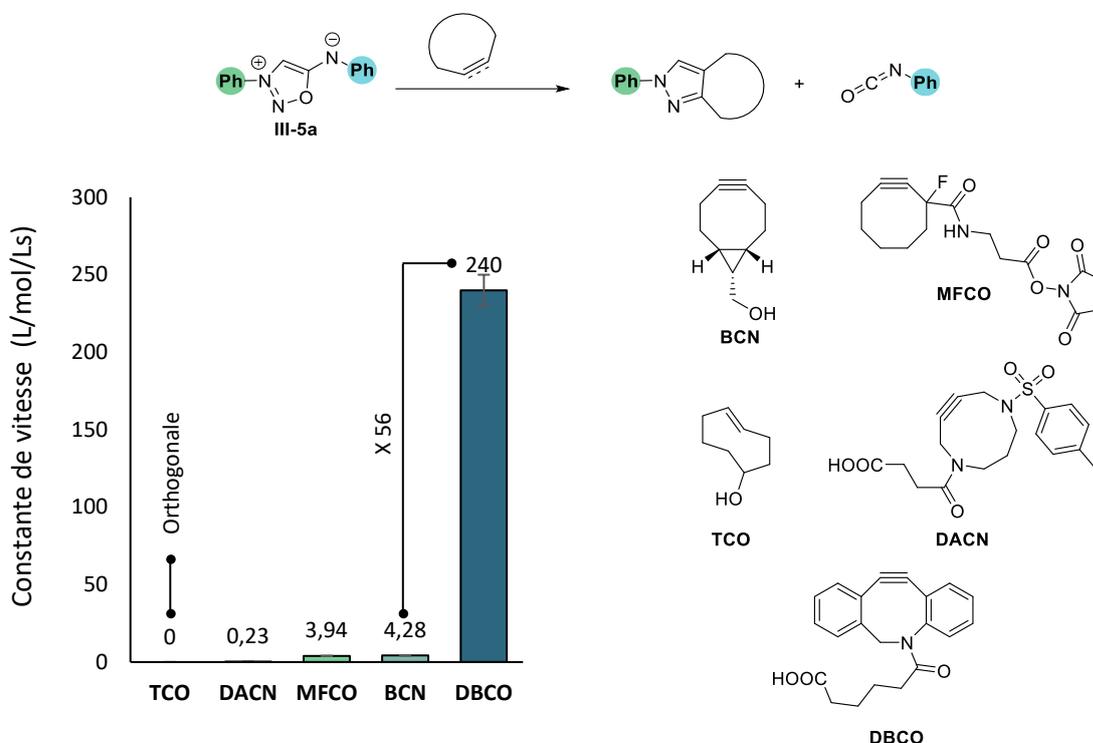
élevé, le dipôle sera donc intrinsèquement plus réactif mais la forme mésoionique sera moins présente à un pH donné. La réactivité des aryl iminosydnones est donc un subtil équilibre entre la réactivité du dipôle et le pKa de de la fonction N-H en position 6.

Malheureusement, la cinétique de cycloaddition s'est révélée être extrêmement lente avec le composé **III-5x**. Ce substrat aurait pu être utile pour le relargage du fluorophore TNBD. Cette absence de réactivité pourrait provenir du groupement nitro qui favorise les formes mésomères inactives (forme **B** et **C** indiquées dans le **Schéma 65**).



**Schéma 65.** Formes mésomères du composé **III-5x**

Ensuite, l'influence de la structure du dipolarophile a été étudiée (**Figure 57**).



**Figure 57.** Influence de la structure du dipôle sur la constante de vitesse de la réaction SPICC avec **III-5a** ( $C = 100 \mu\text{M}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $n = 2$ ,  $\text{pH} = 7,4$ )

Tout d'abord, le DBCO est de loin le plus réactif des cyclooctynes testés, jusqu'à 56 fois plus réactif que le BCN et 60 fois plus que le MFCO. Le cyclononyne DACN est quant à lui le moins réactif, ce qui est certainement dû à sa tension de cycle moins forte que les trois autres. Le TCO, très utilisé comme dipolarophile dans la réaction IEDDA, s'est révélé totalement inerte avec **III-5a**.

Les aryls iminosydnones sont donc totalement orthogonales à la réaction de cycloaddition à demande inverse (Tz/TCO) et pourraient donc être utilisées pour des applications de double click avec par exemple une sydnone aryl comportant dans sa structure une tétrazine (**Schéma 66**).

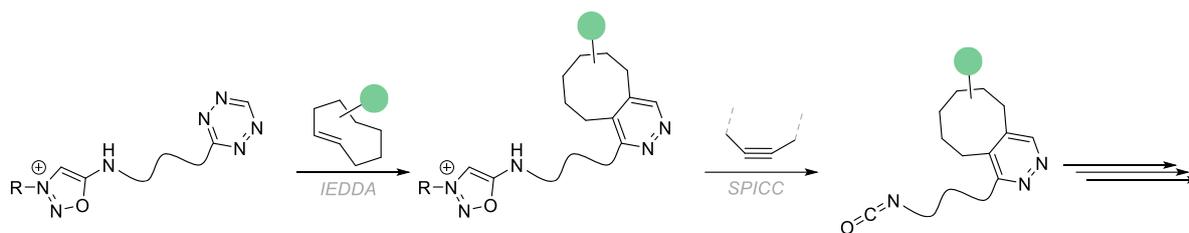


Schéma 66. Double click IEDDA/SPICC

Tous les résultats obtenus sont assez encourageants pour la suite de l'étude puisque les constantes de vitesse sont jusqu'à 1 million de fois plus rapide que celles décrites dans la littérature avec des iminosynones<sup>1</sup> ou même 5000 fois plus rapide que la SPAAC qui est la réaction référence dans le domaine <sup>114</sup>.

L'influence de la température a finalement été investiguée, les cinétiques de cycloaddition ont donc été calculées à différentes températures allant de 10 °C à 37 °C (Figure 58).

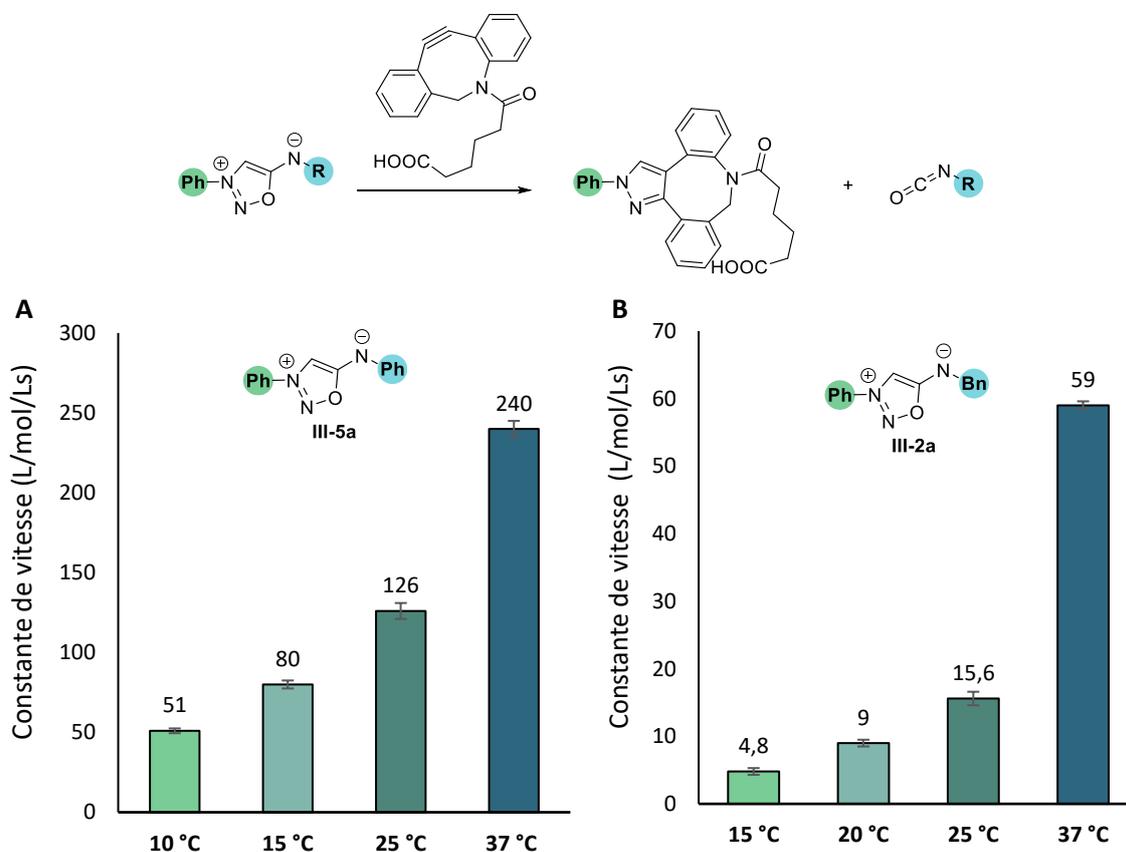


Figure 58. Influence de la température sur la constante de vitesse de la réaction SPICC avec III-5a ou III-2a (C = 100 μM, PBS/DMSO, n = 2, pH = 7,4)

La température a comme attendu une influence assez importante sur la cinétique réactionnelle : plus elle est faible plus la réaction est lente. Cela indique que la réaction est endothermique.

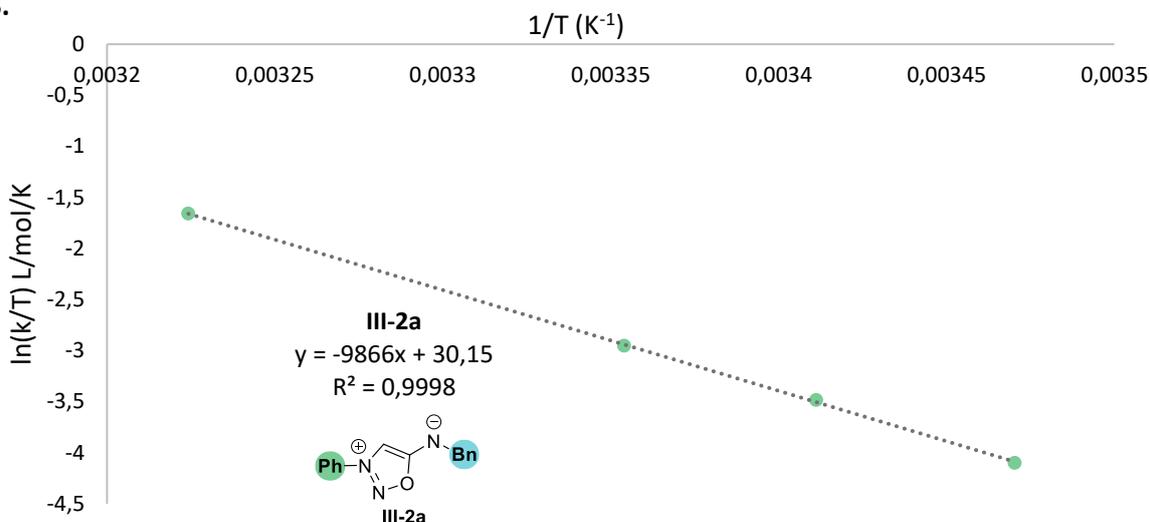
Pour finir, il est possible de tirer d'autres informations des expériences de variation de la température. En effet, en utilisant le model d'Eyring-Polanyi il est possible de tracer  $\ln(k/T) = f(1/T) = aT + b$  (Figure 59).

<sup>114</sup> D. Svatunek, N. Houszka, T. A. Hamlin, F. M. Bickelhaupt, and H. Mikula, *Chem. Eur. J.*, 25/3 (2019), 754–58.

A.

$$\ln \frac{k}{T} = \left( \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right) - \left( \frac{\Delta G^\ddagger}{R} \right) \frac{1}{T}$$

B.



C.

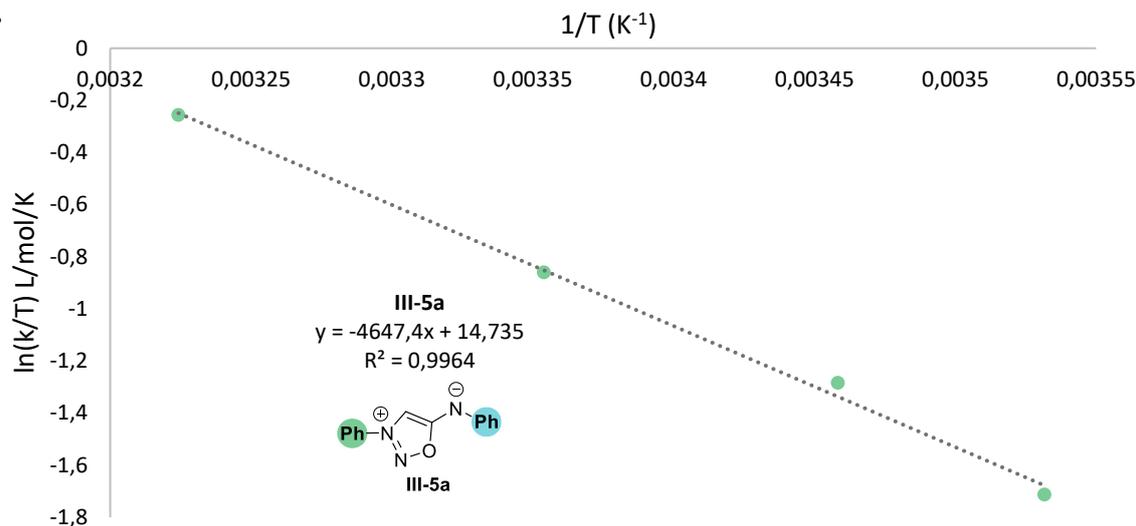


Figure 59. A. Régression linéaire de l'équation D'Eyring-Polanyi,  $k_B$  : constante de Boltzmann,  $h$  : constante de Planck B. Régression D'Eyring-Polanyi pour le composé **III-2a**, C. pour le composé **III-5a**.

Cette linéarisation permet de déterminer l'énergie d'activation de la réaction de cycloaddition (Tableau 16).

Tableau 16. Paramètres déterminés par régression d'Eyring-Polanyi

Entrée	IS	a	b	$\Delta_r H^\ddagger$	$\Delta_r S^\ddagger$
1	<b>III-2a</b>	-9866	30,15	19,7 kcal/mol	13,3 kcal/mol/K
2	<b>III-5a</b>	-4647	14,73	9,0 kcal/mol	-17,5 kcal/mol/K

Dans le cas du composé **III-2a**, l'enthalpie d'activation expérimentale est de 19,7 kcal et l'entropie est de 13,3 kcal/K. Ces valeurs sont dans les mêmes ordres de grandeurs que celles décrites dans la littérature.<sup>68</sup> En revanche, dans le cas du composé **III-5a** l'enthalpie d'activation est très faible comparée à celle obtenue avec **III-2a**.

L'entropie d'activation de réaction indique la molécularité de l'étape déterminant la vitesse de la réaction, ce qui traduit directement si les deux réactifs s'associent ou se dissocient lors du processus. Les valeurs positives suggèrent une augmentation de l'entropie, ce qui traduit un mécanisme dissociatif. A l'inverse si l'entropie est négative, la réaction déterminant la vitesse de réaction est associative.

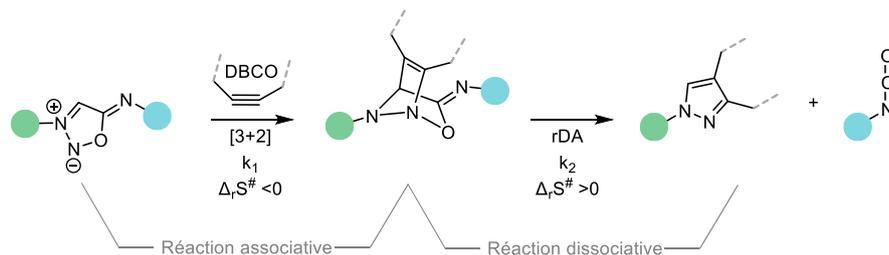


Schéma 67. Cycloaddition et retro Diels-Alder

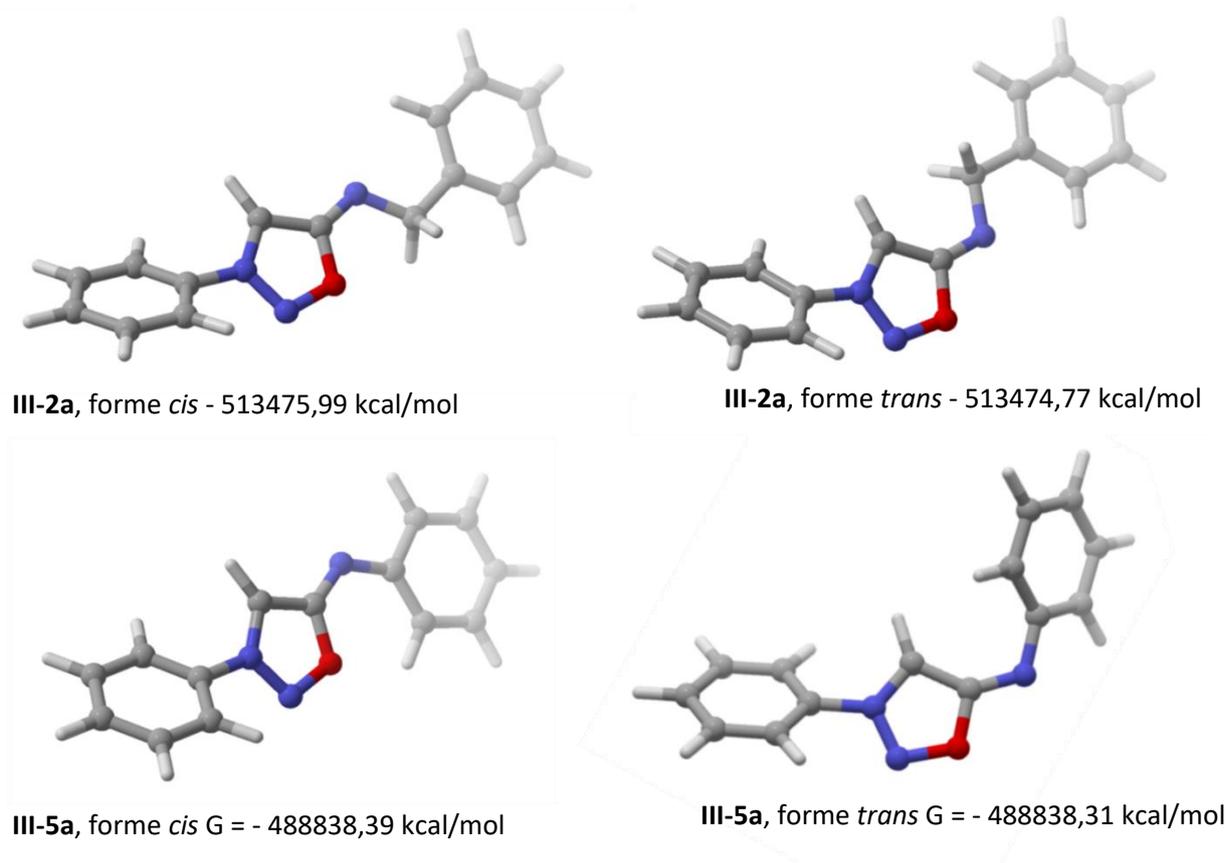
Les résultats obtenus sont assez surprenants puisque la réaction entre **III-2a** et le DBCO induit une entropie d'activation calculée positive, la valeur de cinétique serait alors calculée sur une réaction dissociative, soit la réaction de rétro Diels-Alder. La valeur de la constante de vitesse de la cycloaddition serait alors beaucoup plus élevée que celle de la rDA. A l'inverse, dans le cas de l'iminosydnone arylique **III-5a** l'entropie d'activation est négative ce qui cette fois-ci traduit que la vitesse est calculée sur la réaction de cycloaddition. La constante de vitesse de la rétro Diels-Alder serait alors beaucoup plus grande que celle de la cycloaddition.

Ces deux résultats opposés sont assez surprenants puisque les deux composés modèles ne possèdent pas une différence chimique significative, aucune explication ne permet actuellement de conclure sur ces données. Les valeurs expérimentales ne sont peut-être pas assez précises pour calculer avec exactitude les paramètres thermodynamiques. Une petite variation sur une constante de vitesse entraîne une variation significative sur l'enthalpie réactionnelle expérimentale. De plus, la ligation coupure est un processus en deux étapes qu'il est difficile de modéliser avec les équations d'Eyring qui elles traduisent des réactions simples.

#### III.4 Calcul DFT

Après avoir déterminé les paramètres influençant la réaction ainsi que les valeurs expérimentales d'énergie d'activation, des calculs DFT ont été menés afin de mieux comprendre les résultats obtenus dans la partie précédente. Cette partie a été effectuée par le Dr. Grégory Pieters de notre unité de recherche en collaboration étroite avec le Prof. Pier-Alexandre Champagne du *New Jersey Institute of Technology* aux USA. Dans un premier temps une optimisation rapide des structures au niveau MM2 permet d'avoir une idée de la structure tridimensionnelle des composés. Les structures optimisées sont ensuite réutilisées pour déterminer l'énergie libre d'activation de l'état de transition de la cycloaddition [3+2].

Dans notre cas deux conformations d'énergie différentes sont possibles, la forme *cis* et la forme *trans*. (Figure 60). Pour calculer l'énergie des états de transition la forme la plus basse en énergie est prise comme base pour le calcul.



**Figure 60.** Calculs énergétiques des formes *cis* et *trans* pour les composé **III-2a** et **III-5a** sous forme mésoionique.

Dans les deux cas la forme *trans* est la plus basse en énergie et donc la plus stable, avec des écarts observés entre les deux formes de 1,217 kcal/mol pour **III-2a** et 0,07 kcal/mol pour **III-5a**. Cette différence d'énergie assez faible traduit une répartition de population similaire entre les deux formes, l'équilibre *cis-trans* est sans doute extrêmement rapide.

En s'inspirant des travaux de Houk,<sup>115</sup> et en collaboration avec Pier-Alexandre Champagne, les états de transitions ont été déterminés pour les deux composés modèles **III-5a** et **III-2a** avec des niveaux de calculs M06-2X avec une base 6-31+G(d,p) (**Figure 61**). Pour modéliser le DBCO, la chaîne aliphatique a été réduite pour optimiser les temps de calcul, cette approximation implique que la fonction acide du DBCO n'est pas impliquée dans des interactions non covalentes dans l'état de transition.

<sup>115</sup> H. Tao, F. Liu, R. Zeng, Z. Shao, L. Zou, Y. Cao, J. Murphy, K. N. Houk, Y. Liang, *Chem. Comm.*, (2018), 54, 5082-5085.

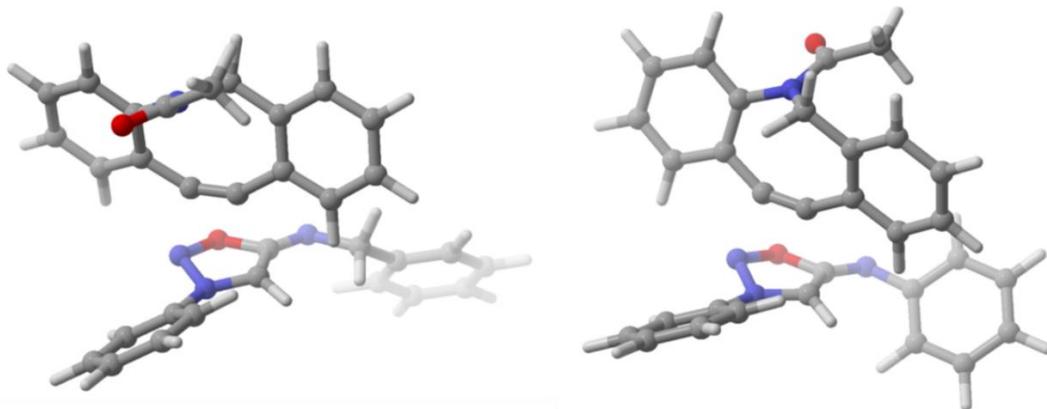


Figure 61. A. Etat de transition obtenu avec III-2a et le DBCO. B. Etat de transition obtenu avec III-5a et le DBCO

Les calculs montrent que la réaction entraîne une courbure du dipôle qu'il est possible de visualiser sur les états de transition obtenus. La visualisation de la fréquence de vibration permet également de confirmer ce phénomène. Les enthalpies réactionnelles ont ensuite été déterminées, ainsi la réaction entre III-2a et le DBCO possède une enthalpie d'activation de 20,0 kcal/mol alors que la réaction avec III-5a a une enthalpie de 20,5 kcal/mol (Tableau 17).

Tableau 17. Valeurs thermodynamiques calculées vs expérimentales

Entrée	IS	$\Delta_r H^\#$ expérimental	$\Delta_r H^\#$ calculé
1	III-2a	19,7 kCal/mol	20,0 kcal/mol
2	III-5a	9,0 Kcal/mol	20,5 kcal/mol

Le profil réactionnel complet pour la réaction de III-2a avec le DBCO modèle a ensuite été déterminé (Schéma 68.). A noter qu'un profil similaire aurait été obtenu avec III-5a.

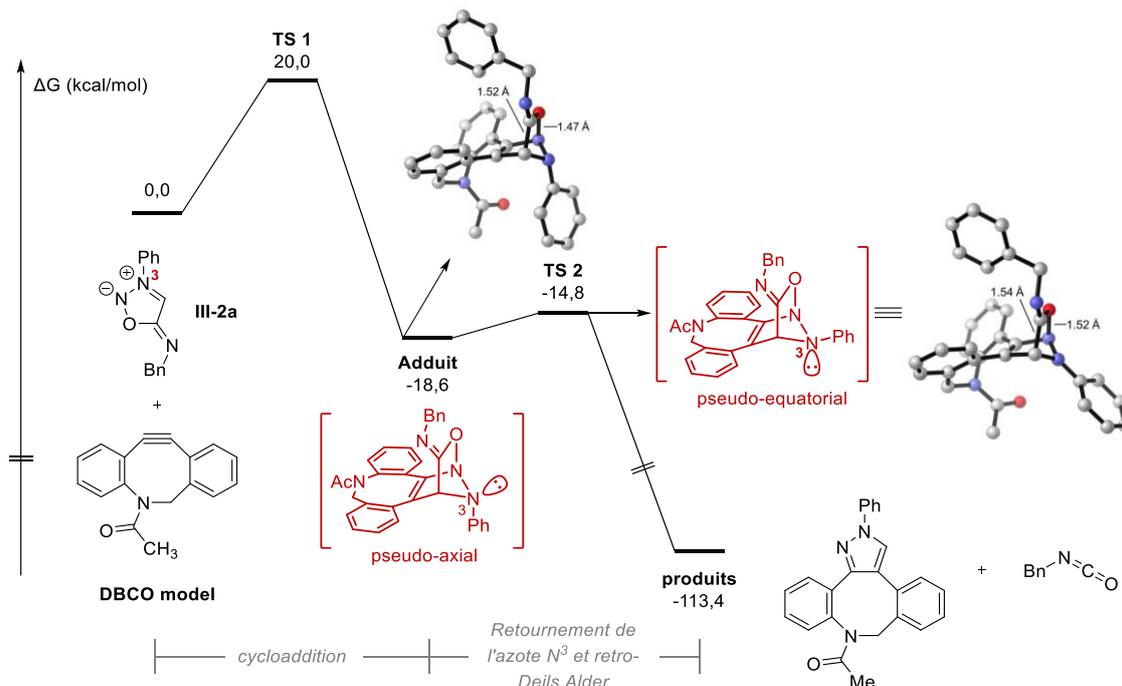
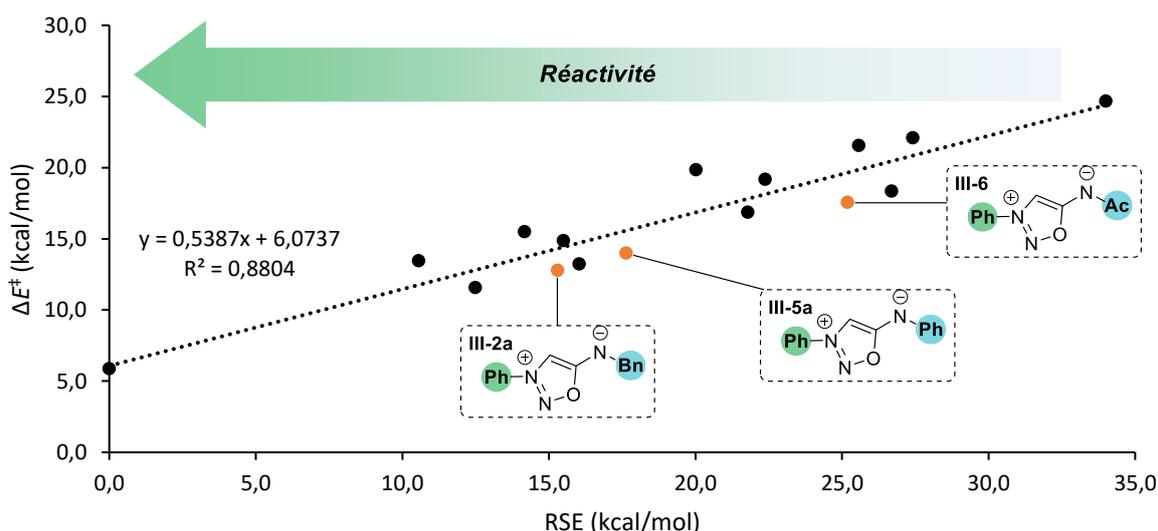


Schéma 68. Profil de réaction de III-2a avec le DBCO modèle. Les énergies libres en kcal/mol ont été obtenues au niveau de théorie M06-2X/6-31+G(d,p)/PCM(H<sub>2</sub>O) // M06-2X/Def2TZVPP/PCM(H<sub>2</sub>O)

La cycloaddition passant par **TS1** a une barrière d'activation de 20,0 kcal/mol et conduit à l'adduit avec une énergie libre de réaction de -18,6 kcal/mol. En raison des exigences orbitales pendant la cycloaddition, le substituant phényle en N<sup>3</sup> est dans une position pseudo-axiale sur la structure bicyclique de l'adduit. La réaction de rétro-Diels-Alder s'effectue cependant *via* **TS2** pour former les produits : le pyrazole et l'isocyanate. Il est intéressant de noter que la fréquence imaginaire de ce TS correspond principalement au retournement autour de l'azote N<sup>3</sup>, plaçant le substituant phényle dans une position pseudo-équatoriale. Après ce changement conformationnel, aucun intermédiaire stable ne peut être localisé et la rétro-Diels-Alder se produit spontanément. Ceci est en accord avec des cycloadditions similaires entre sydnones et cyclooctynes.<sup>116</sup> Cette étape est très exergonique (-94,7 kcal/mol), en raison de la formation du produit pyrazole aromatique très stable.

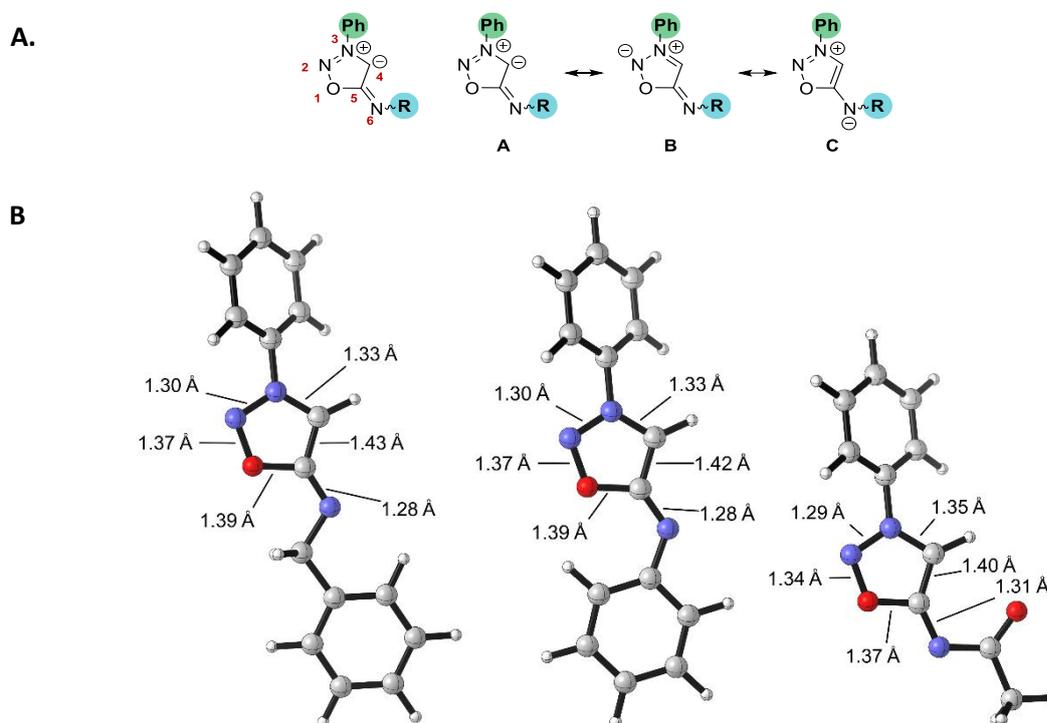
Pour comparer la réactivité entre les aryl iminosydnones et les alkyl iminosydnones, l'énergie de stabilisation de résonance (RSE) a été déterminée pour les deux composés modèles au niveau M06-2X/6-311+G(d,p)/M06-2X/6-31G(d) et cette énergie a été corrélée en fonction de leur énergie d'activation. L'énergie de stabilisation par résonance traduit le caractère aromatique d'une molécule, en effet dans notre cas plus la RSE est élevée (i.e plus la molécule est stable) plus la cycloaddition (qui entraîne une désaromatization du système) sera lente. Ces données ont été implémentées à celles déjà obtenues par le groupe de Champagne pour d'autres dipôles mésoioniques (structure de tous les mésoioniques dans l'article de Houk et son équipe).<sup>110</sup> Le graphe de la **Figure 62** montre que plus l'énergie de stabilisation de résonance est faible plus l'enthalpie d'activation est faible et donc plus le dipôle est réactif. A titre d'exemple l'iminosydnone amide **III-6** est d'avantage sur la droite de la régression que **III-2a** et **III-5a**, expérimentalement ce dipôle cycloadditionne 150 000 fois moins rapidement que **III-2a** par exemple. Ces informations traduisent en d'autres termes que plus le groupement en position N<sup>6</sup> est électrodonneur, plus l'énergie de RSE sera faible et par conséquent le dipôle sera plus réactif et sa constante de cycloaddition sera plus élevée. En comparant l'énergie d'activation de **III-2a** et **III-5a** (20,0 kcal/mol vs 20,5 kcal/mol) il est possible de déterminer que **III-2a** cycloadditionne théoriquement 2,3 fois plus vite que **III-5a**. La valeur expérimentale est quant à elle de 4,5.



**Figure 62.** Corrélation entre l'énergie d'activation de la cycloaddition (kcal/mol, avec acétylène) et l'énergie de stabilisation de résonance (kcal/mol, calculée à l'aide de l'équation eq. SI-2) pour différents dipôles (Cf partie expérimentale). Chaque point noir représente un mésoionique (Cf partie expérimentale<sup>110</sup>)

<sup>116</sup> E. Yen-Pon, F. Buttard, L. Frédéric, P. Thuéry, F. Taran, G. Pieters, P. A. Champagne, and D. Audisio, *JACS Au*, 1/6 (2021), 807–18.

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive sur les iminosydnones, les mésoioniques peuvent être décrits par diverses structures de résonance telles que **A**, **B** et **C** (**Schéma 69 A**).



**Schéma 69.** A. Structures de résonance des dipôles B. géométries et longueurs de liaison de **III-2a**, **III-5a** et **III-6** optimisées par DFT.

Bien que la structure **C** soit couramment utilisée, il a été montré par Champagne et Houk qu'elle ne représente pas la structure réelle de ces molécules.<sup>110</sup> En effet, dans les münchnones ou les sydnones, la liaison entre C<sup>5</sup> et le substituant exocyclique est courte et présente un caractère clairement sp<sup>2</sup>. Les structures de résonance **A** ou **B** sont plus représentatives. Pour les iminosydnones, cette longueur de liaison est liée à la contribution moyenne de la structure de résonance **C** à la structure globale. Ce caractère imine est notamment observable par infrarouge avec une bande caractéristique très intense vers 1670 cm<sup>-1</sup>. Les conformations les plus stables des iminosydnones **III-2a**, **III-5a** et **III-6** sont représentées sur le **Schéma 69 B**. Pour les substituants alkyl **III-2a** ou aryl **III-5a** en N<sup>6</sup>, la liaison C<sup>5</sup>-N<sup>6</sup> a une longueur similaire (1,28 Å) à celle de l'iminosydnone non substituée (1,27 Å, non montré).<sup>110</sup> Pour **III-6**, qui possède un groupe acétyl attracteur d'électrons en N<sup>6</sup>, la longueur de la liaison augmente à 1,31 Å, ce qui indique un caractère de liaison simple plus prononcé. Cela laisse supposer une plus grande contribution de **C** à la structure globale de **III-6**, car la densité électronique sur N<sup>6</sup> est plus stabilisée en raison du substituant acétyle.

Comme cela a été montré précédemment,<sup>110</sup> les dipôles mésoioniques qui présentent une plus grande contribution de la structure de résonance " aromatique " **C** sont moins réactifs dans les cycloadditions.

Les calculs sont donc bien en accord avec les tendances observées expérimentalement, malheureusement les valeurs obtenues ne correspondent pas avec la théorie dans le cas de l'aryl-iminosydnone (**Tableau 17**) puisque des erreurs de près de 50% ont été constatées. De plus amples investigations sont nécessaires pour pouvoir pleinement apprécier les résultats obtenus.

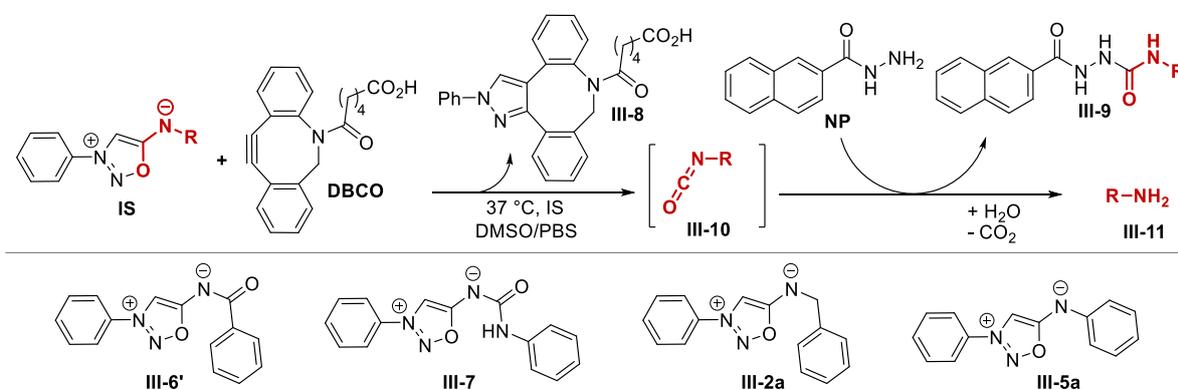
Pour continuer nos investigations nous nous sommes intéressés au produit de coupure de la réaction SPICC qui devrait être un isocyanate alkylique ou aryle. La nature des isocyanates relargués est

sensiblement différente des isocyanates activés par un groupement carbonyle, sulfonyle ou phosphorylé libérés avec les iminosydnone décrites jusque là. Une étude complète sur les produits de relargage est donc nécessaire.

### III.5 Réactivité des isocyanates relargués

Pour prouver que la réaction de retro Diels-Alder génère bien un isocyanate, des expériences de capture dans le PBS ont été mises en place. L'utilisation de nucléophile *alpha* comme l'hydrazide naphthoïque permet de capturer l'isocyanate potentiellement formé et la quantification par HPLC du produit qui en résulte pourrait aider à déterminer à la fois si l'isocyanate est bien formé mais également à quantifier sa formation dans le milieu. Une étude comparative a donc été menée en choisissant 4 types d'iminosydnone : une iminosydnone amide, une urée, une alkyl et une aryl (**Tableau 18**).

**Tableau 18.** Expérience de piégeage des isocyanates



Entrée	IS	Conv. IS	$k \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Temps	III-8	III-9	III-10	III-11
1	III-6'	> 99%	$10^{-3}$	15 h	> 98%	0%	n.d	> 99%
2	III-7	> 99%	5	2 h	> 98%	0%	n.d	> 99%
3	III-2a	> 99%	59	10 min	> 98%	28%	n.d	23%
4	III-5a	> 99%	240	10 min	> 98%	41%	n.d	6%

**n.d** : non détecté, **IS** : iminosydnone, **Temps** : Temps de réaction (entre ajout du DBCO et injection en HPLC)

Dans le cas de l'iminosydnone amide **III-6'** 15 heures sont nécessaires pour avoir une conversion totale et seul le produit issu de l'hydrolyse de l'isocyanate est détecté à hauteur de plus 99%. C'est un résultat assez prévisible puisque l'isocyanate relargué étant très électrophile en raison de la présence d'un carbonyle en position *alpha* est donc très peu stable dans l'eau et subit une hydrolyse spontanée. L'iminosydnone **III-7** donne des résultats similaires au bout de 2 heures. Par contre, dans le cas de l'alkyl iminosydnone **III-2a**, la réaction est totale en moins de 10 min et cette fois-ci le produit de capture de l'isocyanate est détecté à hauteur de 28%, ce qui prouve que c'est bien un isocyanate qui se forme et qu'il est assez stable pour réagir avec l'hydrazide naphthoïque même en milieu aqueux. Le rendement n'est cependant pas très élevé, et une quantification de la benzylamine révèle un rendement de 23% après 10 min. Il y a donc un mélange de benzylamine isocyanate, de benzylamine et de produit de capture dans le milieu. Dans le cas de l'aryl-iminosydnone **III-5a** le rendement en produit de capture est sensiblement plus élevé ce qui semble logique au vu de la plus grande réactivité du phenyl-isocyanate comparé au benzyl-isocyanate.<sup>117</sup> La quantification de l'aniline montre quant à elle un faible taux d'hydrolyse (moins de 10%) après 10 min. L'addition des pourcentages des produits d'hydrolyse

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

et de ceux issus de la réaction avec l'hydrazide naphthoïque ne fait pas 100%. Aucune des méthodes de spectrométrie de masse testée n'a permis de détecter l'isocyanate, il est donc possible que le pourcentage restant corresponde à l'isocyanate qui n'a pas réagi et à d'éventuels produits secondaires. Les isocyanates relargués après l'étape de rétro Diels-Alder sont donc capables de réagir rapidement avec des nucléophiles même en milieu aqueux. Ainsi, les iminosydnonnes développées dans ce projet peuvent être considérées comme des isocyanates protégés pouvant être libérés par réaction bioorthogonale. Ces iminosydnonnes sont donc des générateurs d'isocyanates activables par addition de cyclooctynes dans des conditions douces compatibles avec les milieux biologiques. Les paragraphes suivants cherchent à tirer profit de ces propriétés remarquables et de tenter d'utiliser ces iminosydnonnes pour diverses applications biologiques.

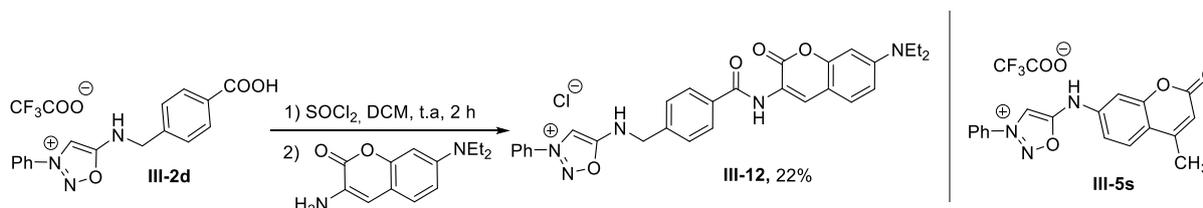
## IV Relargage contrôlé d'alkyl/aryl isocyanates pour des applications de bioconjugaison.

### IV.1 Synthèse et caractérisation des sondes fluorogéniques

L'utilisation des isocyanates en bioconjugaison est assez réduite et la principale utilisation reste la fonctionnalisation de protéines sur les résidus nucléophiles (cystéine, lysine, tryptophane, tyrosine). Cette ancienne méthode est assez efficace malgré son manque de sélectivité. Elle a notamment permis d'induire des modifications structurales des protéines *in vitro* pour, par exemple, effectuer des quantifications par spectrométrie de masse.<sup>118</sup>

Dans cette étude nous avons voulu déterminer si notre système permettait de fonctionnaliser une protéine dans des conditions réactionnelles douces et biocompatibles.

Pour suivre plus facilement l'isocyanate relargué, un rapporteur diethylaminocoumarine a été synthétisé par couplage peptidique à partir de **III-2d** préalablement traité par du chlorure de thionyle (**Schéma 70**).



**Schéma 70.** Synthèse de **III-12**

Le composé **III-12** a été obtenu avec un rendement de 22% après purification. **III-5s**, précédemment synthétisé, a également été utilisé dans la suite de l'étude. Ces deux composés permettent de libérer un isocyanate coumarine alkyl et aryl respectivement.

Dans un premier temps les propriétés photophysiques des deux composés modèles ont été déterminées (**Schéma 71**).

<sup>118</sup> D. E. Mason and D. C. Liebler, *Journal of Proteome Research*, 2/3 (2003), 265–72.

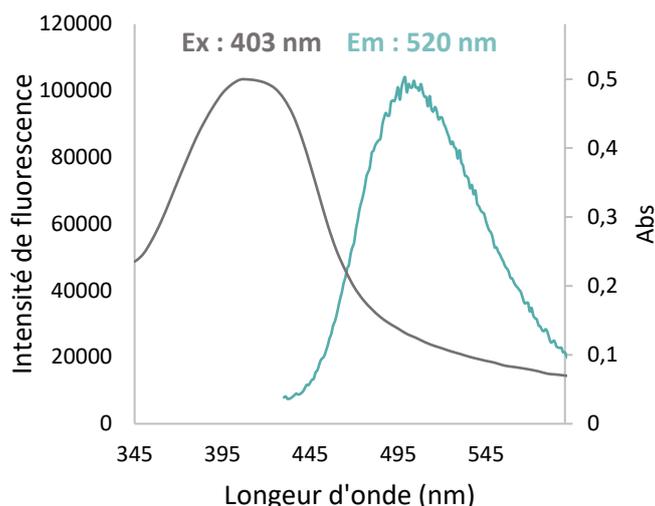


Schéma 71. Spectre d'absorbance et d'excitation de III-12

III-12 présente des caractéristiques physicochimiques intéressantes, puisqu'il s'excite à une longueur d'onde un peu plus élevée que 400 nm. Cette spécificité lui permet d'être utilisé sur des microscopes plein champ et confocaux, notamment pour de l'imagerie cellulaire. Une cinétique de ligation coupure SPICC a également été réalisée pour déterminer la vitesse de la réaction et une constante de vitesse de 208 L/mol/s a été obtenue (Schéma 72).

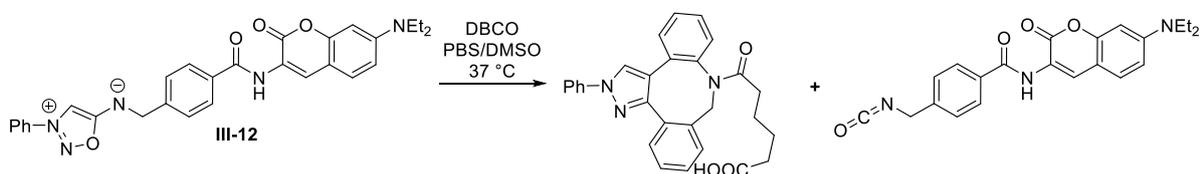
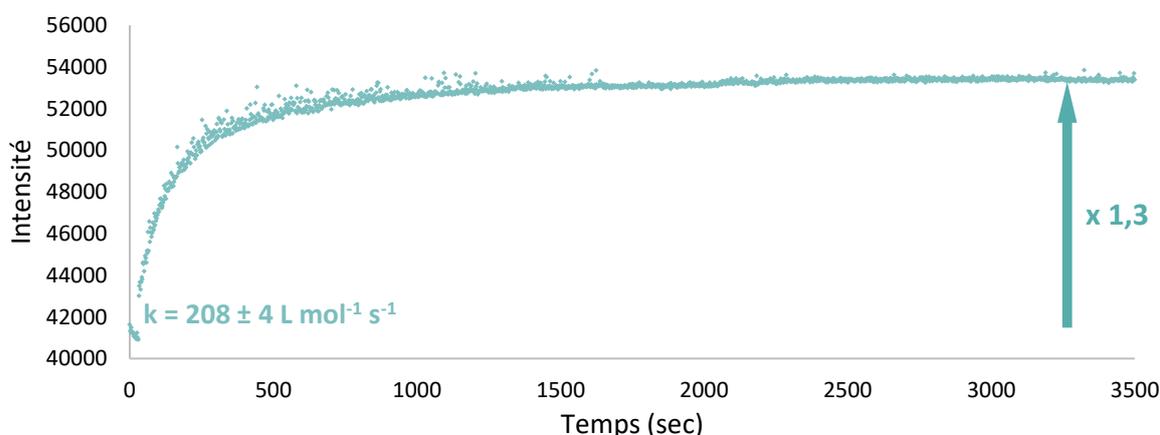


Schéma 72. Suivi de la fluorescence au cours du temps pour la réaction de ligation coupure entre le composé III-12 et le DBCO acide (37 °C, 403 nm, PBS/DMSO)

De la même façon les caractéristiques physicochimiques de III-5s ont été déterminées. Ce composé possède malheureusement une longueur d'onde maximum d'excitation trop basse (350 nm) pour être utilisé dans une étude d'imagerie cellulaire. Néanmoins, ce composé présente une valeur de Turn-ON de fluorescence de près de 20 ce qui est intéressant notamment pour des études *in vitro* de marquage de protéines (Schéma 73).

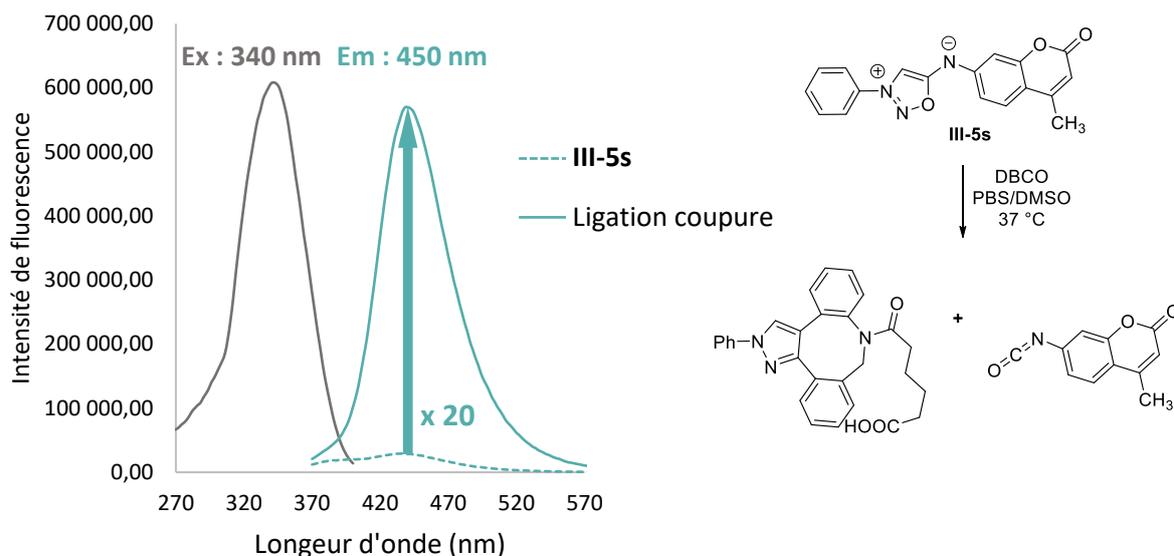


Schéma 73. Spectre d'absorbance et de fluorescence de III-5s

Dans notre cas la fluorescence observée est celle de l'isocyanate, puisque le temps de demi-vie d'un isocyanate aromatique est d'environ 1 heure en milieu aqueux. A noter que la fluorescence du motif coumarine est inhibée par l'effet mesomère attracteur de l'iminosydnone ce qui explique le turn-On de fluorescence d'un facteur 20.

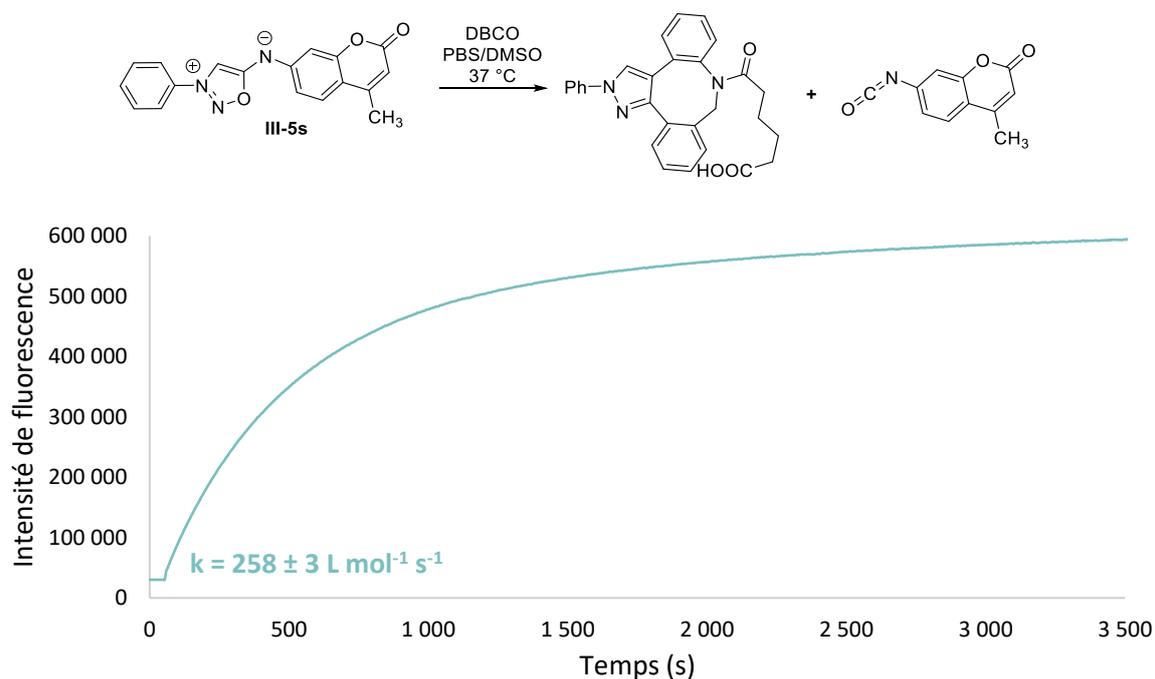


Schéma 74. Suivi de la fluorescence au cours du temps pour la réaction de ligation coupure entre le composé III-5s et le DBCO acide (37 °C, 340 nm, PBS/DMSO)

La constante de vitesse est quant à elle sensiblement équivalente à celle du composé III-12 (Schéma 74).

## IV.2 Réaction d'alkyl et d'aryl isocyanates avec des biomolécules

Une fois les caractéristiques physicochimiques des deux composés déterminées, une réaction de ligation coupure a été réalisée en présence de 10 équivalents de glutathion (GSH) pour mimer l'environnement intracellulaire où le GSH représente le nucléophile le plus présent dans la cellule (concentration d'environ 1 mM). Il est connu que les isocyanates sont capables de réagir avec une variété de fonctions chimiques (thiol, alcool, acide carboxylique, imidazole) présentes dans la structure de nombreux acides aminés.<sup>117</sup> Le GSH possède deux fonctions nucléophiles susceptibles de réagir avec les isocyanates : une fonction amide et une fonction thiol.

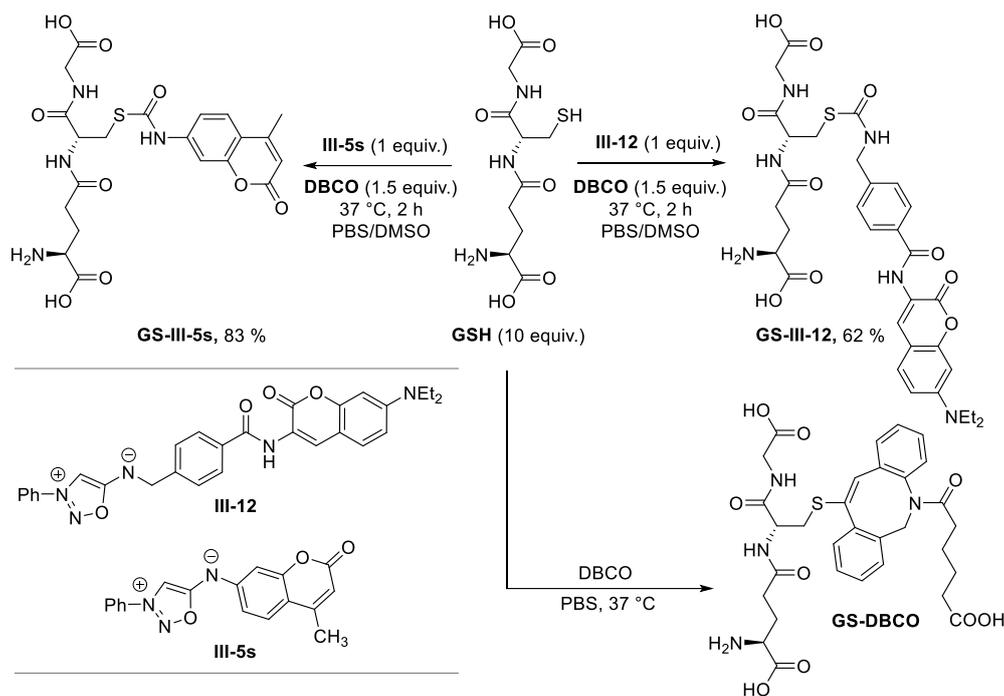


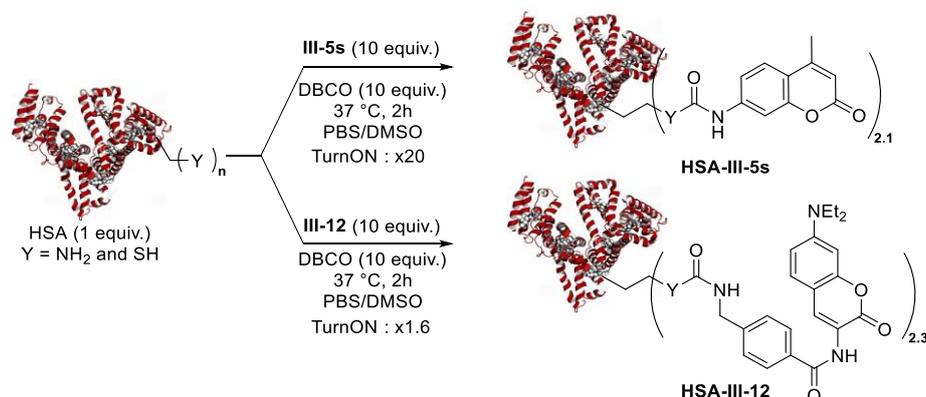
Schéma 75. Libération d'alkyl et d'aryl isocyanates en présence de GSH

A partir des deux sondes III-12 et III-5s, seuls les adduits GS-III-12 et GS-III-5s ont été détectés et quantifiés par HPLC-MS à hauteur de 62% et 83% respectivement. Une étude HRMS/MS a également confirmé que l'isocyanate réagissait uniquement avec le thiol libre (et non avec l'amine) pour former le thiocarbamate correspondant (Schéma 75). A l'image de l'étude de piégeage avec l'hydrazine, les isocyanates aromatiques réagissent mieux que les alkyliques.

Les spectres HPLC montrent également que le thiol du GSH attaque la triple liaison du DBCO pour former le thioether vinylique GS-DBCO mettant en lumière le manque de biocompatibilité de certains cyclooctynes comme le DBCO (Schéma 75). Ces résultats tendent à montrer une fois de plus les limites des réactions bioorthogonales développées jusqu'à présent. Aucune réaction ne possède tous les critères pour être parfaite, et souvent les grandes réactivités nécessaires à l'efficacité des réactions entraîne aussi une certaine instabilité et un risque d'apparition de réactions parasites. Un très bon exemple est l'isomérisation du *trans*-cyclooctène en sa forme inactive le *cis*-cyclooctène dans le cadre de la réaction IEDDA.<sup>119</sup>

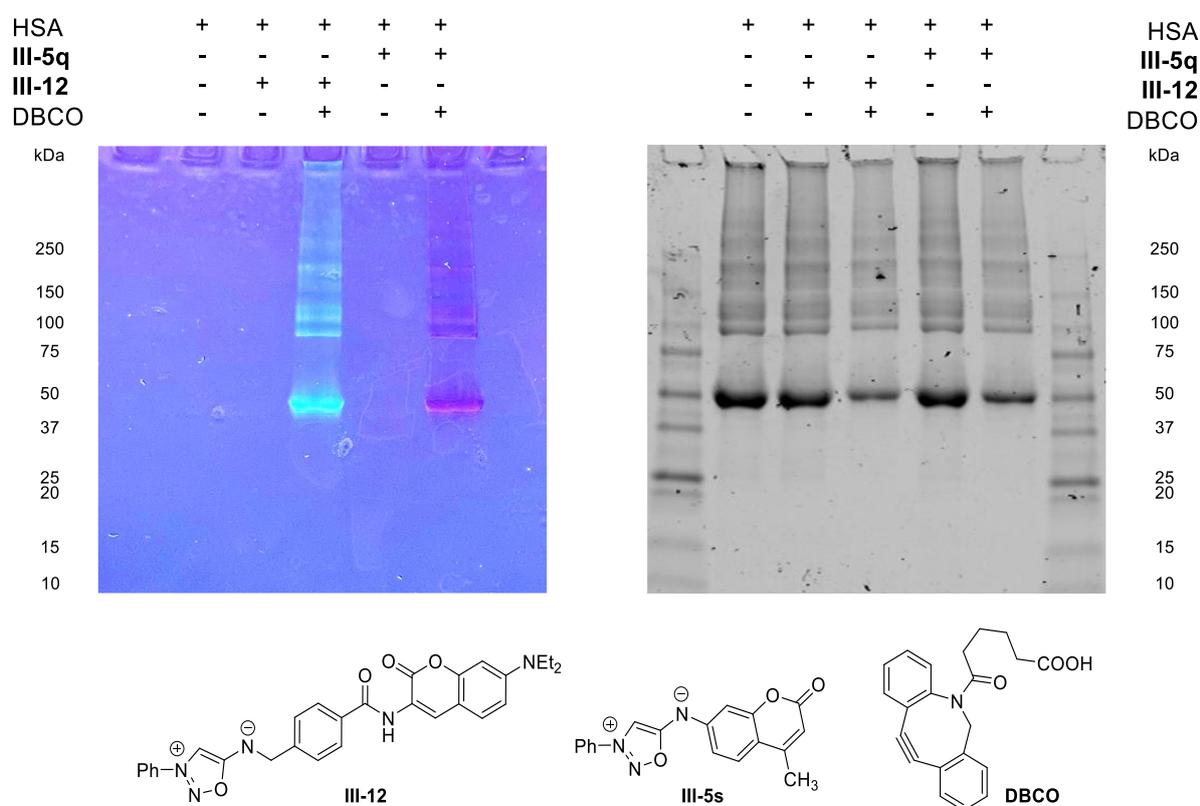
<sup>119</sup> J.-B. Béquignat, N. Ty, A. Rondon, L. Taiariol, F. Degoul, D. Canitrot, M. Quintana, I. Navarro-Teulon, E. Miot-Noirault, C. Boucheix, J.-M. Chezal, and E. Moreau, *Eur. J. Med. Chem.*, 203 (2020), 112574.

Ensuite la même réaction a été réalisée sur l'albumine humaine (HSA) pour vérifier si, en plus des petites molécules, la réaction de ligature coupure permettait de modifier des protéines (**Schéma 76**). La HSA est connue pour avoir une cystéine particulièrement réactive en position 34.<sup>120</sup>



**Schéma 76.** Piégeage d'isocyanates par l'albumine humaine

Des analyses d'absorbance sur les conjugués **HSA-III-5s** et **HSA-III-12** purifiées confirment que la libération contrôlée d'isocyanates permet la modification de la HSA. L'incorporation d'environ 2 motifs coumarine par HSA (cette valeur a été déterminé par absorbance) indique que le thiol accessible de la protéine n'est pas la seule fonction à avoir réagi. Que ce soit pour l'isocyanate aromatique ou aliphatique les résultats sont sensiblement équivalents.



**Figure 63.** SDS PAGE, image de gauche révélation par fluorescence à 380 nm, droite révélation au bleu de Coomassie

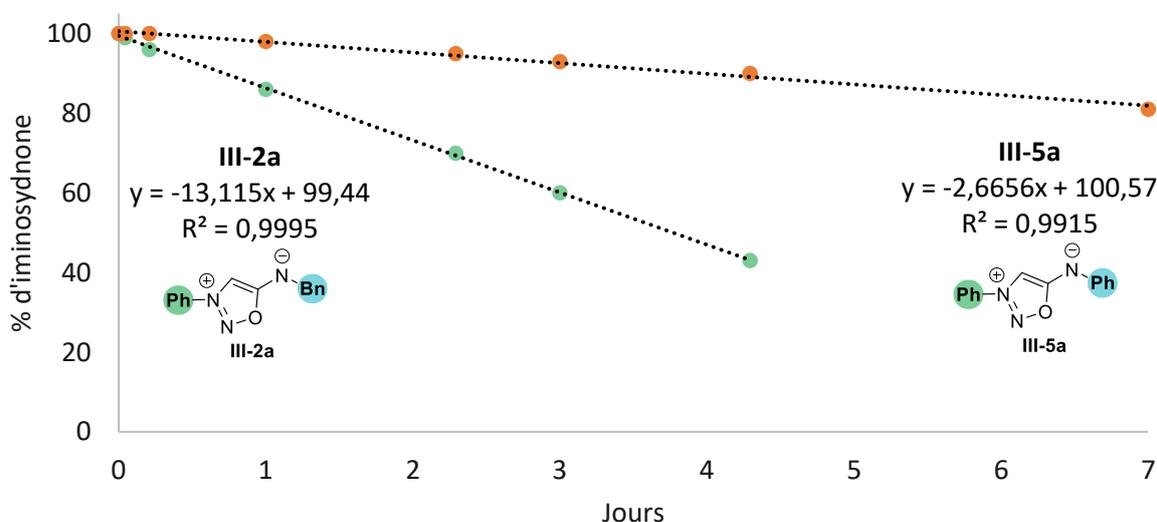
<sup>120</sup> Z. Liu and X. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 45/5 (2016), 1432–56.

Tous ces résultats ont été confirmés par une analyse SDS PAGE (**Figure 63**). De plus, les contrôles négatifs permettent d'affirmer que sans DBCO la réaction de relargage ne se fait pas et aucun marquage fluorescent de la HSA n'est alors observé.

Après avoir obtenu ces résultats encourageants, à la fois pour la modification de petites molécules et de protéines, des études de stabilité ont été menées pour envisager d'éventuelles applications biologiques plus complexes.

#### IV.3 Test de stabilité dans le plasma humain

Une bonne stabilité dans le plasma sanguin est un prérequis pour une éventuelle utilisation des iminosydnonnes *in vivo*. Pour ce faire, les deux iminosydnonnes modèles ont été dissoutes dans du plasma humain et leurs concentrations ont été quantifiées sur une semaine par HPLC (**Figure 64**).



**Figure 64.** Courbe de stabilité des composés modèles III-2a et III-5a ( $C_0 = 300 \mu\text{M}$ )

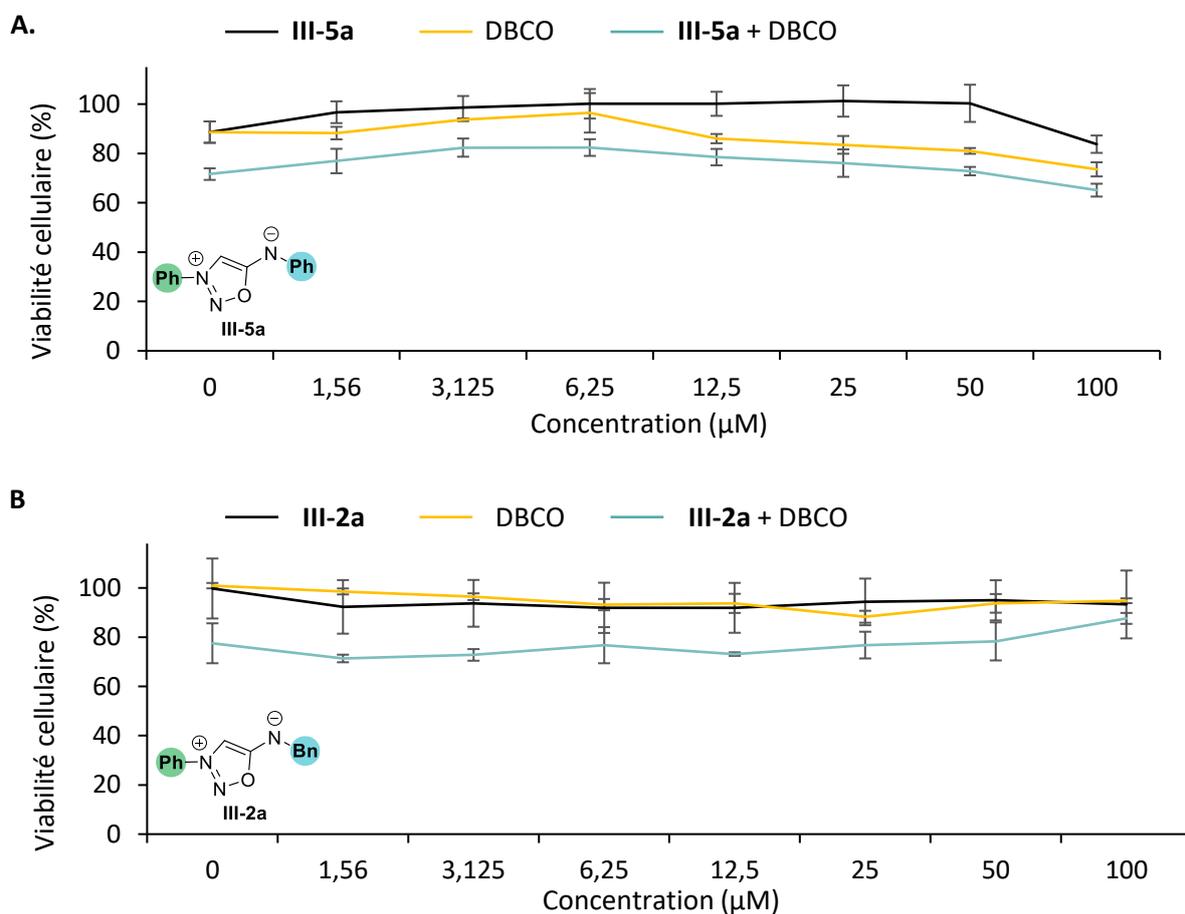
Les courbes de stabilité des composé III-2a et III-5a montrent que ces deux nouvelles familles d'iminosydnonnes sont relativement stables dans le plasma humain et possèdent des temps de demi-vie de 3 jours et plus de 7 jours respectivement. Les cinétiques réactionnelles sont bien plus rapides que celle de la dégradation (en approximant que les ordres de réactions sont les mêmes)  $240 \text{ L/mol/s}$  vs  $3,1 \times 10^{-5} \text{ L/mol/s}$  soit près de 10 millions de fois plus rapide par exemple pour le composé III-5a.

#### IV.4 Relargage d'alkyl/Aryl-isocyanates et toxicité

La toxicité des produits est un paramètre essentiel qu'il faut également maîtriser pour envisager des applications biologiques. Les isocyanates sont des composés réputés toxiques en raison de leur électrophilie.<sup>121</sup> Il est donc important d'estimer la toxicité non seulement des iminosydnonnes mais aussi de leur association avec le DBCO susceptibles de libérer des isocyanates à l'intérieur des cellules. Des tests de viabilité cellulaire (Test à la Résazurine) en fonction de la concentration en alkyl ou aryl iminosydnonnes en présence ou en absence de DBCO ont donc été réalisés par Amélie Goudet, technicienne de notre unité de recherche (**Figure 65**). Avantagusement pour nous, aucune toxicité n'a été détectée à des concentrations allant jusqu'à  $100 \mu\text{M}$  pour les deux iminosydnonnes étudiées.

<sup>121</sup> J. M. Peters, *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 63/4 (1970), 372–75.

Ensuite, des réactions de ligation coupure ont été menées en présence de DBCO (concentration fixée à 100  $\mu\text{M}$ ) sur cellules vivantes et, là encore, aucune toxicité n'a été observée. Ce résultat semble indiquer que ni le pyrazole ni l'isocyanate, qu'ils soient issus de **III-2a** ou de **III-5a**, ne sont toxiques pour la cellule et ce même à des concentrations élevées de 100  $\mu\text{M}$ . La seule toxicité que nous avons pu observer est celle du DBCO lorsque celui-ci est utilisé à plus de 100  $\mu\text{M}$ .



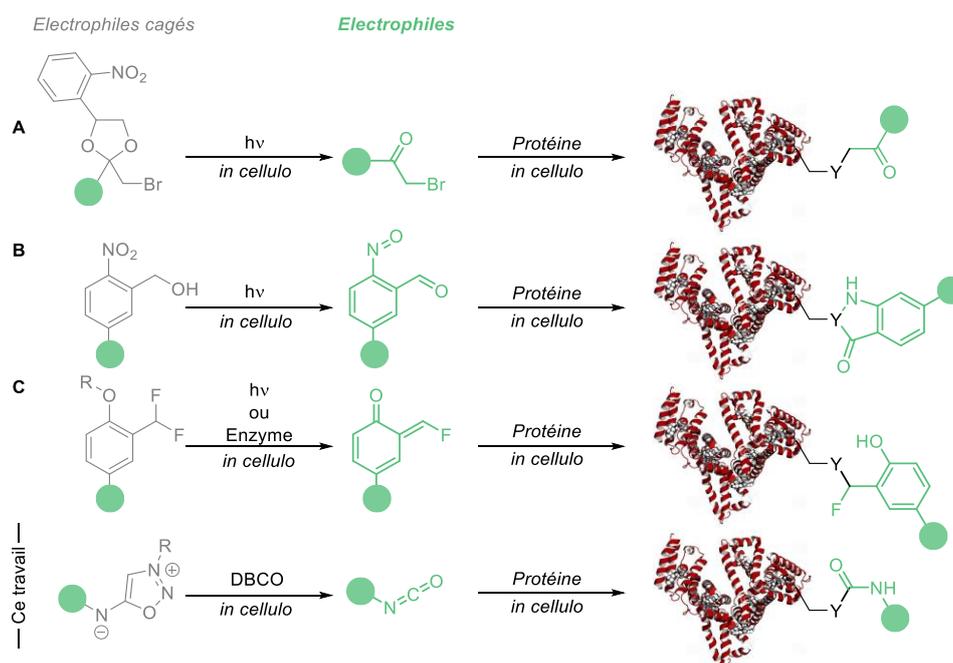
**Figure 65.** Viabilité cellulaire en présence des iminosynones en mélange ou non avec le DBCO. **A.** **III-5a** **B.** **III-2a**  
(Expérience **III-2a** + DBCO, La concentration de DBCO est fixée à 100  $\mu\text{M}$ )

Ce résultat assez surprenant indique que des isocyanates, électrophiles assez puissants supposés toxiques, exercent une influence mineure sur l'intégrité de la cellule aux concentrations utilisées. Il est reporté dans la littérature que les électrophiles sont piégés *via* des mécanismes impliquant le glutathion (GSH) puis excrétés par des transporteurs.<sup>122</sup> Nous pouvons supposer que ce type de mécanisme se met en place dans le cas présent, limitant ainsi la toxicité présumée de l'isocyanate.

<sup>122</sup> Y. Kumagai and Y. Abiko, *Chem. Res. Toxicol.*, 30/1 (2017), 203–19.

## IV.5 Relargage d'alkyl-isocyanates dans des cellules vivantes

L'utilisation d'électrophiles dans le cadre de recherches en protéomique est une approche bien établie dans la littérature.<sup>123,124,125</sup> La méthode classiquement utilisée en chémobiologie consiste à utiliser des électrophiles directement sur la cible (typiquement des protéines) pour en modifier les résidus nucléophiles et incorporer la molécule d'intérêt (fluorophore, marqueur de masse, etc.). Récemment, des améliorations ont été apportées en utilisant des électrophiles cagés activables par des stimuli externes ou internes (**Schéma 60**). Cette modification permet de contrôler la libération de l'électrophile aussi bien spatialement que temporellement. Il est alors possible de les utiliser sur des cibles plus complexes (cellules vivantes) pour étudier divers mécanismes biologiques. On peut par exemple citer les travaux de Weerapana et de son équipe qui ont développé en 2015 une bromométhylcétone cagée libérable par irradiation UV (**Schéma 60. A**).<sup>126</sup> Cette méthode a permis une analyse globale des cystéines réactives à l'intérieur de cellules vivantes en identifiant 366 protéines contenant un résidu cystéine. Plus récemment, la formation induite par la lumière d'espèces nitroso-benzaldéhyde capables de cycliser avec des amines endogènes a permis de montrer que ce système était efficace pour la purification protéines dans la cellule ainsi qu'au profilage du protéome des mitochondries dans des cellules vivantes (**Schéma 60. B**).<sup>127</sup> Chen a utilisé en 2021 des quinones-méthides électrophiles libérables par irradiation capables de réagir avec des nucléophiles endogènes (**Schéma 60. C**).<sup>128</sup> A notre connaissance, aucun isocyanate cagé n'a été développé à ce jour en chémobiologie et, compte tenu de la réactivité intrinsèque de ces électrophiles, il serait intéressant d'étudier leur devenir à l'intérieur de la cellule.



**Schéma 77.** Libération d'électrophiles dans des cellules

<sup>123</sup> P. R. A. Zanon, L. Lewald, and S. M. Hacker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59/7 (2020), 2829–36.

<sup>124</sup> T. Zhang, J. M. Hatcher, M. Teng, N. S. Gray, and M. Kostic, *Cell Chem. Biol.*, 26/11 (2019), 1486–1500.

<sup>125</sup> K. M. Backus, B. E. Correia, K. M. Lum, S. Forli, B. D. Horning, G. E. González-Páez, S. Chatterjee, B. R. Lanning, J. R. Teijaro, A. J. Olson, D. W. Wolan, and B. F. Cravatt, *Nat.*, 534/7608 (2016), 570–74.

<sup>126</sup> M. Abo and E. Weerapana, *JACS*, 137/22 (2015), 7087–90.

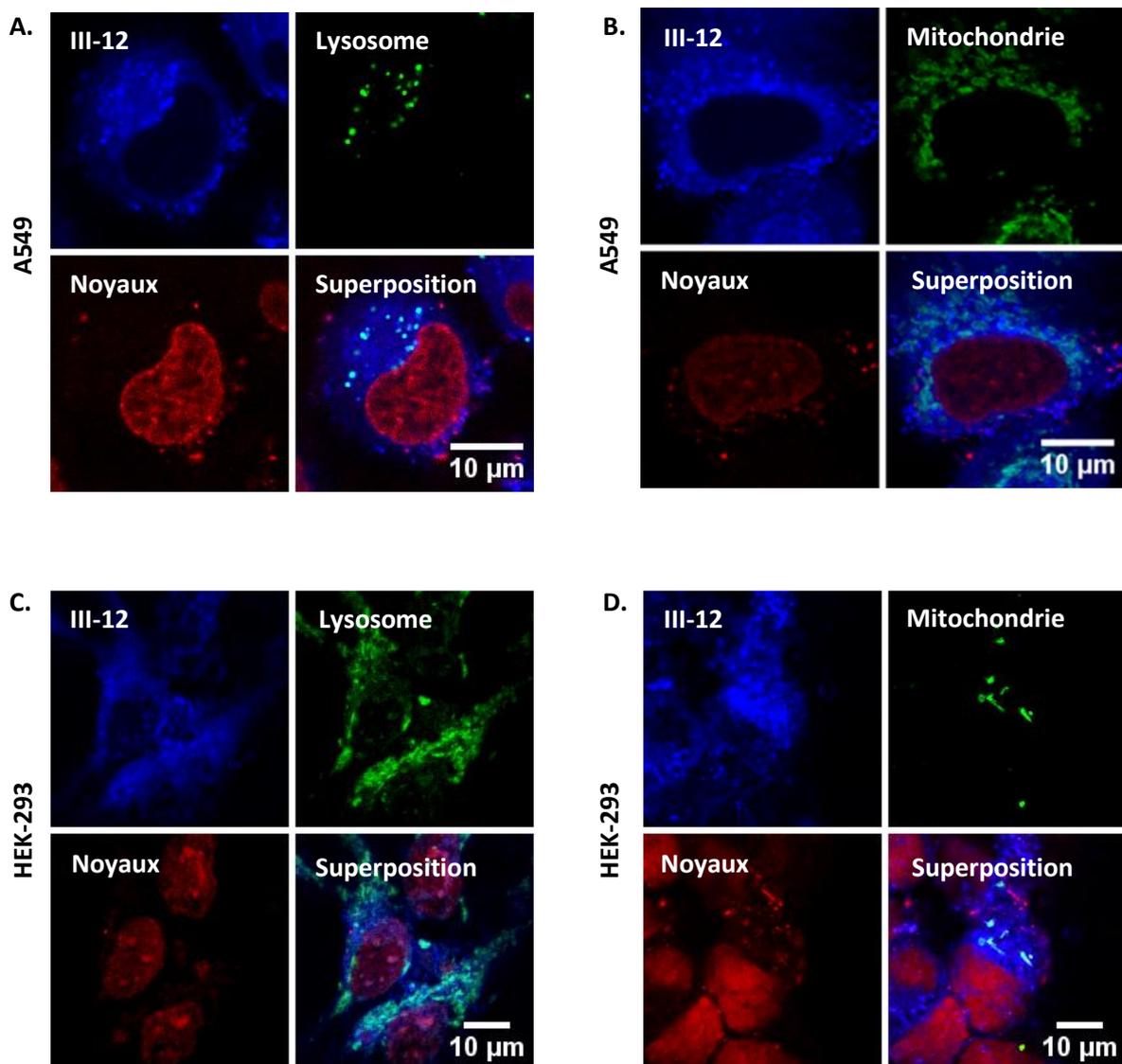
<sup>127</sup> A.-D. Guo, D. Wei, H.-J. Nie, H. Hu, C. Peng, S.-T. Li, K.-N. Yan, B.-S. Zhou, L. Feng, C. Fang, M. Tan, R. Huang, and X.-H. Chen, *Nat. Comm.*, 11/1 (2020), 5472.

<sup>128</sup> Z. Huang, Z. Liu, X. Xie, R. Zeng, Z. Chen, L. Kong, X. Fan, and P. R. Chen, *JACS*, (2021), 7.

La sonde **III-12** serait utile pour montrer que les iminosydnones, que l'on peut considérer comme des isocyanates cagés, sont capables de piéger des nucléophiles endogènes après réaction avec le DBCO dans des cellules vivantes.

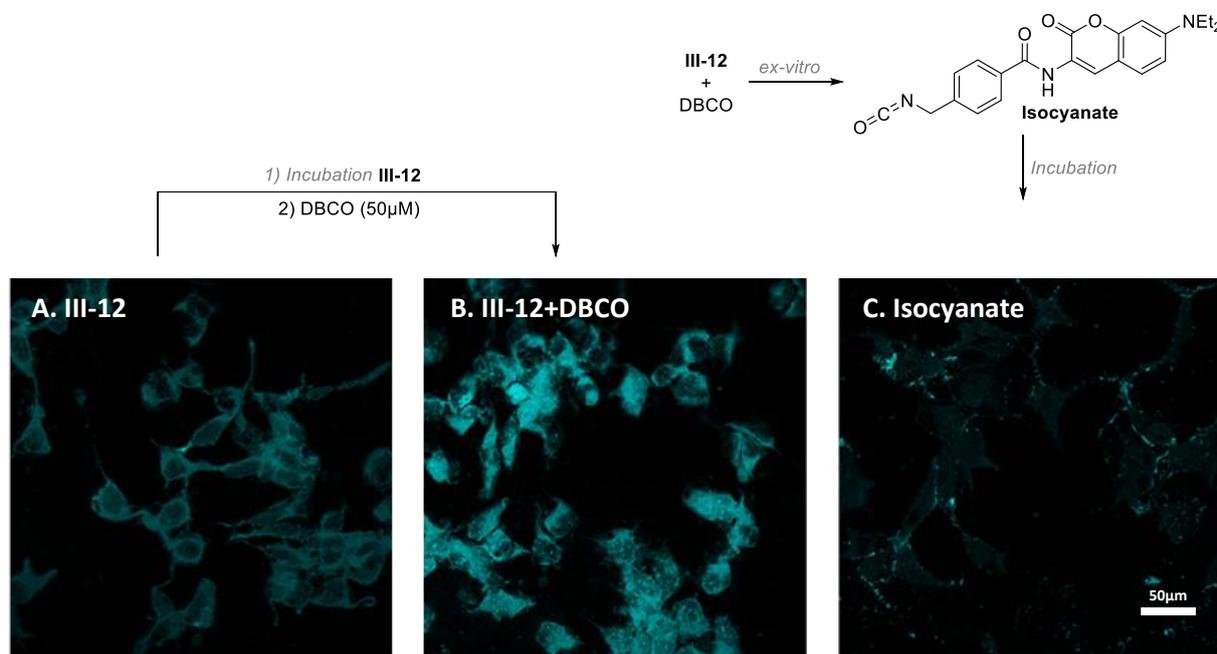
Dans un premier temps nous avons déterminé si la sonde **III-12** possédait un tropisme particulier dans la cellule, pour cela, des expériences de co-localisation ont été menées (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces expériences d'imagerie cellulaire ont été effectuées par Arnaud Chevalier de l'ICSN à Gif sur Yvette.

Deux lignées cellulaires (A549 et HEK-293) en culture dans nos laboratoires ont été utilisées pour cette étude. Les cellules sont dans un premier temps traitées avec 10  $\mu$ M de **III-12** puis après lavage le marqueur choisi (lysosomal, mitochondrial, nucléaire) est incubé pendant 15 min. Une série de clichés a ensuite permis de localiser chaque traceur en fonction de la longueur d'onde d'observation (rouge : noyaux, bleu : sonde **III-12**, vert : mitochondrie ou lysosome).



**Figure 66.** Images de co-localisation **III-12** avec divers marqueurs d'organites (10  $\mu$ M). A. LysoViewTM A549 B. MitoViewTM A549 C. LysoViewTM HEK293 D. MitoViewTM HEK-293.

Aucune localisation particulière ne semble se dégager des images, ce qui laisse penser que la sonde se répartit uniformément dans le cytoplasme et les organelles cellulaires et ce dans les deux lignées cellulaires étudiées. Ensuite, pour évaluer l'influence de la réaction de ligature coupure à l'intérieur de cellules vivantes, des expériences sur microscope confocal ont été menées (**Figure 66**).

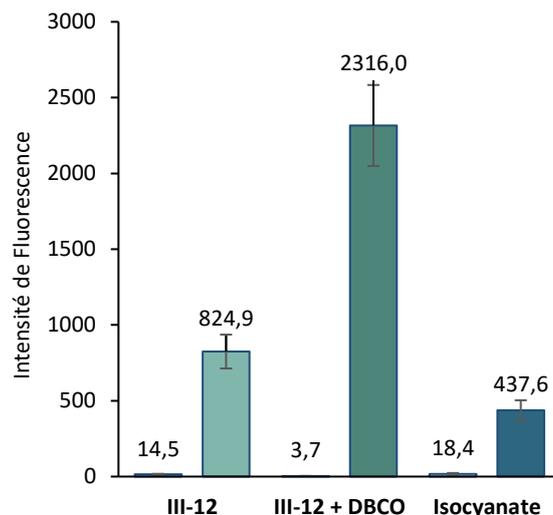


**Figure 67.** Images de microscopie sur cellules vivantes HEK-293 (Excitation : laser pulsé 40 MHz, 440 nm, Emission : 460 à 550 nm) **A.** III-12 (10 μM) **B.** Réaction entre III-12 (10 μM) et DBCO (50 μM) **C.** Isocyanate formé *extra cellulo* (10 μM).

Une première image après 3h d'incubation de la sonde **III-12** permet de déterminer un  $t^0$  (cliché présenté en **Figure 67. A**). Une autre série de clichés est ensuite prise après 2 heures d'incubation de DBCO acide (**Figure 67. B**). La différence d'intensité de fluorescence visible sur les clichés indique que la réaction a potentiellement eu lieu.

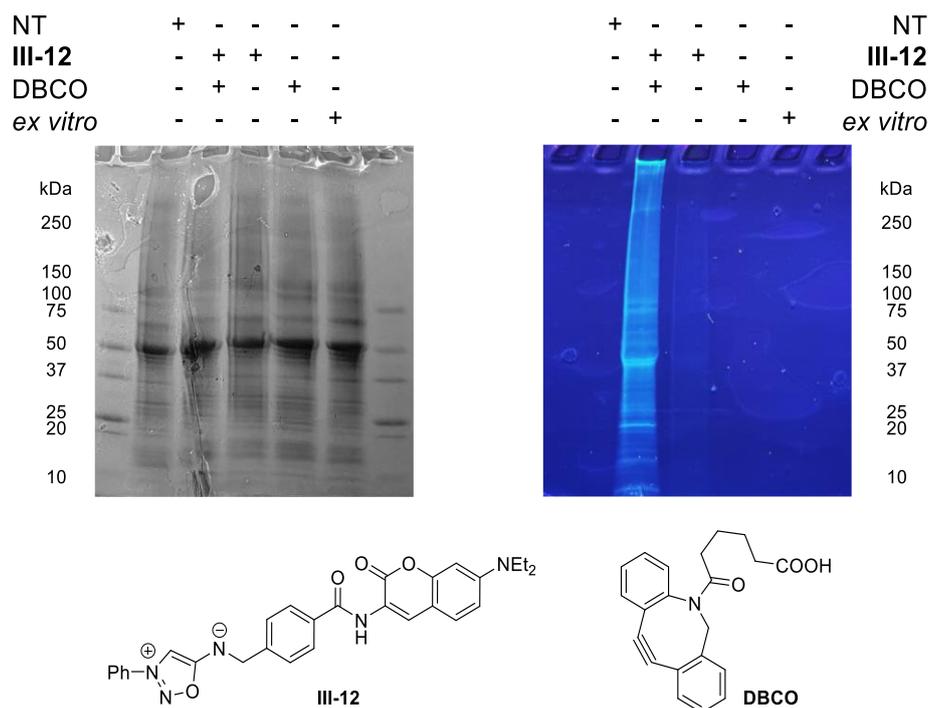
L'isocyanate coumarine préalablement formé *ex vitro* puis additionné sur les cellules donne quant à lui de mauvaises images et quasiment aucune fluorescence n'est détectée à l'intérieur des cellules (**Figure 67. C**). Nous supposons que ce résultat s'explique soit par une mauvaise pénétration cellulaire de l'isocyanate soit par une hydrolyse ou une réaction avec des nucléophiles du milieu de culture pour former des produits qui seraient éliminés lors des étapes de lavage. Cette expérience montre tout l'intérêt de libérer un isocyanate à l'intérieur de la cellule par chimie bioorthogonale. Des mesures d'intensité de fluorescence ont été effectuées sur ces trois clichés à l'aide du logiciel de traitement d'image « ImageJ ». Elles ont permis de générer le graphique présenté en

**Figure 68.** Le rapport signal sur bruit (S/N) est différent selon le cliché considéré, lorsque la sonde est seule ce rapport S/N est de 62 alors qu'en présence de DBCO il atteint une valeur de 746. En revanche, lorsque l'isocyanate est préformé puis ajouté sur les cellules, le rapport chute à 27 ce qui traduit un mauvais marquage cellulaire. La différence des deux rapports signal sur bruit entre la sonde seule et l'isocyanate préformé montre également que si l'isocyanate est introduit de façon extracellulaire le marquage est beaucoup moins efficace ce qui traduit indirectement que l'isocyanate pénètre moins bien la cellule que la sonde **III-12**. Par ailleurs, les valeurs mesurées nous permettent d'estimer un TurnOn de fluorescence d'environ 3 ce qui est légèrement plus élevé que ce qui a été obtenu *in vitro* (**Schéma 53**).



**Figure 68.** Rapport signal de fluorescence sur bruit (cellules vivantes HEK-293) déterminé avec ImageJ

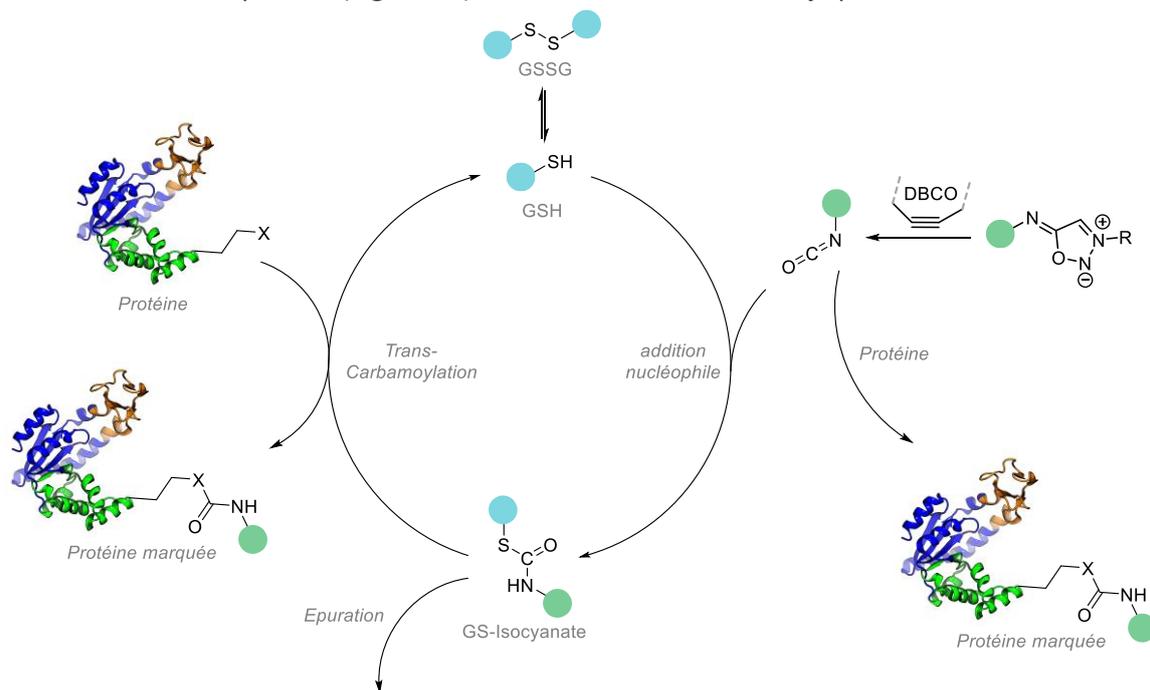
Pour confirmer définitivement que la réaction a bien eu lieu, les cellules ont été lysées en présence de Triton® et un gel d'électrophorèse montre qu'une série de protéines de tous poids moléculaires a été marquée (**Figure 69**). Une prédominance de protéines à 50 kDa peut être également observée.



**Figure 69.** SDS PAGE, image de droite révélation par fluorescence à 380 nm, gauche révélation au bleu de Coomassie (NT : cellules non traitées, *ex vitro* : préincubation DBCO + III-12 pour préformer l'isocyanate)

Ce résultat est assez surprenant puisque le nucléophile le plus abondant dans la cellule reste le glutathion (GSH). Il est présent en très large excès (1 mM) par rapport à l'isocyanate relargué par la réaction de ligature coupure puisque la sonde III-12 a été utilisée à seulement 10 µM. Il est possible que des réactions de trans-carbamoylation se déroulent à l'intérieur de la cellule, où le GSH jouerait

alors le rôle d'un transporteur (**Figure 70**). Un tel mécanisme a été déjà postulé dans la littérature.<sup>122</sup>



**Figure 70.** Mécanisme hypothétique de transcarbamylation

Cette hypothèse pourrait être vérifiée en ajoutant l'adduit **GS-II12** sur des cellules vivantes. Cependant, cette expérience nécessite que l'adduit **GS-12** soit capable de pénétrer la membrane cellulaire sans se dégrader ou réagir avec les protéines membranaires. L'autre hypothèse serait que les mécanismes d'épuration mis en place par le GSH à l'intérieur des cellules ne soit pas assez efficaces et aussi rapides que la réaction de piégeage de l'isocyanate par les résidus nucléophiles des protéines. En condition de stress cellulaire, le rapport GSH/GSSG change à l'intérieur de la cellule en large faveur de GSSG. Il est possible que l'incubation de la sonde modifie son état de stress et donc augmente son taux de GSSG qui, du fait de sa forme disulfure ne serait plus capable d'interagir avec l'isocyanate. Les protéines pourraient alors réagir avec l'isocyanate par leurs résidus nucléophiles (lysine ou cystéine par exemple).

#### IV.6 Application pour le Target Fishing

Le Target Fishing est l'une des applications qui pourrait avantageusement utiliser la libération contrôlée d'isocyanates pour l'identification de protéines. Pour envisager de telles applications, une fonction alcyne peut être introduite dans la structure de l'iminosydone. Cette sonde permettrait alors de libérer un isocyanate alcyne à l'intérieur de la cellule. Les protéines pourraient alors être fonctionnalisées par une étiquette biotine puis purifiées à l'aide d'avidine à partir du lysat cellulaire correspondant (**Schéma 60**).

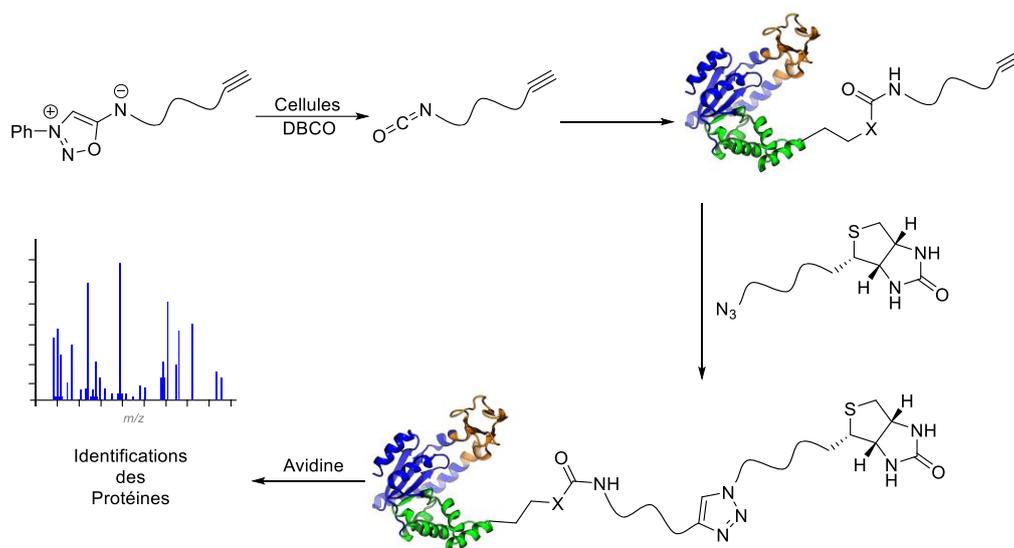


Schéma 78. Principe général du Target Fishing à l'aide d'iminosydones

Plusieurs voies de synthèses ont été élaborées pour accéder à une iminosydnone ayant une fonction alcyne terminal (**Schéma 79**). Dans un premier temps, un couplage peptidique de la propargylamine avec le composé **III-2d** a permis d'isoler le composé souhaité, une analyse RMN du proton après évaporation du brut réactionnel montre qu'il s'agit bien du produit. Néanmoins une deuxième analyse RMN  $^1\text{H}$  quelques heures après montre que le composé s'est totalement dégradé pour une raison inconnue. A noter qu'un test de couplage peptidique avec la biotine amine n'a pas non plus donné les résultats espérés. En effet, une fois isolé le composé s'est lui aussi révélé être instable. Ce composé aurait pu être utilisé pour directement libérer un isocyanate biotinylé, ce qui aurait permis de s'affranchir de l'étape de CuAAC. La méthode de cyclodeshydratation au  $\text{PCl}_5$  a ensuite été utilisée pour synthétiser la sonde alcyne **III-15** avec un très bon rendement de 86%. **III-15** s'est révélé être stable dans le temps et a donc été sélectionné pour la suite de l'étude.

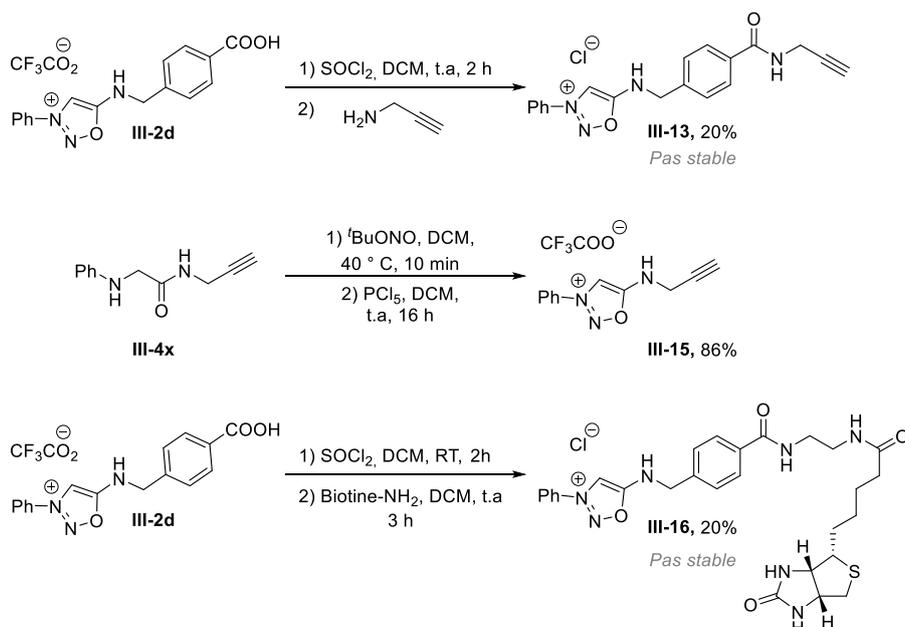
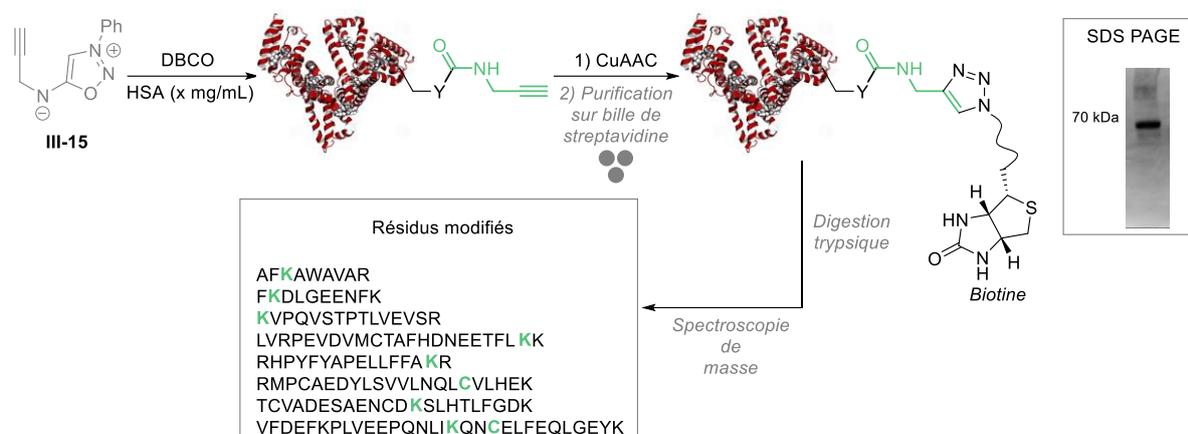


Schéma 79. Synthèse de sonde pour des applications de Target Fishing

Une fois la sonde **III-15** entre nos mains, des tests sur protéines isolées ont pu être menés par Aurélie Rachet et le Dr. Agnès Delaunay-Moisan (**Schéma 80**). Dans un premier temps la sonde est incubée en présence de HSA et de DBCO pour libérer le propargyle isocyanate. Ensuite une réaction de CuAAC en présence de biotine azoture permet de clicker la biotine aux fonctions alcynes liées à l'HSA.



**Schéma 80.** Résultats obtenus lors de l'expérience de Target Fishing sur HSA

Des analyses de spectrométrie de masse indiquent que 9 acides aminés ont été modifiés, en majorité des lysines. Des expériences sur cellules vivantes ont permis de déterminer que cette nouvelle méthode peut être adaptée à des applications en protéomique, des expériences complémentaires sont en cours au laboratoire pour exploiter au mieux ce nouvel outil.

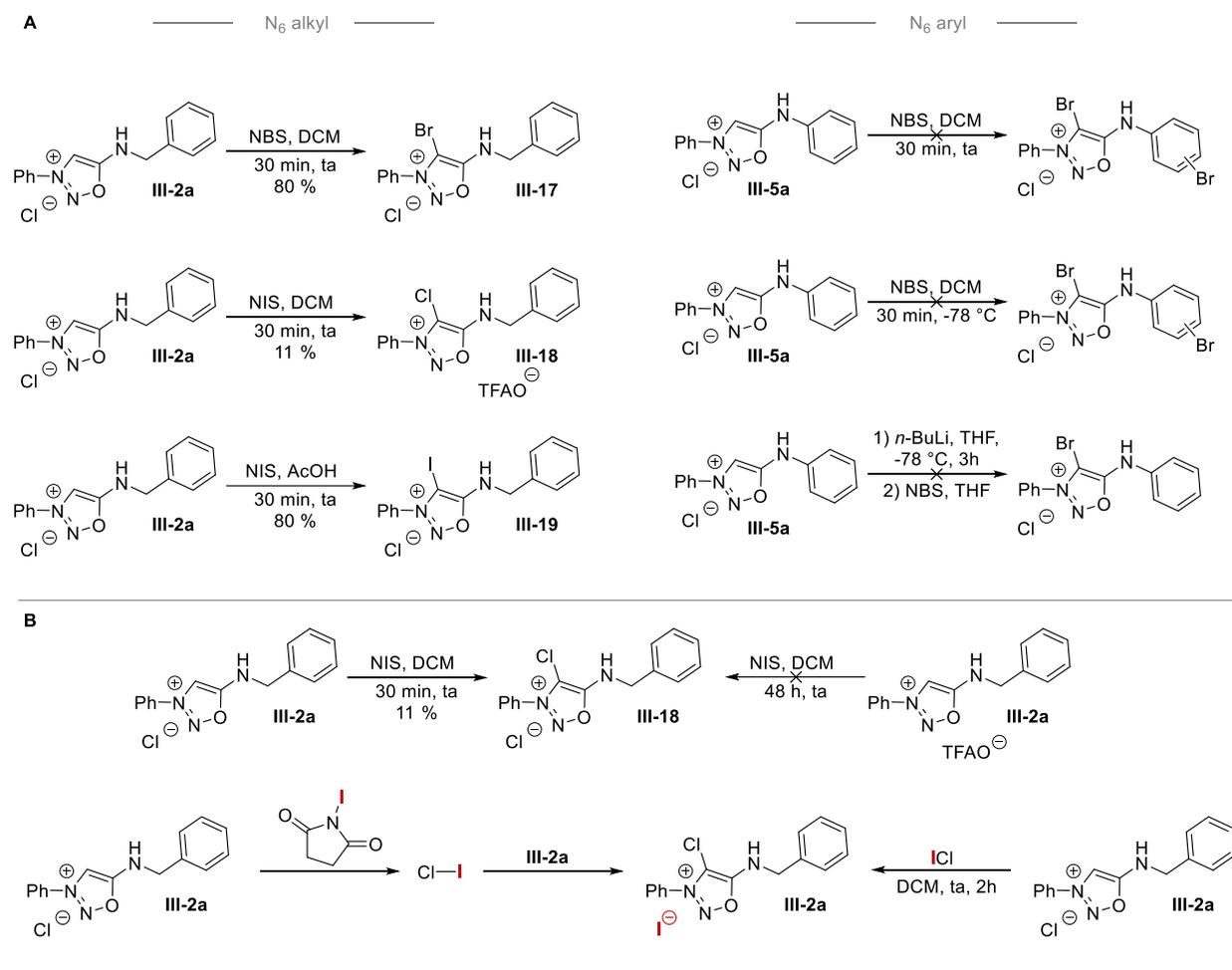
Les *N*-6-alkyl/aryl iminosydones peuvent donc être utilisées pour des applications en chémobiologie, mais leur post-fonctionnalisation reste encore inexplorée, la prochaine partie présentera les résultats obtenus à ce sujet.

## V Post-fonctionnalisation des *N*-6-Alkyl/Aryl-iminosydones.

Comme nous l'avons vu précédemment, le pKa de l'azote exocyclique a une grande influence sur la vitesse de réaction de cycloaddition, puisque seule la forme mésoionique cycloadditionne. A titre d'exemple, le composé **III-2a** est 4 fois plus réactif que **III-5a** mais à pH physiologique **III-2a** réagit 4 fois moins vite à cause de son pKa plus élevé. Des modifications structurales du squelette iminosydnone pourraient permettre de diminuer le pKa du proton en N<sub>6</sub> et ainsi améliorer encore la réactivité. Notre groupe a décrit dans la littérature que les halogènes en position C<sup>4</sup> de sydnones ou d'iminosydones ont tendance à rendre le dipôle plus réactif.<sup>30</sup> Des calculs réalisés par l'équipe de Houk ont montré que cet effet bénéfique était dû à la distorsion du dipôle induite par la présence de l'halogène.<sup>31</sup> Cette fonctionnalisation pourrait avoir le même effet sur les aryl et alkyl-iminosydones développées dans notre étude mais pourrait aussi faire baisser le pKa du proton en N<sup>6</sup> par effet inductif attracteur. L'addition de ces effets, distorsion du dipôle et abaissement du pKa, devraient permettre une amélioration notable de la réactivité.

## V.1 Halogénération de la position C<sup>4</sup>

Des premiers tests de fonctionnalisation en C<sup>4</sup> du sel **III-2a** en présence de NBS ont permis d'obtenir la bromo-iminosydnone **III-17** avec un bon rendement de 80% (**Schéma 81 A**).



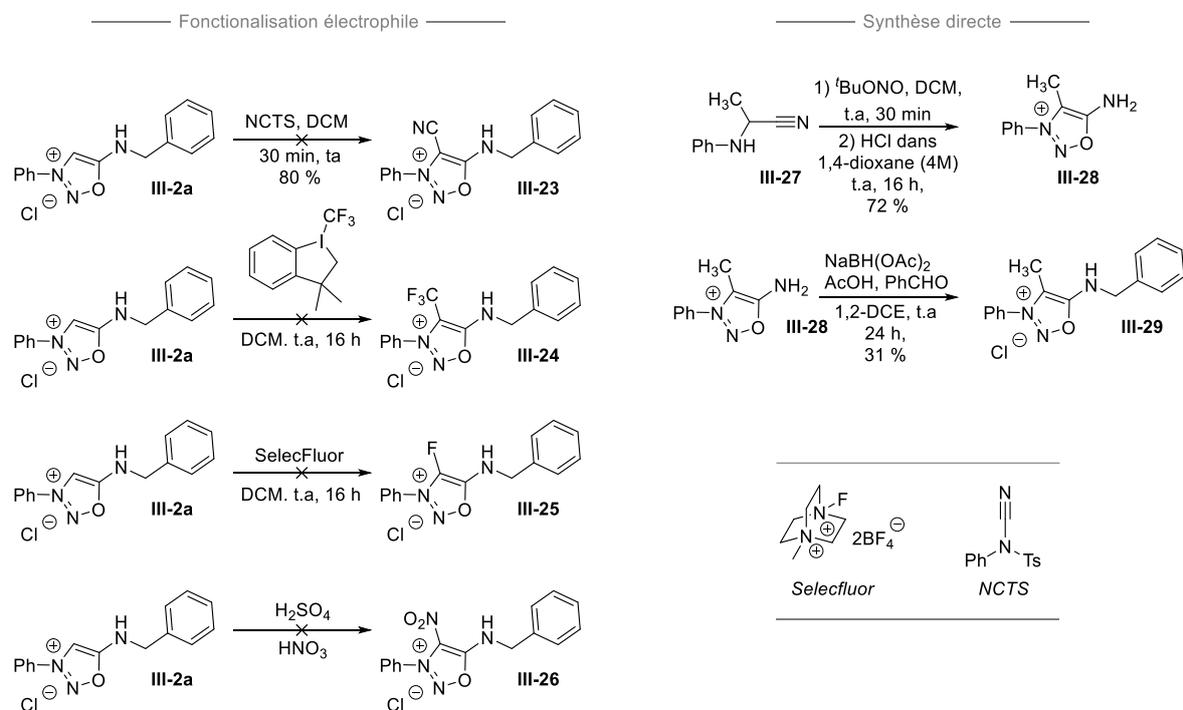
**Schéma 81. A.** Halogénération en position C<sup>4</sup> des sels **III-2a** et **III-5a** **B.** Proposition d'explication de la chloration de **III-2a**

En revanche, dans le cas de la iminosydnone **III-5a** une poly-bromation a été observée générant un mélange complexe impurifiable. La diminution de la température n'a pas d'impact sur la réaction ni l'utilisation d'une base forte pour former le carbène en C<sup>4</sup>.

Afin d'avoir divers halogènes en C<sup>4</sup>, des tests d'iodation ont été réalisés sur **III-2a** dans les mêmes conditions que la bromation, c'est-à-dire dans le DCM mais en présence de NIS. De façon inattendue, le composé iodé a été observé en mélange 1/1 avec le composé chloré dans le brut réactionnel. La seule source de chlore dans la réaction étant le contre ion il est possible que l'iode électrophile réagisse avec l'ion chlorure pour former un interhaogène, le ICl, qui est une source de chlore électrophile. En effet, lorsque le sel de chlore **III-2a** est traité avec 1.0 équivalent de ICl le composé issu de la chloration est obtenu en mélange avec la iodation en position C<sup>4</sup>. En revanche, lorsque le sel de trifluoroacétate est traité avec du NIS seule la iodation est observée (**Schéma 81 B**). A noter que le dérivé chloré, semble ne pas être très stable dans le temps, certainement dû à sa forte réactivité. Une telle réaction, en présence de ICl pourrait avoir des applications importantes pour la chloration des iminosydnones. En remplaçant le sel de chlore par le sel de triflate de **III-2a** le dérivé iodo-C<sup>4</sup> **III-19** est obtenu avec un rendement de 80% (**Schéma 81 A**).

## V.2 Autres fonctionnalisations en position C<sup>4</sup>

Pour diversifier les fonctions chimiques en position C<sup>4</sup> susceptibles de faire baisser le pKa des iminosydrones, d'autres électrophiles comme le *N*-Cyano-*N*-phenyl-*p*-methylbenzenesulfonamide (NCTS) ou le réactif de Togni ont été testés mais aucune conversion n'a été observée (**Schéma 82**).

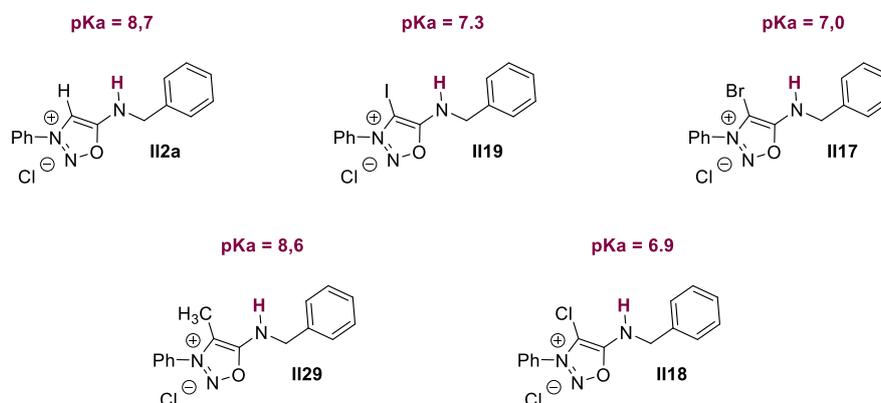


Un essai de fluoration avec le selecfluor<sup>®</sup> n'a donné que des traces de produit dans le brut réactionnel. Des résultats similaires ont été observés pour la réaction de nitration en conditions acides.

Nous avons également souhaité évaluer l'impact de l'encombrement stérique sur la réaction et décidé de synthétiser une iminosydnone substituée en position C<sup>4</sup> par un méthyle. Ce composé a été synthétisé par amination réductrice du sel d'iminosydnone correspondant.

### V.3 Influence des groupements en position C<sup>4</sup> sur le pKa du proton en position N<sup>6</sup>

Pour évaluer l'influence du groupement en position C<sup>4</sup>, les pKa ont été systématiquement calculés pour les nouveaux composés obtenus (**Figure 71**).



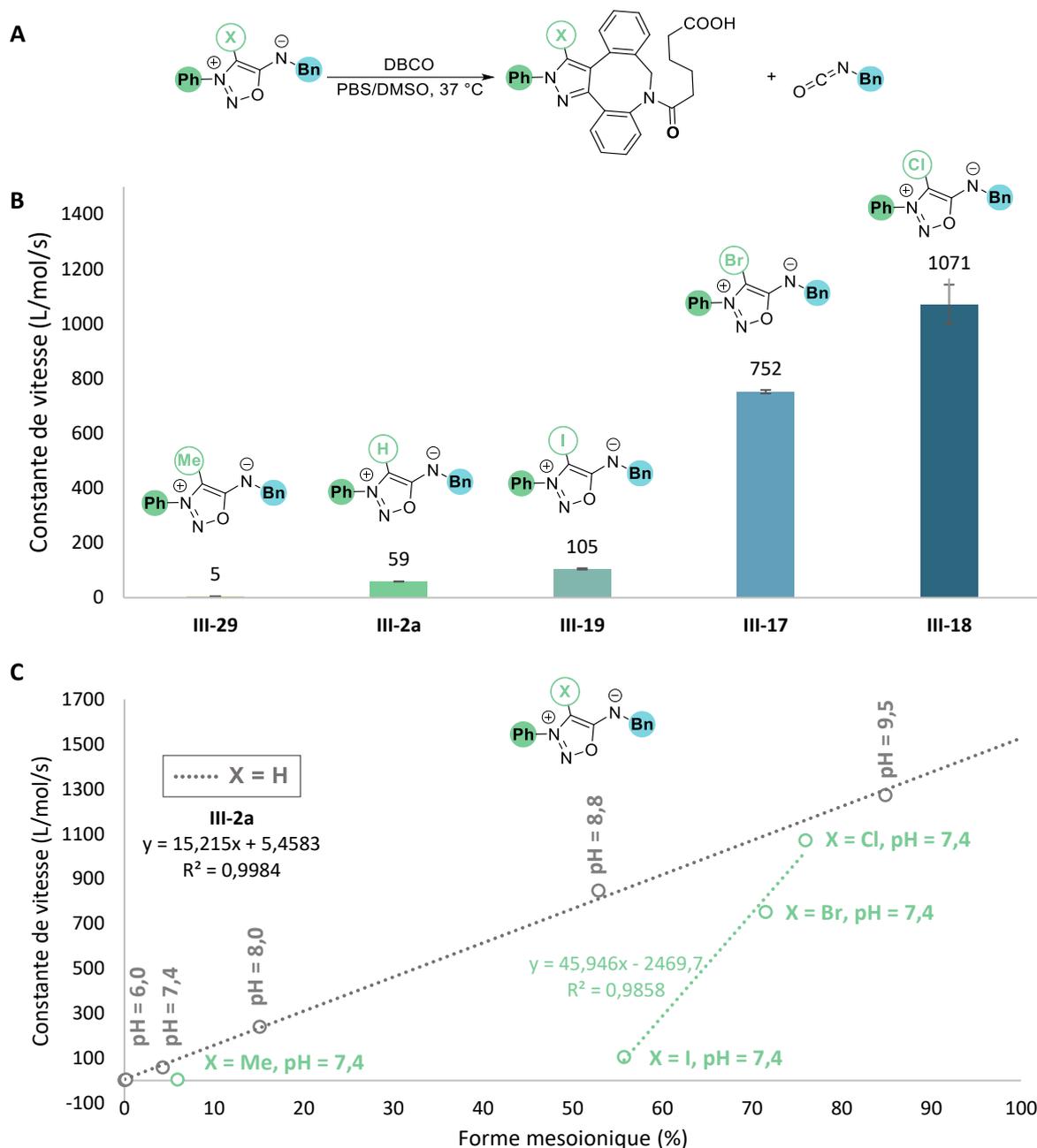
**Figure 71.** pKa obtenus pour les composés III-2a, III-17, III-18, III-19, et III-29

Les halogènes induisent une diminution notable du pKa d'environ deux unités en moyenne. Cet effet peut s'expliquer par l'effet inductif attracteur des halogènes qui appauvrissent le cycle iminosynone. Lorsque la position C<sup>4</sup> est halogénée le pKa passe de 8,7 à environ 7,0. Cette diminution de 1,7 unité de pKa multiplie par près de 15 la présence de la forme mésoionique en solution à pH = 7,4. Cette augmentation influencera certainement la cinétique de cycloaddition, la prochaine partie sera donc consacrée à l'étude de l'influence de la position C<sup>4</sup> sur les différents substrats obtenus.

### V.4 Influence des groupements en position C<sup>4</sup> sur la réaction SPICC

Comme attendu, la présence d'halogènes en position C<sup>4</sup> a un effet bénéfique très important sur la vitesse de la réaction SPICC (**Figure 72 B**). A pH 7,4, la présence de chlore par exemple augmente la constante de vitesse d'environ 18 par rapport à l'iminosynone non chlorée pour atteindre une valeur supérieure à 1000 L/mol/s. Il est clair que cet effet bénéfique est lié à la diminution de la valeur de pKa du N-H en position 6 mais nous avons voulu savoir si un autre effet, tel que la distorsion du dipôle, pouvait aussi jouer un rôle dans cette augmentation de réactivité. Pour mieux évaluer l'influence de la modification en C<sup>4</sup> sur la cinétique de cycloaddition il est nécessaire de corréler le pourcentage de forme mésoionique en solution en fonction de la constante de vitesse pour mieux apprécier la réactivité d'un composé par rapport à un autre. Pour cela la constante de vitesse a été déterminée à différents pourcentages de forme mésoionique de III-2a afin de déterminer le coefficient de droite correspondant à la réactivité intrinsèque du dipôle de référence. Le graphe ainsi obtenu (**Figure 72 C**) montre que le coefficient de réactivité de III-2a est de 15,299 L/mol/s par % de forme mésoionique ce qui traduit simplement qu'à 100% de forme mésoionique la constante est de 1529,9 L/mol/s alors qu'à 50% elle ne sera que de 764,9 L/mol/sec.

Connaissant les constantes de vitesse des composés modifiés en C<sup>4</sup> ainsi que leurs pKa, il est alors possible de placer chaque composé sur le graphique (**Figure 72 C**).

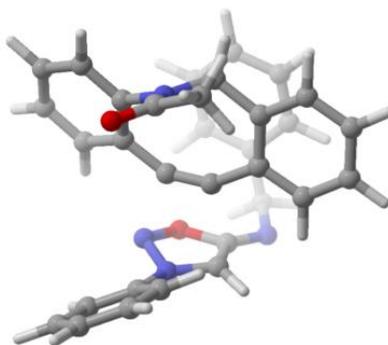


**Figure 72.** A. Réaction étudiée B. Constantes de vitesses obtenues (100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, PBS/DMSO, pH = 7,4) pour les composés III-29, III-2a, III-19, III-17 et III-18 et le DBCO C. Corrélation de la constante de vitesse en fonction du pourcentage de forme mésoionique dans la solution.

De façon surprenante la bromation ou même la chloration ne semblent pas augmenter la réactivité intrinsèque du dipôle comme pour d'autres iminosydnones. En effet, les deux points sont en dessous de la droite de réactivité de l'iminosydnone de référence III-2a, ce qui semble indiquer que l'abaissement du pKa est l'effet prédominant pouvant expliquer l'augmentation de la vitesse. Tous les points correspondant aux iminosydnones substituées en position C<sup>4</sup> sont sous la droite de corrélation (y compris l'iminosydnone chlorée III-18). Cela indique que des phénomènes influencent négativement la réaction et que la modification en C<sup>4</sup> change probablement des paramètres sur l'état de transition. Lorsque les groupements sont volumineux (X = I ou X = Me) l'effet est encore plus prononcé puisque la constante de vitesse est extrêmement faible dans le cas du composé C<sup>4</sup>-Me III-29. L'encombrement stérique du groupement en C<sup>4</sup> exercerait alors une forte influence négative sur la réaction.

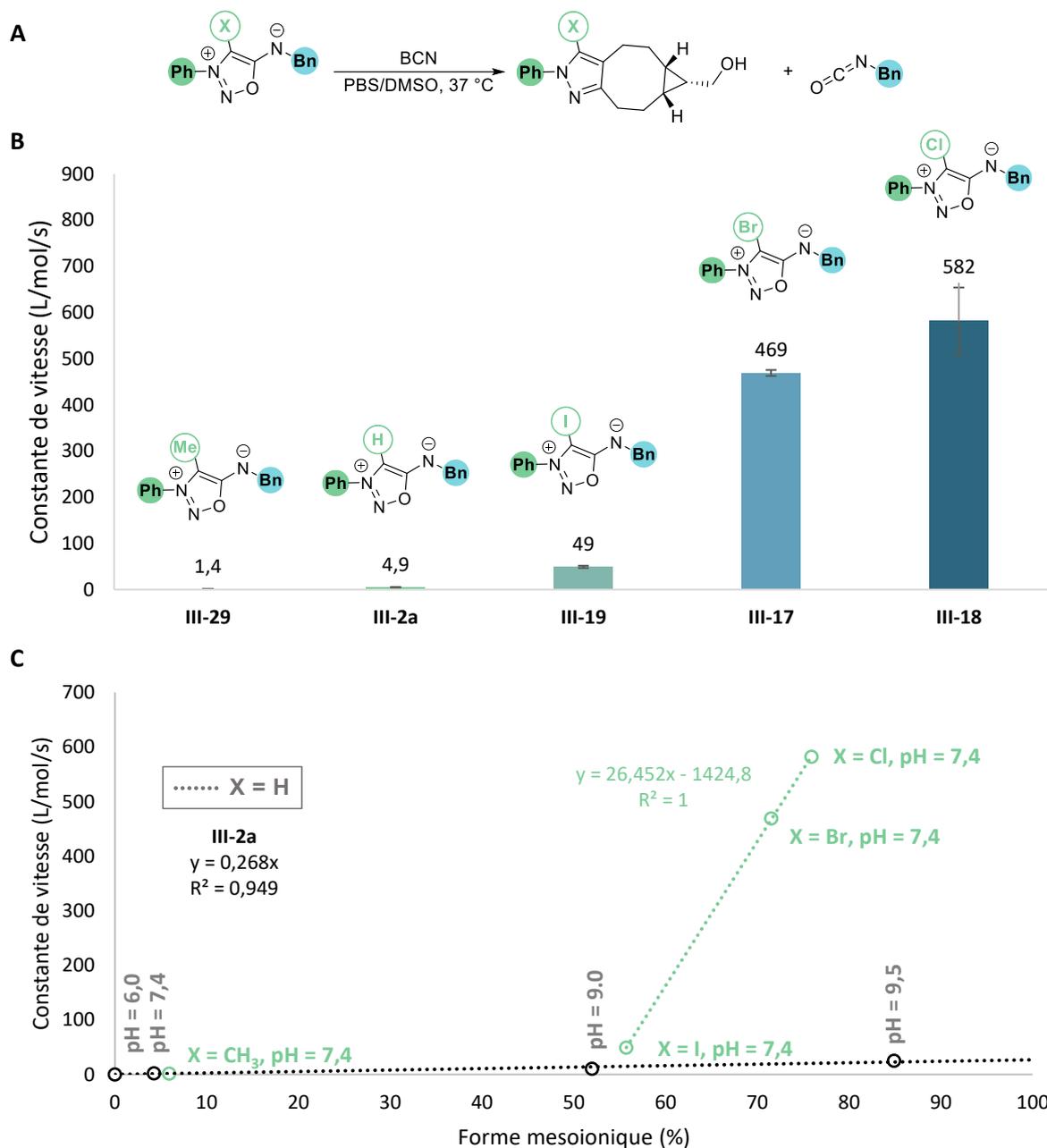
A noter que l'augmentation de la réactivité du dipôle en fonction de l'halogène semble être linéaire. Ainsi plus l'halogène est électroattracteur plus le dipôle est réactif. L'effet électroattracteur des halogènes baisse l'énergie de la LUMO ce qui entraîne une diminution de l'énergie de distorsion du dipôle, nécessaire pour atteindre l'état de transition.<sup>31</sup>

Des calculs théoriques sur l'état de transition au niveau M06-2X avec une base 6-31+G(d,p) montrent en effet que le proton du benzène du DBCO est assez proche spatialement de celui situé en position C<sup>4</sup> (**Figure 73**). Cet encombrement stérique pourrait augmenter la barrière d'activation de la réaction et donc ralentir la vitesse de la cycloaddition. D'autres calculs sont actuellement en cours au laboratoire pour modéliser les états de transitions des cycloadditions entre les iminosydnones modifiées en C<sup>4</sup> et le DBCO.



**Figure 73.** Etat de transition calculé entre **III-2a** et le DBCO modèle

Pour mieux évaluer la validité de cette hypothèse, la même expérience a été menée avec cette fois-ci du BCN, moins encombré que le DBCO, et surtout n'ayant pas de cycle aromatique susceptible d'interagir avec la position C<sup>4</sup> (**Figure 74**). Le coefficient de réactivité de **III-2a** avec le BCN a été déterminé de la même façon. Cette expérience permet de calculer que le BCN est 52 fois moins réactif que le DBCO avec l'iminosydnone **III-2a**. Cette valeur est similaire à celle déterminée avec **III-5a** (Cf **Figure 57** page 115).



**Figure 74.** A. Réaction étudiée B. Constantes de vitesse obtenues (100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, PBS/DMSO, pH = 7.4) pour les composés III-29, III-2a, III-19, III-17 et III-18 et le BCN C. Corrélation de la constante de vitesse en fonction du pourcentage de forme mésoionique dans la solution.

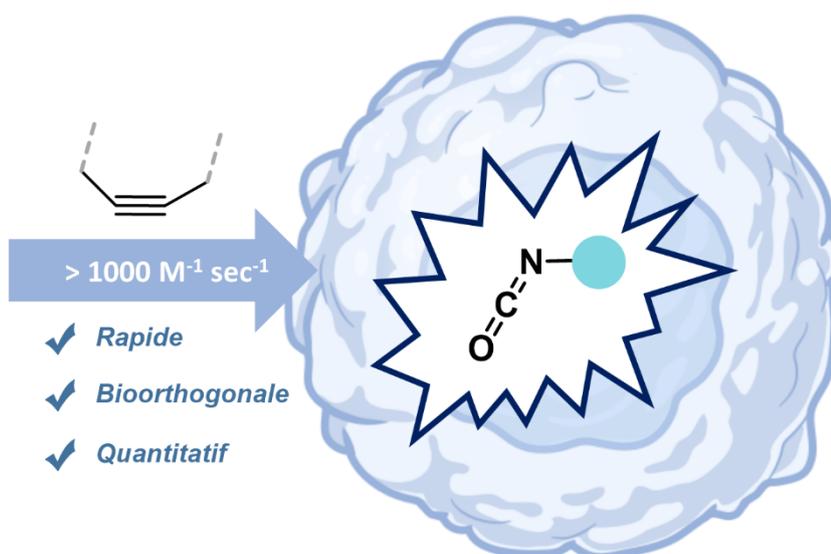
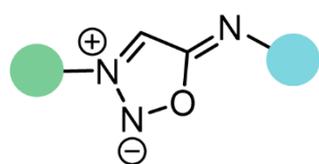
Avec le BCN l'effet halogène est observable de façon encore plus spectaculaire qu'avec le DBCO puisque le Brome en position C<sup>4</sup> augmente de près de 100 fois la cinétique de cycloaddition et presque 120 dans le cas du chlore (calculs effectués en divisant la constante de vitesse de III-2a et III-17 ou III-18 à pH = 7,4). L'iode quant à lui n'a pas d'impact significatif puisque qu'il augmente la vitesse de seulement deux fois. En effet l'iode est assez encombrant et son électronégativité se rapproche de celle de l'hydrogène. Lorsque les cinétiques obtenues sont en dessous de la droite grise (X = H) la vitesse de cycloaddition serait majoritairement conditionnée par les effets stériques alors que lorsque les points sont au-dessus c'est l'effet de distorsion du dipôle qui prévaut. A noter que lorsque dans le cas du composé III-29, le méthyle ne semble plus gêner la cycloaddition puisque la constante de vitesse

avec le BCN est de 1,4 L/mol/s et cette valeur est comparable à celle entre le composé **III-2a** et le BCN (2,0 L/mol/s). Ces résultats confirment donc le double effet bénéfique de la présence des halogènes en position C<sup>4</sup> des 6-*N*-alkyl-iminosydnonnes, celui lié à l'abaissement du pKa de la fonction N-H augmentant la proportion de forme mésoionique et celui lié à la distorsion du dipôle. Dans ce cas aussi l'augmentation de la réactivité due à la substitution de l'hydrogène par un halogène en position C<sup>4</sup> semble évoluer de façon linéaire.

## VI Conclusions et perspectives

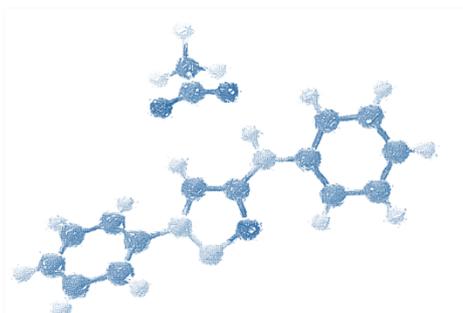
Pour conclure cette partie, deux nouvelles familles d'iminosydnonnes ont été développées : les 6-*N*-alkyl et les 6-*N*-aryl-iminosydnonnes. Pour cela deux nouvelles réactions ont été optimisées et utilisées pour la synthèse de plus 50 nouvelles iminosydnonnes. Une étude détaillée de ces nouveaux dipôles a permis de caractériser leurs propriétés physicochimiques. Ainsi, des études de stabilité ont montré que ces nouveaux composés sont stables dans les milieux biologiques et peuvent être utilisés dans des réactions de SPICC avec des constantes de vitesse sans précédent. De nombreux clichés cristallographiques ont aidé à comprendre leur structure. Les valeurs des cinétiques réactionnelles se sont révélées être jusqu'à un million de fois plus rapides que celles décrites dans la littérature avec d'autres iminosydnonnes. Des calculs DFT ont également été réalisés pour confirmer les tendances observées expérimentalement. Plus important encore, ces dipôles sont capables de libérer des isocyanates relativement stables qui peuvent être utilisés pour fonctionnaliser des protéines dans des conditions très douces. Ce système d'isocyanates cagés a ensuite pu être utilisé sur des cellules cancéreuses vivantes mettant en exergue l'extraordinaire efficacité de la cellule à se protéger des électrophiles grâce notamment à des mécanismes d'épuration impliquant certainement le glutathion. Cette étude a montré également que ce système permettait d'effectuer des analyses de Target-Fishing pour identifier les protéines au sein de la cellule. Pour compléter cette étude sur la réactivité de ces nouveaux dipôles, des travaux sur l'effet de la fonctionnalisation en C<sup>4</sup> ont été entamés mettant en lumière l'effet bénéfique de l'atome de chlore et de brome en position C<sup>4</sup> sur les cinétiques de cycloadditions.

- ✓ 2 nouvelles familles
- ✓ Isocyanates Cagés
- ✓ Non toxiques
- ✓ 3 nouvelles voies de synthèse



- ✓ Rapide
- ✓ Bioorthogonale
- ✓ Quantitatif

- ✓ Calculs DFT
- ✓ Influence C<sup>4</sup>
- ✓ Sonde Turn-ON



- ✓ Structure RX
- ✓ pKa
- ✓ UV-Vis

Figure 75. Schéma récapitulatif

Une nouvelle réaction de SNAr est en cours d'investigation au laboratoire, ce qui a permis notamment d'obtenir des composés totalement inédits, mais ces résultats restent préliminaires et des investigations sont encore nécessaires (Schéma 83).

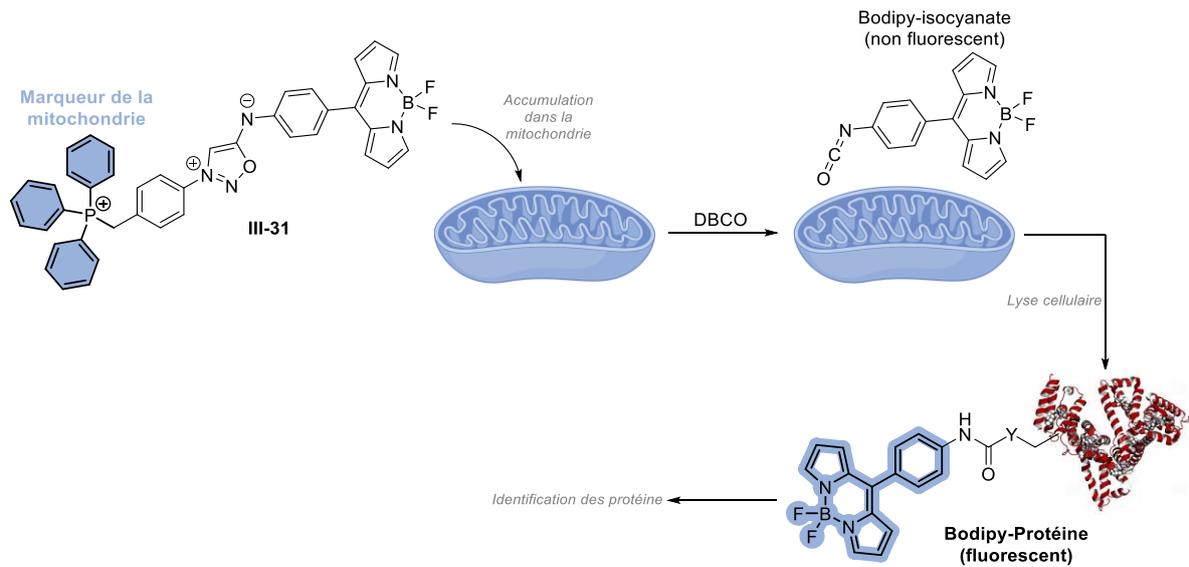


Schéma 83. Réaction de SNAr

Le projet dans sa globalité apporte de toutes nouvelles applications aux iminosydones pour la protéomique et plus généralement pour l'étude de mécanismes complexes. A l'avenir il serait intéressant de complexifier les structures des sondes pour explorer leur réactivité dans un compartiment cellulaire particulier (Schéma 84). Par exemple la sonde III-31 pourrait être utilisée pour étudier le relargage d'isocyanates pro-fluorescents dans la mitochondrie pour en étudier ces mécanismes. Ce type d'étude pourrait avoir une importance majeure puisque de nombreuses pathologies sont liées à des dysfonctionnements de la mitochondrie.<sup>129</sup>

<sup>129</sup> L. Pala, H. M. Senn, S. T. Caldwell, T. A. Prime, S. Warrington, T. P. Bright, H. A. Prag, C. Wilson, M. P. Murphy, and R. C. Hartley, *Front. Chem.*, 8 (2020), 783.

Phase I



Phase II

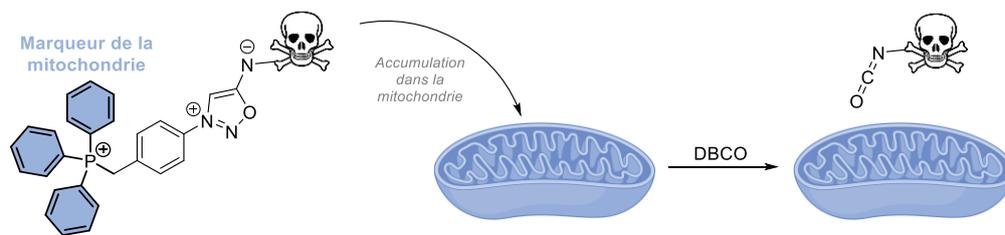
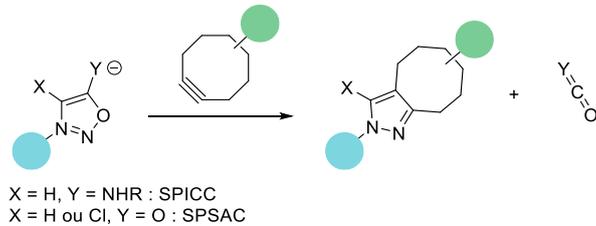


Schéma 84. Perspectives

Une deuxième application possible consisterait à remplacer le motif fluorescent par une drogue connue pour moduler le fonctionnement de la mitochondrie et d'évaluer l'impact de la libération de cette drogue isocyanate. L'isocyanate ainsi relargué se lierait de façon covalente à sa cible ce qui permettrait potentiellement d'observer un gain d'efficacité de la drogue.

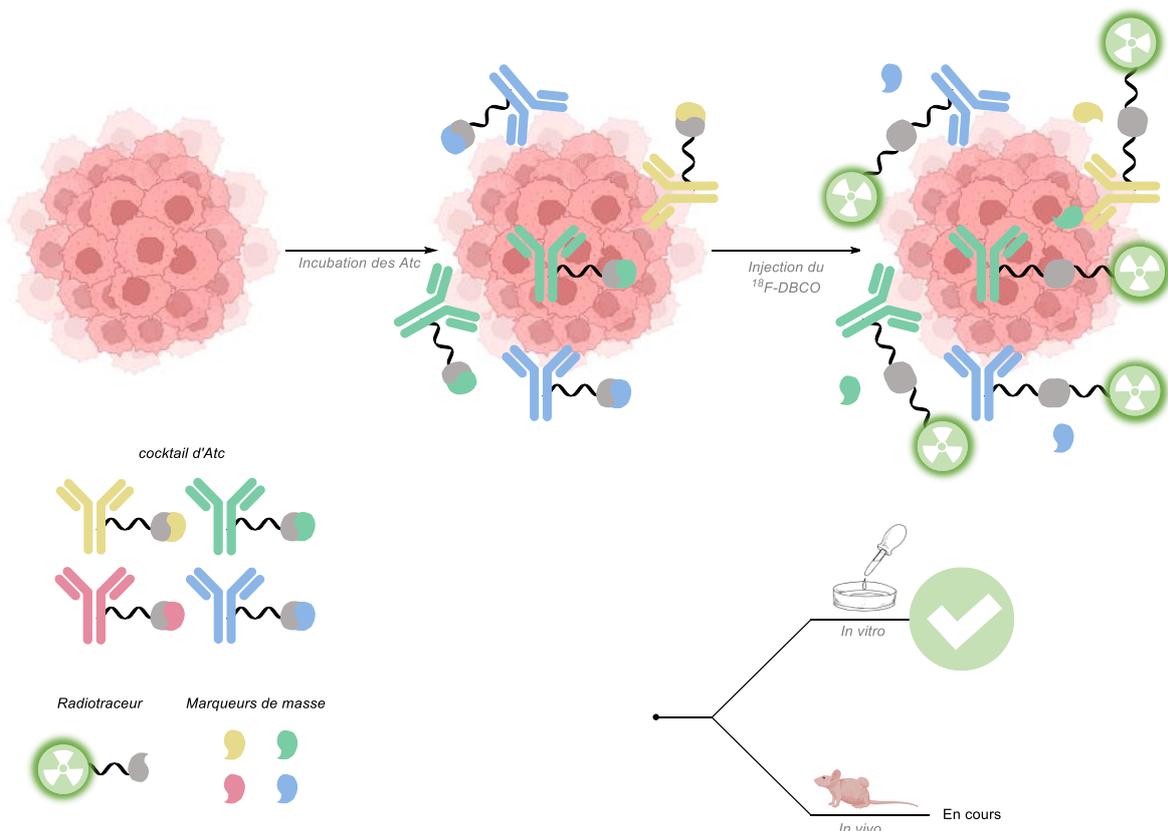
# Conclusion générale

Ces dernières années la chimie bioorthogonale a permis de développer des outils essentiels pour comprendre et/ou modifier le vivant. L'objectif de la thèse était de développer des méthodes de diagnostic du cancer en s'appuyant sur la chimie bioorthogonale et plus particulièrement sur les réactions de SPSAC et de SPICC (**Figure 76**).



**Figure 76.** Réactions de SPSAC et de SPICC

Un premier projet a permis de montrer que la réaction de SPICC pouvait être utilisée *in vitro* et *in vivo* pour la quantification d'épitopes antigéniques tumoraux. Le projet visait à développer une approche permettant la caractérisation de marqueurs tumoraux en alliant la chimie bioorthogonale et l'analyse par spectrométrie de masse (**Figure 77**).

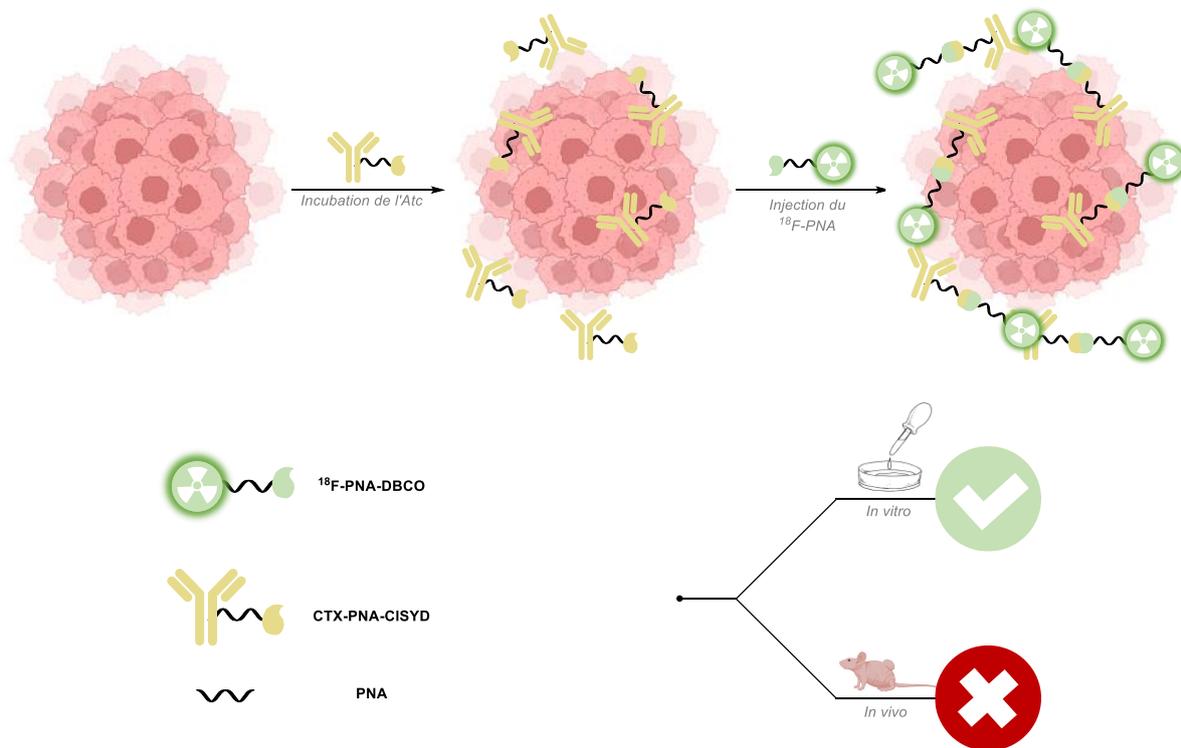


**Figure 77.** Quantification de récepteurs tumoraux par réaction SPICC

Cette technologie implique l'injection d'un cocktail d'anticorps étiquetés avec des marqueurs de masse, liés par un espaceur clivable par réaction SPICC. Ensuite, un dérivé cyclooctyne est injecté pour

induire une réaction de ligation coupure avec le cocktail d'anticorps fixés dans la zone tumorale. Ainsi cette réaction entraîne la libération des marqueurs de masse qu'il est possible de quantifier. L'abondance de chaque marqueur permet alors de connaître la répartition de chaque récepteur tumoral au sein de la lésion. Cette analyse permet de déterminer quel récepteur est le plus abondant dans la masse tumorale et donc de déterminer quel anticorps peut être utilisé pour soigner le patient. Ainsi, quatre anticorps ciblant quatre récepteurs différents ont été synthétisés. Ensuite les immunoconjugués ont été testés séparément sur cellules vivantes surexprimant le récepteur ciblé pour vérifier leur viabilité. Ensuite des expériences sur coupe tissulaire ont montré qu'il était possible de quantifier l'abondance de 4 récepteurs simultanément.

Un second projet s'attachait quant à lui à montrer l'intérêt des PNA pour le préciblage au fluor 18 par réaction de SPSAC entre une chlorosydnone et un DBCO.



**Figure 78.** Détection de tumeurs solides par préciblage SPSAC au  $^{18}\text{F}$  assisté par PNA

Des expériences sur cellules vivantes ont montré que la réaction de SPICC assistée par PNA a bien fonctionné. Malheureusement, l'expérience *in vivo* n'a montré aucun marquage spécifique de la tumeur. Des problèmes techniques sont sans doute la cause de cet échec mais il n'est pas possible d'exclure que ce soit tout simplement la méthode qui ne soit pas viable.

Enfin le dernier projet reporte la synthèse et la caractérisation de deux nouvelles familles d'iminosydnone : les iminosydnone alkyl et aryl (**Figure 79**). Pour avoir accès à ces deux nouvelles classes, deux réactions ont pu être développées. Pour la synthèse d'iminosydnone alkyl une amination réductrice s'est avérée être la plus adaptée alors que pour les iminosydnone aryls c'est une réaction de nitrosylation/cyclodeshydratation qui a donné les meilleurs résultats. Ces deux nouvelles familles d'iminosydnone ont la particularité d'être capables de libérer des isocyanates et ce de façon très rapide en présence d'alcyne tendu. Nous avons utilisé cette particularité pour explorer dans un premier temps la modification *in vitro* de protéines en conditions très douces. En parallèle de ça, des études cinétiques ont permis de rationaliser les effets de la température, du pH du milieu et de la

structure (du cyclooctyne et de l'iminosydnone) sur la vitesse de cycloaddition. Des calculs théoriques ont permis de confirmer tous ces résultats.

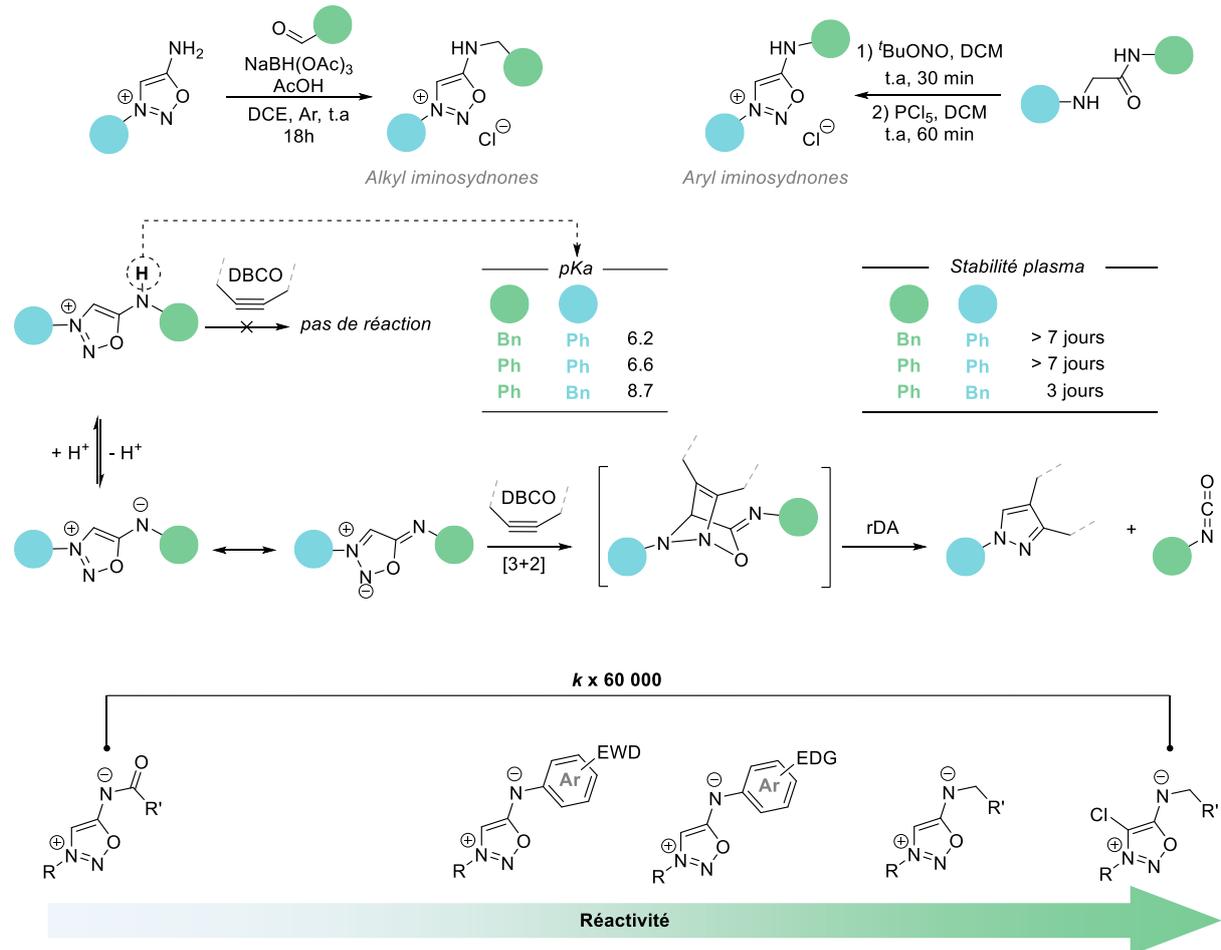


Figure 79. Synthèse et caractérisation de deux nouvelles familles d'iminosydnone

Pour finir, des expériences sur cellules vivantes nous ont permis de montrer que l'isocyanate relargué par réaction SPICC pouvait réagir avec les protéines intracellulaires. Nous avons ainsi pu montrer que les protéines intracellulaires pouvaient réagir avec un isocyanate fluorescent permettant leur visualisations dans les cellules vivantes. Une preuve de concept à également pu être développée en utilisant une alkyl iminosydnone alcyne capable de libérer par réaction SPICC du propargyl isocyanate. Les protéines modifiées par l'alcyne peuvent ensuite être identifiées par des techniques classiques de Fishing à l'aide d'azoture biotinylés pour des applications en protéomique.



# Partie expérimentale

---

## I Material and equipment

All chemical products commercially available were purchased from Sigma-Aldrich, Acros and Fluka and used without further purification. All anhydrous solvents were purchased in anhydrous form and used without further purification. THF was dried from sodium/benzophenone under nitrogen. Dichloromethane was distilled from calcium hydride under nitrogen.

Reactions were monitored by TLC carried out on silica 0,25 EM (60 F254, Merck) using UV light as visualizing agent and basic aqueous permanganate as developing agent.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) were measured on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from residual solvents peaks and coupling constants are reported as Hertz (Hz). Splitting patterns are designated as singlet (s), broad singlet (br. s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintet (quint), heptuplet (hept), multiplet (m). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

Electrospray mass spectra were obtained using an ESI-Quadripole autopurify, Waters (pump: 2545, mass: ZQ2000) mass Spectrometer.

High resolution mass spectroscopy of the final compounds were determined using a Xevo<sup>®</sup> G2-XS QTof

Infrared spectra (IR) were obtained on a Perkin Elmer system 2000 FT-IR spectrophotometer or a Perkin Elmer UATR TWO FTIR spectrophotometer and are reported as wavelength numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Melting points (Mp) were obtained on a BÜCHI Melting Point B-545 and are reported in °C.

Absorbances were measured on a UV JASCO V-750 equipped with an injection module (GSP-909) and a Peltier (EHCS-760).

Steady state spectra were reported on an Edinburgh FS5 spectrofluorometer with SC20 module.

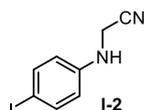
Purification on reversed phase chromatography were done with a Pruriflash<sup>®</sup> XS520Plus (Columns: BIOTAGE<sup>®</sup> SNAP Cartridge KP-C18-SH-120g or KP-C18-SH-60g) or by Supercritical fluid chromatography (SFC) JASCO<sup>®</sup>.

## II Partie expérimentale Chapitre 1

### II.1 Synthetic Procedure and analytical Data for TMPP Tags

#### II.1.i Synthesis of iminosydnone linker

##### 2-((4-iodophenyl)amino)acetonitrile – I-2



C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>I  
MW: 258,06 g/mol  
Yellow Powder  
90%

To a suspension of 4-iodoaniline (28 g, 0.13 mol, 1 equiv.) in MeCN (300 mL), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21 g, 0.15 mol, 1.2 equiv.) and NaI (19 g, 0.13 mol, 1 equiv.) were added. Chloroacetonitrile (16 mL, 0.26 mol, 2 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred and refluxed for 65 hours, under argon atmosphere. The dark mixture was allowed to cool down at room temperature and was filtered on a pad of Celite (rinsing with EtOAc). The filtrate was washed with brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> before concentration under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, from 8/2 to 7/3 heptane/EtOAc) to afford the desired product **I-2** as a yellow powder (33 g, 0.11 mol, 90%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), NH unobserved.

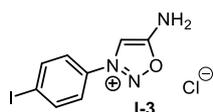
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 144.8, 138.3 (2C), 116.7, 115.8 (2C), 81.7, 32.6.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3375, 2256.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M+H]<sup>+</sup> 259.

**Mp:** 113 – 115 °C.

##### 5-amino-3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – I-3



C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>IClN<sub>3</sub>O  
MW: 323.52 g/mol  
Beige Powder  
84%

**I-2** (30 g, 0.11 mol, 1 equiv.) was suspended in DCM and <sup>t</sup>BuONO (39.2 mL, 0.33 mol, 3 equiv.) was added to this solution. After completion of the reaction, the mixture was evaporated and suspended in freshly dried HCl 4M in dioxane (125 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon. Et<sub>2</sub>O was added and the precipitate was collected by filtration, washed with Et<sub>2</sub>O to afford the product as a beige powder (31.8 g, 0.10 mol, 84%).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 9.96 (s, 2H), 8.67 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H).

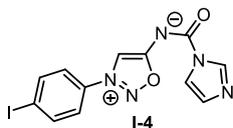
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 169.4, 139.1 (2C), 132.4, 124.4 (2C), 102.4, 101.6.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1675, 829.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> 288.

**Mp:** 209 – 211 °C.

(1*H*-imidazole-1-carbonyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide – **I-4**



C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>IN<sub>5</sub>O  
MW: 381.13 g/mol  
Beige solid  
89%

To a solution of 1,1'-carbonyldiimidazole (1.1 g, 6.8 mmol, 1.1 equiv.) in a mixture MeCN/DMF (9 mL/3 mL) was added **I-3** (2 g, 6.2 mmol, 1 equiv.). The solution was stirred at room temperature for 3 hours before being concentrated under reduced pressure. The resulting solid was washed with water and Et<sub>2</sub>O to afford the desired product as a beige solid (2.1 g, 5.5 mmol, 89%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 9.03 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.14-8.12 (m, 2H), 7.92-7.90 (m, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.01 (s, 1H).

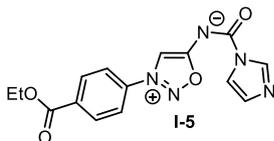
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 174.3, 153.1, 139.0 (2C), 136.8, 133.2, 129.4, 124.3 (2C), 117.3, 106.5, 100.8.

IR (cm<sup>-1</sup>): 1671, 1570, 1374, 1296, 1008, 976.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 382.

Mp: 221 – 223 °C.

(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(1*H*-imidazole-1-carbonyl)amide – **I-5**



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 327.30 g/mol  
Yellow Powder  
62%

Compound **I-4** (0.5 g, 1.31 mmol, 1 equiv.) was dissolved in a mixture of absolute EtOH (7.5 mL) and Et<sub>3</sub>N (7.5 mL). PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (92mg, 0.13 mmol, 0.1 equiv.) was added and the reaction mixture was kept under a CO atmosphere for 18 hours at 80 °C. The solvent was evaporated, and the crude mixture was charged on a plug of silica. Impurities were removed by first filtrating with DCM, and then the desired product was obtained by flushing the plug with EtOAc. After evaporation of this filtrate, the product was obtained as a beige solid (0.26 g, 1.22 mmol, 62%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.45 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.36-8.34 (m, 2H), 7.93-7.91 (m, 2H), 7.64-7.62 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 4.45 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

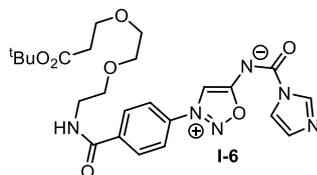
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 175.1, 164.3, 154.7, 137.6, 136.3, 135.3, 132.0 (2C), 129.8, 121.7 (2C), 117.3, 104.6, 62.2, 14.3.

IR (cm<sup>-1</sup>): 1718, 1666, 1575, 1371, 1278, 846, 769.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 328

Mp: 159 – 161 °C

(3-(4-((2-(2-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxopropoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(1*H*-imidazole-1-carbonyl)amide – **I-6**



C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>  
MW: 514.21 g/mol  
Yellow foam  
42% (over two steps)

Compound **I-5** (2.0 g, 6.1 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in a mixture of THF (7.5 mL) and H<sub>2</sub>O (7.5 mL). NaOH (0.269 g, 6.7 mmol, 1.1 equiv.) in water (1.0 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, THF was evaporated, and the water solution was washed with DCM. Then, HCl (1M) was added until pH reached 3 and the precipitate was collected by centrifugation and dry under vacuum. The yellow wish solid was solubilized in a mixture of MeCN (7.5 mL) and DMF (7.5 mL) and DiPEA (3.1 mL, 18.3 mmol, 3.0 equiv.) was added followed by HATU (2.8 g, 7.3 mmol, 1.2 equiv.) and NH<sub>2</sub>PEG<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu (1.56 g, 6.7 mmol, 1.1 equiv.). Solvents were removed under vacuum and the crude mixture was purified by column chromatography (DCM 100% to DCM/MeOH 94/6) to afford **I-6** as a yellow foam (1.3 g, 2.5 mmol, 42% over two steps).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.46 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.18-8.15 (m, 2H), 7.96-7.96 (m, 2H), 7.63 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.05-7.04 (m, 1H), 3.76-3.61 (m, 11H), 2.48 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

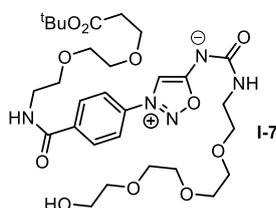
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 175.0, 171.1, 165.0, 154.5, 139.6, 137.5, 135.1, 129.8 (2C), 129.4, 121.7 (2C), 117.4, 105.6, 100.0, 80.8, 70.3, 69.4, 66.9, 40.1, 36.3, 28.1 (3C).

IR (cm<sup>-1</sup>): 3317, 3135, 2977, 2872, 1723, 1660, 1572, 1502, 1470, 1434, 1414, 1366, 1351, 1291, 1254, 1223, 1207, 1157, 1093, 1051, 1008, 974, 843.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H-imidazole]<sup>+</sup> 448

HRMS (ESI) : calculated for [C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>7</sub>]<sup>+</sup> 537.2068; found 537.2070

(3-(4-((2-(2-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxopropoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)amide – **I-7**



C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>  
MW: 639.70 g/mol  
yellow oil  
52% over two steps

Compound **I-6** (0.800 g, 1.55 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in MeCN (8.0 mL). MeI (0.387 mL, 6.22 mmol, 4.0 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16h. Then, volatiles were removed. And CHCl<sub>3</sub> (stabilized on amylene) (15.0 mL) and NH<sub>2</sub>PEG<sub>4</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu (0.330 g, 1.70 mmol, 1.1 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at room temperature for 16h. Solvent was removed under vacuum and the crude mixture was purified by column chromatography (DCM/MeOH 94/06) to afford **3** as a yellow oil (0.582 g, 0.910 mmol, 52% over two steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.22 (s, 1H), 8.11 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.86 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.36 (brs, 1H), 6.23 (brs, 1H), 3.78-3.57 (m, 24H), 3.49-3.41 (m, 2H), 2.47 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H), NH unobserved.

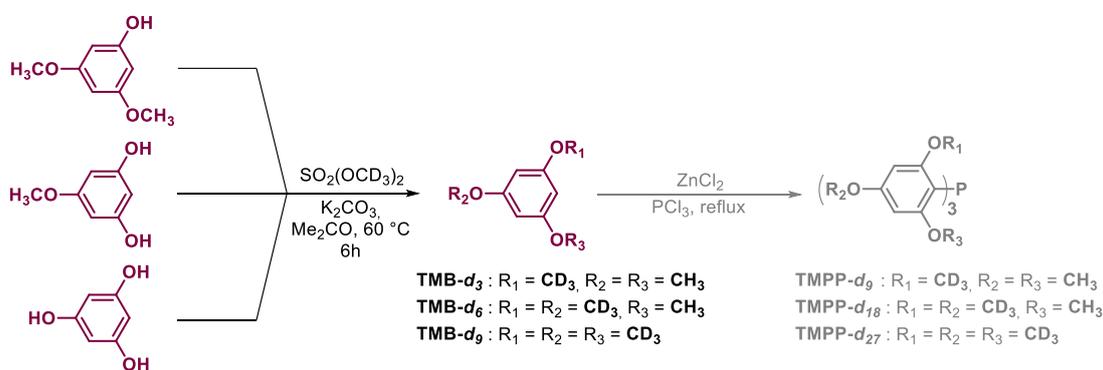
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.2 (2C), 165.4, 139.0, 135.7, 129.7 (2C), 121.8 (2C), 102.6, 81.0, 72.9, 70.7, 70.6, 70.4 (6C), 69.7, 67.0, 61.6, 40.5, 40.2, 36.4, 28.2 (3C).

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3334, 2870, 1725, 1637, 1590, 1504, 1439, 1392, 1366, 1352, 1287, 1216, 1115, 957.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 640

**HRMS (ESI) :** calculated for [C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>11</sub>]<sup>+</sup> 662.3001 found 662.3001

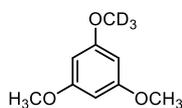
### II.1.ii Synthesis of trimethoxybenzene



#### General procedure for TMB synthesis

The appropriate phenol (1.0 equiv.) was suspended in dry acetone (0.5 M) in an oven dry sealed tube, then K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and deuterated-dimethylsulfate (1.1 equiv. 2,2 equiv. or 3,3 equiv. depending of the starting material) was successively added to the solution. The resulting mixture was then heated at 60 °C for six hours. After completion of the reaction, the crude product was evaporated and purified by column chromatography on silica gel (Hep/AcOEt 90/10) to give the desired trimethoxybenzene (81% to 91%).

#### 1,3-dimethoxy-5-(methoxy-*d*<sub>3</sub>)benzene – TMB-*d*<sub>3</sub>



C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>D<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 171.21 g/mol  
 White solid  
 88%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 6.09 (s, 3H), 3.77 (s, 6H).

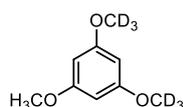
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 161.6 (3C), 93.0 (3C), 55.5 (3C).

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3001, 2961, 2939, 2840, 1590, 1477, 1460, 1427, 1194, 1167, 1151, 1107, 1069.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 172

**HRMS (ESI) :** calculated for [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>D<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 172.1053 found 172.1055

1-methoxy-3,5-bis(methoxy-*d*<sub>3</sub>)benzene – TMB-*d*<sub>6</sub>



C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 174.22 g/mol  
White solid  
81%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 6.09 (s, 3H), 3.77 (s, 3H).

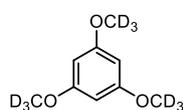
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 161.6 (3C), 93.0(3C), 55.5 (3C).

IR (cm<sup>-1</sup>): 3000, 2940, 2841, 2252, 2220, 2070, 1591, 1471, 1437, 1199, 1174, 1154, 1108, 1057.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 175

HRMS (ESI) : calculated for [C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 175.1241 found 175.1242

1,3,5-tris(methoxy-*d*<sub>3</sub>)benzene – TMB-*d*<sub>9</sub>



C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>D<sub>9</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 177.24 g/mol  
White solid  
91%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 6.09 (s, 3H).

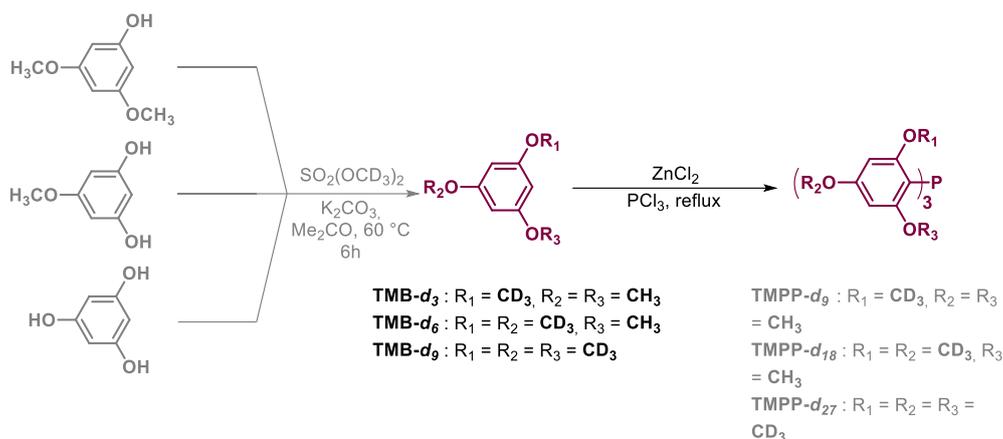
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 161.6 (3C), 93.0 (3C), 55.5 (m, 3C).

IR (cm<sup>-1</sup>): 2252, 2220, 2130, 2070, 1590, 1466, 1170, 1107, 1054.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 178

HRMS (ESI) : calculated for [C<sub>9</sub>H<sub>4</sub>D<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 178.1429 found 178.1429

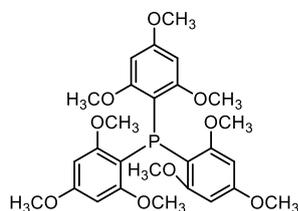
### II.1.iii Synthesis of tris-trimethoxyphenylphosphines



#### General procedure for TMPP synthesis

Appropriate trimethoxybenzene (3.0 equiv.) and ZnCl<sub>2</sub> extra dry (1.0 equiv. stored in glovebox) were added into a sealed vial in glovebox. The vial was sealed, then PCl<sub>3</sub> (3.0 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 16 h, then cooled to room temperature. Toluene (2.0 mL) was added dropwise very carefully to the mixture at 0 °C and then removed to afford a viscous residual complex of ZnCl<sub>2</sub>. Aqueous ammonia was then added at 0 °C and the solution was extracted with toluene. The organic phases were combined and dry over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. The crude material was recrystallized in Et<sub>2</sub>O to afford the desired phosphine.

#### tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine – TMPP-*d*<sub>0</sub>



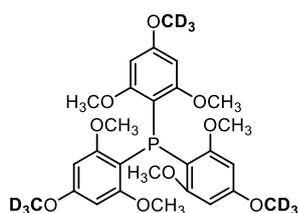
C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>O<sub>9</sub>P  
 MW: 532.18 g/mol  
 White solid  
 22%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 6.03 (d, <sup>4</sup>J<sub>P-H</sub> = 2.5 Hz, 6H), 3.77 (s, 9H), 3.48 (s, 18H).

This compound was obtained as described in the literature.<sup>130</sup>

<sup>130</sup> Protopopov, *Obshch. Khim.*(1963), 33, 3050–3052

tris(2,6-dimethoxy-4-(methoxy-*d*<sub>3</sub>)phenyl)phosphine – **TMPP-*d*<sub>9</sub>**



C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>D<sub>9</sub>O<sub>9</sub>P  
 MW: 541.58 g/mol  
 White solid  
 31%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 6.03 (d, <sup>4</sup>J<sub>P-H</sub> = 2.5 Hz, 6H), 3.77 (s, 6H), 3.48 (s, 12H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 163.3, (d, <sup>4</sup>J<sub>P-C</sub> = 9 Hz, 6C), 160.8 (3C), 108.4 (d, <sup>4</sup>J<sub>P-C</sub> = 19 Hz, 3C), 91.31 (6C), 56.3 (6C), 55.2 (3C).

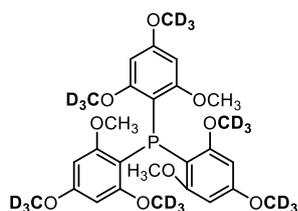
**<sup>31</sup>P NMR (163 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** -70.04.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2072, 1712, 1590, 1572, 1452, 1415, 1347, 1290, 1230, 1191, 1168, 1125, 1106, 1002, 977.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 543

**HRMS (ESI) :** calculated for [C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>D<sub>9</sub>O<sub>9</sub>P]<sup>+</sup> 541.2427 found 541.2429

tris(2,6-dimethoxy-4-(methoxy-*d*<sub>3</sub>)phenyl)phosphine – **TMPP-*d*<sub>18</sub>**



C<sub>27</sub>H<sub>15</sub>D<sub>18</sub>O<sub>9</sub>P  
 MW: 550.63 g/mol  
 White solid  
 29%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 6.02 (d, *J* = 2.4 Hz, 6H), 3.77 (s, 3H), 3.48 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 167.3, (m, 6C), 160.8 (3C), 100.1 (3C), 91.6 (6C), 56.3 (6C), 55.2 (m, 3C).

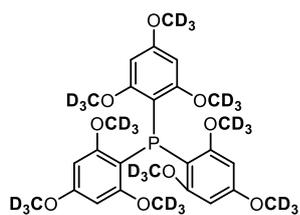
**<sup>31</sup>P NMR (163 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** -70.10.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3338, 2221, 2071, 1708, 1590, 1572, 1452, 1415, 1347, 1291, 1227, 1195, 1168, 1125, 1106, 1002.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 551

**HRMS (ESI) :** calculated for [C<sub>27</sub>H<sub>16</sub>D<sub>18</sub>O<sub>9</sub>P]<sup>+</sup> 551.3070 found 551.3071

tris(2,4,6-tris(methoxy-*d*<sub>3</sub>)phenyl)phosphine – **TMPP-*d*<sub>27</sub>**



C<sub>27</sub>H<sub>6</sub>D<sub>27</sub>O<sub>9</sub>P  
MW: 559.69 g/mol  
White solid  
36%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 6.04 (d, *J* = 2.4 Hz, 6H).

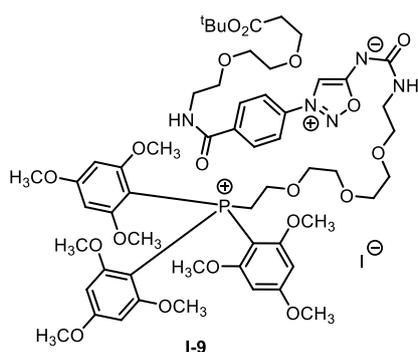
This compound was obtained as described in the literature.<sup>130</sup>

## II.1.iv TAG Synthesis

### General procedure for Tagged linker synthesis

Et<sub>3</sub>N (0.527 mL, 3.91 mmol, 5.0 equiv.) and TsCl (0.297 g, 1.56 mmol, 2.0 equiv.) was added to a solution of **I-7** (0.500 mg, 0.78 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (50.0 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. Then, DCM was removed under reduced pressure and the crude mixture was rapidly purified by flash chromatography (DCM/MeOH 98/02), divided in 4 batches, and directly engaged in the next step. The tosylated intermediate (1.0 equiv.) was dissolved in dry DMF (0.2 M) and the appropriate phosphine (1.0 equiv.) and NaI (1.1 equiv.) were added to the solution. The mixture was heated overnight at 40 °C. DMF was removed under reduced pressure and AcOEt 4.0 mL was added in order to precipitated impurities. The suspension was centrifuged, and the supernatant was collected and evaporated under reduced pressure. The crude mixture was finally purified by column chromatography on silica gel (slowly DCM 100% to DCM/MeOH 95/05) to give the desired product **I-9**, **I-12**, **I-13**, **I-14** as a yellow oil.

((2-(2-(2-(bis(4-((1-oxidaneyl)-15-methyl)-2,6-dimethoxyphenyl)(2-((1-oxidaneyl)-15-methyl)-4,6-dimethoxyphenyl)phosphonio)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)(3-(4-((2-(2-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxopropoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide iodide – **I-9**



C<sub>56</sub>H<sub>77</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P  
MW: 1282.12 g/mol  
Yellow oil  
28%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.29-8.24 (m, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 6.11 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 3.87 (s, 9H), 3.73-3.32 (m, 44H), 2.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.2, 165.9 (d, *J* = 1 Hz, 3C), 165.4, 163.9 (d, *J* = 1 Hz, 6C), 139.2, 135.4, 130.1 (2C), 121.6 (2C), 102.4, 91.6 (d, *J* = 106 Hz, 3C), 91.2 (d, *J* = 7 Hz, 6C), 80.8, 70.6-70.3 (m, 8C), 69.5, 67.0, 66.6, 56.4 (6C), 56.2 (3C), 40.4, 40.0, 36.4, 28.2 (3C). (2C missing)

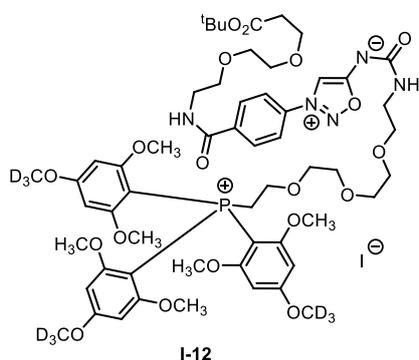
**<sup>31</sup>P NMR (163 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 0.1.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2938, 1726, 2640, 1596, 1578, 1502, 1458, 1413, 1337, 1288, 1231, 1208, 1161, 1126, 1096, 1025, 951, 919, 815.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>2+</sup> 578

**HRMS (ESI) :** calculated for [C<sub>56</sub>H<sub>77</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P]<sup>+</sup> 1154.4944 found 1154.4925

((2-(2-(2-(2-((1-oxidaneyl)-15-methyl)-6-methoxy-4-(methoxy-d3)phenyl)bis(2,6-dimethoxy-4-(methoxy-d3)phenyl)phosphonio)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)(3-(4-((2-(2-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxopropoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide iodide – **I-12**



$C_{56}H_{68}D_9IN_5O_{19}P$   
 MW: 1291.18 g/mol  
 Yellow oil  
 32%

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm):** 8.23 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.59 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 6.11 (d,  $J = 4.7$  Hz, 6H), 5.72 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.87 (s, 6H), 3.72 – 3.56 (m, 30H), 3.49–3.35 (m, 8H), 2.48 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm):** 172.8, 171.2, 165.9 (3C), 165.4, 163.9 (6C), 161.8, 139.2, 135.4, 130.0 (2C), 121.5 (2C), 101.9, 91.6 (d,  $J = 106$  Hz, 3C), 91.2 (d,  $J = 7$  Hz, 6C), 80.8, 70.6–70.3 (m, 8C), 69.5, 67.0, 66.6, 56.4 (6C), 56.2 (3C), 40.4, 40.0, 36.4, 28.2 (3C).

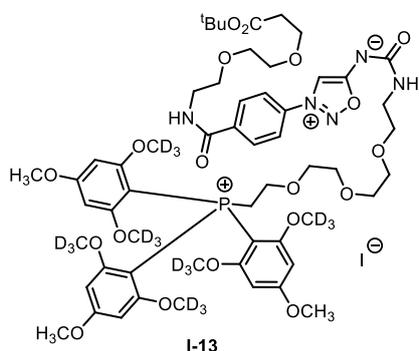
**$^{31}P$  NMR (163 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm):** 0.1.

**IR ( $cm^{-1}$ ):** 3284, 2925, 2072, 1725, 1643, 1596, 1577, 1503, 1463, 1417, 1346, 1289, 1204, 1232, 1166, 1129, 1104, 1012, 955, 815, 728.

**LCMS (ESI) :**  $m/z$   $[M+H]^{2+}$  583

**HRMS (ESI) :** calculated for  $[C_{56}H_{68}D_9N_5O_{19}P]^+$  1163.5509 found 1163.5503

((2-(2-(2-(2-(bis(4-((11-oxidaneyl)-15-methyl)-2,6-bis(methoxy-d<sub>3</sub>)phenyl)(4-methoxy-2,6-bis(methoxy-d<sub>3</sub>)phenyl)phosphonio)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)(3-(4-((2-(2-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxopropoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide iodide – **I-13**



C<sub>56</sub>H<sub>59</sub>D<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P  
 MW: 1300.23 g/mol  
 Yellow oil  
 15%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.53 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.11 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 5.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.75-3.53 (m, 25H), 3.48-3.33 (m, 7H), 2.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 172.9, 171.2, 165.9 (3C), 165.4, 163.9 (6C), 161.8, 139.2, 135.4, 130.0 (2C), 121.5 (2C), 101.9, 91.6 (d, *J* = 106 Hz, 3C), 91.2 (d, *J* = 7 Hz, 6C), 80.8, 70.6-70.3 (m, 8C), 69.5, 67.0, 66.6, 56.4 (6C), 56.2 (3C), 40.4, 40.0, 36.4, 28.2 (3C).

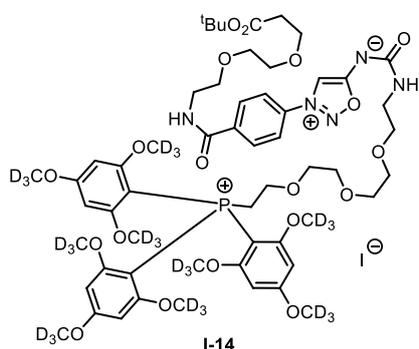
**<sup>31</sup>P NMR (163 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 0.1.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2938, 1726, 2640, 1596, 1578, 1502, 1458, 1413, 1337, 1288, 1231, 1208, 1161, 1126, 1096, 1025, 951, 919, 815.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>2+</sup> 586

**HRMS (ESI) :** calculated for [C<sub>56</sub>H<sub>59</sub>D<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P]<sup>+</sup> 1172.6074 found 1172.6052

(3-(4-((2-(2-(3-(tert-butoxy)-3-oxopropoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-(2-(2-(2-(tris(2,4,6-tris(methoxy-*d*<sub>3</sub>)phenyl)phosphonio)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)amide iodide – **I-14**



C<sub>56</sub>H<sub>50</sub>D<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P  
 MW: 1309.29 g/mol  
 Yellow oil  
 25%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.53 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 6.11 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 5.70 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.71-3.55 (m, 17H), 3.48 – 3.44 (m, 8H), 2.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 172.8, 171.2, 165.8 (3C), 165.4, 163.9 (6C), 161.7, 139.0, 135.7, 130.0 (2C), 121.5 (2C), 101.9, 91.6 (d, *J* = 106.1 Hz, 3C), 91.2 (d, *J* = 7.1 Hz, 6C), 80.8, 70.6-70.3 (m, 8C), 69.5, 67.0, 66.6 (d, *J* = 3.9 Hz), 56.1-55.3 (m, 9C), 40.4, 40.0, 36.4, 28.2 (3C).

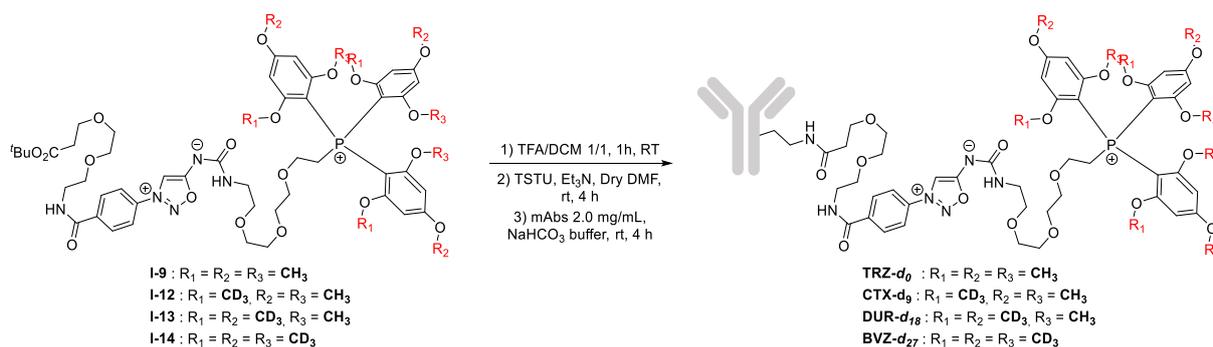
**<sup>31</sup>P NMR (163 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 0.1.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2938, 1726, 2640, 1596, 1578, 1502, 1458, 1413, 1337, 1288, 1231, 1208, 1161, 1126, 1096, 1025, 951, 919, 815.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>2+</sup> 590

**HRMS (ESI) :** calculated for [C<sub>56</sub>H<sub>50</sub>D<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P]<sup>+</sup> 1181.6644 found 1181.6646

## II.2 General procedure for antibody-Tag conjugates preparation



### General procedure for TMPP-antibody bioconjugation

The appropriated *tert*-butyl ester was dissolved in a solution of DCM/TFA 1/1 (0.05 M) and the solution was stirred for 2 hours. After completion of the reaction, the crude mixture was evaporated under high vacuum over night to give the corresponding carboxylic acid quantitatively. To this acid (1.0 equiv.), TSTU (1.05 equiv.) and Et<sub>3</sub>N (1.05 equiv.) were added in dry DMF at 25 °C for 4 hours. Then 10-20 μL, depending of the mAb, of this solution (10-20 equiv.) were then added to 1.0 mL of a solution of mAb at 2.0 mg/mL in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3. The mixture was then incubated at 25°C for 4 hours and the resulting mAbs-d<sub>xx</sub> were purified *via* a minitrap® cartridge (1000 μL loading, 1000 μL elution of 0.9% NaCl in DI water) **Table S1**.

**Table S1.** Equivalent of activated ester used

mAb-d <sub>xx</sub>	<i>tert</i> -butyl ester (equiv.)
TRZ-d <sub>0</sub>	I-9 (20 equiv.)
CTX-d <sub>9</sub>	I-12 (20 equiv.)
DUR-d <sub>18</sub>	I-13 (10 equiv.)
BVZ-d <sub>27</sub>	I-14 (20 equiv.)

### General procedure for BCA assay

The concentration of immunoconjugates (TRZ-d<sub>0</sub>, CTX-d<sub>9</sub>, DUR-d<sub>18</sub>, BVZ-d<sub>27</sub>) was determined by BCA assay. Briefly in a 96-well plate, 90 μL of the BCA Working Reagent solution were added to 10 μL of the antibody solution and incubated 30 min at 37 °C. After 5 min, the temperature was cooling down to room temperature, the absorbance of the solution at 562 nm was measured on a microplate spectrophotometer (CLARIO Start Plus, BM6 LABTECH). The antibody concentration was determined by comparison to a standard calibration curved made with BSA protein at concentration ranging from 0.2 to 1.0 g/L. (**Figure S1**). Results in **Table S2**.

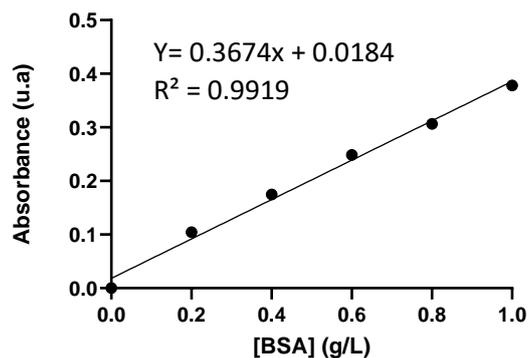
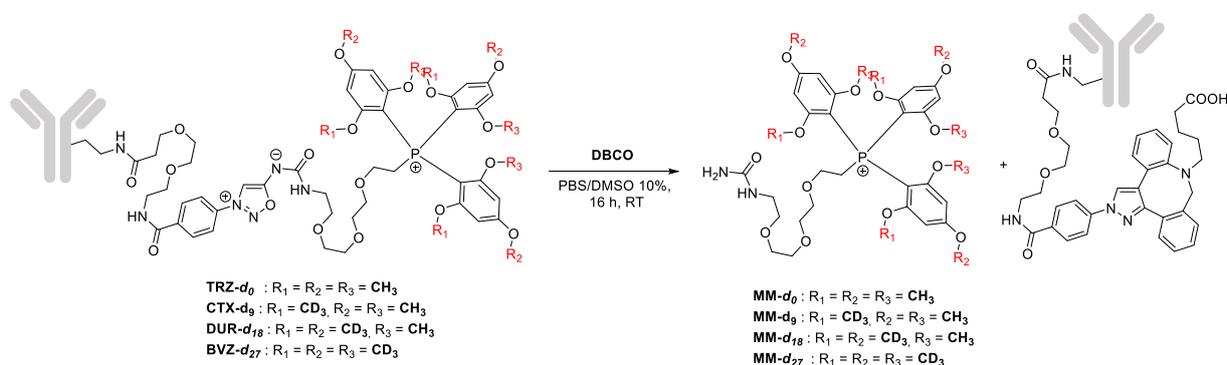


Figure S1. BSA standard calibration curve. BSA absorption at 562 nm versus protein concentration (g/L)

Table S2. Concentration of mAb- $d_{xx}$

mAb- $d_{xx}$	Concentration
TRZ- $d_0$	1.26 mg/mL
CTX- $d_9$	1.06 mg/mL
DUR- $d_{18}$	1.28 mg/mL
BVZ- $d_{27}$	0.54 mg/mL

### General procedure for TAR (Tag-Antibody-Ratio) determination

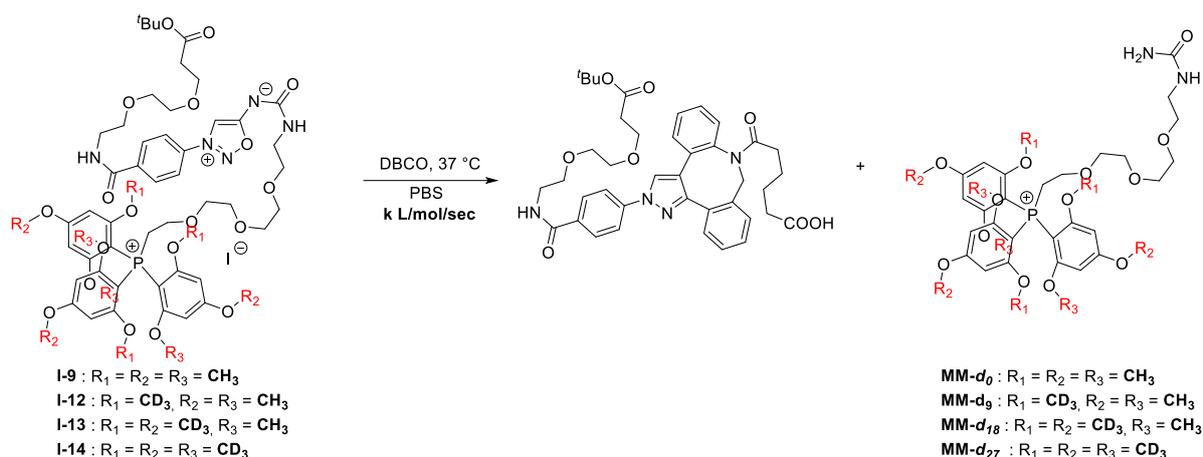


DBCO (10  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 100 equiv./mAbs) was added to a solution of mAbs- $d_{xx}$  (100  $\mu\text{L}$ , 1 equiv.) in 0.9% NaCl solution. The mixture was agitated overnight, and the released Tag was quantified in this solution by HPLC. Knowing the concentration of both the antibody and the tag the TAR was calculated by dividing the amount the EM- $d_{xx}$  by the amount of antibody. Results in **Table S3**.

Table S3. TAR of mAbs- $d_{xx}$

mAb- $d_{xx}$	TAR
TRZ- $d_0$	4.16
CTX- $d_9$	2.49
DUR- $d_{18}$	2.35
BVZ- $d_{27}$	3.44

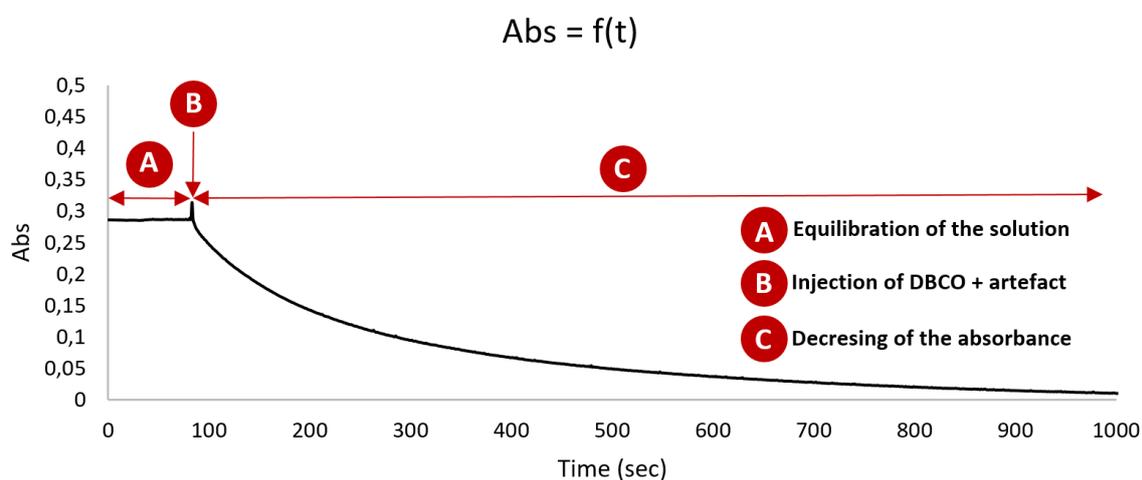
## II.3 Kinetic studies



Reactions were followed by measuring the decrease of the maximum absorbance signal of the iminosynone at 360 nm.

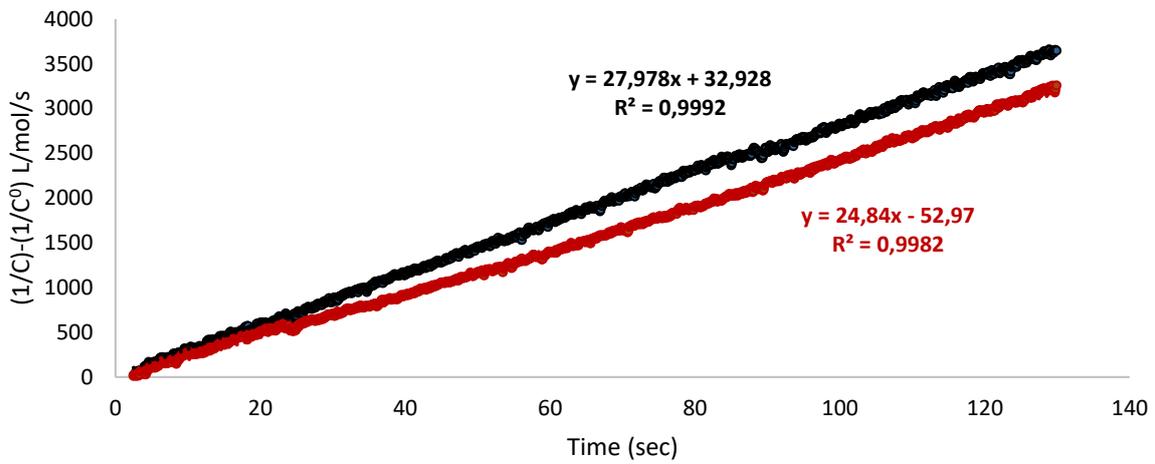
30  $\mu\text{L}$  of appropriated *tert*-butyl ester at 10 mM in UV-spectroscopy DMSO were diluted in 2960  $\mu\text{L}$  of PBS. The absorbance spectrum of the solution was first measured during 100 sec. until equilibration of the solution and then 10  $\mu\text{L}$  of DBCO-Acid (30 mM in UV-spectroscopy DMSO; 1.0 equiv.) were added. The kinetic of the reaction was followed by the absorbance of the solution at 360 nm. Each experiments was done in duplicate.

Correspondences between absorbance and concentrations were established by plotting the calibration curve obtained by measuring the absorbance at 360 nm for different concentrations.

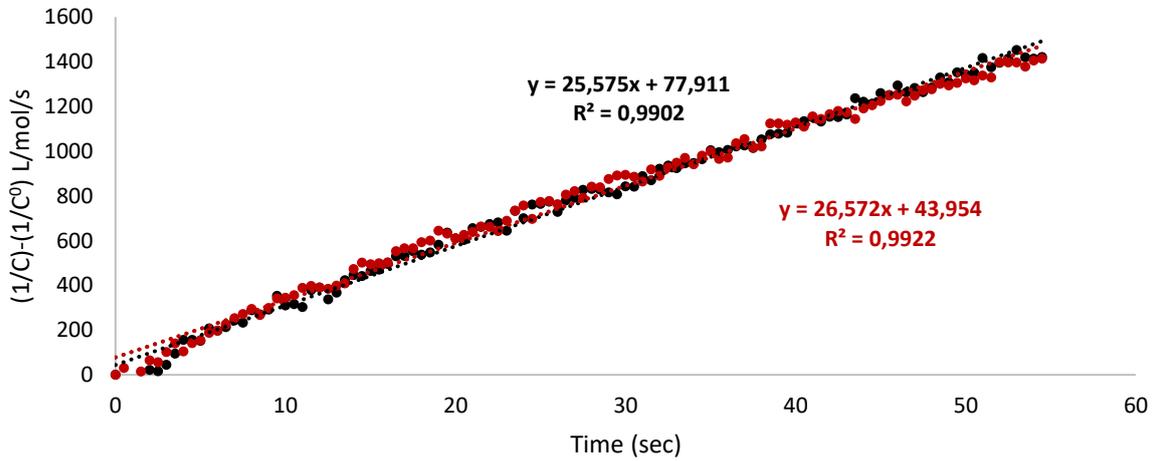


The kinetics were calculated after the decreasing of the artefact due to the DBCO injection. The monitoring of the solution was performed after stabilization of the temperature ( $\pm 0.1$   $^\circ\text{C}$ ). The injection was performed after 100 seconds of monitoring in order to wait the equilibration of the solution. The corresponding kinetic constant was determined by plotting  $(1/C) - (1/C_0) = f(t)$  between 0% to 30% of conversion.

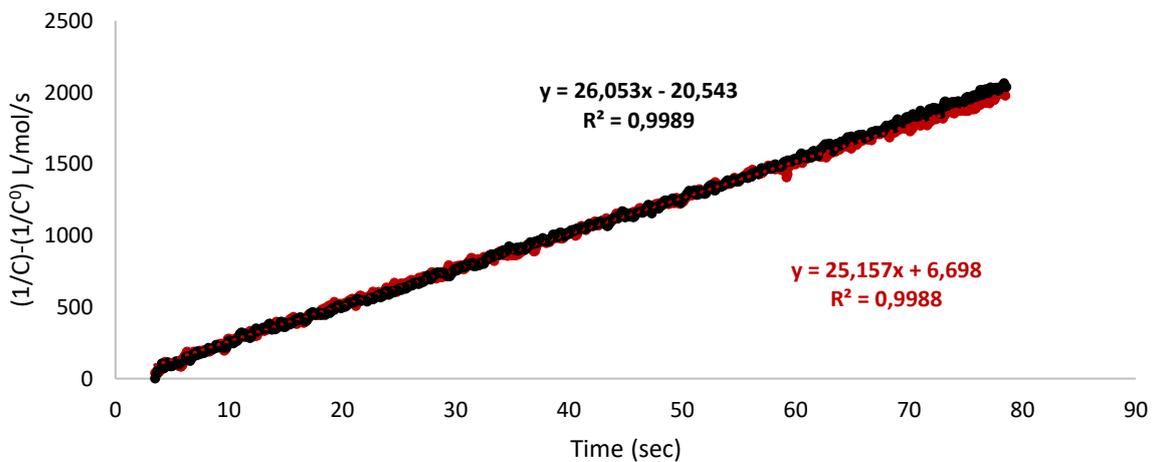
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ ,  $n = 2$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{PBS pH} = 7.4$ , I-9



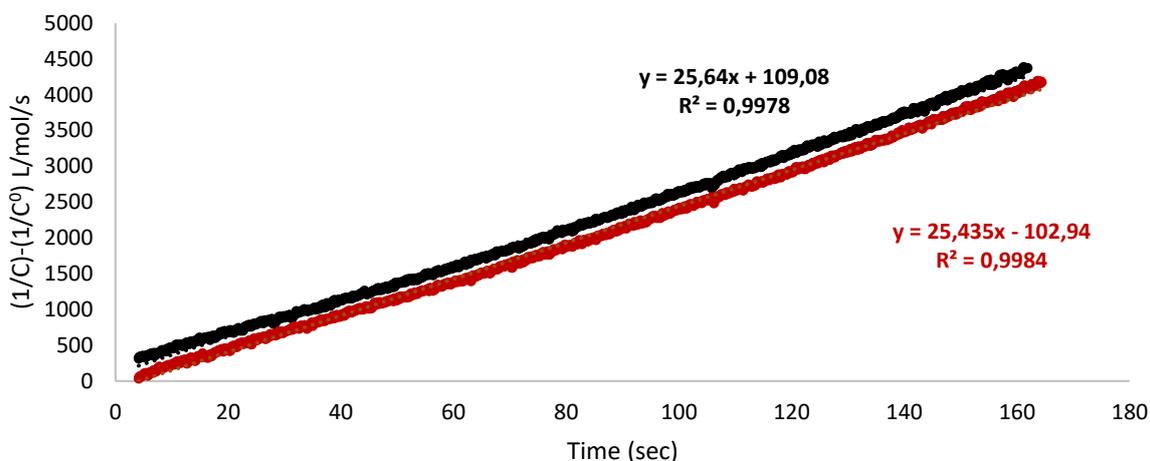
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ ,  $n = 2$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{PBS pH} = 7.4$ , I-12



$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ ,  $n = 2$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{PBS pH} = 7.4$ , I-13



$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ ,  $n = 2$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{PBS pH} = 7.4$ , **I-14**



**Figure S2.** Kinetic studies of the click and release reaction of compounds **I-9**, **I-12**, **I-13**, **I-14** with DBCO acid

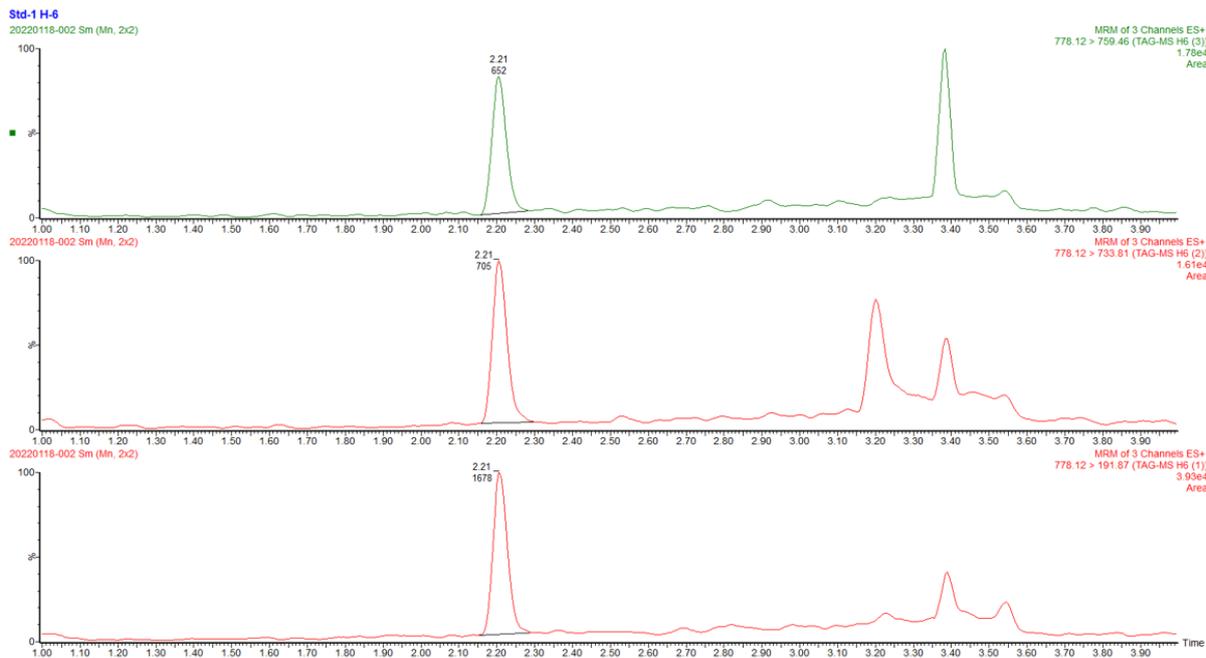
#### *II.4 Detection and quantitation limits of TMPP-tags by UPLC-MS/MS*

15  $\mu\text{L}$  of the cell media was evaporated to dryness under nitrogen using a Turbovap LV evaporator maintained at  $40^\circ\text{C}$  (Biotage, UK). Dried residue was then resuspended with 50  $\mu\text{L}$  of a mixture of water/methanol (70/30) with 0.1% formic acid. The whole was vortexed 15 s and centrifuged 10 min at 20,000 g and supernatant was transferred into a vial for analysis.

10  $\mu\text{L}$  of supernatant maintained at  $+4^\circ\text{C}$  was injected into the LC-MS/MS system which consist on a Waters ACQUITY I-Class UPLC<sup>®</sup> System with an Acquity BEH C18 2.1x50 EM, 1.7  $\mu\text{m}$ , 130  $\text{Å}$  pore size column and a reversed phase gradient over a run time of 5.5 minutes. A mix of mobile phase A (water with 0.1% formic acid) and mobile phase B (methanol with 0.1% formic acid) were used at a flow rate of 0.5 mL/min and a column temperature of  $60^\circ\text{C}$ . The gradient conditions ramped from 0% to 100% B between 0.5 and 3.0 min and then return to 0% B at 3.51 and were maintained up to 5.5 min for re-equilibration. In these conditions mean retention time was around 2.20 min for all EM.

The mass spectrometry analysis was performed on a Waters XEVO<sup>™</sup> TQ-S Mass Spectrometer operating in positive ion electrospray MRM mode. Three transitions were monitored for each TMPP-tags. Quantitation was performed by averaging the 3 concentrations thus obtained. Multiple transitions monitored were  $m/z$  750.95>180.0, 708.1, 734.15, 760.46>184.1, 717.26, 743.29, 769.46>189.13, 726.29, 752.22 and 778.12>191.87, 733.81, 759.46 for **EM-d<sub>0</sub>**, **EM-d<sub>9</sub>**, **EM-d<sub>18</sub>** and **EM-d<sub>27</sub>**, respectively.

Quantitation were performed using linear regression with  $1/X^2$  weighing. Lower limit of quantitation (LLOQ) was determined as the lower concentration which gave a signal-to-noise ratio around 10 and whose concentration calculated by linear regression shown a maximum deviation of 20%. Limit of detection was determined as concentration which gave a signal-to-noise ratio of about 3.



Compound name: TAG-H6 (1)  
 Correlation coefficient:  $r = 0.997147$ ,  $r^2 = 0.994303$   
 Calibration curve:  $34715.5 * x + -412.077$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x^2$ , Axis trans: None

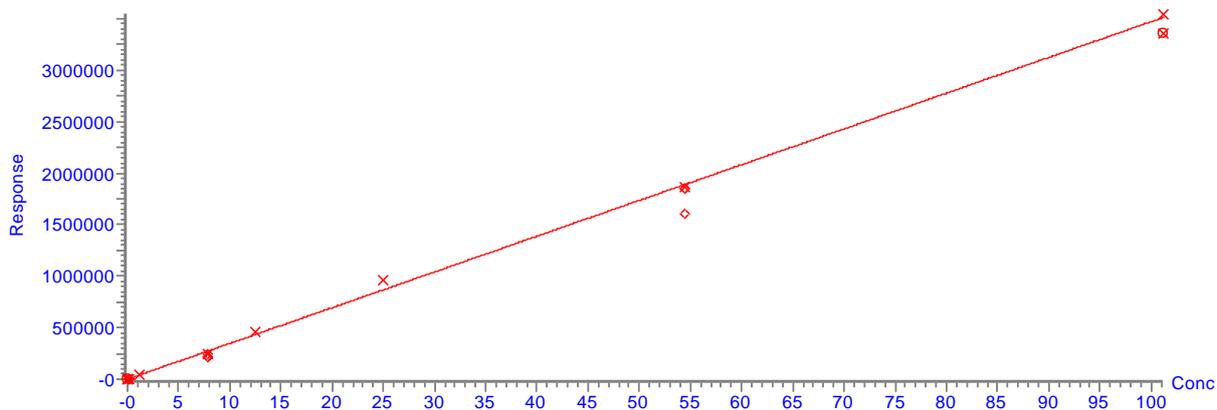
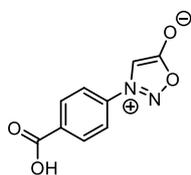


Figure S3. Typical chromatogram at the LLOQ level and calibration curve of EM (here EM-d<sub>27</sub>)

### III Partie expérimentale Chapitre 2

#### III.1 Analytical data

##### 3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate – II-2

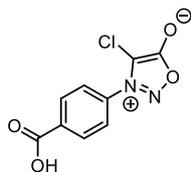


C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 206.15 g mol<sup>-1</sup>  
White off solid  
44%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>, δ ppm):** 8.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.88 (s, 1H), COOH unobserved.

The data of the compound II-2 was in accordance with the literature.<sup>131</sup>

##### 3-(4-carboxyphenyl)-4-chloro-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate – II-3

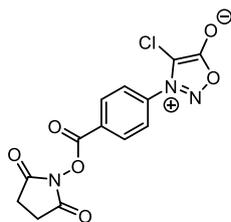


C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 240.60 g mol<sup>-1</sup>  
Yellowish solid  
40%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.30 (m, 2H), 7.87 (m, 2H), COOH unobserved.

The data of the compound II-3 was in accordance with the literature.<sup>131</sup>

##### 4-chloro-3-(4-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate – II-4



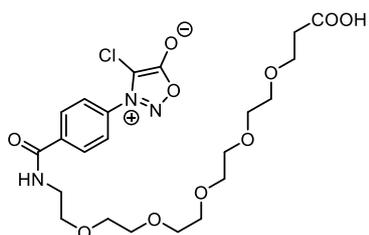
C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>  
MW: 337.67 g mol<sup>-1</sup>  
White off solid  
46%

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8,46-8,41 (m, 2H), 7,88-7,84 (m, 2H), 2,95 (s, 4H).

The data of the compound II-4 was in accordance with the literature.<sup>131</sup>

<sup>131</sup> C. Favre, L. de Cremoux, J. Badaut, and F. Friscourt, *The Journal of Organic Chemistry*, 83/4 (2018), 2058–66.

3-(4-((17-carboxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)carbamoyl)phenyl)-4-chloro-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate – **SI-2**



$C_{22}H_{30}ClN_3O_{10}$   
MW: 531.94 g mol<sup>-1</sup>  
Brown oil  
43%

**SI-1** (50.0 mg, 0.14 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DMF (1.4 mL) and 1-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecan-18-oic acid (49.5 mg, 0.16 mmol, 1.2 equiv.) was added to the solution followed by triethylamine (38  $\mu$ L, 0.28 mmol, 2.0 equiv.). The mixture was stirred at room temperature overnight. Then, DMF was removed under *vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 9/1 + 0.5% AcOH) to afford **SI-2** as a brown oil (33.5 mg, 0.06 mmol, 43 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8.19 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.72 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 3.73-3.56 (m, 22H), 2.54 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), COOH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 174.5, 165.6, 163.9, 138.7, 134.7, 129.4 (2C), 124.5 (2C), 105.6, 70.6, 70.5, 70.4, 70.3, 70.3, 70.2, 70.0, 69.7, 66.5, 40.1, 35.0.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 2873, 1784, 1744, 1654, 1545, 1503, 1451, 1350, 1295, 1219, 1102, 1040, 860, 706.

LCMS (ESI):  $m/z$  [M]<sup>+</sup> 531

HRMS (ESI) : calculated for [C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>10</sub>]<sup>+</sup> 532.1698; found 532.1701.

### III.2 General procedure for antibody-Tag conjugates preparation

**PNA-CISYD** (1.0 equiv.), TSTU (1.05 equiv.) and Et<sub>3</sub>N (1.05 equiv.) were added in dry DMF at 25 °C for 4 hours. Then 50  $\mu$ L of this solution (100 equiv.) were then added to 1.0 mL of a solution of CTX at 2.0 mg/mL in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3. The mixture was then incubated at 25 °C for 4 hours and the resulting **CTX-PNA-CISYD** were purified *via* protein A column.

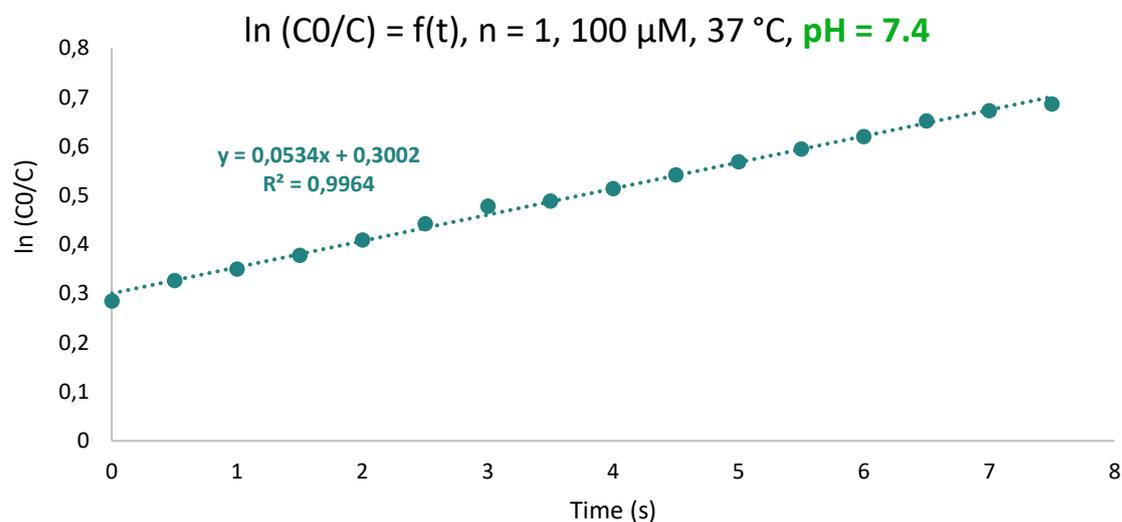
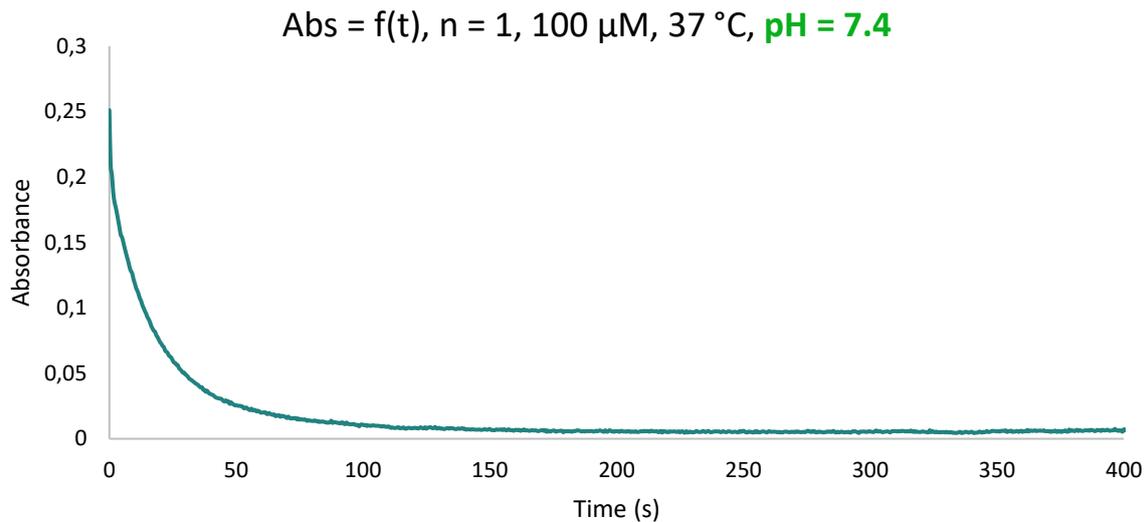
#### General procedure for BCA assay

The concentration of the immunoconjugate **CTX-PNA-CISYD** was determined by BCA assay. Briefly in a 96-well plate, 90  $\mu$ L of the BCA Working Reagent solution were added to 10  $\mu$ L of the antibody solution and incubated 30 min at 37 °C. After 5 min, the temperature was cooling down to room temperature, the absorbance of the solution at 562 nm was measured on a microplate spectrophotometer (CLARIO Start Plus, BM6 LABTECH). The antibody concentration was determined by comparison to a standard calibration curved made with BSA protein at concentration ranging from 0.2 to 1.0 g/L.

### III.3 Kinetic study with PNA-chlorosydnone and PNA-DBCO

30  $\mu\text{L}$  of appropriated *tert*-butyl ester at 10 mM in UV-spectroscopy DMSO were diluted in 2940  $\mu\text{L}$  of PBS. The absorbance spectrum of the solution was first measured during 100 sec. until equilibration of the solution and then 30  $\mu\text{L}$  of PNA-DBCO (10 mM in UV-spectroscopy DMSO; 1.0 equiv.) were added. The kinetic of the reaction was followed by the absorbance of the solution at 310 nm were the disparition of the starting material can be observed at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

This reaction is considered as a pseudo first order. To determine the apparent constant ( $k_{\text{app}}$ ) of the reaction,  $\ln([\text{SM}]_0/[\text{SM}]_t)$  is plotted versus time.



### III.4 Radio-labelling

No-carrier-added aqueous [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride ion was produced *via* the [ $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ ] nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [ $^{18}\text{O}$ ]water target (> 97%-enriched, CortecNet) on an Cyclone-18/9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA) and was transferred to the appropriate hot cell. Target hardware: commercial, 2-mL, two-port, stainless steel target holder equipped with a domed-end niobium cylinder insert. Target to hot cell liquid-transfer system: 60 m PTFE line (0.8 mm internal diameter; 1/16 inch external diameter), 2.0 bar helium drive pressure, transfer time 3-6 min. Typical production of [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride ion at the end of bombardment for a 20  $\mu\text{A}$ , 30 minutes irradiation: 27-30 GBq.

#### High Pressure Liquid Chromatography

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) was performed on the following systems:

**Semi-preparative:** integrated to the TRACERLab FXFN/FXNPro (GE Medical Systems): S1122 Solvent Delivery System (Sykam); U.V. Detector K-2501 (Knauer); radioactivity  $\beta$  detector; column SymmetryPrep™ C18 7  $\mu\text{m}$  7.8x300 mm (Waters);  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ : 85/15/0.1 (v/v/v); flow rate: 5 mL/min; detection  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

**Analytic:** Waters Alliance 2690 equipped with a UV spectrophotometer (Photodiode Array Detector, Waters 996 (Waters)) and a Berthold LB509 radioactivity detector; column: analytical Symmetry-M® C-18, 50 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Waters); solvent A :  $\text{H}_2\text{O}$  containing Low-UV PIC® B7 reagent (20 mL for 1000 mL), solvent B:  $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$ : 30:70 (v/v) containing Low-UV PIC® B7 reagent (20 mL for 1000 mL), flow rate: 2.0 mL/min; U.V. detection at  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

#### II-7 radiosynthesis.

No-carrier-added aqueous [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride ion was produced *via* the [ $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ ] nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [ $^{18}\text{O}$ ]water target (IBA Cyclone-18/9 cyclotron) and was transferred to the appropriate hot cell. The aqueous solution containing [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride anions was automatically transferred to a TRACERLab FX-FN or FX N Pro synthesizer after the end of irradiation. The irradiated water was then sucked through an anion exchange cartridge (Sep-Pak® Accell Plus QMA Plus Light cartridge, Waters) to fix [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride anions and remove the enriched water which was separately collected. [ $^{18}\text{F}$ ]Fluoride anions were recovered from the resin by elution with a  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_{222}$  solution (2 mg of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 300  $\mu\text{L}$  of water and 12 to 15 mg of Kryptofix® 222 in 700  $\mu\text{L}$  of acetonitrile).  $\text{K}[\text{F}^{18}]\text{F}-\text{K}_{222}$  complex was next prepared by evaporation of the solution in two heating steps : (i) 60 °C for 7 min under reduced pressure along with a stream of helium and (ii) 120 °C for 5 min under vacuum. A solution of precursor **4** (5-6 mg) in DMSO (700  $\mu\text{L}$ ) was added to the dried  $\text{K}[\text{F}^{18}]\text{F}-\text{K}_{222}$  complex and the resulting mixture was heated to 160 °C for 5 minutes. Reactor was cooled to 100 °C, a solution of NaOH (0.1 M, 1 mL) was added and the reaction mixture was further stirred at 100 °C for 2 min. After cooling to 35 °C, the crude mixture was transferred through an alumina cartridge (Sep-Pak® Alumina N Plus Long, Waters) and collected before HPLC injection. A solution of HCl 1M / acetonitrile 1:1 (2 mL) was added to the reactor for rinsing and transferred *via* the alumina cartridge to the crude mixture. The resulting solution was submitted to semi-preparative HPLC purification (Symmetry C18 column, Waters) using acetonitrile/water 40:60 mixture (0.1% TFA, 5 mL/min) as eluent. Purification was monitored by both UV (254 nm) and radioactivity detection and **II-7** was collected at a retention time of ca 10 min. For the final formulation, water (20 mL) was added to the collected fraction and this mixture was transferred through a C18 cartridge (Sep-Pak® C18 Plus Short cartridge, Waters) which was then washed with water (10 mL). [ $^{18}\text{F}$ ]FPyOctA was recovered after elution of the cartridge with acetone (1.5 mL).

In a typical radiosynthesis, an activity of 6.21 GBq of **II-7** was obtained from an initial activity of 37.9 GBq of [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride after a synthesis time of 76 min (26% RCY). Chemical and radiochemical purities were assessed on an aliquot by analytical HPLC using non-radioactive reference as standard. Molar

activity of **II-7** was determined from HPLC quantification (UV, triplicate) correlated with the corresponding activity, with a typical value of  $147.8 \pm 0.1$  GBq/ $\mu$ mol.

## IV Partie expérimentale Chapitre 3

### IV.1 N-alkyl-Iminosydones

#### IV.1.i Optimization of the reductive amination

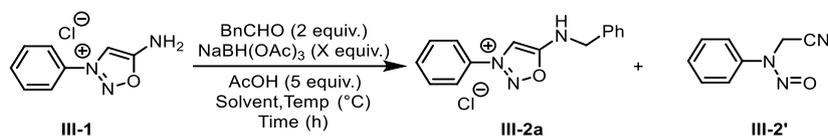


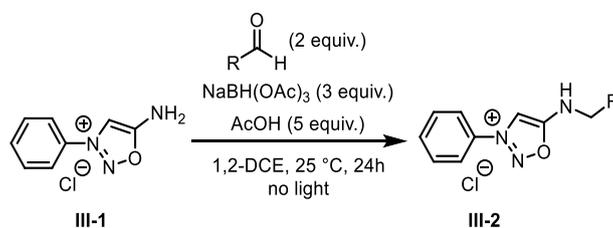
Table S4. Optimization table of the reaction (Method A)

Entry	Solvent	Time	[III-1]	Temp.	NaBH(OAc) <sub>3</sub>	III-2a/ III-2' <sup>(a)</sup>	Conv. Of III-1 <sup>(a)</sup>	Yield of III-2a <sup>(b)</sup>
1	1,2-DCE	24 h	0.2 M	rt	1.05 equiv.	-	< 10%	Traces
2	1,2-DCE	24 h	0.2 M	rt	3.0 equiv.	-	60%	41%
3	1,2-DCE	24 h	0.2 M	40 °C	3.0 equiv.	-	> 99%	17%
<b>4</b>	<b>1,2-DCE</b>	<b>24 h</b>	<b>0.4 M</b>	<b>rt</b>	<b>3.0 equiv.</b>	<b>98/02</b>	<b>&gt; 99%</b>	<b>50%</b>
5	THF	24 h	0.4 M	rt	3.0 equiv.	98/02	> 99%	45%
6	MeCN	24 h	0.4 M	rt	3.0 equiv.	86/14	90%	51%
7	MeOH	24 h	0.4 M	rt	3.0 equiv.	02/98	90%	Traces

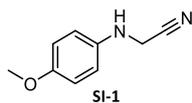
<sup>(a)</sup> Calculated by UPLC/MS. <sup>(b)</sup> Isolated yields.

#### IV.1.ii Synthetic procedure and analytical data

General procedure A for the reductive amination:



To a solution of the iminosydnone salt **III-1** (1.0 equiv.) in anhydrous 1,2-DCE (0.4 M) was added AcOH (5.0 equiv.) and the desired aldehyde (2.0 equiv.). The mixture was stirred for 30 minutes under argon atmosphere and protected from light. The temperature was kept constant at 25 °C during all the experiment. Then, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (3.0 equiv.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The crude mixture was evaporated and the product was obtained by precipitation or purification by reversed phase chromatography.

2-((4-methoxyphenyl)amino)acetonitrile – **SI-1**

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O  
 MW: 162.20 g.mol<sup>-1</sup>  
 Beige solid  
 85%

To a suspension of *p*-anisidine (250 mg, 2.03 mmol, 1.0 equiv.) in MeCN (20.0 mL) was added successively NaI (304 mg, 2.03 mmol, 1.0 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (337 mg, 2.44 mmol, 1.2 equiv.) and chloroacetonitrile (257 μL, 4.06 mmol, 2.0 equiv.). The mixture was refluxed for 18 hours. The reaction mixture was filtered and partitioned between EtOAc and H<sub>2</sub>O. The organic layer was separated and washed with brine. The crude was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, heptane/EtOAc, 80/20) to give the desired product **SI-1** as a beige solid (280.7 mg, 1.73 mmol, 85%).

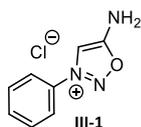
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 6.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 154.2, 139.1, 117.4, 115.7 (2C), 115.3 (2C), 55.9, 34.0.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3370, 2956, 2835, 1512, 1429, 1235, 1180, 1083, 1031, 822.

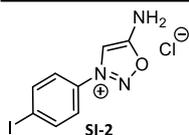
LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 163

Mp: 74 – 75 °C

5-amino-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-1**

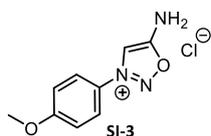
C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O  
 MW: 197.62 g.mol<sup>-1</sup>  
 Beige powder  
 86%

Compound **III-1** was prepared as described in the literature.<sup>1</sup>

5-amino-3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **SI-2**

C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>IClN<sub>3</sub>O  
 MW: 323.52 g.mol<sup>-1</sup>  
 Beige powder  
 90%

Compound **SI-2** was prepared as described in the literature.<sup>1</sup>

5-amino-3-(4-methoxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **SI-3**

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 227.65 g.mol<sup>-1</sup>  
 Brown solid  
 81%

To a solution of **SI-1** (100 mg, 0.62 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (3.0 mL), *tert*-butyl nitrite (221 μL, 1.85 mmol, 3.0 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The mixture was then stirred at room temperature for 7 hours. After full conversion, the solvent was evaporated under reduce pressure. To the crude was added HCl 4 M in dioxane (3.0 mL). The mixture was stirred during 2 hours at room temperature under argon. Et<sub>2</sub>O was added and the precipitate was collected by filtration, washed with Et<sub>2</sub>O to afford the product **SI-3** as a brown solid (115 mg, 0.505 mmol, 81%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.27 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), NH<sub>2</sub> unobserved.

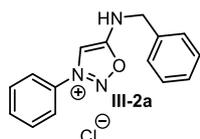
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 171.5, 165.4, 127.3, 125.2 (2C), 116.8 (2C), 102.1, 56.8.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2959, 1673, 1596, 1513, 1456, 1418, 1313, 1268, 1184, 1019, 983, 844.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> 192

**Mp:** 191 – 192 °C

5-(benzylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2a**



C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O  
MW: 287.75 g.mol<sup>-1</sup>  
Beige solid  
50%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2a** was obtained in 50% yield by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O, with AcOH (1.0 equiv.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 12.40 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.66 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.39-7.28 (m, 3H), 4.72 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 168.3, 134.9, 134.1, 132.6, 130.8 (2C), 129.0 (2C), 128.4, 128.0 (2C), 121.9 (2C), 102.0, 47.2.

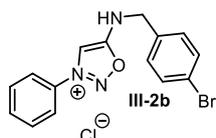
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3364, 2988, 1669, 1454, 1356, 765.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> 252

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 252.1137; found 252.1138

**Mp:** 143 – 144 °C

5-((4-bromobenzyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2b**



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>BrClN<sub>3</sub>O  
MW: 366.64 g.mol<sup>-1</sup>  
Off-white solid  
37%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2b** was obtained in 37% yield by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O, with AcOH (1.0 equiv.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 12.41 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.70 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 168.2, 134.2, 134.0, 132.6, 132.2 (2C), 130.8 (2C), 129.7 (2C), 122.5, 122.0 (2C), 102.1, 46.6.

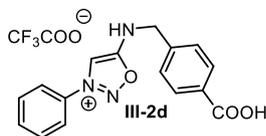
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3675, 2987, 2901, 1672, 1406, 1394, 1230, 1057.

**LCMS (ESI)  $m/z$ :** [M-Cl]<sup>+</sup> 330

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 330.0242; found 330.0247

**Mp:** 143 – 144 °C

5-((4-carboxybenzyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2d**



C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 409.32 g.mol<sup>-1</sup>  
Off-white solid  
72%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2d** was obtained in 72% yield by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9/1, δ ppm):** 9.00 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.78 (dt, *J* = 14.9, 7.2 Hz, 3H), 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.77 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9/1, δ ppm):** 168.9, 167.1, 158.7 (q, *J* = 32 Hz), 141.3, 133.9, 133.1, 130.7 (2C), 130.6, 129.9 (2C), 128.0 (2C), 122.7 (2C), 117.3 (q *J* = 299 Hz), 102.6, 46.9.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9/1, δ ppm):** -77.24.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2934, 1697, 1603, 1557, 1506, 1469, 1436, 1359, 1320, 1286, 1262, 1228, 1178, 1060, 1029, 985, 809, 750, 691.

**LCMS (ESI)  $m/z$ :** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 296

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 296.1035; found 296.1037

**Mp:** 225 °C – decomp.

5-((2-hydroxybenzyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2e**



C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 303.74 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown solid  
24%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2e** was obtained in 24% yield by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O, with AcOH (1.0 equiv.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.53 (s, 1H), 8.04-7.97 (m, 2H), 7.83 (dd, *J* = 8.5, 6.3 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 10.5, 4.9 Hz, 2H), 7.35-7.32 (m, 1H), 7.20 (td, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 6.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.67 (s, 2H), OH and NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 170.2, 157.2, 135.0, 134.6, 131.7 (2C), 131.1, 131.1, 123.5 (2C), 122.8, 120.7, 116.3, 102.3, 45.1.

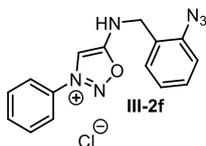
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3105, 1672, 1599, 1458, 1352, 1277, 1199, 1131, 979, 922, 840, 799, 758, 719, 688, 535.

**LCMS (ESI)  $m/z$ :** [M-Cl]<sup>+</sup> 268

**HRMS (ESI):** calculated for  $[C_{15}H_{14}N_3O_2]^+$  268.1086; found 268.1090

**Mp:** 150 – 155 °C

5-((2-azidobenzyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2f**



$C_{15}H_{13}ClN_6O$   
MW: 328.76 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange sticky solid  
38%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2f** was obtained in 38% yield by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O, with AcOH (1.0 equiv.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 12.08 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.77 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.39 (td, *J* = 7.7, 0.8 Hz, 1H), 7.21-7.15 (m, 2H), 4.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H).

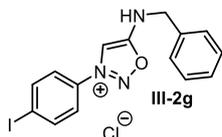
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 168.4, 138.6, 134.3, 132.8, 131.0 (2C), 130.1, 130.0, 126.0, 125.4, 122.1 (2C), 118.5, 102.2, 42.9.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3674, 2987, 2901, 2122, 1669, 1583, 1489, 1450, 1406, 1393, 1354, 1284, 1066, 1056, 891, 761, 682, 560.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> 293

**HRMS (ESI):** calculated for  $[C_{15}H_{13}N_6O]^+$  293.1151; found 293.1154

5-(benzylamino)-3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2g**



$C_{15}H_{13}ClIN_3O$   
MW: 413.64 g.mol<sup>-1</sup>  
Off-white solid  
66%

Starting from the iminosydnone salt **SI-2** using general procedure A, the compound **III-2g** was obtained in 66% yield by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O, with AcOH (1.0 equiv.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 12.43 (m, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.38 – 7.31 (m, 3H), 4.71 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 168.3, 140.1 (2C), 135.1, 132.4, 129.1 (2C), 128.6, 128.1 (2C), 123.4 (2C), 102.3, 101.1, 47.4.

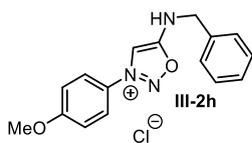
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3333, 3029, 2823, 1668, 1576, 1432, 1351, 1273, 978, 825, 731, 699.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> 378

**HRMS (ESI):** calculated for  $[C_{15}H_{13}IN_3O]^+$  378.0103; found 378.0107

**Mp:** 145 – 146 °C

5-(benzylamino)-3-(4-methoxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2h**



C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 317.77 g.mol<sup>-1</sup>  
 Beige solid  
 31%

Starting from the iminosydnone salt **SI-3** using general procedure A, the compound **III-2h** was obtained in 31% yield by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O, with AcOH (1.0 equiv.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 12.05 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.38-7.30 (m, 3H), 7.08 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.69 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 168.3, 164.0, 135.3, 129.2 (2C), 128.5, 128.1 (2C), 125.5, 123.6 (2C), 116.0 (2C), 101.4, 56.3, 47.3.

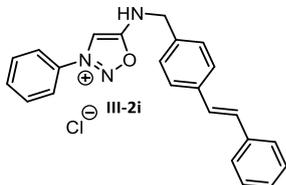
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2927, 1669, 1592, 1510, 1450, 1309, 1264, 1180, 1025, 839, 704.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> 282

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 282.1242; found 282.1248

**Mp:** 150 – 155 °C

(*E*)-3-phenyl-5-((4-styrylbenzyl)amino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2i**



C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O  
 MW: 389.88 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 59%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2i** was obtained in 59% yield by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O, with AcOH (1.0 equiv.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.61 (s, 1H), 8.03-7.99 (m, 2H), 7.86-7.82 (m, 1H), 7.79-7.74 (m, 2H), 7.65-7.61 (m, 2H), 7.58-7.54 (m, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.37-7.23 (m, 4H), 7.20 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 4.71 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 170.4, 139.2, 138.6, 135.8, 135.1, 134.6, 131.8 (2C), 130.5, 129.7 (2C), 129.4 (2C), 128.9, 129.8, 128.1 (2C), 127.6 (2C), 123.5 (2C), 102.5, 49.2 (under the solvent peak).

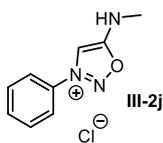
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3333, 3025, 1672, 1596, 1511, 1491, 1418, 1447, 1265, 1212, 1112, 1073, 1013, 969, 864, 810, 782, 747, 690.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> = 354

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 354.1606; found 354.1613

**Mp:** 192 – 195 °C

## 5-(methylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – III-2j



C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O  
 MW: 211.65 g.mol<sup>-1</sup>  
 Red oil  
 51%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2j** was obtained in 51% yield by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 10.37 (brs, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.76-7.73 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 3.23 (s, 3H).

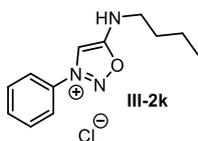
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 168.8, 134.3, 132.9, 131.0 (2C), 122.0 (2C), 101.4, 29.7.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2960, 2898, 1670, 1600, 1421, 1478, 1359, 1290, 1112, 1077.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-Cl]<sup>+</sup> 176

HRMS (ESI): calculated for [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 176.0824; found 176.0821

## 5-(butylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – III-2k



C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O  
 MW: 253.73 g.mol<sup>-1</sup>  
 Orange sticky solid  
 52%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2k** was obtained in 52% yield by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour and half).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 11.55 (brs, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.77 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.70 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.55-1.46 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

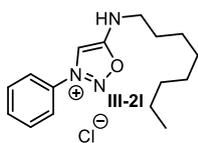
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 168.1, 133.9, 132.7, 130.7 (2C), 121.9 (2C), 101.4, 43.7, 30.7, 19.9, 13.5.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2958, 2933, 2871, 1671, 1599, 1492, 1469, 1356, 1295, 1108, 1077, 986, 925, 765, 683.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-Cl]<sup>+</sup> 218

HRMS (ESI): calculated for [C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 218.1293; found 218.1292

5-(octylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2l**



C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>3</sub>O  
 MW: 309.16 g.mol<sup>-1</sup>  
 Red oil  
 66%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2l** was obtained in 66% yield by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour and half).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.54 (s, 1H), 8.04-7.98 (m, 2H), 7.88-7.81 (m, 1H), 7.80-7.73 (m, 2H), 3.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.81-1.70 (m, 2H), 1.52-1.27 (m, 11H), 0.91 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

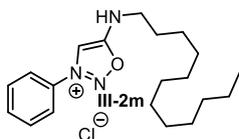
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 170.4, 135.1, 134.6, 131.8 (2C), 123.5 (2C), 102.1, 45.7, 33.0, 30.0, 30.0, 29.9, 27.7, 23.7, 14.4.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3074, 2928, 2857, 1675, 1468, 1199, 1134, 979, 921, 831, 798, 763, 718, 705, 682.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> = 274

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 274.1919; found 274.1921

5-(dodecylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-2m**



C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>3</sub>O  
 MW: 365.94 g.mol<sup>-1</sup>  
 Red oil  
 20%

Starting from the iminosydnone salt **III-1** using general procedure A, the compound **III-2m** was obtained in 20% yield by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour and half).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.55 (brs 1H), 8.03-8.00 (m, 2H), 7.86-7.82 (m, 1H), 7.79-7.74 (m, 2H), 3.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.79-1.72 (m, 2H), 1.50-1.26 (m, 19H), 0.91-0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

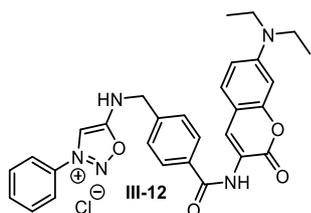
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 170.5, 135.2, 134.8, 131.9 (2C), 123.6 (2C), 102.2, 45.8, 33.2, 30.9, 30.84, 30.78, 30.6, 30.5, 30.4, 30.1, 27.8, 23.9, 14.6.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3118, 2924, 2854, 1673, 1492, 1468, 1358, 1313, 1138, 1029, 979, 920, 833, 797, 762, 719, 705, 681.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> = 331

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 330.2545; found 330.2550

5-((4-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)carbamoyl)benzyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – **III-12**



C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 546.02 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown sticky solid  
22%

To a solution of **III-2d** (69.5 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.) in freshly distilled DCM (7.0 mL) was added SOCl<sub>2</sub> (0.152 mL, 2.1 mmol, 10.0 equiv.) and the mixture was stirred for 2 hours under argon atmosphere at room temperature. Then, volatiles were removed and the solid was suspended in freshly distilled DCM (7.0 mL). Then, a solution of 3-amino-7-(diethylamino)-coumarin (50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.) in freshly distilled THF (1.0 mL) was added dropwise to the suspension. The mixture was stirred at room temperature for 12 hours. After evaporation the compound was isolated by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour and half).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.65 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.03 – 7.97 (m, 4H), 7.84 (dd, *J* = 8.5, 6.3 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 10.6, 5.0 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.82 (s, 2H), 3.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 5H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 170.5, 167.6, 161.2, 154.8, 151.4, 141.1, 135.4, 135.2, 134.6, 131.8 (2C), 130.9, 130.2, 129.2 (3C), 123.5 (2C), 119.5, 111.3, 109.4, 102.7, 98.3, 45.8 (3C), 12.7 (2C).

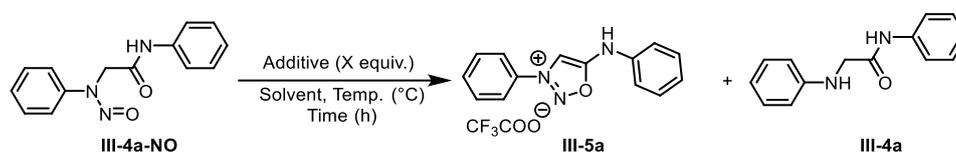
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2927, 1669, 1606, 1527, 1502, 1408, 1356, 1248, 1198, 1130, 798, 765, 718.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> = 510

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 510.2141; found 510.2140

## IV.2 *N*-aryl-Iminosydnones

### IV.2.i Optimization of the cyclization reaction



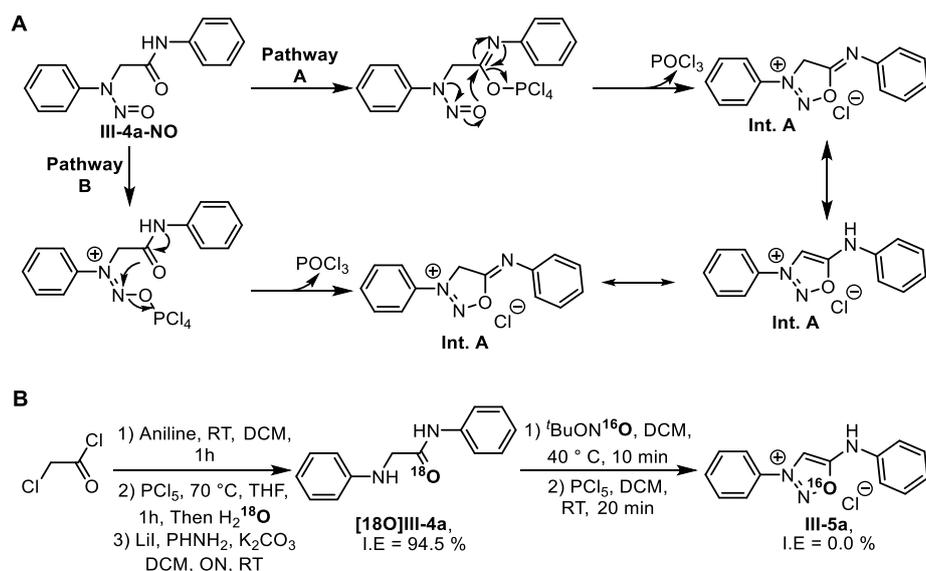
**Table S5.** Optimization table of the reaction

Entry	Solvent	Time	Temp.	[III-4a-NO]	Additive	Conv. of III-4a-NO	III-4a <sup>(a)</sup>	Yield of III-5a <sup>(b)</sup>
1	POCl <sub>3</sub>	1 h	40 °C	0.2 M	-	-	-	-(c)
2	SOCl <sub>2</sub>	1 h	40 °C	0.2 M	-	-	-	-(c)
3	AcCl	1 h	40 °C	0.2 M	-	0%	1%	-
4	DCM	1 h	40 °C	0.2 M	COCl <sub>2</sub> (1.1 equiv.)	5%	1%	Traces
5	DCM	1 h	40 °C	0.2 M	TFAA (1.1 equiv.)	10%	2%	Traces
6	DCM	1 h	40 °C	0.2 M	Burgess reagent (1.1 equiv.)	0%	0%	-
7	DCM/ EtOAc	1h	40 °C	0.2 M	T3P	0%	0%	-
8	DCM	1 h	rt	0.2 M	PCl <sub>5</sub> (3.0 equiv.)	> 99%	< 1%	93%
9	<b>DCM</b>	<b>1 h</b>	<b>rt</b>	<b>0.2 M</b>	<b>PCl<sub>5</sub> (1.1 equiv.)</b>	<b>&gt; 99%</b>	<b>&lt; 1%</b>	<b>95%</b>
10	DCM	1 h	rt	0.2 M	Tf <sub>2</sub> O (1.1 equiv.)	> 99%	5%	82%

<sup>(a)</sup> Calculated by UPLC/MS. <sup>(b)</sup> Isolated yields. <sup>(c)</sup> Total degradation. The trifluoroacetate anion comes from the mobile phase of the reversed phase purification.

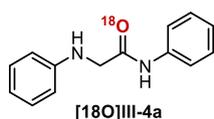
### IV.2.ii Mechanistic investigations

Two main pathways may be considered: pathways A and B (Scheme S1-a). PCl<sub>5</sub>-mediated cyclodeshydration reaction conducted with <sup>18</sup>O labelled *N*-nitroso-phenyl-glycine afforded unlabelled iminosydnone **III-5a** (Scheme S1-B) indicating that pathway A is the favoured mechanism in this reaction.



**Scheme S1.** (A) Mechanistic investigations, (B)  $^{18}\text{O}$ -labeling experiments

$^{18}\text{O}$ -*N*-phenyl-2-(phenylamino)acetamide- $^{18}\text{O}$  – **[ $^{18}\text{O}$ ]III-4a**



$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2^{18}\text{O}$   
 MW: 228.28 g.mol<sup>-1</sup>  
 White off solid  
 55% (3 steps)

Chloroacetyl chloride (0.150 mL, 1.88 mmol, 2.0 equiv.) was dissolved in freshly distilled DCM (10 mL) and aniline (88  $\mu\text{L}$ , 0.94 mmol, 1.0 equiv.) was added at 0 °C. After completion of the reaction (20 min at 25 °C), volatiles were removed under vacuum and the crude mixture was suspended in THF (10.0 mL).  $\text{PCl}_5$  (195.6 mg, 0.94 mmol, 1.0 equiv.) was added and the solution was refluxed for one hour.  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (33,8  $\mu\text{L}$ , 1.88 mmol, 2.0 equiv.) was added to the clear yellow solution and the mixture was cooled down at 0 °C. Volatiles were removed under high vacuum and the crude mixture was dissolved in THF (10.0 mL). Lithium iodide (375.0 mg, 2.82 mmol, 3.0 equiv.)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (389,1 mg, 2.82 mmol, 3.0 equiv.) and aniline (262.3  $\mu\text{L}$ , 2.82 mmol, 3.0 equiv.) were added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The crude mixture was evaporated under vacuum and the solid was purified on silica column Heptane/EtOAc70/30 to give **[ $^{18}\text{O}$ ]III-4a** as a white off solid (118.5 mg, 0.52 mmol, 55% over 4 steps).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 8.60 (s, 1H), 7.62-7.49 (m, 2H), 7.37-7.31 (m, 2H), 7.29-7.24 (m, 2H), 7.16-7.11 (m, 1H), 6.91-6.87 (m, 1H), 6.75-6.71 (m, 2H), 4.38 (t,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 3.93 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 169.0, 147.1, 137.4, 129.7 (2C), 129.1 (2C), 124.7, 120.0 (2C) 119.9, 113.7 (2C), 50.1.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3333, 3053, 2906, 1665, 1599, 1522, 1497, 1442, 1311, 1256, 1180, 750, 691.

LCMS (ESI):  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 229

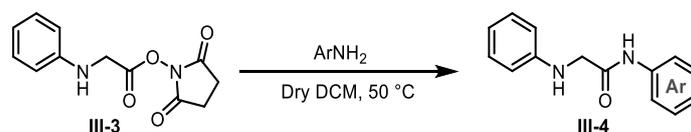
HRMS (ESI): calculated for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2^{18}\text{O}]^+$  229.1227; found 229.1229

Isotopic Enrichment: 94.2% for  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2^{18}\text{O}$

Mp: 111 – 113 °C

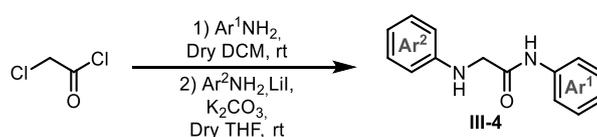
#### IV.2.iii Synthetic procedure and analytical data

##### General procedure B for *N*-aryl-2-(arylamino)acetamide synthesis:



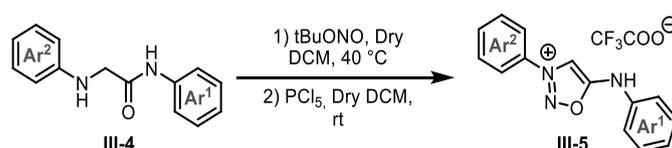
To a solution of the 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl phenylglycinate **III-3** (1.0 equiv.) in anhydrous DCM (0.5 M) was added the desired aniline (3.0 equiv.). The mixture was stirred overnight in a sealed vial at  $50^\circ\text{C}$ . After cooling down, the solution was concentrated under vacuum and the crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH) to give the desired product **III-4**.

##### General procedure C for *N*-aryl-2-(arylamino)acetamide synthesis:



The desired aniline ( $\text{Ar}^1\text{NH}_2$ ) (1.0 equiv.) was first suspended in freshly distilled DCM (0.1 M) and chloroacetyl chloride (2.0 equiv.) was added dropwise at  $0^\circ\text{C}$ , then the mixture was warmed to room temperature. After completion of the reaction, volatiles were removed under reduced pressure. The crude mixture was then dissolved in freshly distilled THF (0.1 M) and lithium iodide was added (3.0 equiv.), followed by the desired aniline (3.0 equiv.) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3.0 equiv.). After completion of the reaction, the crude mixture was concentrated in vacuum and purified by chromatography on silica gel, or by reversed phase on automatized Puriflash® or by precipitation to give the desired *N*-aryl-2-(arylamino)acetamide **III-4**.

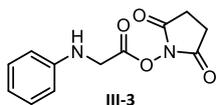
##### General procedure D for 3-aryl-5-(aryl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium synthesis 2,2,2-trifluoroacetate:



The desired *N*-aryl-2-(arylamino)acetamide **3** (1.0 equiv.) was suspended in freshly distilled DCM (0.2 M) in a dry sealed tube.  $\text{tBuONO}$  (3.0 equiv.) was added to the solution, the mixture was heated at  $40^\circ\text{C}$  for 10 min. After completion of the reaction<sup>(\*)</sup>, volatiles were removed under reduced pressure (for at least 30 min) and the crude mixture was re-suspended in freshly distilled DCM (0.2 M). Then,  $\text{PCl}_5$  (1.1 equiv.) was added to the mixture and the reaction was stirred at room temperature. After completion of the reaction, the DCM was removed, and the crude product was purified by reversed phase on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour) to give the desired trifluoroacetate 6-*N*-aryl sydnone imine salt **III-5** (10% to 95%).

<sup>(\*)</sup> By TLC the *N*-nitroso compound is less polar than the starting material. In LCMS (ESI+) the adduct [M-30] is often observed which corresponds to the adduct [M] of the starting material.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl phenylglycinate – III-3



C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 248.23 g.mol<sup>-1</sup>  
Beige powder  
Quant.

*N*-phenylglycine (1.00 g, mmol, 1.0 equiv.) was solubilized in DMF (15.0 mL), NHS (2.28 g, 19.8 mmol, 3.0 equiv.) and DCC (2.04 g, 9.9 mmol, 1.5 equiv.) were successively added to the solution. The reaction was stirred at room temperature overnight. DMF was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM 100%). DCM was removed and the solid was washed with cold DCM to afford III-3 as a beige crystal powder (quant.).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 7.12-7.08 (m, 2H), 6.63-6.58 (m, 3H), 6.27 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.81 (s, 4H).

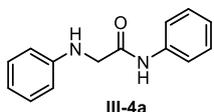
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 170.1 (2C), 167.9, 147.3, 128.9 (2C), 116.9, 112.2 (2C), 42.3, 25.4 (2C).

IR (cm<sup>-1</sup>): 3318, 2055, 3028, 2925, 1650, 1504, 1496, 1453, 1424, 1312, 1257, 1180.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 249

Mp: 161 – 162 °C

*N*-phenyl-2-(phenylamino)acetamide – III-4a



C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O  
MW: 226.27 g.mol<sup>-1</sup>  
White off solid  
59%

The compound III-4a was obtained in 59% yield using the general procedure B. Reaction time: 6 h. The compound was purified on silica column (100% DCM to DCM/MeOH 98/02).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.52 (brs, 1H), 7.62-7.60 (m, 2H), 7.45-7.43 (m, 2H), 7.25-7.21 (m, 2H), 7.18 -7.13 (m, 2H), 7.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.81 (s, 2H), NH unobserved.

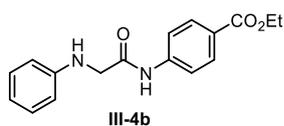
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 169.0, 147.1, 137.3, 129.7 (2C), 129.1 (2C), 124.7, 120.0 (2C) 119.9, 113.7 (2C), 50.0.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3333, 3053, 2906, 1665, 1599, 1522, 1497, 1442, 1311, 1256, 1180, 750, 691.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 227

Mp: 105 – 107 °C

## ethyl 4-(2-(phenylamino)acetamido)benzoate – III-4b



C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 298.33 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 56%

The compound III-4b was obtained in 56% yield using the general procedure B. Reaction time: 16 h. The compound was purified on silica column (100% DCM to DCM/MeOH 98/02).

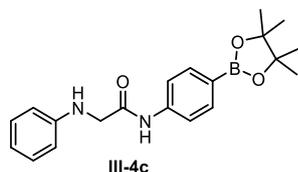
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 10.31 (s, 1H), 7.94-7.89 (m, 2H), 7.78-7.73 (m, 2H), 7.13-7.07 (m, 2H), 6.64-6.57 (m, 3H), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 170.0, 165.3, 148.2, 143.1, 130.2 (2C), 128.9 (2C), 124.3, 118.6, 118.5, 116.5, 112.3 (2C), 60.4, 47.3, 14.16.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3334, 2981, 2927, 1692, 1602, 1513, 1443, 1407, 1393, 1367, 1309, 1275, 1174, 1016, 1019, 856, 769, 751, 693.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 299.

Mp: 166 – 168 °C

2-(phenylamino)-*N*-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamide – III-4c

C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 352.24 g.mol<sup>-1</sup>  
 White off oil  
 46%

The compound III-4c was obtained in 46% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The compound was purified on silica column (100% DCM to DCM/MeOH 99/1).

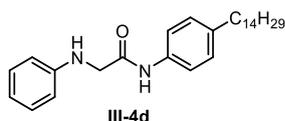
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.68 (s, 1H), 7.83-7.79 (m, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.32-7.26 (m, 2H), 6.94-6.89 (m, 1H), 6.76-6.73 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 1.38 (s, 12H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 169.0, 147.1, 140.0, 135.9 (2C), 129.7 (2C), 120.0, 118.8 (2C), 113.8 (2C), 100.1, 83.9 (2C), 50.1, 25.0 (4C).

IR (cm<sup>-1</sup>): 3387, 1660, 1605, 1456, 1361, 1191, 1134, 1087, 987, 949, 841, 799, 723.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 354

2-(phenylamino)-*N*-(4-tetradecylphenyl)acetamide – **III-4d**



C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O  
 MW: 422.66 g.mol<sup>-1</sup>  
 Sticky solid  
 59%

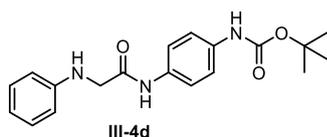
The compound **III-4d** was obtained in 59% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The compound was purified on silica column Heptane/Et<sub>2</sub>O 40/60.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8.51 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.33 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 2.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.32 – 1.20 (m, 24H), 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 168.8, 147.2, 139.5, 135.0, 129.7 (2C), 129.0 (2C), 120.0 (2C), 119.9, 113.7 (2C), 110.7, 50.1, 35.5, 32.1, 31.7, 29.8, 29.8 (3C), 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 22.8, 14.3.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 424

*tert*-butyl (4-(2-(phenylamino)acetamido)phenyl)carbamate – **III-4e**



C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 341.40 g.mol<sup>-1</sup>  
 White off solid  
 42%

The compound **III-4e** was obtained in 42% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The pure compound was obtained by automatized purification on reversed phase Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/DMSO-*d*<sub>6</sub> 3/1, δ ppm): 7.28 – 7.22 (m, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.99 – 6.93 (m, 2H), 6.53 – 6.43 (m, 3H), 3.67 (s, 2H), 1.31 (s, 9H). NH not observed

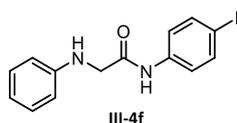
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/DMSO-*d*<sub>6</sub> 3/1, δ ppm): 171.7, 155.0, 149.5, 137.1, 134.1, 130.3 (2C), 122.0 (2C), 120.2, 119.2 (2C), 114.0 (2C), 80.6, 49.3, 28.8 (3C).

IR (cm<sup>-1</sup>): 3346, 2977, 2406, 1664, 1603, 1516, 1437, 1384, 1310, 1250, 1164, 1116, 1068, 835, 751.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 343

Mp: 196 – 197 °C

*N*-(4-iodophenyl)-2-(phenylamino)acetamide – **III-4f**



C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>2</sub>O  
 MW: 352.17 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 64%

The compound **III-4f** was obtained in 64% yield using the general procedure B. Reaction time: 6 h. The compound was purified on silica column (100% DCM to DCM/MeOH 98/02).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm):** 10.05 (s, 1H), 7.65-7.62 (m, 2H), 7.47-7.44 (m, 2H), 7.11-7.07 (m, 2H), 6.59-6.55 (m, 3H), 5.95 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H).

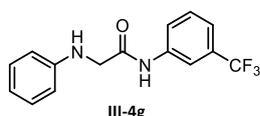
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm):** 169.5, 148.2, 138.6, 137.7 (2C), 128.8 (2C), 121.4 (2C), 116.4, 112.3 (2C), 86.7, 47.3.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3351, 3317, 1664, 1604, 1580, 1524, 1513, 1493, 1445, 1389, 1310, 1263, 1179, 1113, 1005, 814, 751, 690.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 353

**Mp:** 188 – 190 °C

2-(phenylamino)-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide – **III-4g**



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 294.27 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown sticky solid  
Quant.

The compound **III-4g** was obtained in quantitative amount using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The pure compound was obtained by automatized purification on reversed phase Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.77 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.29-7.23 (m, 2H), 6.92-6.87 (m, 1H), 6.73-6.68 (m, 2H), 4.05 (s, 1H), 3.94 (s, 2H).

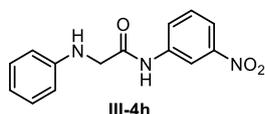
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 169.5, 146.9, 137.9, 131.6 (q, *J* = 32 Hz), 129.8 (2C), 129.7, 123.9 (q, *J* = 272 Hz), 123.0, 121.3-121.2 (m), 120.3, 116.8-116.6 (m), 113.9 (2C), 50.1.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** -62.73.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3335, 1690, 1611, 1590, 1503, 1456, 1330, 1286, 1105, 1060, 1034, 908

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 295

*N*-(3-nitrophenyl)-2-(phenylamino)acetamide – **III-4h**



C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 271.27 g mol<sup>-1</sup>  
Brown sticky solid  
27%

The compound **III-4h** was obtained in 27% yield with the general procedure C. Reaction time: 16 h. Obtained by automatized purification on reversed phase Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour).

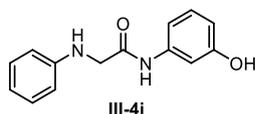
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 10.49 (s, 1H), 8.66 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H), 8.00 – 7.96 (m, 2H), 7.91 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 0.9 Hz, 2H), 7.60 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (dd, *J* = 8.6, 7.3 Hz, 4H), 6.63 – 6.57 (m, 6H), 3.91 (s, 3H). (*Rotamers*)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.4, 170.3, 148.3, 148.2, 148.0, 140.0, 139.9, 130.2, 128.9, 125.3, 125.2, 117.8, 116.6, 116.5, 113.4, 113.3, 112.3, 47.4, 47.3.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3328, 2922, 1673, 1603, 1526, 1429, 1348, 1314, 1258, 1078, 884, 799, 754, 737, 693, 476.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 272

***N*-(3-hydroxyphenyl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4i**



C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 242.27 g mol<sup>-1</sup>  
Off red solid  
36%

The compound **III-4i** was obtained in 36% yield with the general procedure C. Reaction time: 16 h. Obtained by automatized purification on reversed phase Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.17 (ddd, *J* = 7.1, 6.3, 2.1 Hz, 3H), 7.09 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.91 (ddd, *J* = 8.1, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 6.78 – 6.69 (m, 3H), 6.54 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 0.8 Hz, 1H), 3.90 (s, 2H). NH and OH not observed

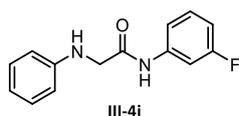
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.1, 159.0, 147.7, 140.2, 130.6, 130.4 (2C), 120.8, 115.4 (2C), 112.5, 112.4, 108.5, 50.2.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3316, 2923, 1661, 1502, 1541, 1495, 1451, 1365, 1314, 1191, 1138, 977, 843, 798, 776, 752, 721, 689, 532, 485.

**LCMS (ESI) :** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 243

**Mp:** 140 – 142 °C

***N*-(3-fluorophenyl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4j**



C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>2</sub>O  
MW: 244.26 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
66%

The compound **3s** was obtained in 66% yield using the general procedure B. Reaction time: 16 h. The compound was purified on silica column (100% DCM to DCM/ MeOH 98/02).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.75 (s, 1H), 7.57-7.52 (m, 1H), 7.29-7.21 (m, 3H), 7.16 (dd, *J* = 8.1, 0.7 Hz, 1H), 6.88 (td, *J* = 7.4, 0.9 Hz, 1H), 6.85-6.79 (m, 1H), 6.72-6.68 (m, 2H), 3.90 (s, 2H), NH unobserved.

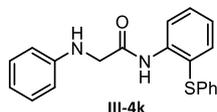
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 169.3, 163.0 (d, *J* = 245.0 Hz), 147.0, 138.8 (d, *J* = 10.8 Hz), 130.2 (d, *J* = 9.3 Hz), 129.7 (2C), 119.9, 115.3 (d, *J* = 2.9 Hz), 113.6 (2C), 111.3 (d, *J* = 21.3 Hz), 107.4 (d, *J* = 26.2 Hz), 49.9.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** -104.72.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3335, 3054, 1672, 1604, 1525, 1492, 1444, 1313, 1276, 1260, 1213, 1181, 1141, 1075, 969, 865, 775, 752, 692.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 245

2-(phenylamino)-*N*-(2-(phenylthio)phenyl)acetamide – **III-4k**



C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>OS  
MW: 334.43 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
81%

The compound **III-4k** was obtained in 81% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The pure compound was obtained by precipitation in EtOH.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 9.1 Hz, 5H), 6.93-6.89 (m, 2H), 6.71 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), NH unobserved.

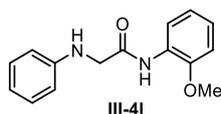
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 172.6, 149.2, 140.4, 137.6, 136.8, 131.6, 130.2 (2C), 130.2 (2C), 129.1 (2C), 127.5, 126.1, 123.8, 122.2, 119.7, 114.2 (2C), 50.4.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3355, 3055, 2899, 2441, 1674, 1602, 1580, 1499, 1476, 1438, 1392, 1311, 1257, 1180, 1155, 1115, 1023, 873, 747, 689, 498.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 335

**Mp:** 88 – 90 °C

*N*-(2-methoxyphenyl)-2-(phenylamino)acetamide – **III-4l**



C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 256.30 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
49%

The compound **III-4l** was obtained in 49% yield using the general procedure B. Reaction time: 6 h. The compound was purified on silica column (100% DCM to DCM/ MeOH 98/02).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 9.04 (s, 1H), 8.40 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 7.05 (td, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 6.97 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 6.85-6.80 (m, 2H), 6.73-6.69 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), NH unobserved.

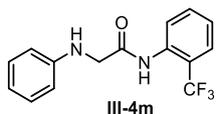
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 168.8, 148.5, 147.2, 129.5 (2C), 127.2, 124.2, 121.2, 120.1, 119.4, 113.7 (2C), 110.4, 55.9, 50.0.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3349, 1671, 1599, 1525, 1503, 1461, 1433, 1312, 1289, 1233.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 257

**Mp:** 110 – 111 °C

2-(phenylamino)-N-(2-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide – III-4m



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 294.27 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown sticky solid  
95%

The compound III-4m was obtained in 95% yield using the general procedure B. Reaction time: 16 h. The pure compound was obtained by automatized purification on reversed phase Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 9.28 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.5-7.53 (m, 2H), 7.28-7.18 (m, 3H), 6.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.56 (s, 1H). 3.93 (s, 2H).

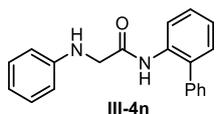
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 169.8, 146.7, 134.9, 132.8, 129.4 (2C), 126.0 (q, *J* = 5 Hz), 124.4, 123.8 (q, *J* = 273 Hz), 123.5, 120.0 (q, *J* = 30 Hz), 119.7, 113.5 (2C), 49.7.

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): -60.88

IR (cm<sup>-1</sup>): 1686, 1604, 1589, 1500, 1455, 1317, 1285, 1169, 1105, 1060, 1034, 908, 751, 730, 690, 645.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 295

N-([1,1'-biphenyl]-2-yl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4n



C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O  
MW: 302.38 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
93%

The compound III-4n was obtained in 93% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The compound was purified on silica column (100% DCM to DCM/ MeOH 98/2).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 8.31-8.23 (m, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 8.3, 6.4, 2.6 Hz, 1H), 7.24-7.04 (m, 9H), 6.75 (tt, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 6.49-6.43 (m, 2H), 3.69 (s, 2H), NH unobserved.

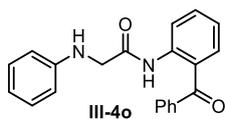
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 172.4, 149.0, 139.0, 135.5, 134.6, 131.3, 130.2 (2C), 130.0 (2C), 129.8 (2C), 129.2, 128.6, 125.9, 122.4, 119.6, 114.2 (2C), 50.1.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3331, 3055, 3029, 2900, 2469, 1665, 1602, 1582, 1519, 1500, 1482, 1436, 1397, 1310, 1259, 746, 701, 691, 492, 478.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 304.

Mp: 98 – 99 °

**N-(2-benzoylphenyl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4o**



C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 330.13 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
73%

The compound **III-4o** was obtained in 73% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The compound was purified by precipitation in EtOH.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 11.44 (s, 1H), 8.65 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 7.66-7.62 (m, 2H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.51 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.48-7.42 (m, 2H), 7.20-7.14 (m, 2H), 7.13-7.08 (m, 1H), 6.77-6.69 (m, 3H), 3.96 (s, 2H), NH unobserved.

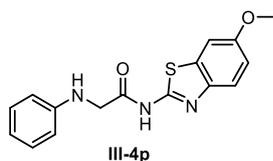
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 198.9, 170.2, 147.0, 139.4, 138.5, 133.9, 133.2, 132.4, 129.9 (2C), 129.3 (2C), 128.3 (2C), 124.4, 122.6, 121.7, 119.0, 113.4 (2C), 49.7.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3280, 3056, 2921, 2247, 1683, 1638, 1600, 1577, 1503, 1444, 1313, 1292, 1260, 1179, 1156, 1111, 1075, 999, 986, 918, 749, 697, 640, 498.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 331.

**Mp:** 126 – 127°

**N-(6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4p**



C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S  
MW: 313.09 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
64%

The compound **III-4p** was obtained in 64% yield using the general procedure C. Reaction time: 10 h. The pure compound was obtained by precipitation in EtOH.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.62 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.23 – 7.18 (m, 2H), 7.02 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.84 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.64 – 6.58 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), NH unobserved.

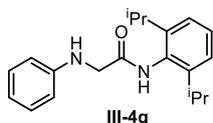
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 169.7, 157.0, 155.4, 146.3, 142.2, 133.4, 129.7 (2C), 121.6, 120.0, 115.4, 113.4 (2C), 104.3, 55.9, 48.9.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2934, 1697, 1603, 1557, 1506, 1469, 1485, 1359, 1320, 1262, 1228, 1178, 1060, 1029, 985, 809, 750.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 314

**Mp:** 168 – 179 °C

**N-(2,6-diisopropylphenyl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4q**



C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O  
MW: 310.44 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown sticky solid  
59%

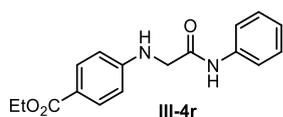
Due to the instability, the compound **III-4q** was prepared using the general procedure C and rapidly purified by reverse reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour). Reaction time: 10 h The compound was used for the next step right after the concentration.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.05 (s, 1H), 7.30-7.23 (m, 3H), 7.15 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.79-6.74 (m, 2H), 4.47 (s, 1H), 4.00 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 2.97 (sept, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.14 (s, 6H), 1.13 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** Not stable enough for a carbon <sup>13</sup>C-NMR.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 311

**4-((2-oxo-2-(phenylamino)ethyl)amino)phenyl propionate – III-4r**



C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 298,34 g.mol<sup>-1</sup>  
Off white solid  
58%

The compound **III-4r** was obtained in 58% yield using the general procedure C. Reaction time: 30 h The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 10.06 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.97 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

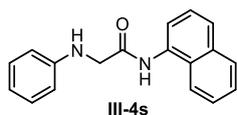
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 168.4, 165.8, 152.5, 138.8, 130.8 (2C), 128.8 (2C), 123.3, 119.2 (2C), 116.9, 111.3 (2C), 59.6, 46.3, 14.3.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3368, 3330, 2977, 2494, 2076, 1671, 1608, 1523, 1501, 1445, 1385, 1313, 1288, 1181, 1148, 1113, 969, 769, 751, 693.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 299

**Mp:** 163 – 165 °C

**N-(naphthalen-1-yl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4s**



C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O  
MW: 276,34 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
98%

The compound **III-4s** was obtained in 98% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The compound was purified on silica column (70/30 to 50/50 Heptane/EtOAc).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 9.16 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.53-7.43 (m, 3H), 7.36 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.31-7.25 (m, 2H), 6.93-6.88 (m, 1H), 6.82-6.80 (m, 2H), 4.50 (s, 1H), 4.05 (s, 2H).

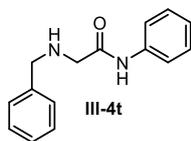
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 169.3, 147.0, 134.2, 131.9, 129.8 (2C), 128.8, 126.9, 126.4, 126.1, 125.9, 125.7, 120.4, 120.1, 120.1, 113.8 (2C), 50.1.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3322, 1675, 1595, 1513, 1482, 1442, 1434, 1427, 1298, 1344, 1309, 1259, 1249, 1198, 1176, 1142, 1107, 1078.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 277

**Mp:** 154 – 156 °C

**2-(benzylamino)-N-phenylacetamide – III-4t**



C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O  
MW: 240.30 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown solid  
98%

The compound **III-4t** was obtained in 98% yield using the general procedure C. Reaction time: 10 h. The compound was purified on silica column (70/30 to 50/50 Heptane/EtOAc).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 9.28 (s, 1H), 7.59-7.56 (m, 2H), 7.40-7.27 (m, 7H), 7.14-7.09 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.43 (s, 2H), 1.95 (s, 1H).

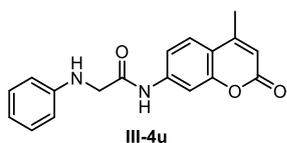
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 169.7, 139.2, 137.7, 129.1 (2C), 128.9 (2C), 128.2 (2C), 127.7, 124.3, 119.6 (2C), 54.2, 52.6.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3301, 3060, 1669, 1599, 1520, 1497, 1441, 1310, 1252, 751, 694.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 241

**Mp:** 59 – 61 °C

**N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4u**



C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 308,33 g.mol<sup>-1</sup>  
White off solid  
49%

The compound **III-4u** was obtained in 49% yield using the general procedure C. Reaction time: 16 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm):** 10.45 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 7.12-7.07 (m, 2H), 6.63-6.56 (m, 3H), 6.26 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 3.92 (s, 2H), 2.39 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H). One NH missing

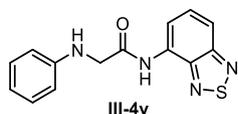
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm):** 170.2, 160.1, 153.6, 153.1, 148.2, 142.2, 128.9 (2C), 126.0, 116.5, 115.2, 115.1, 112.4 (2C), 112.3, 105.7, 47.4, 18.0.

**IR (cm<sup>-1</sup>) neat:** 3410, 3264, 3187, 3093, 1688, 1621, 1603, 1588, 1580, 1502, 1442, 1419, 1391, 1362, 1252, 1226, 1213, 1183, 1171, 1150, 1132, 1070, 846, 744, 692.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 309

**Mp:** 179 °C – decomp.

**N-(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)-2-(phenylamino)acetamide – III-4v**



C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>OS  
MW: 284.33 g.mol<sup>-1</sup>  
Off-white solid  
71%

The compound **III-4v** was obtained in 71% yield using the general procedure C. Reaction time: 10 h. The pure compound was obtained by precipitation in EtOH.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/DMSO-d<sub>6</sub> 1/9, δ ppm):** 8.42 (dd, *J* = 7.2, 1.1 Hz, 1H), 7.74–7.64 (m, 2H), 7.15–7.08 (m, 2H), 6.70–6.60 (m, 3H), 4.01 (s, 2H). NH missing

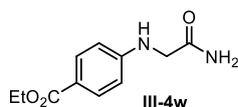
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/DMSO-d<sub>6</sub> 1/9, δ ppm):** 170.1, 154.2, 147.8, 174.0, 130.6, 129.4, 128.8 (2C), 117.1, 115.2, 114.6, 112.4 (2C), 47.9

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3372, 3318, 3114, 3053, 2906, 1680, 1603, 1547, 1501, 1492, 1413, 1397, 1337, 1309, 1256, 1240, 1180, 809, 751, 689.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 285

**Mp:** 200 °C – decomp.

## 4-((2-amino-2-oxoethyl)amino)phenyl propionate – III-4w



C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 222,10 g.mol<sup>-1</sup>  
 White off solid  
 86%

Ethyl 4-aminobenzoate (0.5 g, 3.0 mmol, 1.0 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.25 g, 9.1 mmol, 3.0 equiv.), NaI (1.7 g, 9.1 mmol, 3.0 equiv.) was solubilized in dry MeCN (5.0 mL) and 2-chloroacetamide (0.429 g, 6.04 mmol, 2.0 equiv.) was added to the suspension. After completion of the reaction the mixture was filtered and concentrated under vacuum. Then, the crude mixture was dissolved in DCM (10.0 mL) and washed with water. The crude product was purified by reverse phase semi-prep chromatography to afford III-4w as a yellow off solid (0.580 mg, 2.60 mol, 86%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 7.84–7.78 (m, 2H), 6.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

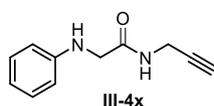
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 176.0, 168.4, 153.5, 132.3 (2C), 119.6, 112.7 (2C), 61.3, 47.3, 14.6.

IR (cm<sup>-1</sup>): 1671, 1601, 1586, 1541, 1504, 1477, 1436, 1421, 1398, 1362, 1350, 1327, 1286, 1265, 1223, 1176, 1125, 1109, 1023, 997, 839, 769, 700.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 223

Mp: 121 – 122 °C

## 2-(phenylamino)-N-(prop-2-yn-1-yl)acetamide – III-4x



C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O  
 MW: 188.23 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow oil  
 57%

The compound III-4x was obtained in 57% yield using the general procedure C. Reaction time: 10 h. The desired compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 95/5).

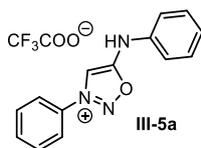
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.25–7.20 (m, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.83 (tt, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 6.64–6.60 (m, 2H), 4.07 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 2.19 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 169.6, 146.1, 128.6 (2C), 118.4, 112.4 (2C), 78.3, 70.7, 48.0, 28.0.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3285, 1651, 1601, 1503, 1418, 1340, 1313, 1257, 1180, 986, 750, 691, 643.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 189

3-phenyl-5-(phenylamino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5a**



$C_{16}H_{12}F_3N_3O_3$   
 MW: 351.28 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 95%

Starting from **III-4a**, compound **III-5a** was obtained in 95% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.94 (s, 1H), 8.13-8.06 (m, 2H), 7.92-7.85 (m, 1H), 7.84-7.78 (m, 2H), 7.56 (ddd, *J* = 9.2, 5.6, 1.9 Hz, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 7.42-7.34 (m, 1H). NH not observed

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 168.2, 137.1, 135.3, 134.6, 131.8 (2C), 131.2 (2C), 127.8, 123.7 (2C), 121.3 (2C), 104.5. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.13.

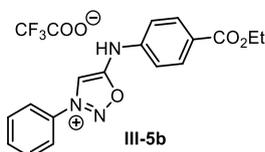
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1677, 1590, 1528, 1500, 1419, 1191, 1130, 986, 799, 747, 718, 680, 612.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 238

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 238.0980; found 238.1015

**Mp:** 80 – 82 °C

5-((4-(ethoxycarbonyl)phenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5b**



$C_{19}H_{16}F_3N_3O_5$   
 MW: 423.35 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 88%

Starting from **III-4b**, compound **III-5b** was obtained in 88% yield using the general procedure D. Reaction time: 2 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 9.05 (s, 1H), 8.18–8.14 (m, 2H), 8.12–8.08 (m, 2H), 7.88 (ddd, *J* = 7.5, 3.8, 1.2 Hz, 1H), 7.83–7.78 (m, 2H), 7.57–7.53 (m, 2H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 167.5, 167.0, 163.3 (m, Carbonyl CF<sub>3</sub>COO) 141.5, 135.4, 134.5, 132.5 (2C), 131.9 (2C), 129.0, 123.7 (2C), 120.2 (2C), 118.0 (q, *J* = 282 Hz, CF<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>COO) 105.5, 62.3, 14.6.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -78.85.

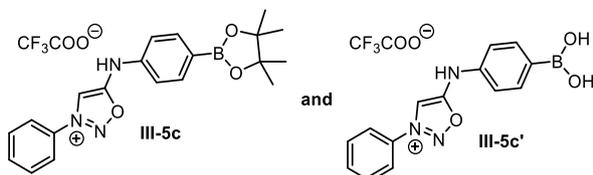
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3384, 2923, 2853, 1671, 1606, 1587, 1514, 1471, 1369, 1280, 1199, 1138, 1020, 853, 800, 764, 723, 681.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 310

**HRMS (ESI):** calculated for  $[C_{17}H_{16}N_3O_3]^+$  310.1192; found 310.1198

**Mp:** 223 – 225 °C

3-phenyl-5-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)amino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5c**  
5-((4-boronophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5c'**



$C_{22}H_{23}BF_3N_3O_5$   
and  
 $C_{16}H_{13}BF_3N_3O_5$   
MW: 477.24 g.mol<sup>-1</sup>  
And  
MW: 395.10 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
58%

Starting from compound **III-4c**, the compounds **III-5c** and **III-5c'** were obtained in a mixture (1/1) using the general procedure D (boronate hydrolysis occurred during the purification). Reaction time: 1 h. The mixture was obtained by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 7/3, δ ppm):** 8.93 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.07–8.02 (m, 4H), 7.90–7.80 (m, 6H), 7.75 (m, 4H), 7.43 (m, 4H), 1.35 (s, 12H), 1.21 (s, 7H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 7/3, δ ppm):** 167.5, 167.4, 163.2 (m, C=O CF<sub>3</sub>COO), 139.3, 137.4, 136.4, 135.2, 135.2, 134.2, 134.2, 131.7, 131.7, 123.4, 119.6, 119.6, 116.2, 104.6, 104.4, 85.2, 76.1, 25.1, 24.9.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 7/3, δ ppm):** -78.84.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3387, 1660, 1605, 1456, 1361, 1191, 1134, 1087, 848, 799, 723.

**LCMS (ESI) III-5c:** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 365

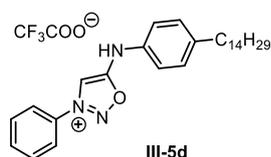
**LCMS (ESI) III-5c':** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 282

**HRMS (ESI) III-5c:** calculated for  $[C_{20}H_{23}BN_3O_3]^+$  364.1836; found 364.1837.

**HRMS (ESI) III-5c':** calculated for  $[C_{14}H_{13}BN_3O_3C]^+$  282.1044; found 282.1052.

**Mp:** 198 °C – decomp.

5-((4-(pentadec-1-yn-1-yl)phenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5d**



$C_{30}H_{40}F_3N_3O_3$   
MW: 547.66 g.mol<sup>-1</sup>  
Sticky solid  
21%

Starting from **III-4d**, compound **III-5d** was obtained in 21% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.86 (s, 1H), 8.09–8.04 (m, 2H), 7.89–7.82 (m, 1H), 7.82–7.75 (m, 2H), 7.39–7.33 (m, 4H), 2.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.64 (dd, *J* = 14.7, 7.2 Hz, 2H), 1.39 – 1.23 (m, 23H), 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 168.2, 143.2, 135.2, 134.6, 134.6, 131.8 (2C), 131.1 (2C), 123.7 (2C), 121.5, 121.5, 104.3, 36.3, 33.1, 32.6, 30.8, 30.8, 30.7 (2C), 30.7, 30.7, 30.6, 30.4, 30.3, 23.7, 14.4. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

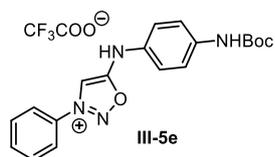
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.24.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2916, 2848, 1671, 1613, 1588, 1515, 1471, 1422, 1379, 1200, 1129, 989, 830, 198, 798, 763, 719, 680.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 435

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 434.3171; found 434.3175

5-((4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate –  
**III-5e**



C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 423.35 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange sticky solid  
23%

Starting from **III-4e**, compound **III-5e** was obtained in 23% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.82 (s, 1H), 8.09–8.04 (m, 2H), 7.84 (dd, *J* = 4.9, 3.8 Hz, 1H), 7.81–7.75 (m, 2H), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.40–7.34 (m, 2H), 1.53 (s, 9H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 168.3, 155.1, 139.7, 135.2 (2C), 134.6, 131.8 (2C), 131.3, 123.7 (2C), 122.4 (2C), 120.9, 104.1, 81.2, 28.7 (3C). Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

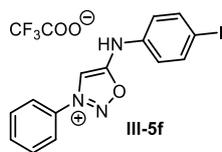
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -78.84.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2979, 1673, 1599, 1518, 1368, 1319, 1200, 1158, 1055, 836, 799, 762.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 353

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 353.1614; found 353.1628

5-((4-iodophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5f**



C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 477.18 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 64%

Starting from **III-4f**, compound **III-5f** was obtained in 64% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): δ 8.96 (s, 1H), 8.12-8.05 (m, 2H), 7.91-7.84 (m, 3H), 7.83-7.76 (m, 2H), 7.29-7.22 (m, 2H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 167.9, 140.3 (2C), 137.0, 135.4, 134.5, 131.9 (2C), 123.7 (2C), 123.0 (2C), 104.9, 91.0. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): -77.23.

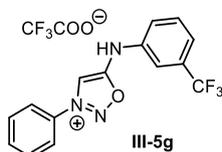
IR (cm<sup>-1</sup>): 1668, 1479, 1488, 1472, 1403, 1373, 1308, 1198, 1132, 1064, 1007, 991, 823, 798, 761, 718, 680.

LCMS (ESI): *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 364

HRMS (ESI): calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 363.9947; found 363.9950

Mp: 149 – 152 °C

3-phenyl-5-((3-(trifluoromethyl)phenyl)amino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5g**



C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 419.07 g.mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 42%

Starting from **III-4g**, compound **III-5g** was obtained in 42% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 9.04 (s, 1H), 8.10 (dt, *J* = 7.3, 2.1 Hz, 2H), 7.87 (ddd, *J* = 6.6, 3.7, 1.1 Hz, 1H), 7.83 – 7.72 (m, 5H), 7.68 – 7.63 (m, 1H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 168.1, 138.1, 135.4, 134.5, 133.4 (q, *J* = 33 Hz), 132.3, 131.8 (2C), 124.9 (q, *J* = 270 Hz), 124.7, 124.1 (q, *J* = 3 Hz), 123.7 (2C), 118.2 (q, *J* = 3 Hz), 105.3. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): -77.07, -64.39.

IR (cm<sup>-1</sup>): 1709, 1721, 1660, 1615, 1596, 1332, 1182, 1126, 1074, 800, 759, 720, 696, 681.

LCMS (ESI): *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 306

HRMS (ESI): calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 306.0854; found 306.0852

**Mp:** 204 – 206 °C

5-((3-fluorophenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5h**



C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 369.28 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
80%

Starting from **III-4j**, compound **III-5h** was obtained in 80% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.92 (s, 1H), 8.11-8.05 (m, 2H), 7.90-7.82 (m, 1H), 7.82-7.73 (m, 2H), 7.56-7.49 (m, 1H), 7.29-7.22 (m, 2H), 7.07 (tdd, *J* = 8.45, 2.39, 0.77 Hz, 1H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 167.8, 164.8 (d, *J* = 246 Hz), 139.7 (d, *J* = 10.7 Hz), 135.2, 134.6, 132.8 (d, *J* = 9.4 Hz), 131.8 (2C), 123.7 (2C), 117.1 (d, *J* = 3.0 Hz), 113.9 (d, *J* = 21.4 Hz), 108.6 (d, *J* = 25.6 Hz), 104.7. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -112.12, -77.13.

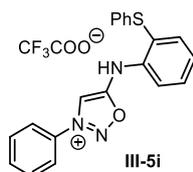
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2324, 1717, 1702, 1661, 1609, 1518, 1494, 1451, 1471, 1205, 1184, 1143, 994, 978, 957, 919, 860, 835, 801.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 256

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 256.0886; found 256.0877

**Mp:** 218 – 219 °C

3-phenyl-5-((2-(phenylthio)phenyl)amino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5i**



C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S  
MW: 459.44 g.mol<sup>-1</sup>  
Sticky solid  
29%

Starting from **III-5k**, compound **III-5i** was obtained in 29% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.58 (s, 1H), 8.02-7.98 (m, 2H), 7.91-7.84 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 2H), 7.67-7.63 (m, 1H), 7.57-7.52 (m, 2H), 7.48-7.43 (m, 1H), 7.38-7.30 (m, 5H), 7.27-7.20 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 169.5, 136.7, 135.6, 135.3, 135.2, 134.4, 133.5, 132.4 (2C), 131.8 (2C), 130.9, 130.7 (2C), 130.4, 128.9, 126.9, 123.5 (2C), 104.0. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

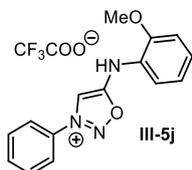
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -78.86.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3063, 2924, 1645, 1581, 1472, 1489, 1409, 1196, 1130, 1065, 1023, 990, 826, 797, 754, 717, 683.

**LCMS (ESI):**  $m/z$  [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 346

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 346.1014; found 346.1008.

5-((2-methoxyphenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5j**



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 381.31 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
69%

Starting from **III-4l**, compound **III-5j** was obtained in 69% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.67 (s, 1H), 8.05 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 7.84 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 7.76 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 7.57 (dd,  $J$  = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.41–7.33 (m, 1H), 7.20 (dd,  $J$  = 8.3, 0.7 Hz, 1H), 7.10 (td,  $J$  = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 168.7, 153.2, 135.2, 134.6, 131.8 (2C), 129.6, 125.4, 123.7 (2C), 123.3, 122.3, 113.4, 104.6, 56.5. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -78.80.

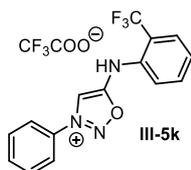
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3074, 1665, 1595, 1504, 1466, 1199, 1130, 799, 749.

**LCMS (ESI):**  $m/z$  [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 268

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 268.1086; found 268.1084

**Mp:** 194 – 195 °C

3-phenyl-5-((2-(trifluoromethyl)phenyl)amino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5k**



C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 419.28 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown solid  
80%

Starting from **III-4m**, compound **III-5k** was obtained in 80% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.66 (s, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.91 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.87–7.75 (m, 5H), 7.65 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 169.8, 163.0 (m), 135.9, 135.5, 135.1, 134.6, 131.7 (2C), 129.7, 128.6 (q,  $J$  = 5.2 Hz), 128.4, 127.0 (q,  $J$  = 30.4 Hz), 124.7 (q,  $J$  = 271.9 Hz), 123.4 (2C), 117.9 (q,  $J$  = 289.5 Hz), 103.9.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -62.27, -77.12

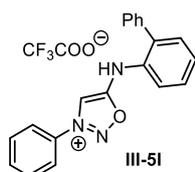
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1721, 1662, 1607, 1477, 1458, 1447, 1319, 1205, 1179, 1132, 1060, 1038, 988, 852, 834, 799, 761, 721.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 306

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 306.0854; found 306.0878

**Mp:** 212 – 215 °C

5-([1,1'-biphenyl]-2-ylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5l**



C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 427.11 g.mol<sup>-1</sup>  
Sticky solid  
85%

Starting from **III-4n**, compound **III-5l** was obtained in 85% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.56 (s, 1H), 7.97-7.93 (m, 2H), 7.87-7.80 (m, 1H), 7.78-7.72 (m, 2H), 7.68–7.63 (m, 1H), 7.59–7.53 (m, 3H), 7.51–7.45 (m, 4H), 7.42–7.36 (m, 1H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 169.4, 139.1, 138.8, 135.2, 134.4, 133.9, 132.9, 131.8 (2C), 130.4, 130.2 (2C), 130.0 (2C), 129.9, 129.2, 126.0, 123.5 (2C), 104.0. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -78.65.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2924, 1664, 1477, 1199, 749, 702.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 315

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 314.1293; found 314.1296

5-((2-benzoylphenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5m**



C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 455.39 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange sticky solid  
10%

Starting from **III-4o**, compound **III-5m** was obtained in 10% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.81 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.87-7.75 (m, 7H), 7.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.54 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** Not stable enough for a carbon <sup>13</sup>C-NMR.

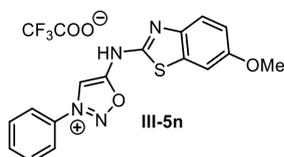
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** Not stable enough for a fluorine <sup>19</sup>F-NMR.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3066, 2925, 1660, 1635, 1596, 1473, 1449, 1270, 1196, 1133, 1075, 991, 939, 929, 831, 798, 762, 701.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 342

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 342.1242; found 342.1242

5-((6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5n**



C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S  
MW: 438.06 g.mol<sup>-1</sup>  
Sticky orange solid  
50%

Starting from **III-4p**, compound **III-5n** was obtained in 50% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 7/3, δ ppm):** 8.51 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 2H), 7.81-7.70 (m, 3H), 7.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.98-6.95 (m, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 7/3, δ ppm):** 168.0, 168.0, 156.1, 134.5, 134.4, 134.3, 133.1, 130.6 (2C), 121.9 (2C), 120.6, 114.1, 105.0, 102.5, 56.0. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

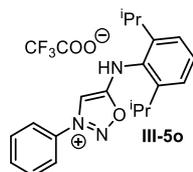
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 7/3, δ ppm):** -78.84.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2914, 1676, 1631, 1490, 1463, 1204, 1140, 800, 724

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 325

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S]<sup>+</sup> 325.0759; found 325.0762.

5-((2,6-diisopropylphenyl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5o**



C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 435.44 g.mol<sup>-1</sup>  
Brown oil  
92%

Starting from **III-4q**, compound **III-5o** was obtained in 92% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.54 (s, 1H), 8.03-7.98 (m, 2H), 7.85-7.80 (m, 1H), 7.77-7.71 (m, 2H), 7.50 (dd, *J* = 8.3, 7.2 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.20 (hept, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 6.7 Hz, 12H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 170.5, 161.5 (m), 147.9, 135.2, 134.6, 131.7 (2C), 131.6 (2C), 130.4, 125.9 (2C), 123.6 (2C), 117.2 (q), 102.5, 29.7 (2C), 24.8 (2C), 23.5 (2C). Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

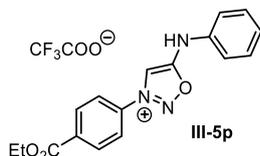
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.12.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1659, 1601, 1473, 1386, 1177, 1134, 1058, 984, 935, 797, 763, 735, 719, 706, 684.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 323

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 322.1919; found 322.1922

3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-5-(phenylamino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5p**



C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 423.35 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
78%

Starting from **III-4r**, compound **III-5p** was obtained in 78% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash<sup>®</sup> (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 9.01 (s, 1H), 8.41-8.36 (m, 2H), 8.21 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.58-7.52 (m, 2H), 7.50-7.46 (m, 2H), 7.40-7.34 (m, 1H), 4.46 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 168.3, 165.8, 137.4, 137.0, 136.8, 132.6 (2C), 131.3 (2C), 128.0, 124.1 (2C), 121.4 (2C), 105.0, 63.1, 14.5. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -78.20.

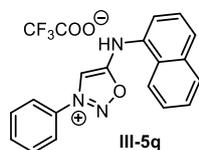
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1672, 1591, 1500, 1438, 1280, 1201, 1136, 1018, 845, 798, 769, 749, 721.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 310

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 310.1192; found 310.1195

**Mp:** decomp.

5-(naphthalen-1-ylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5q**



C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 401.35 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
95%

Starting from **III-4s**, compound **III-5q** was obtained in 95% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash<sup>®</sup> (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.72 (s, 1H), 8.17-8.14 (m, 1H), 8.06-7.99 (m, 4H), 7.86-7.82 (m, 1H), 7.79-7.73 (m, 3H), 7.71-7.62 (m, 3H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 170.3, 136.1, 135.2, 134.6, 132.8, 131.8 (2C), 130.0, 129.8, 129.4, 128.6, 128.4, 126.9, 123.6 (2C), 122.7, 122.6, 104.1. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.18.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1657, 1597, 1576, 1473, 1395, 1198, 1132, 987, 829, 797, 778, 764, 717, 680.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 288

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 288.1137; found 288.1172.

**Mp:** 157 °C – decomp.

3-benzyl-5-(phenylamino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5r**



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 365.31 g.mol<sup>-1</sup>  
Off white solid  
86%

Starting from **III-4t**, compound **III-5r** was obtained in 86% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.65 (s, 1H), 7.57-7.52 (m, 2H), 7.50-7.39 (m, 7H), 7.32-7.22 (m, 1H), 5.80 (s, 2H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 165.5, 161.8 (m, Carbonyl CF<sub>3</sub>COO), 135.2, 131.0, 130.0 (2C), 130.0 (2C), 129.5 (3C), 126.8, 120.0 (2C), 115.8 (q, *J* = 287 Hz, CF<sub>3</sub> CF<sub>3</sub>COO), 105.5, 58.1.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** -77.76.

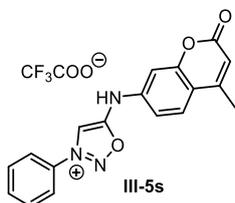
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3069, 1667, 1592, 1499, 1457, 1342, 1182, 1134, 1030, 917, 834, 798, 747, 718.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 252

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 252.1137; found 252.1141.

**Mp:** 103 – 104 °C

5-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5s**



C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 433.08 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
51%

Starting from **III-4u**, compound **III-5s** was obtained in 51% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour). Reaction time

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>, δ ppm):** 8.65 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.87-7.73 (m, 4H), 7.35-7.27 (m, 2H), 6.24 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 2.48 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>, δ ppm):** 164.8, 160.7, 159.3 (m, Carbonyl CF<sub>3</sub>COO), 155.1, 153.6, 149.1, 134.5, 133.3, 130.7 (2C), 126.3, 122.5 (2C), 119.1, 117.3 (q, *J* = 296.1 Hz, CF<sub>3</sub> CF<sub>3</sub>COO), 115.3, 112.1, 107.8, 102.6, 18.0.

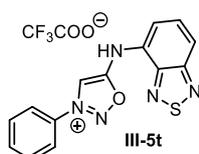
**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>, δ ppm):** -77.12.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3112, 2961, 1670, 1609, 1566, 1391, 1193, 1138, 1070, 854, 799, 721.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 320

**Mp:** 186 °C – decomp

5-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-ylamino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5t**



C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S  
MW: 409.34 g.mol<sup>-1</sup>  
Yellow solid  
84%

Starting from **III-4v**, compound **III-5t** was obtained in 84% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.87 (s, 1H), 8.10-8.07 (m, 2H), 7.94 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.88-7.76 (m, 5H), NH unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 168.0, 163.2 (Carbonyl CF<sub>3</sub>COO), 157.0, 149.8, 135.2, 134.6, 131.8 (2C), 131.3, 130.5, 123.6 (2C), 119.8, 118.0 (q, *J* = 288 Hz, CF<sub>3</sub> CF<sub>3</sub>COO), 118.7, 105.7.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.14.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3430, 2924, 1654, 1548, 1459, 1380, 1193, 1138, 1078, 844, 799, 761, 748.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 296

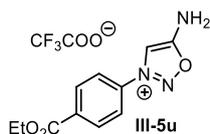
**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>OS]<sup>+</sup> 296.0606; found 296.0604

**Mp:** 175 – 177 °C

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 320.1035; found 320.1039

**Mp:** 190 °C – decomp.

5-amino-3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-5u**



C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 347.25 g.mol<sup>-1</sup>  
Orange solid  
62%

Starting from **III-4w**, compound **III-5u** was obtained in 62% yield using the general procedure D. In this example, Tf<sub>2</sub>O was used instead of PCl<sub>5</sub> (only degradation was observed with PCl<sub>5</sub>). Reaction time: 16

h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.44 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), NH<sub>2</sub> unobserved.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 171.7, 165.9, 161.6-161.2 (m, Carbonyl CF<sub>3</sub>COO), 137.4, 136.5, 132.5 (2C), 123.9 (2C), 117.3 (q, *J* = 288 Hz, CF<sub>3</sub> CF<sub>3</sub>COO), 103.1, 63.1, 14.4.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.89.

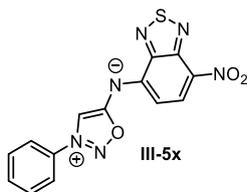
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3117, 2991, 1673, 1607, 1448, 1399, 1371, 1280, 1136, 1105, 1017, 980, 859, 798, 769, 721, 704, 687.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 234

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 234.0879; found 234.0881

**Mp:** 128 – 130 °C

5-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)amino)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-5x



C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S  
MW: 340.31 g.mol<sup>-1</sup>  
Deep red solid  
16%

**III-5t** (30.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 equiv.) was suspended in concentrated nitric acid 65% (3.0 mL). Then, concentrated sulfuric acid 98% (1.0 mL) was added dropwise in the solution at room temperature. The resulting mixture was stirred at room temperature for 15 min and then poured into a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> at 0 °C. The solid was collected by filtration and purified by SFC (Isocratic gradient: CO<sub>2</sub> 83%, DCM 3.4% MeOH 13.6% 15.0 min) to give **III-5x** as a deep red solid (16%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm):** 8.83 (s, 1H), 8.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.16-8.11 (m, 2H), 7.88-7.80 (m, 3H), 7.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm):** Not enough material for carbon 13 NMR.

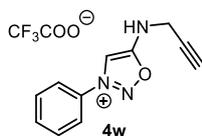
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3386, 2951, 2924, 2854, 1674, 1644, 1527, 1493, 1470, 1319, 1202, 1143, 995, 933, 854, 800, 726.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 341

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S]<sup>+</sup> 341.0457; found 341.0458.

**Mp:** 201 °C – decomp.

3-phenyl-5-(prop-2-yn-1-ylamino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – **III-15**



C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 313.23 g mol<sup>-1</sup>  
 Yellow pale solid  
 86%

Starting from **III-4x**, compound **III-15** was obtained in 86% yield using the general procedure D. Reaction time: 1 h. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 1/1, δ ppm): 8.56 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.84-7.54 (m, 3H), 4.30 (s, 2H), 2.74 (s, 1H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 169.4, 163.3-161.8 (m, Carbonyl CF<sub>3</sub>COO), 134.9, 133.5, 131.4 (2C), 122.6 (2C), 117.05 (q, *J* = 291.6 Hz, CF<sub>3</sub> CF<sub>3</sub>COO), 101.9, 76.6, 74.9, 33.7.

<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): -78.24.

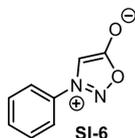
IR (cm<sup>-1</sup>): 3412, 1719, 1666, 1651, 1473, 1451, 1348, 1203, 1184, 1133, 860, 835, 799, 721.

LCMS (ESI): *m/z* [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 200

HRMS (ESI): calculated for [C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 200.0824; found 200.0825

Mp: 183 – 185 °C

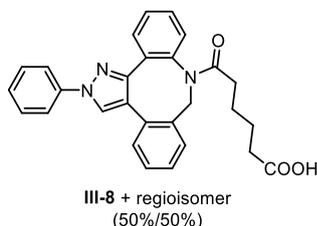
3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate – **SI-6**



C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 162.14 g mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid

Compound **SI-6** was prepared as described in the literature.<sup>2</sup>

6-oxo-6-(2-phenyl-2,8-dihydro-9H-dibenzo[b,f]pyrazolo[3,4-d]azocin-9-yl)hexanoic acid – **III-8**



C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 451.52 g mol<sup>-1</sup>  
 Yellowish oil  
 97%

DBCO acid (10 mg, 30 μmol, 1.0 equiv.) was dissolved in DCM (1.0 mL) and **SI-6** (4.86 mg, 30 μmol, 1.0 equiv.) was added. The mixture was stirred a 40 °C for 1 h and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (Hept./AcOEt/AcOH 70/29/01) to give **III-8** as a yellowish oil (13.1 mg, 29 μmol, 97%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.02 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.77 (ddd, *J* = 14.2, 8.6, 1.0 Hz, 4H), 7.68 – 7.64 (m, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 7H), 7.42 – 7.34 (m, 4H), 7.33 – 7.27 (m, 4H), 7.25 – 7.10 (m, 6H), 6.12 (dd, *J* = 16.5, 7.0 Hz, 2H), 4.44 (dd, *J* = 16.6, 7.1 Hz, 2H), 2.12 – 2.02 (m, 5H), 1.89 – 1.78 (m, 2H), 1.47 – 1.29 (m, 9H).

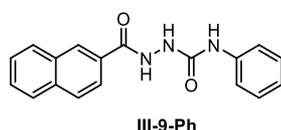
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 173.1, 172.5, 152.2, 149.7, 140.8, 140.6, 139.9, 139.9, 134.7, 134.4, 134.0, 133.6, 133.1, 133.0, 131.4, 130.4, 130.2, 129.9, 129.7, 129.5, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.5, 128.3, 127.7, 127.7, 127.3, 127.1, 126.8, 126.7, 124.6, 124.0, 121.4, 119.1, 119.0, 53.6, 52.5, 33.7, 33.4, 24.4, 24.3, 24.3, 24.1.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3060, 2927, 1706, 1648, 1598, 1502, 1402, 1215, 907, 757, 728, 689.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 452.

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> 450.1818; found 450.1820

2-(2-naphthoyl)-N-phenylhydrazine-1-carboxamide – **III-9-Ph**



C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 305.33 g mol<sup>-1</sup>  
White solid  
87%

Phenylisocyanate (6.8 μL, 57 μmol, 1.0 equiv.) was dissolved in DCM (0.6 mL) and naphthohydrazine (10.7 mg, 57 μmol, 1.0 equiv.) was added to the mixture. The reaction was left under stirring at room temperature during two hours. Then, solvents were removed in vacuo. The desired compound was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0.1% TFA to 100% MeCN + 0.1% TFA over one hour) to give **III-9-Ph** as a white solid (15.1 mg, 29 μmol, 87%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 8.50 (s, 1H), 8.04-7.92 (m, 4H), 7.60 (dq, *J* = 6.9, 5.4 Hz, 2H), 7.45 (dd, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 2H), 7.28 (dd, *J* = 10.7, 5.3 Hz, 2H), 7.06-7.00 (m, 1H), NH unobserved.

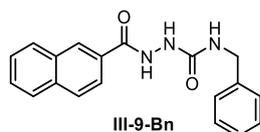
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 140.5, 136.4, 133.9, 131.2, 130.2, 130.0, 129.9 (2C), 129.5, 129.5, 129.2, 128.9, 128.1, 125.3, 123.9, 120.5.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1655, 1502, 1466, 1428, 1209, 748.

**LCMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 306.

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 306.1242; found 306.1248

2-(2-naphthoyl)-N-benzylhydrazine-1-carboxamide – **III-9-Bn**



C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 319.36 g mol<sup>-1</sup>  
White solid  
92%

Benzylisocyanate (7.1 μL, 57 μmol, 1.0 equiv.) was dissolved in DCM (0.6 mL) and naphthohydrazine (10.7 mg, 57 μmol, 1.0 equiv.) was added to the mixture. The reaction was left under stirring at 25° C during two hours then solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified

by column chromatography on silica gel (100% AcOEt) to give **III-9-Ph** as a white solid (16.7 mg, 29  $\mu\text{mol}$ , 92%).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm):** 10.34 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.07-7.89 (m, 5H), 7.70-7.53 (m, 2H), 7.35-7.17 (m, 6H), 4.28 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm):** 166.0, 158.0, 140.1, 133.8, 131.5, 129.6, 128.3, 127.6 (2C), 127.5, 127.3, 127.2, 127.1, 126.4 (2C), 126.2, 125.9, 123.7, 42.1.

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3288, 2921, 2456, 1659, 1629, 1539, 1453, 1393, 1324, 752, 697, 469.

**LCMS (ESI):**  $m/z$  [M+H] $^+$  320.

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>] $^+$  320.1399; found 320.1405.

### IV.3 Physico-chemical properties of iminosydnones

#### IV.3.i Crystallographic data

The compounds (approximately 30 mg) were dissolved in 0.2 mL of MeCN in a HPLC vial and water (0.8 mL) was added (if needed MeCN was added to get a clear solution). The solutions were let in a well-ventilated area for at least one week until crystals formed upon slow evaporation.

The data for all compounds, except **III-2b**, were collected at 100(2) K on a Bruker D8 Quest diffractometer equipped with an Incoatec microfocus source ( $I\mu\text{S}$  3.0 Mo,  $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) and a PHOTON III area detector, and operated through the APEX3 software. Data for **III-2b** were collected at 100(2) K on a Nonius Kappa-CCD area detector diffractometer using graphite-monochromated Mo  $K\alpha$  radiation. The crystals were mounted into glass capillaries or on Mitegen micromounts with a protective coating of Paratone-N oil (Hampton Research). The data were processed with HKL20005 (**III-2b**) or SAINT6 (all other compounds). Absorption effects were corrected empirically with the programs SCALEPACK (**III-2b**) 5 or SADABS7,8 (all other compounds). All structures were solved by intrinsic phasing with SHELXT, and refined by full-matrix least-squares on F2 with SHELXL, using the ShelXle interface. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters. The hydrogen atoms bound to oxygen and nitrogen atoms were retrieved from residual electron density maps and they were refined with restraints if necessary (treated as riding atoms in **III-2b**). The carbon-bound hydrogen atoms were introduced at calculated positions and were treated as riding atoms with an isotropic displacement parameter equal to 1.2 times that of the parent atom (1.5 for  $\text{CH}_3$ , with optimized geometry). Crystal data and structure refinement parameters are given in **Table S6**. The molecular plots were drawn with ORTEP-3. Special details for four of the compounds are as follows.

Compound **III-5f**. The  $\text{CF}_3$  group is rotationally disordered and the two sets of positions were refined with occupancy parameters constrained to sum to unity and with restraints on displacement parameters.

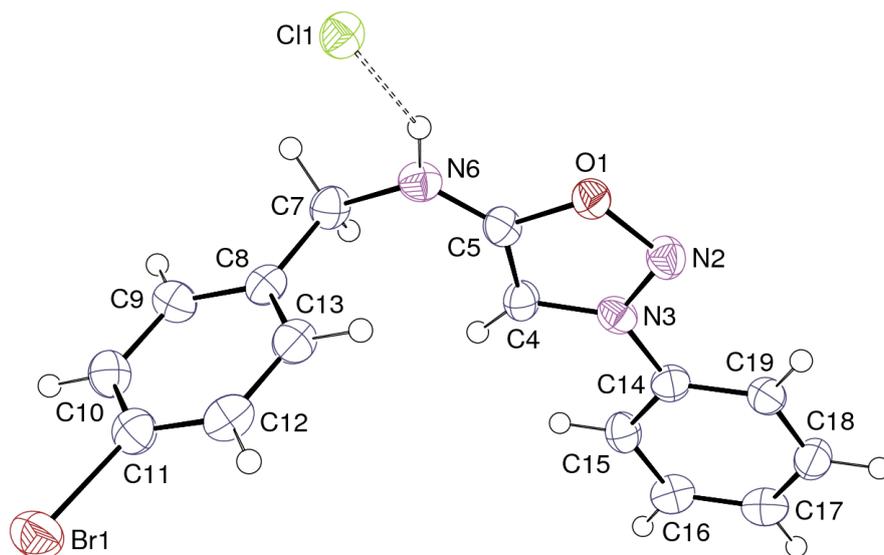
Compound **III-5r**. One  $\text{CF}_3$  group is rotationally disordered and the two sets of positions were refined with occupancy parameters constrained to sum to unity and with restraints on bond lengths and displacement parameters. The hydrogen atoms bound to O8 and O10 are too close to their image by symmetry and they have been given occupancy parameters of 0.5 accordingly, which is also necessary for charge equilibrium.

Compound **III-5x**. One of the hydrogen atoms of the water molecule is disordered over two sites which have been given occupancy parameters of 0.5 and which are both close to their image by symmetry.

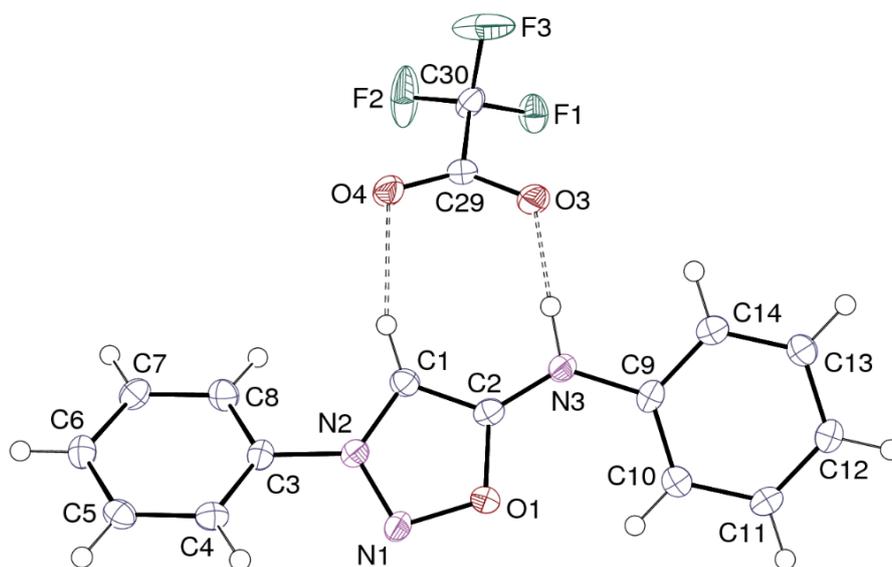
Compound **III-5u**. The ethyl group in one of the two independent molecules is disordered over two positions which were refined with occupancy parameters constrained to sum to unity and restraints on bond lengths and displacement parameters.

**Table S6.** Crystal Data and Structure Refinement Details

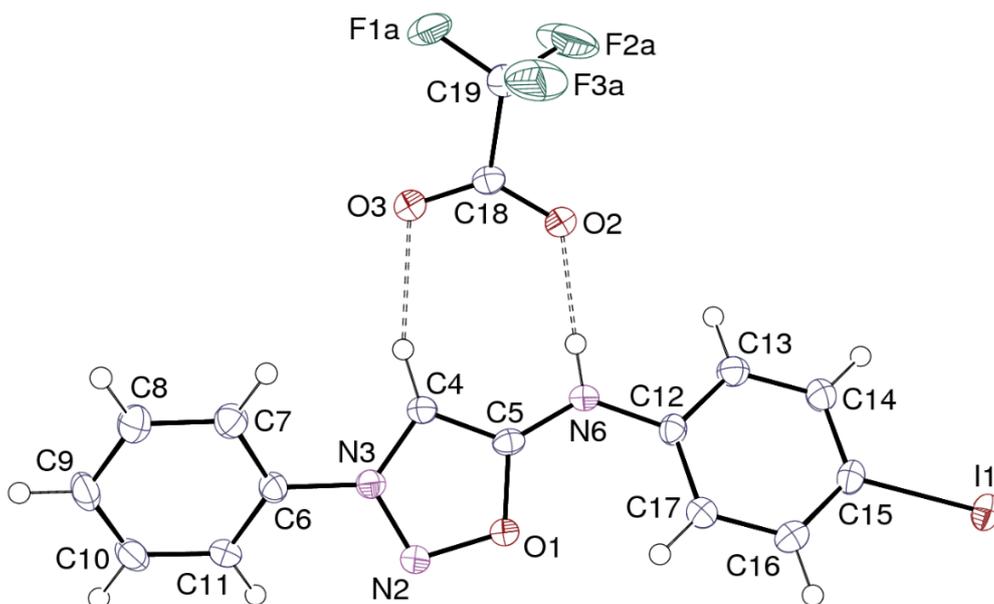
	III-2b	III-5a	III-5f	III-5r	III-5x	III-5p	III-5u
chemical formula	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> BrClN <sub>3</sub> O	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> F <sub>3</sub> IN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>
<i>M</i> (g mol <sup>-1</sup> )	366.64	351.29	477.18	479.34	358.34	423.35	347.26
cryst syst	orthorhombic	monoclinic	orthorhombic	monoclinic	triclinic	monoclinic	monoclinic
space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>Pbca</i>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>n</i>	<i>Cc</i>
<i>a</i> (Å)	5.6791(4)	11.5935(4)	12.8087(6)	14.0211(5)	4.8530(4)	11.4067(3)	20.4395(11)
<i>b</i> (Å)	10.0930(13)	18.2697(6)	13.4876(6)	15.9338(5)	11.7794(9)	27.2710(8)	6.6071(3)
<i>c</i> (Å)	26.168(2)	14.0148(5)	20.2035(9)	19.0589(6)	13.3074(11)	12.1464(4)	10.8889(5)
$\alpha$ (deg)	90	90	90	90	75.195(3)	90	90
$\beta$ (deg)	90	90.2373(16)	90	90.9769(15)	89.776(3)	101.1099(13)	103.423(2)
$\gamma$ (deg)	90	90	90	90	81.505(3)	90	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1499.9(2)	2968.45(18)	3490.3(3)	4257.3(2)	726.94(10)	3707.60(19)	1430.33(12)
<i>Z</i>	4	8	8	8	2	8	4
reflns collcd	20855	153901	25786	198559	18662	48970	27983
indep reflns	2799	5626	3313	8045	2736	7019	3669
obsd reflns [ <i>l</i> > 2 $\sigma$ ( <i>l</i> )]	2339	4638	2907	7433	2324	5805	3548
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.032	0.072	0.059	0.055	0.052	0.045	0.044
params refined	191	457	267	639	235	569	227
<i>R</i> <sub>1</sub>	0.038	0.042	0.024	0.051	0.036	0.038	0.029
<i>wR</i> <sub>2</sub>	0.078	0.109	0.061	0.130	0.089	0.085	0.075
<i>S</i>	1.066	1.048	1.026	1.106	1.059	1.028	1.063
$\Delta\rho_{\min}$ (e Å <sup>-3</sup> )	-0.56	-0.48	-0.40	-0.51	-0.32	-0.44	-0.26
$\Delta\rho_{\max}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0.29	0.58	0.63	0.71	0.22	0.42	0.23



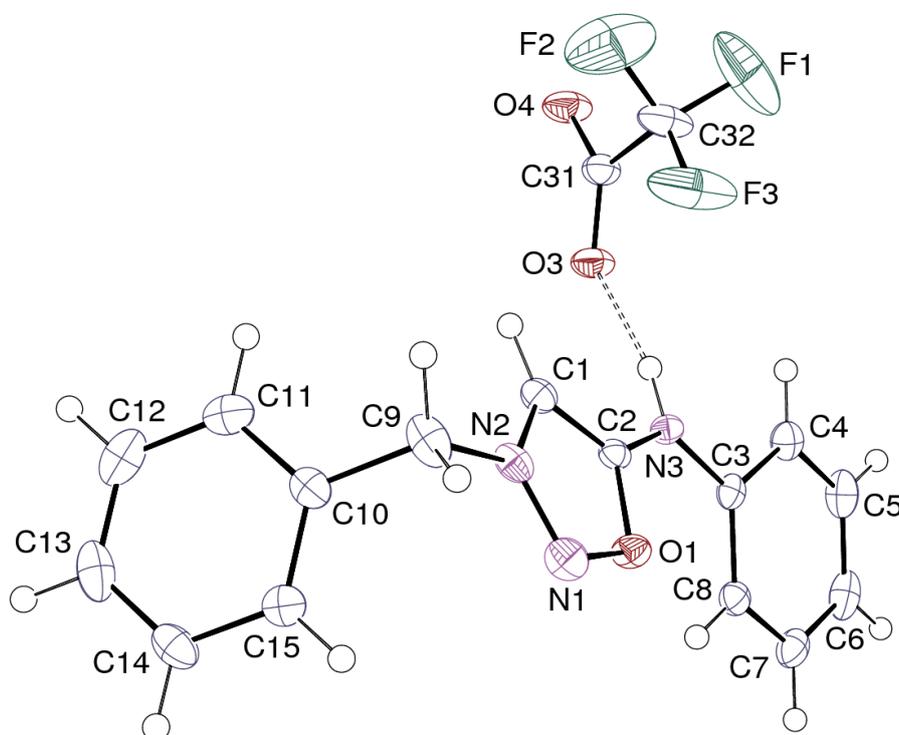
**Figure S4.** View of compound **III-2b** with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level and the hydrogen bond shown as a dashed line.



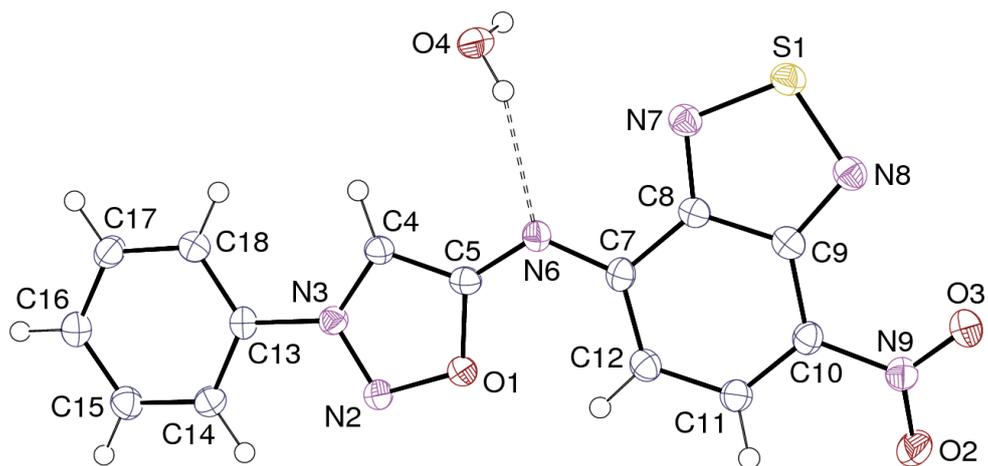
**Figure S5.** View of one of the two independent units in compound **III-5a** with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level and hydrogen bonds shown as dashed lines.



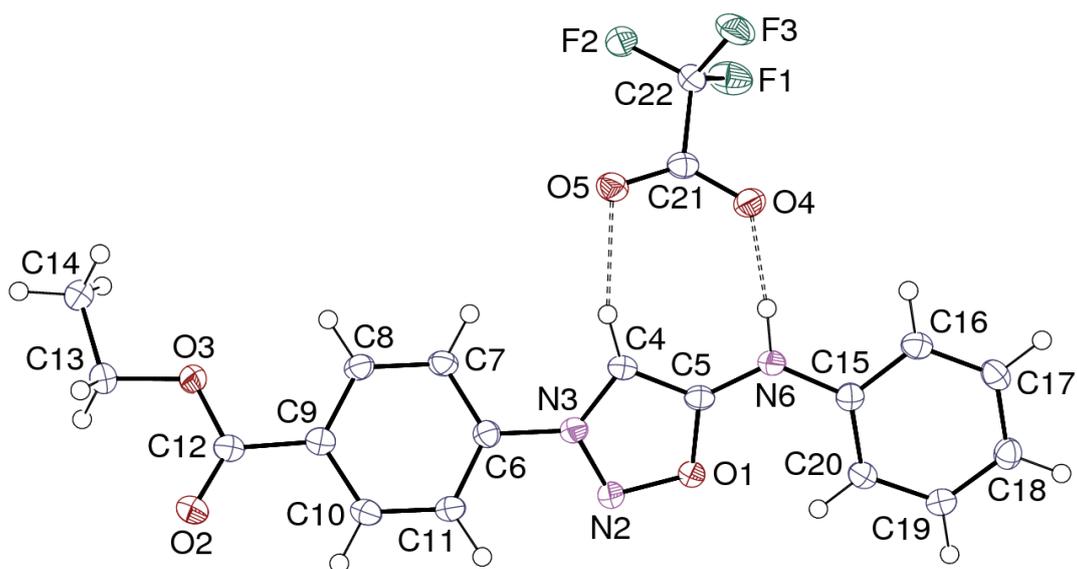
**Figure S6.** View of compound **III-5f** with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level and hydrogen bonds shown as dashed lines. Only one position of the disordered fluorine atoms is represented.



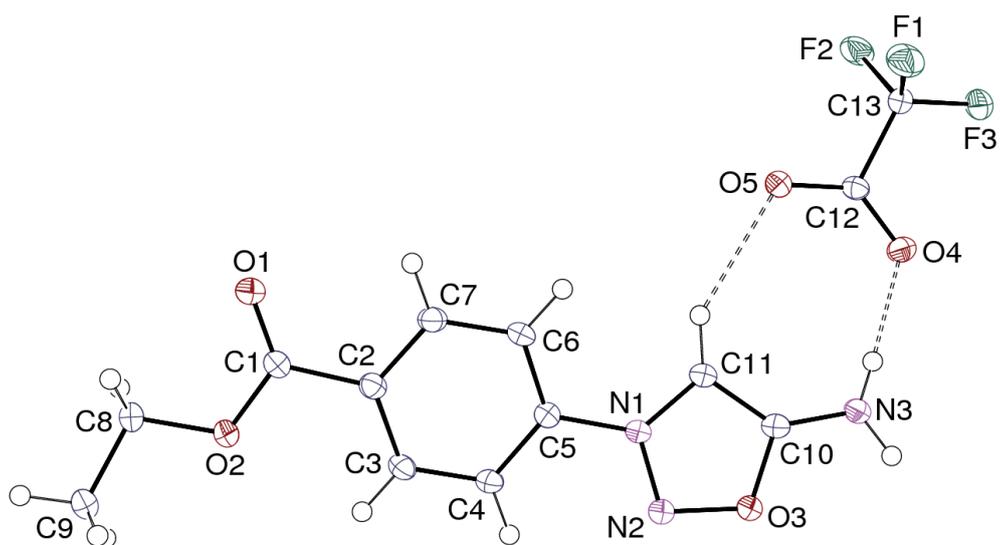
**Figure S7.** View of one of the two independent units in compound **III-5r** with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level and the hydrogen bond shown as a dashed line.



**Figure S8.** View of compound **III-5x** with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level and the hydrogen bond shown as a dashed line. Only one position of the disordered proton is represented.



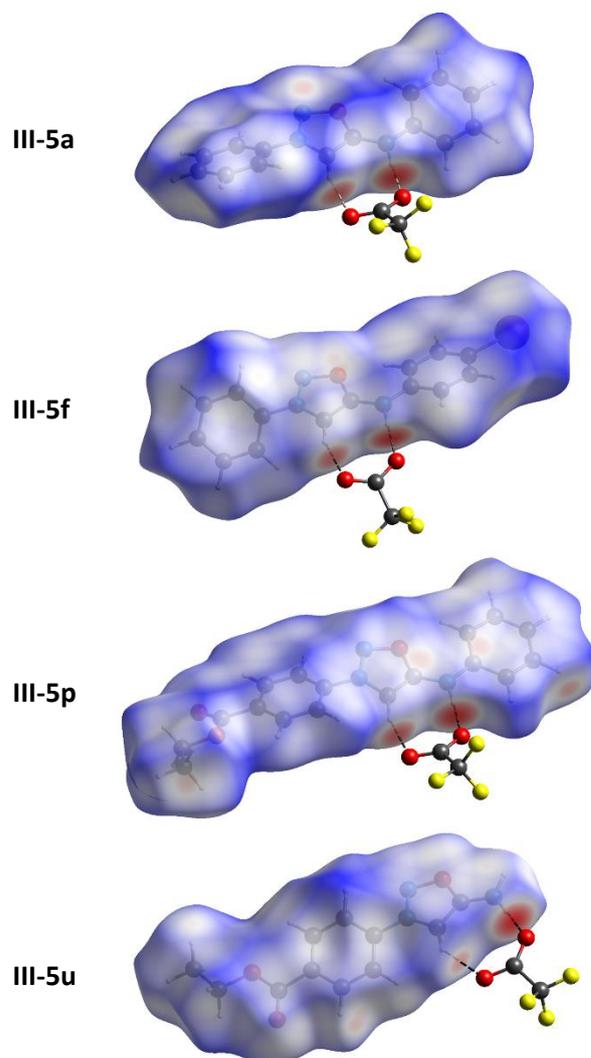
**Figure S9.** View of one of the two independent units in compound **III-5p** with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level and hydrogen bonds shown as dashed lines.



**Figure S10.** View of compound III-5u with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level and hydrogen bonds shown as dashed lines.

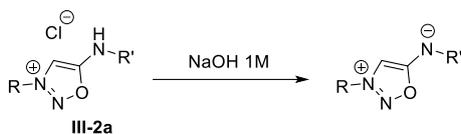
IV.3.ii Calculation of Hirshfeld surfaces.

Hirshfeld surfaces (HSs)<sup>13</sup> have been calculated with CrystalExplorer<sup>14</sup> (Ver. 17.5) for the cations in compounds **III-5a**, **III-5f**, **III-5p** and **III-5u** and they are shown in **Figure S11**. In all these cases, not only the NH...O, but also the CH...O hydrogen bonds<sup>15,16</sup> appear prominently on the HS as a red spot indicative of interaction beyond simple dispersion.



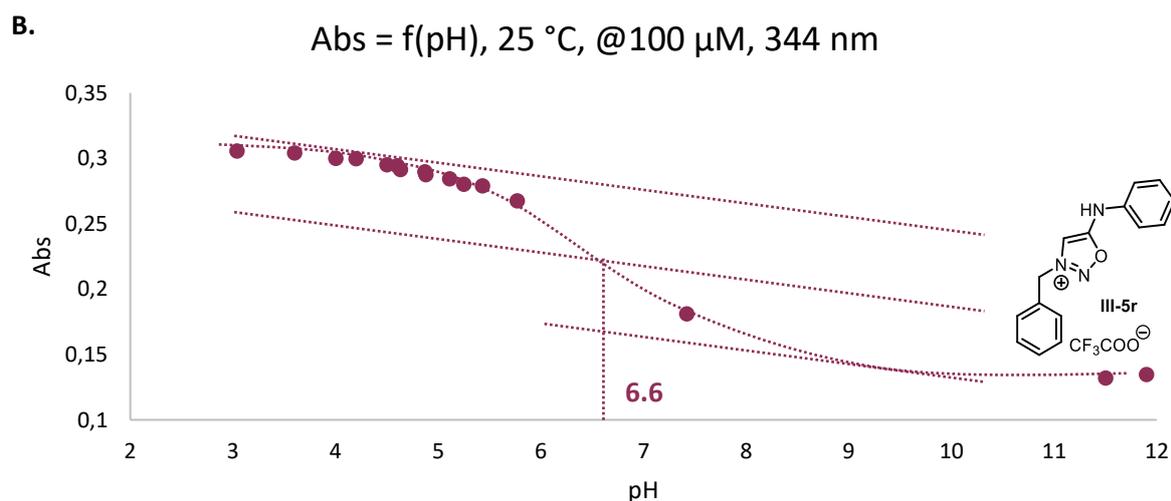
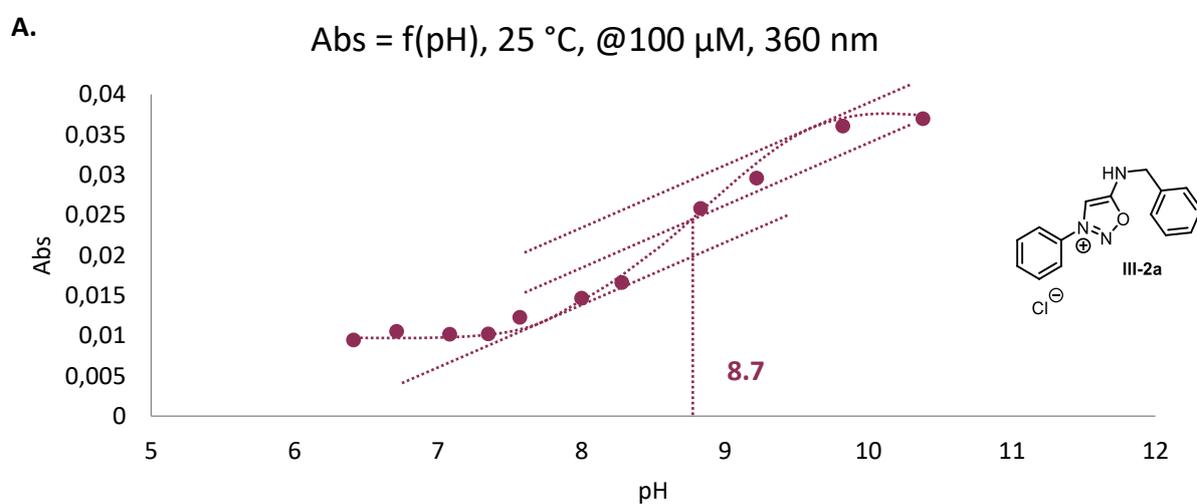
**Figure S11.** Hirshfeld surfaces of the cations in compounds **III-5a**, **III-5f**, **III-5p** and **III-5u** mapped with dnorm. N--O and CH--O hydrogen bonds with the anions are shown as dashed lines.

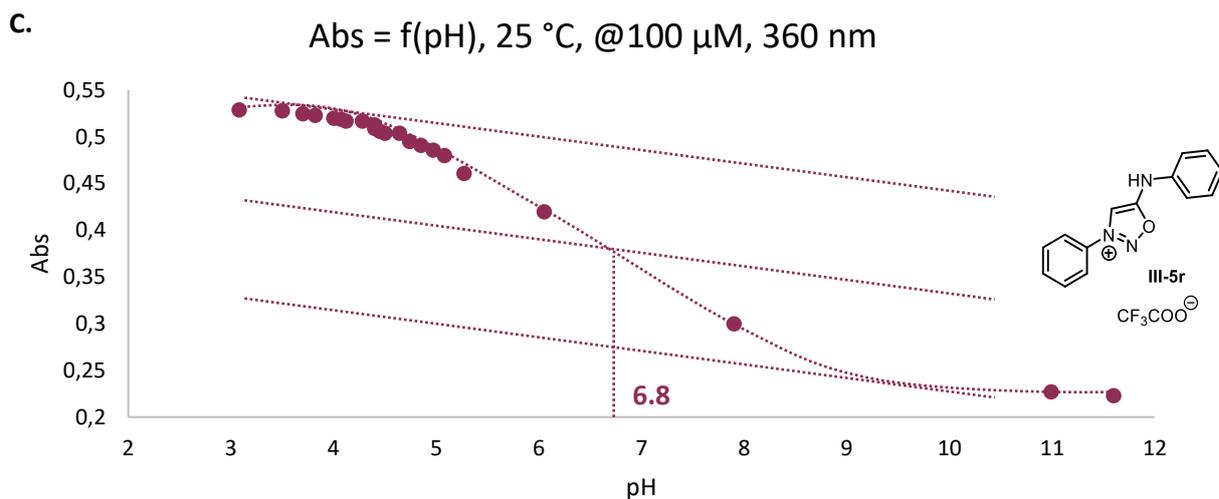
### IV.3.iii pKa determination



To a 100  $\mu\text{M}$  solution of the iminosydnone in AcOH (0.1 M) was progressively added NaOH (1 M). The pH of the solution was measured after each addition and the absorbance spectrum was recorded for each point (from pH 3.5 to pH 10).

The pKa of each iminosydnone was determined by plotting the absorbance characteristic of the protonated compound versus pH.

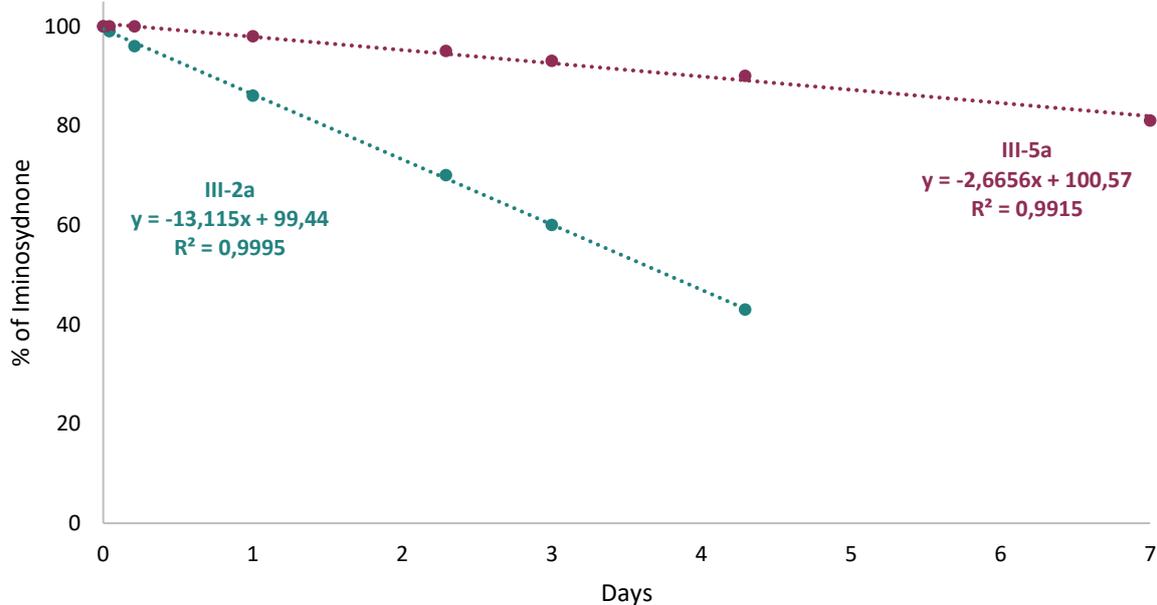




**Figure S12.** A. Absorbance in function of the pH of III-2a at 360 nm. B. Absorbance in function of the pH of III-5r at 344 nm. C. Absorbance in function of the pH of III-5a at 360 nm.

#### IV.3.iv Stability experiments

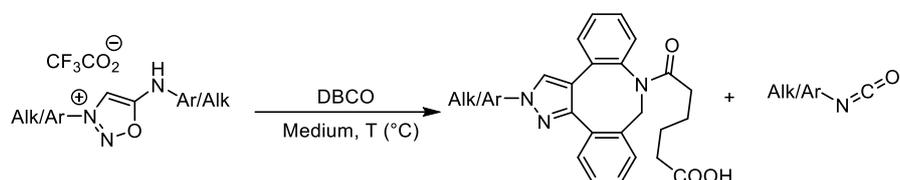
In a HPLC vial, 10 μL of a 10 mM iminosydnone solution in DMSO were added to 989 μL of human plasma. 1 μL of 3-fluoro-4-nitrophenol (100 mM in DMSO) was then added as an internal standard. The solution was stored at room temperature. Quantification of iminosydnone was carried out by HPLC analysis at different times and the percentage of the remaining iminosydnone was determined. To sample the iminosydnone before HPLC injection, 25 μL of the plasmatic solution were added in 160 μL of EtOH and the resulting mixture was cooled down at 0 °C for 5 min. The resulting suspension was then centrifuged for 2 min and the supernatant collected and analyzed by HPLC.



**Figure S13.** Stability experiment

#### IV.4 Kinetics

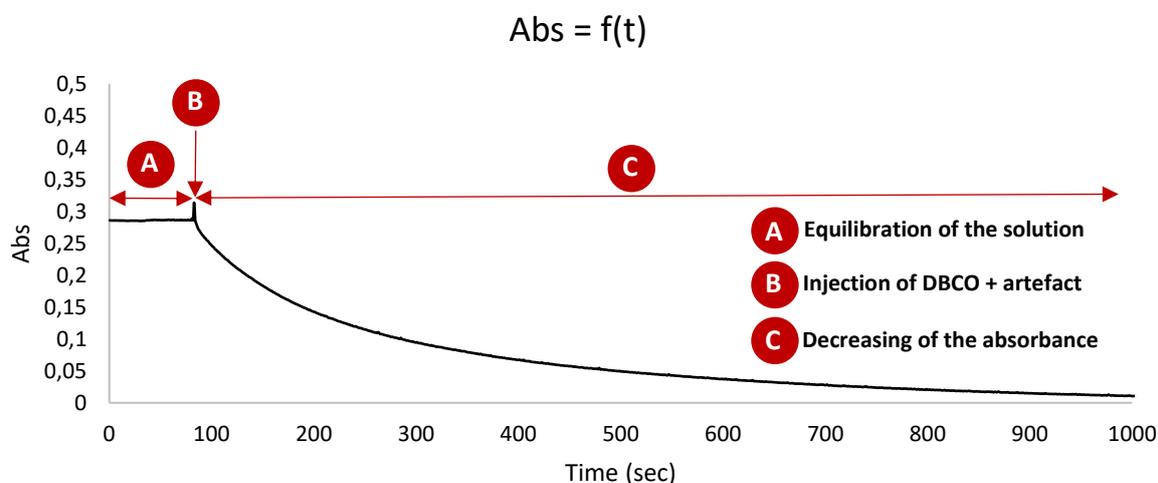
Reactions were followed by measuring the decrease of the maximum absorbance signal of iminosydnone at different wavelengths depending on the media.



**Scheme S2.** SPICC reaction

30  $\mu$ L of 6-N-aryl iminosydnone at 10 mM in DMSO (UV-spectroscopy grade) was diluted in 2960  $\mu$ L of desired media. The absorbance spectrum of the solution was first measured during 100 sec until equilibration of the solution and then 10  $\mu$ L of DBCO-Acid (30 mM in UV-spectroscopy grade DMSO, 1.0 equiv.) were added. The kinetic of the reaction was followed by absorbance of the solution at the wavelength where the disappearance of the starting material can be observed. Each experiment was done in duplicate.

Correspondences between absorbance and concentration were established by plotting the calibration curve obtained by measuring the absorbance at the appropriate wavelength for different concentrations.



**Figure S14.** Example of spectrum recorded.

All the kinetics were calculated after the decrease of the artefact due to the DBCO injection (B in **Figure S14**). The monitoring of the solution was performed after stabilization of the temperature ( $\pm 0.1$  °C). The injection was performed after 100 seconds of monitoring in order to wait for the equilibration of the solution (A in **Figure S14**). The corresponding kinetic constant was determined by plotting  $(1/C) - (1/C_0) = f(t)$  between 0% to 30% of conversion. All the experiments were done in duplicate.

#### IV.4.i Influence of the pH

**Table S7.** Result of the calibration curves for compound **III-2a**.

	pH = 5.0	pH = 6.0	pH = 7.4	pH = 8.0	pH = 8.8	pH = 9.5
Wavelength	326 nm	326 nm	326 nm	326 nm	350 nm	350 nm
Calibration curve	A = 6953.6C	A = 7753.6C	A = 6212.1C	A = 4899.1C	A = 2792.3C	A = 2962.2C

**Table S8.** Result of the calibration curves for compound **III-5a**.

	pH = 5.0	pH = 6.0	pH = 7.4	pH = 8.0	pH = 8.8	pH = 9.5
Wavelength	345 nm	356 nm	380 nm	392 nm	392 nm	392 nm
Calibration curve	A = 4778.9C	A = 4400.1C	A = 4139.7C	A = 4107.3C	A = 4087.3C	A = 4007.2C

**Table S9.** Result of the calibration curves for compound **III-5r**.

	pH = 5.0	pH = 6.0	pH = 7.4	pH = 8.0	pH = 8.8	pH = 9.5
Wavelength	332 nm	332 nm	353 nm	364 nm	364 nm	364 nm
Calibration curve	A = 7287.8C	A = 7196.1C	A = 5208.9C	A = 5369.1C	A = 5218.1C	A = 5462.9C

#### IV.4.ii Influence of the media

**Table S10.** Result of the calibration curves for compound **III-2a**, **III-5a**, **III-5r**.

	Human Plasma		Cell Lysate	
	Wavelength	Calibration curve	Wave-length	Calibration curve
<b>III-2a</b>	390 nm	A = 1689.2C	380 nm	A = 4319.1C
<b>III-5a</b>	413 nm	A = 4214.1C	405 nm	A = 4214.1C
<b>III-5r</b>	380 nm	A = 3188.5C	370 nm	A = 3246.5C

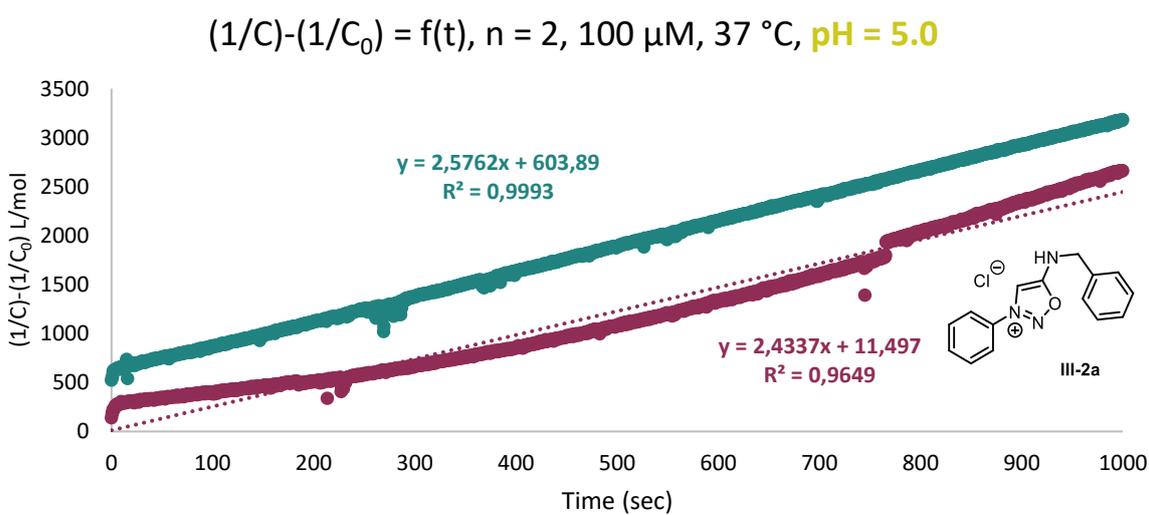
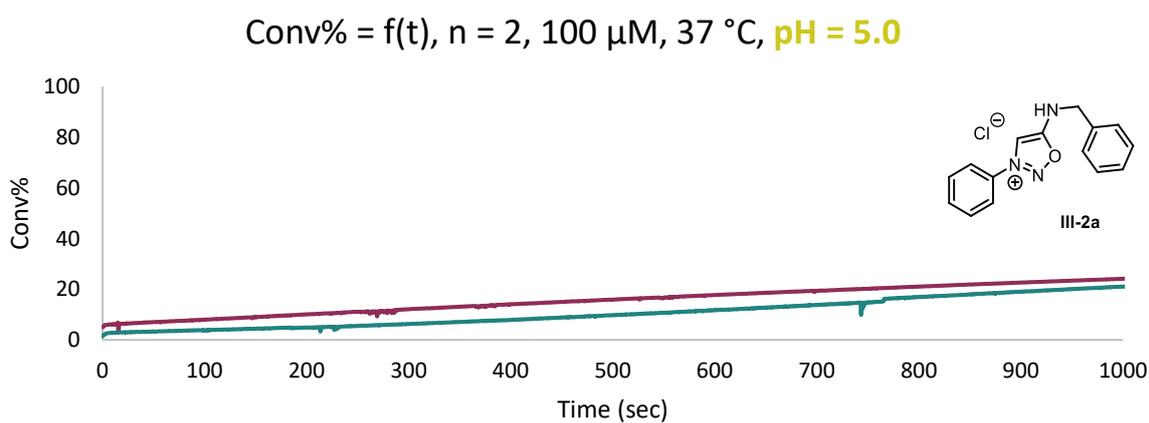
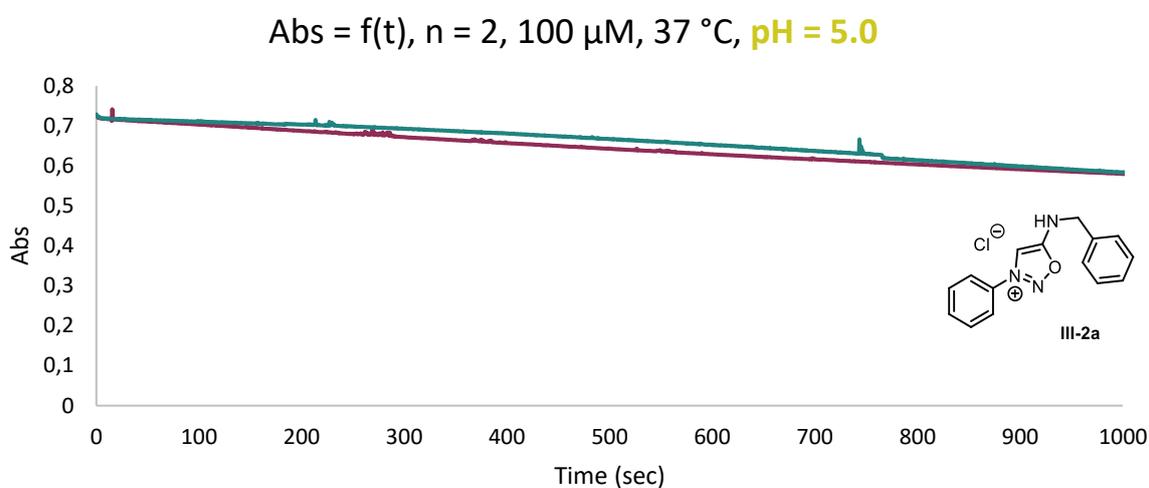
#### IV.4.iii Influence of the iminosydnone structure

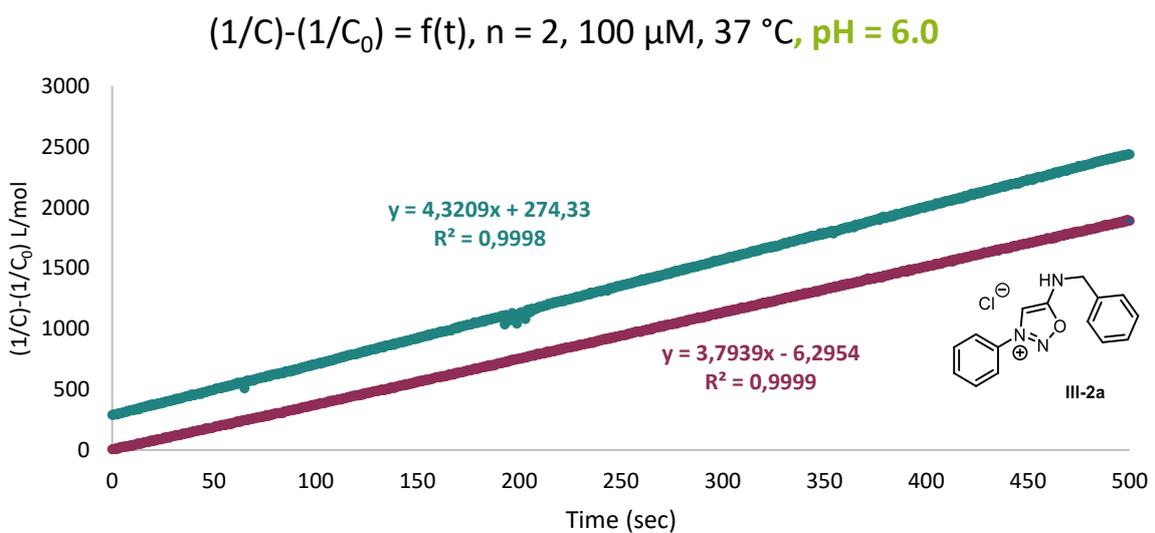
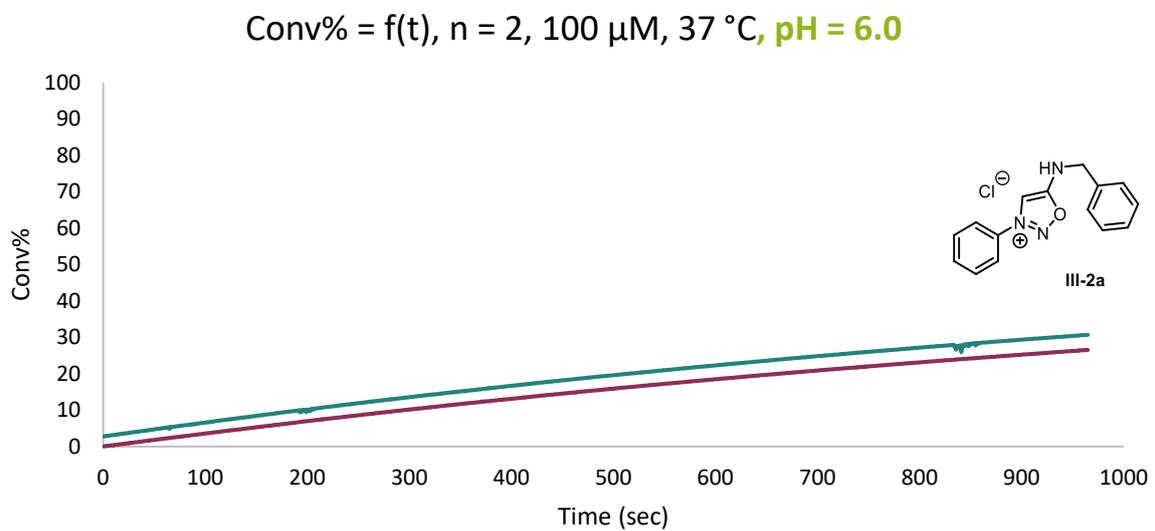
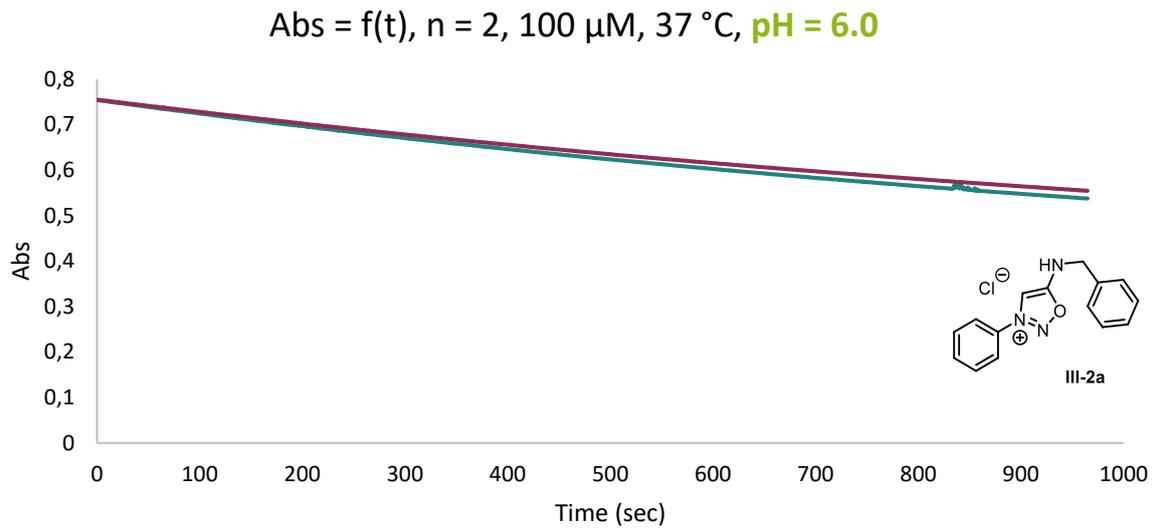
**Table S11.** Results of the calibration curves for compounds **III-5p**, **III-5i**, **III-5p** in PBS

	<b>III-5p</b>	<b>III-5i</b>	<b>III-5p</b>
Wave-length	385 nm	391 nm	416 nm
Calibration curve	A = 4727.5	A = 4384.2C	A = 3328.9C

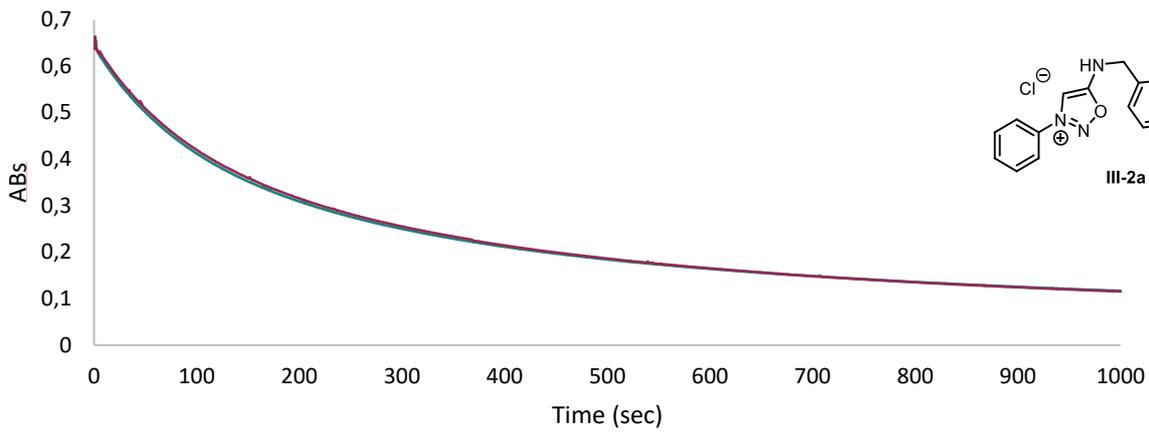
#### IV.4.iv Graphs

- Influence of the pH – III-2a

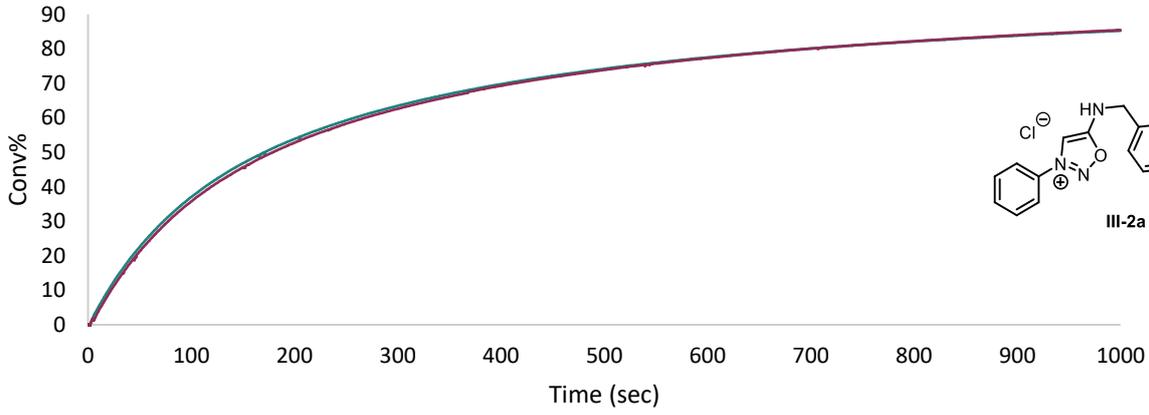




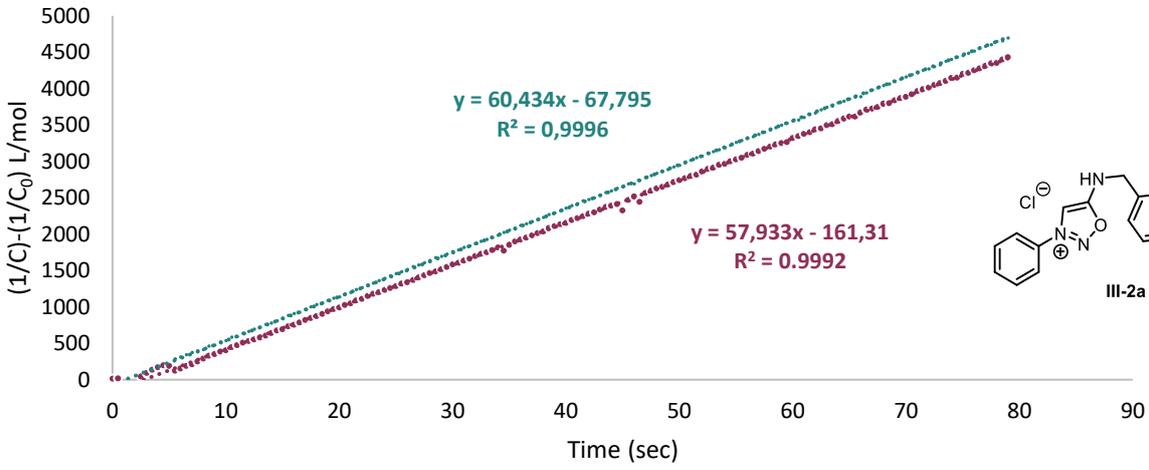
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4



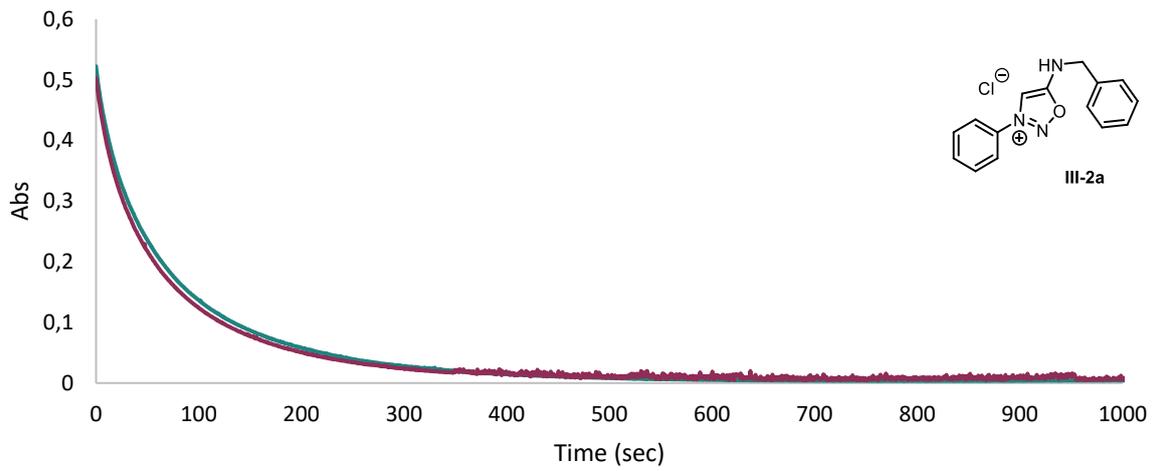
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4



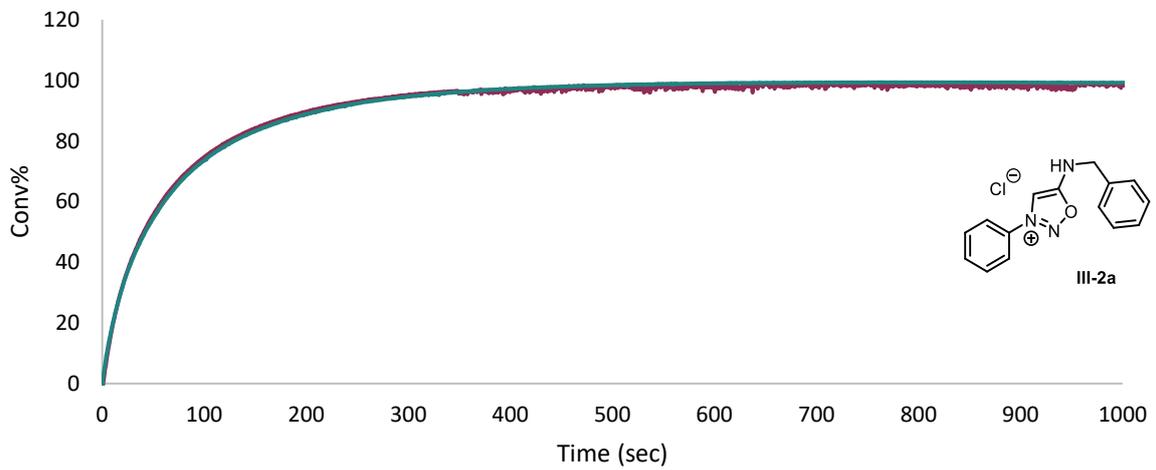
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4



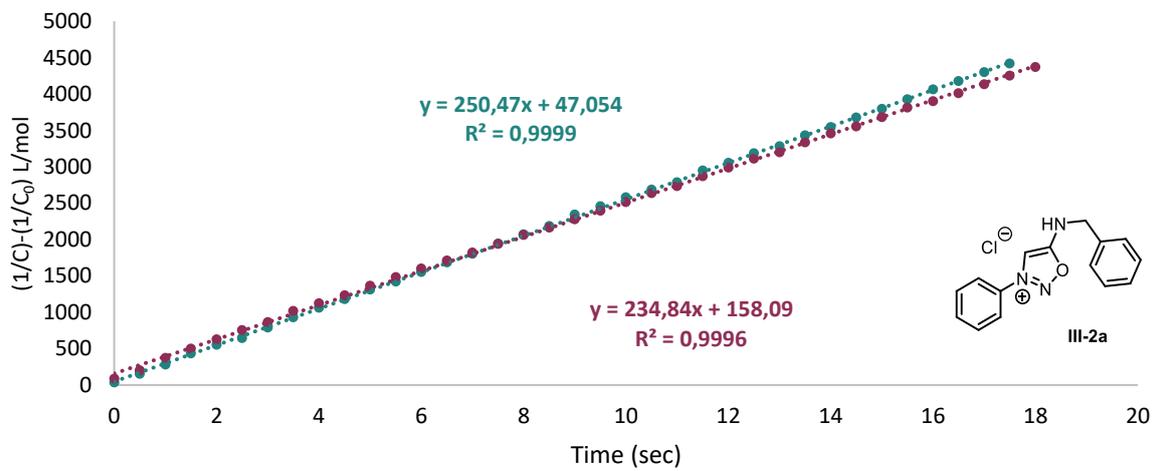
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.0



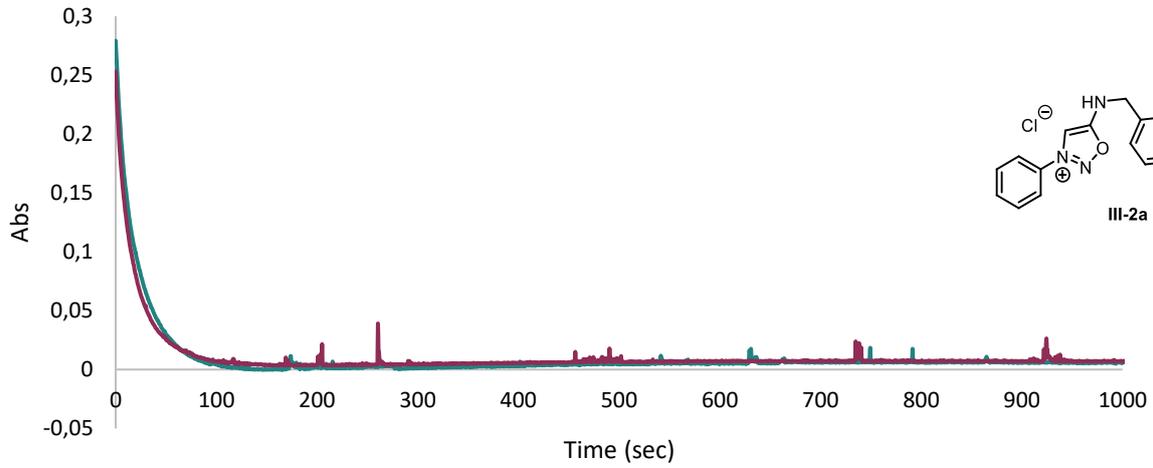
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.0



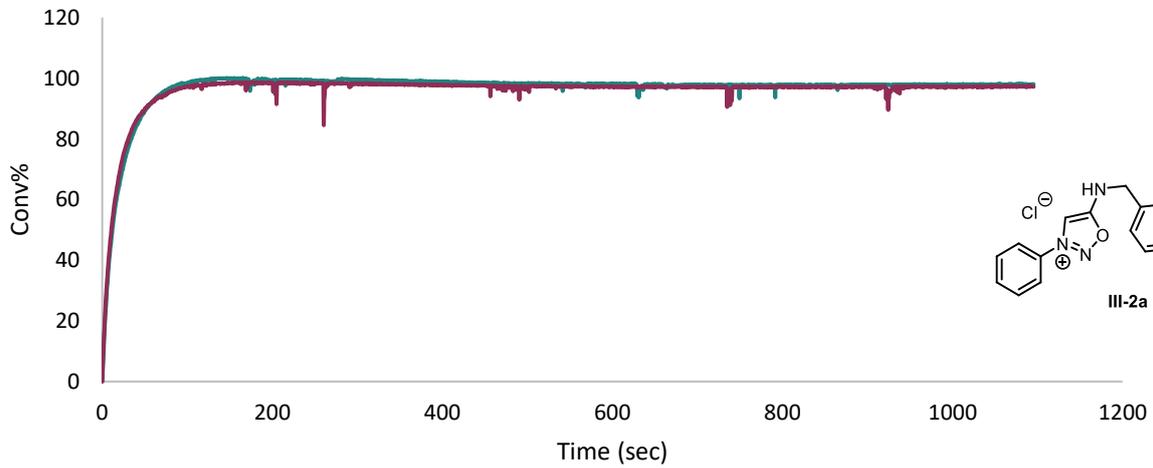
$(1/C) - (1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.0



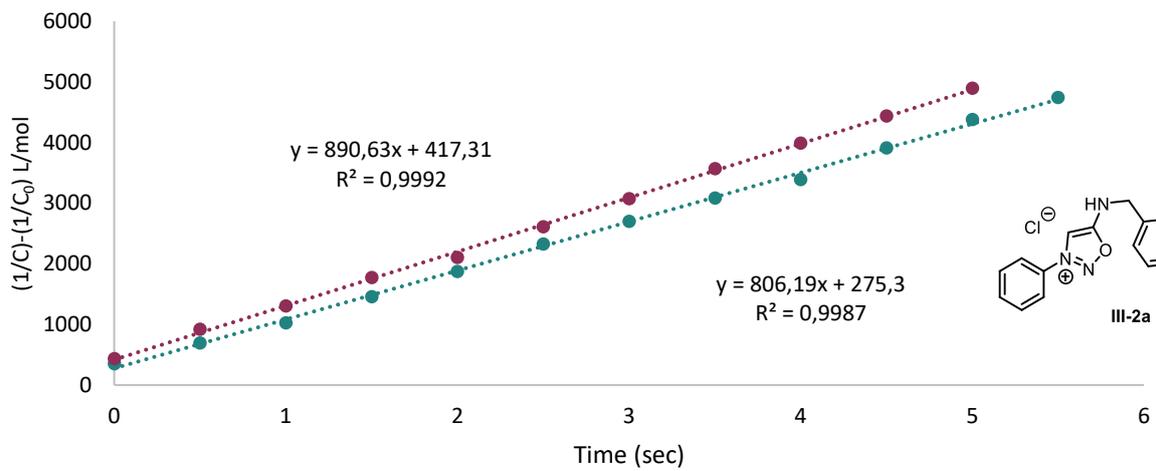
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.8



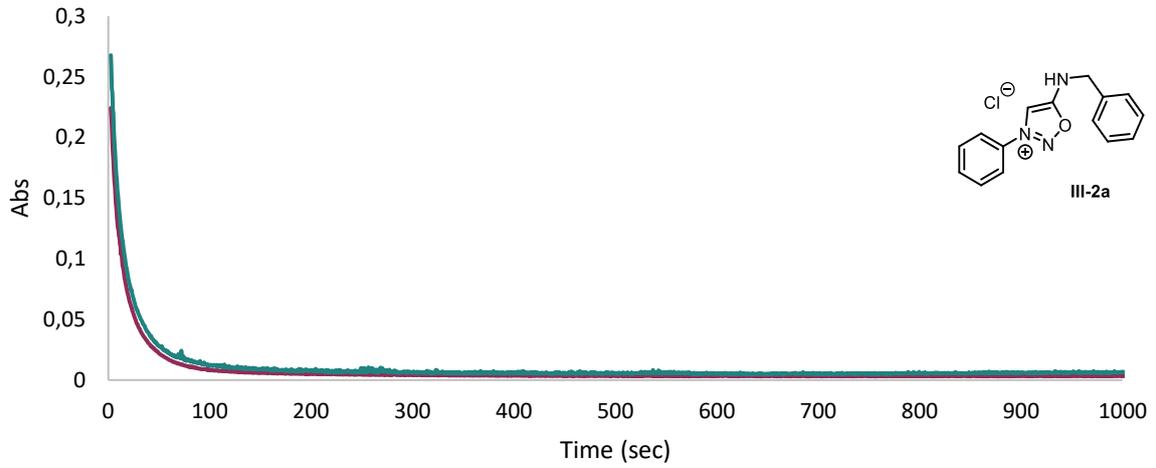
Conv% = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.8



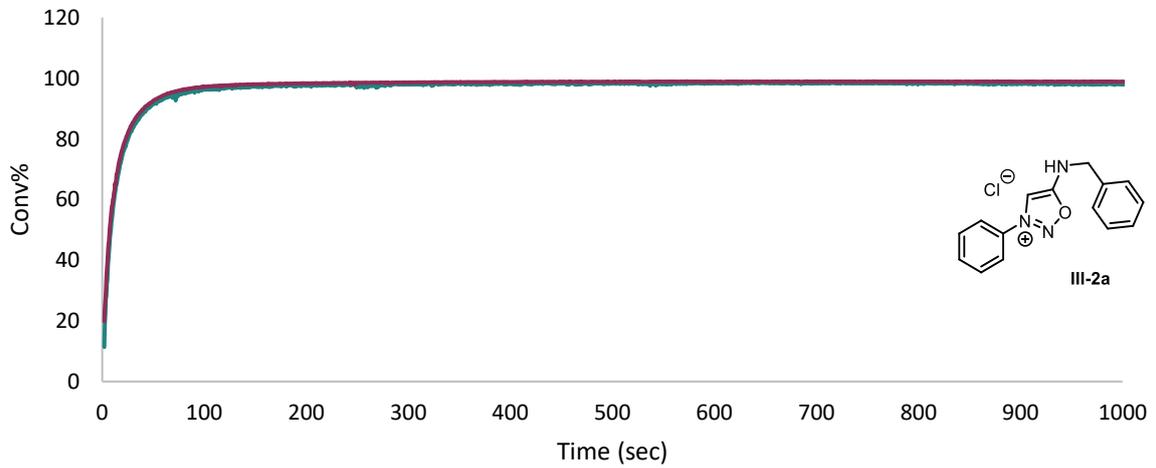
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.8



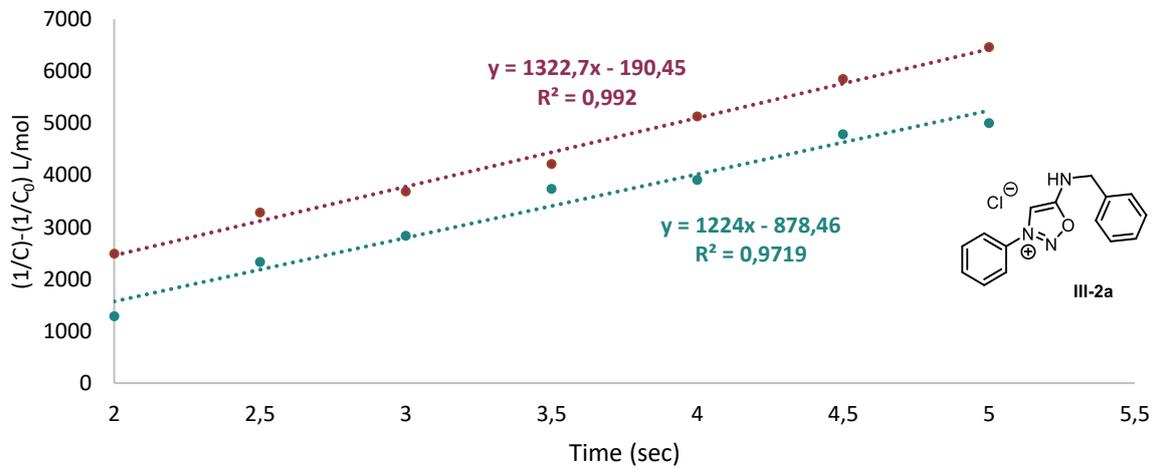
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 9.5



Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 9.5

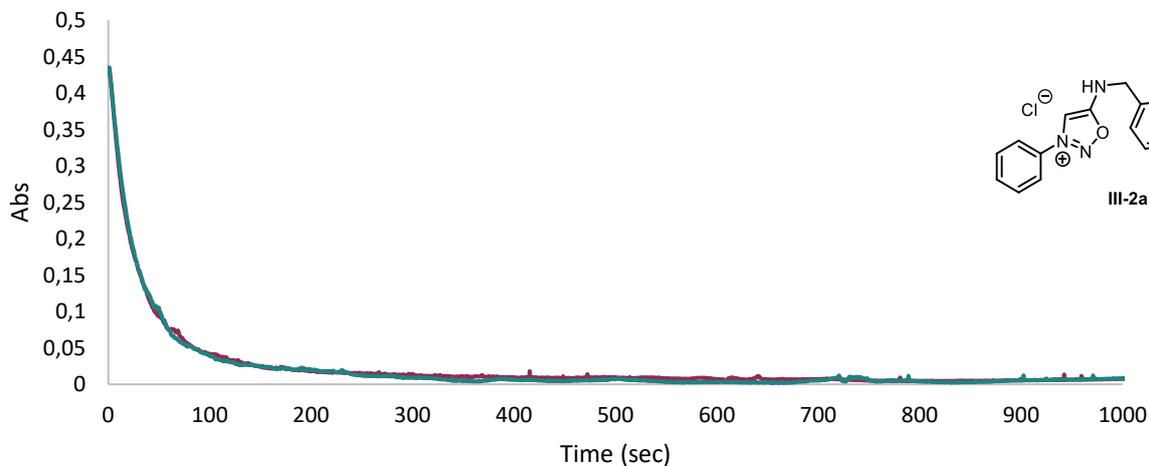


$(1/C) - (1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 9.5

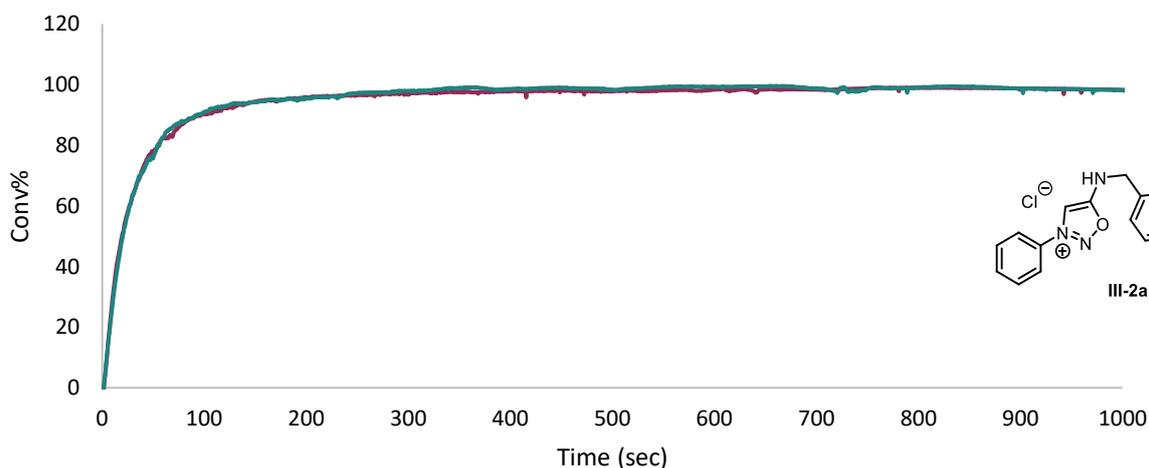


- Influence of the media – III-2a

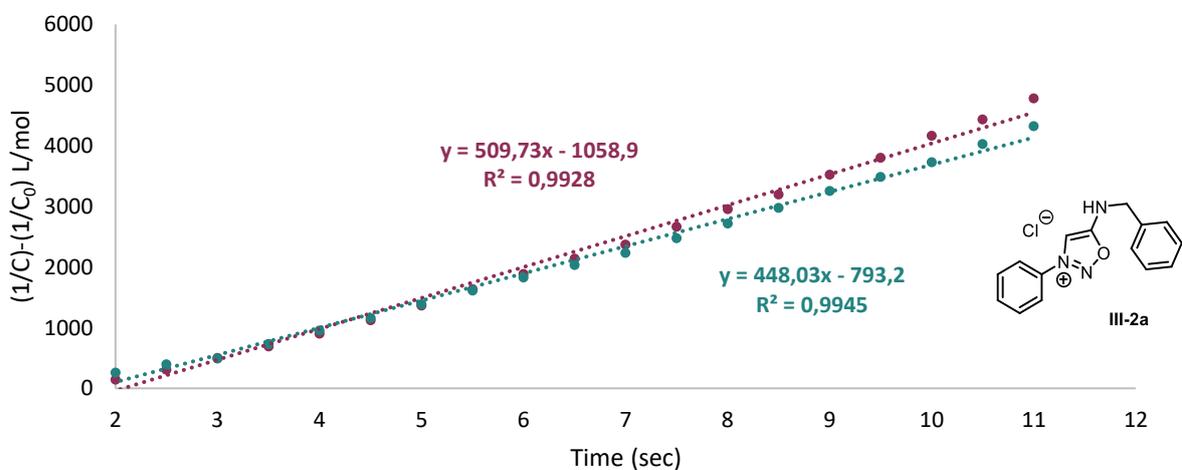
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °, Cell lysate



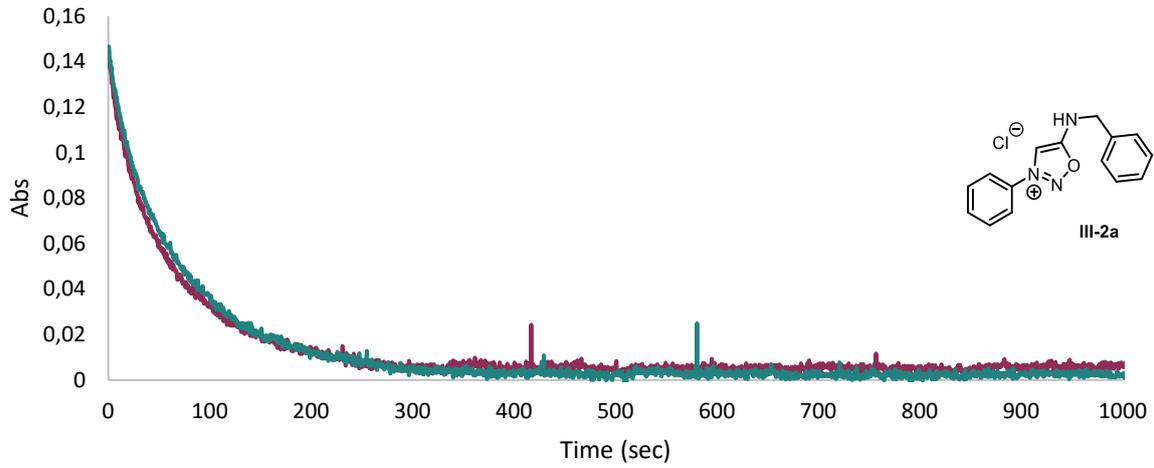
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, Cell lysate



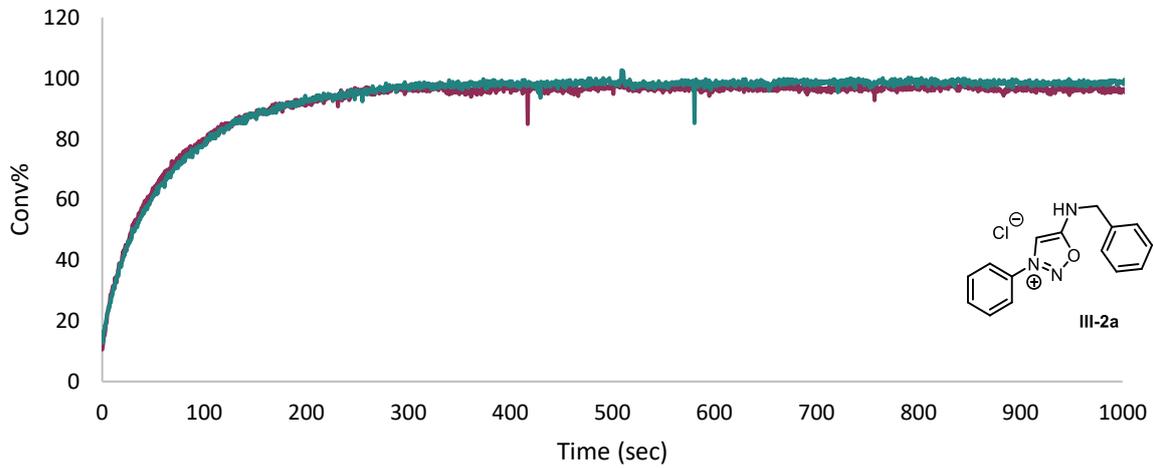
$(1/C) - (1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, Cell lysate



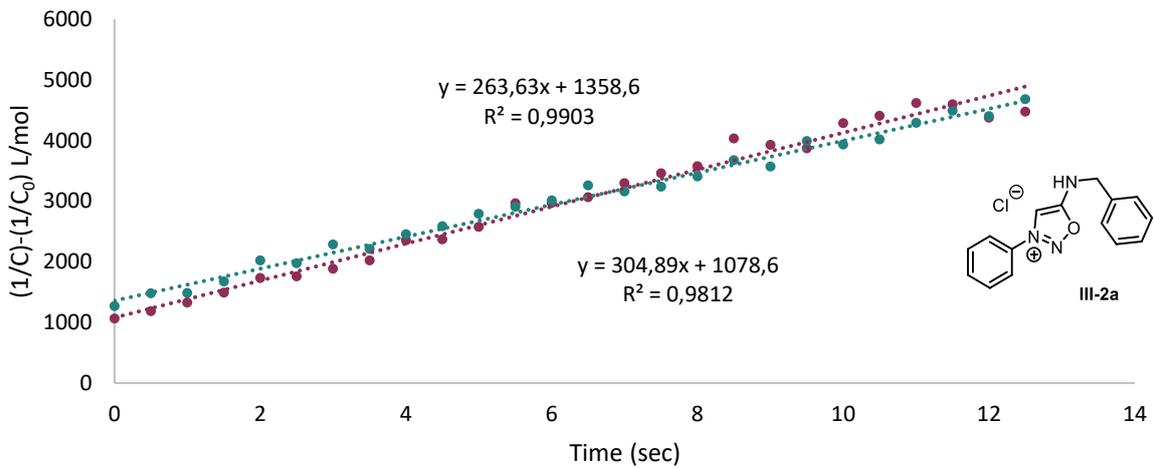
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma



Conv% = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma

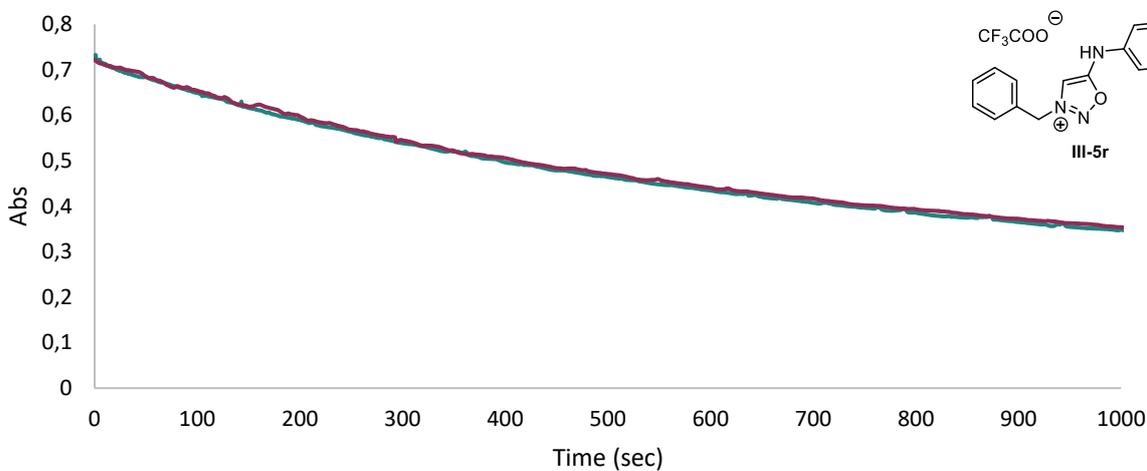


$(1/C) - (1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma

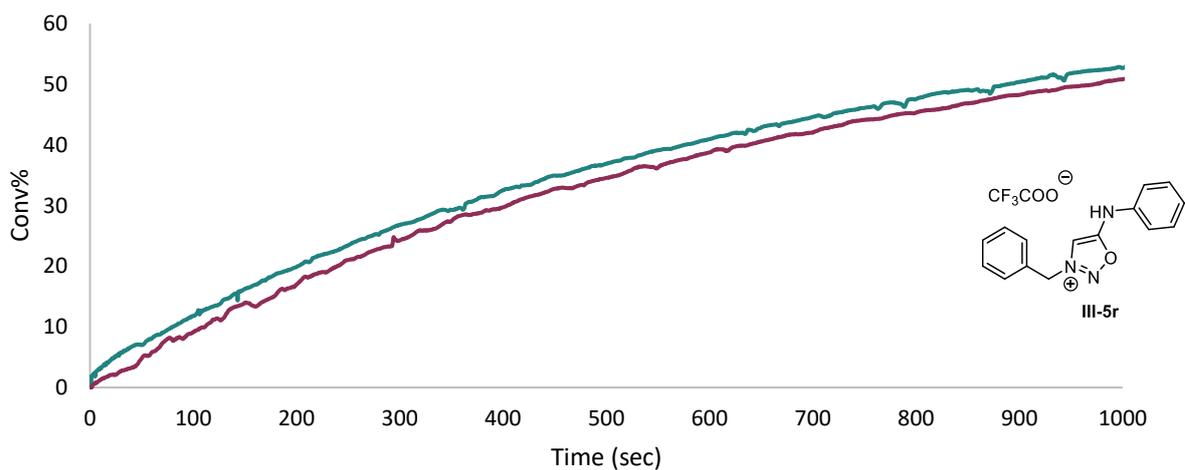


- Influence of the media – III-5r

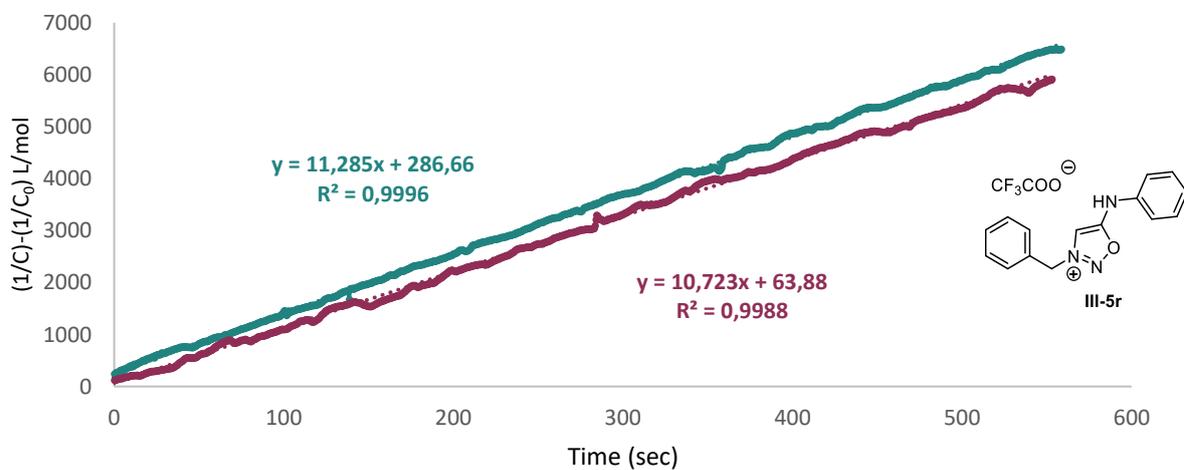
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 6.0



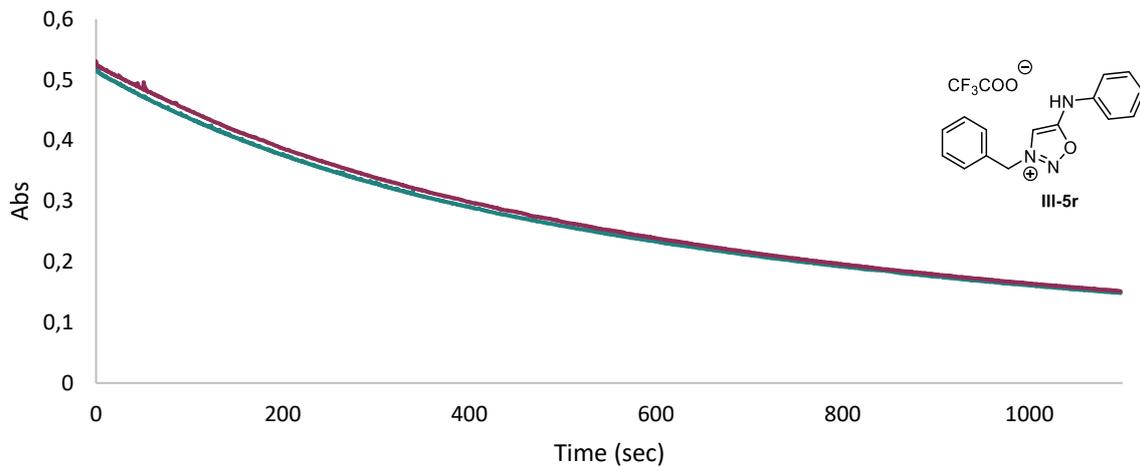
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 6.0



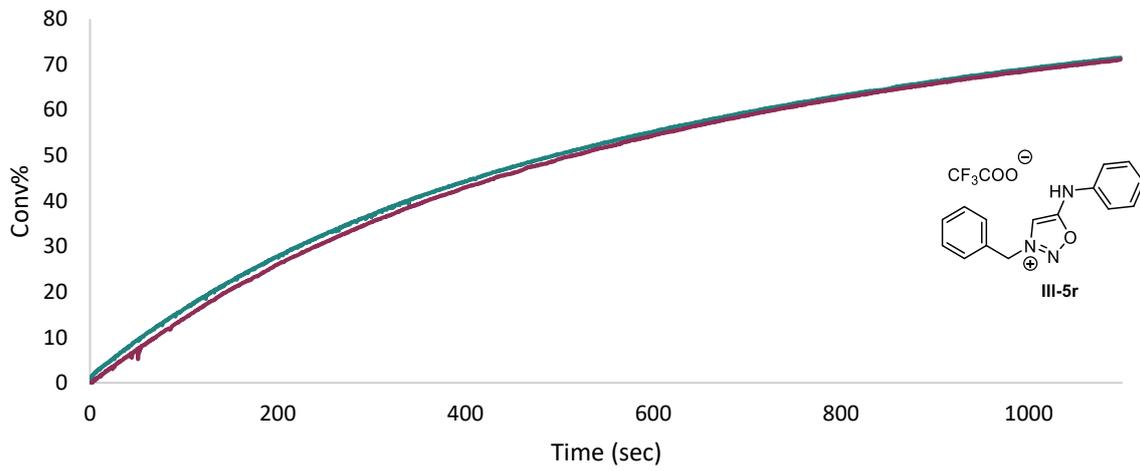
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM 37 °C, pH = 6.0



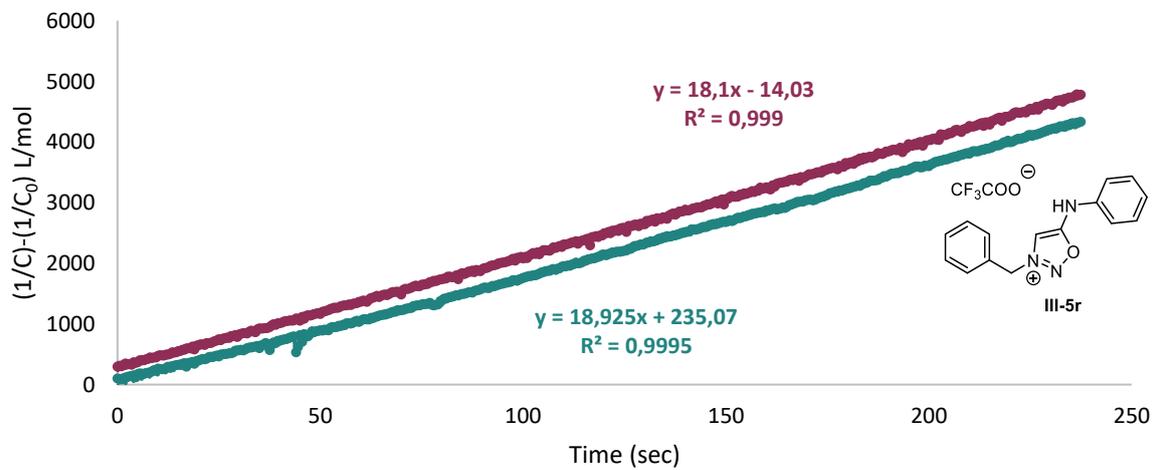
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4



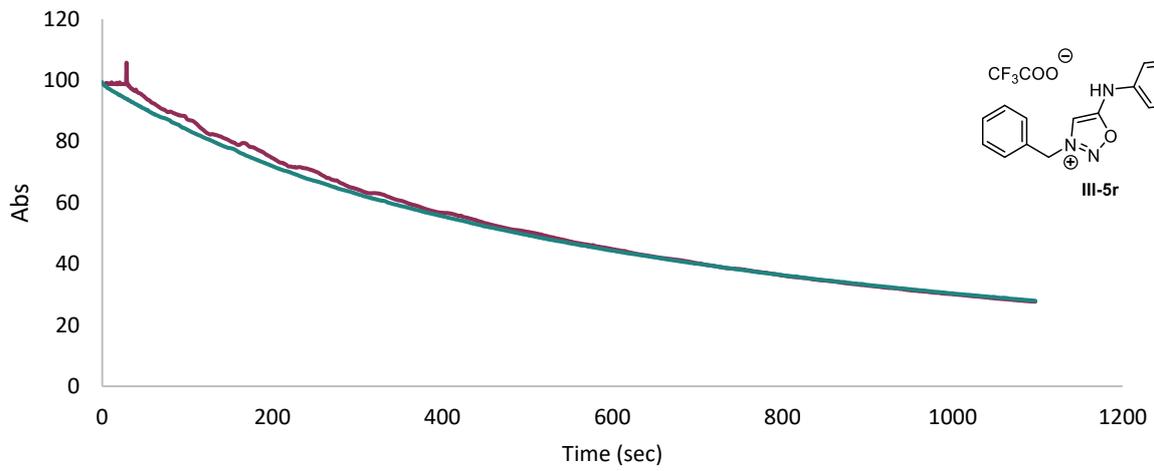
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4



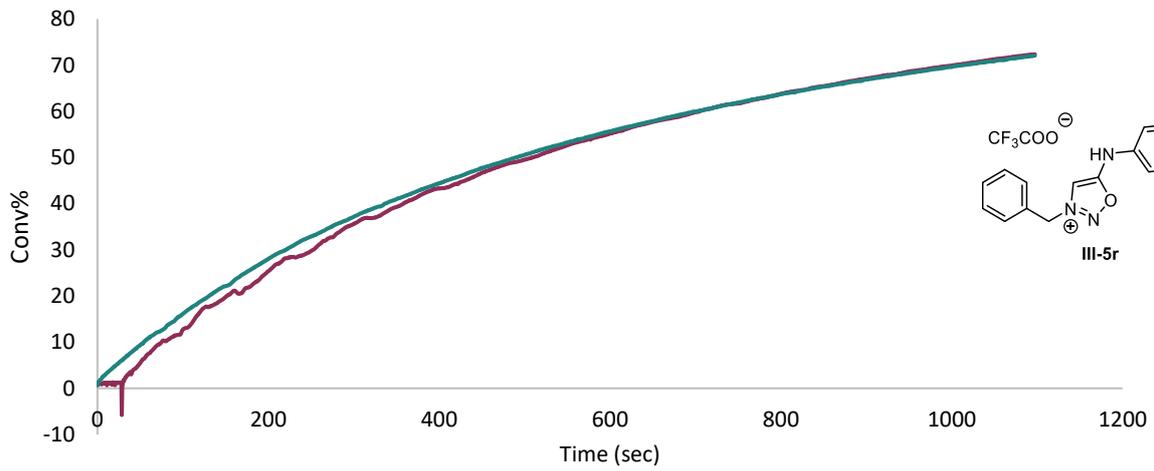
(1/C)-(1/C<sub>0</sub>) = f(t), n = 2, 100 μM 37 °C, pH = 7.4



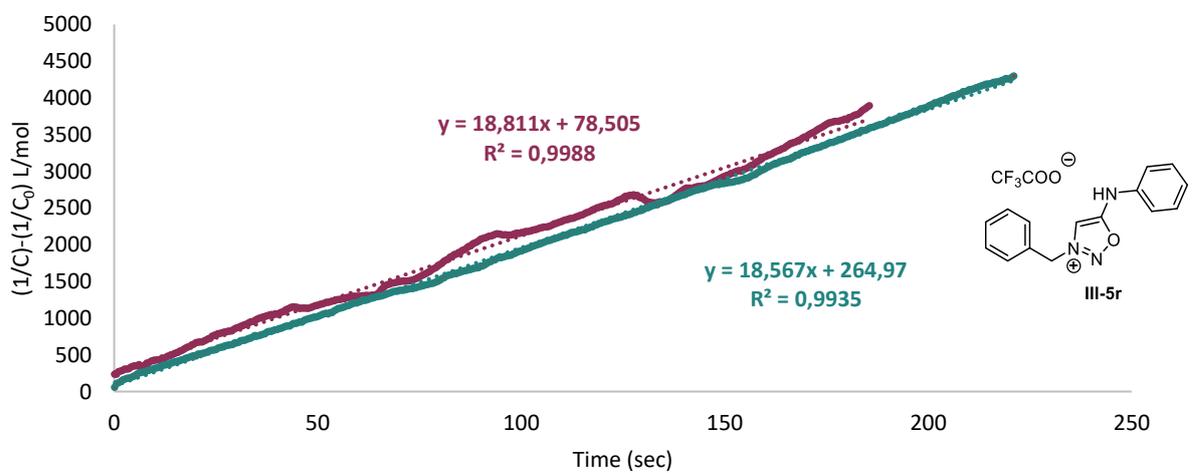
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.0



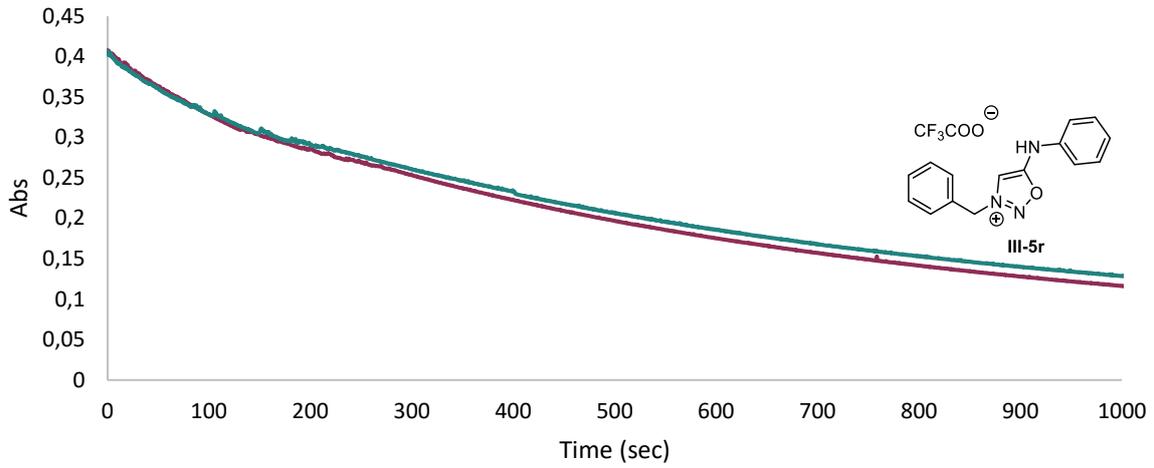
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.0



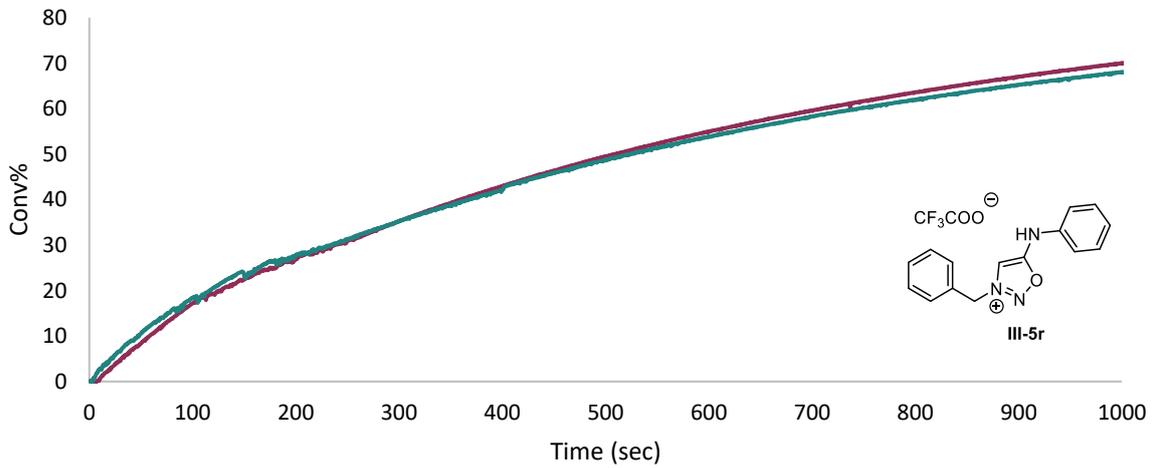
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM 37 °C, pH = 8.0



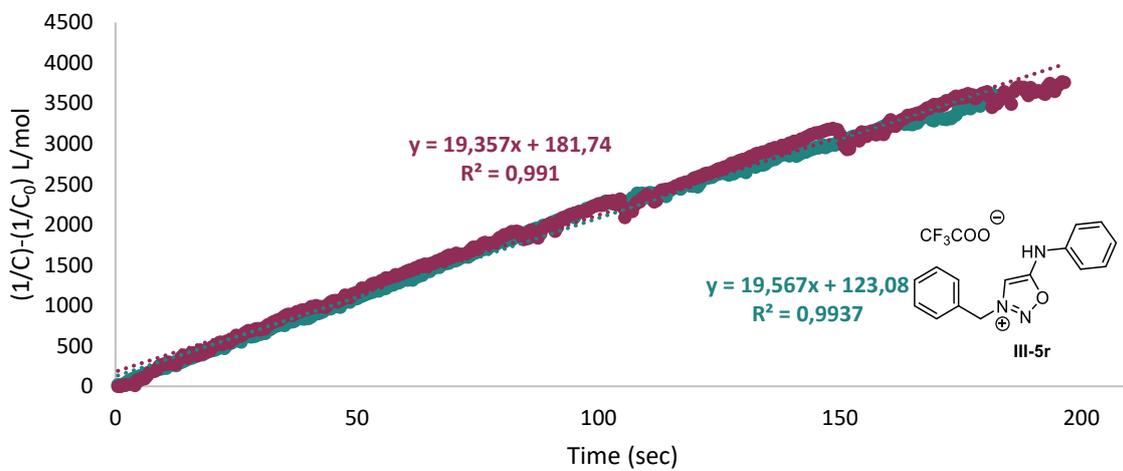
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.8

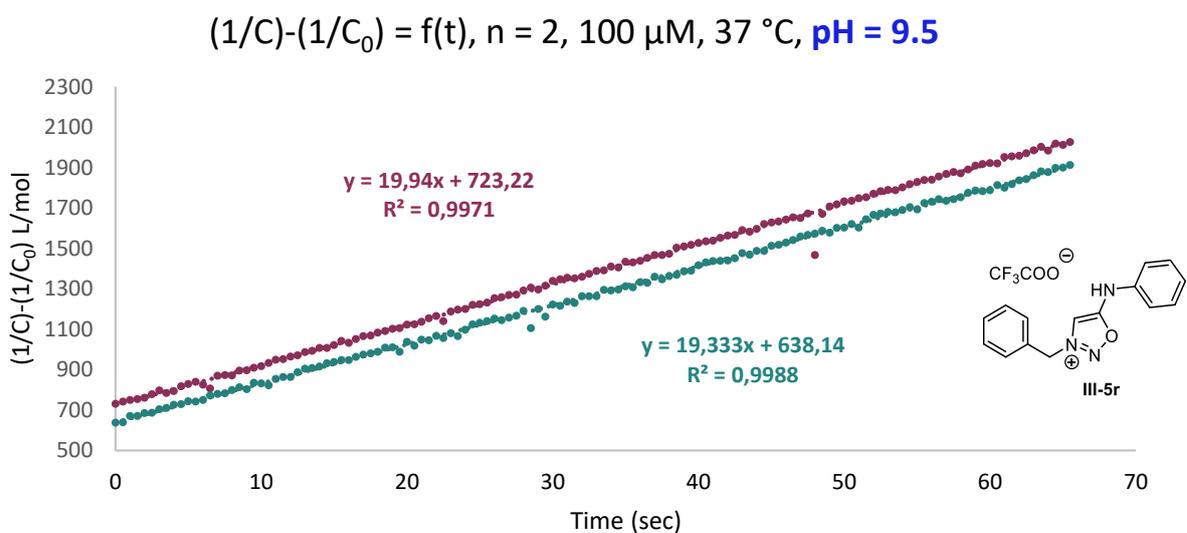
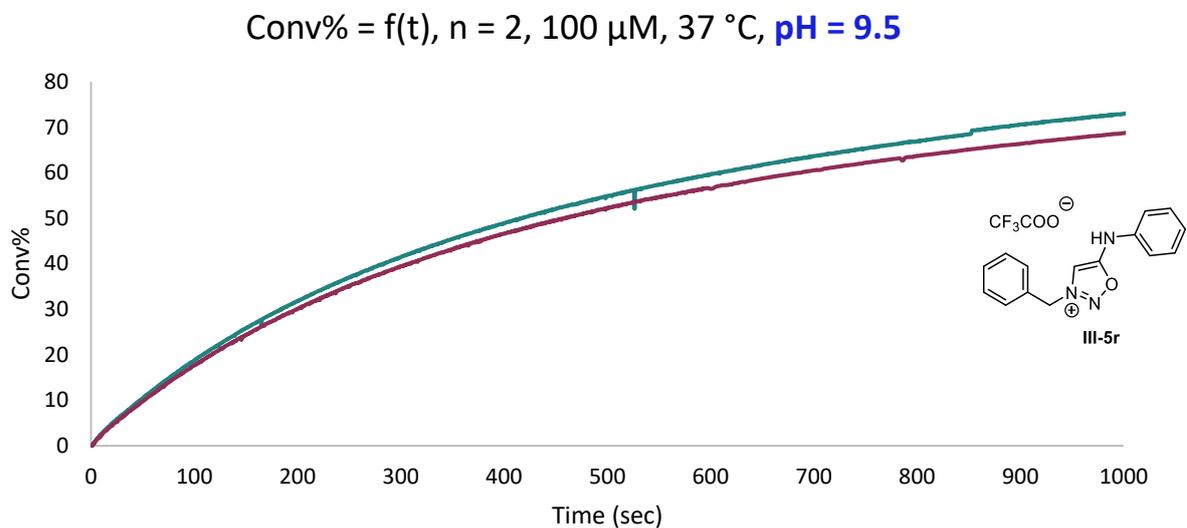
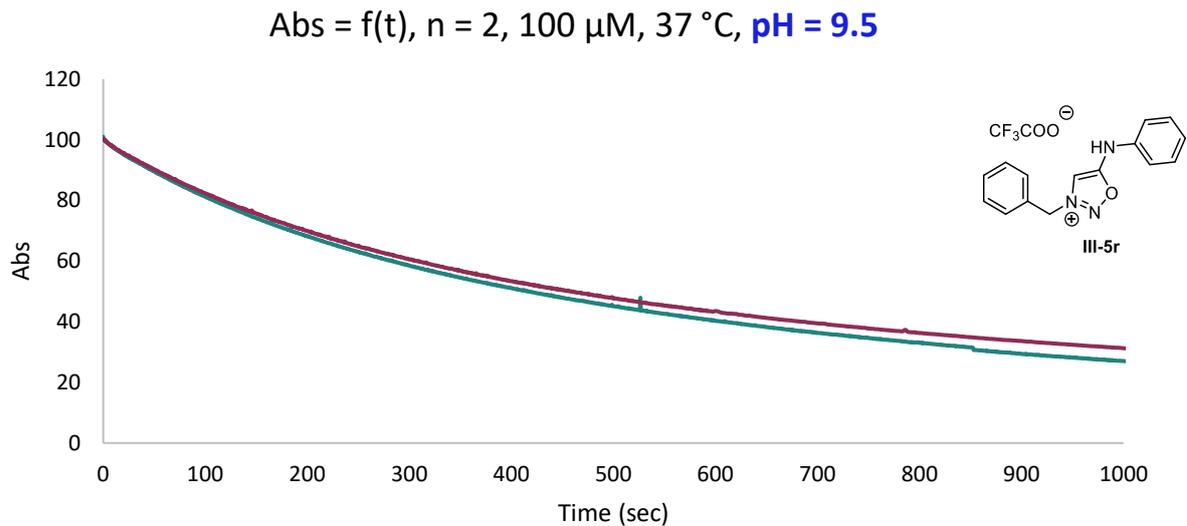


Conv% = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.8



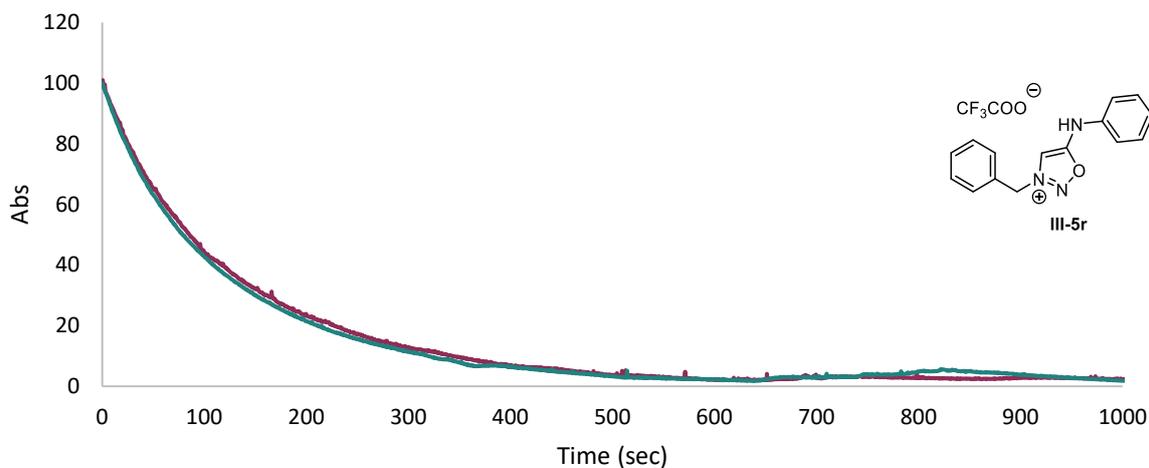
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.8



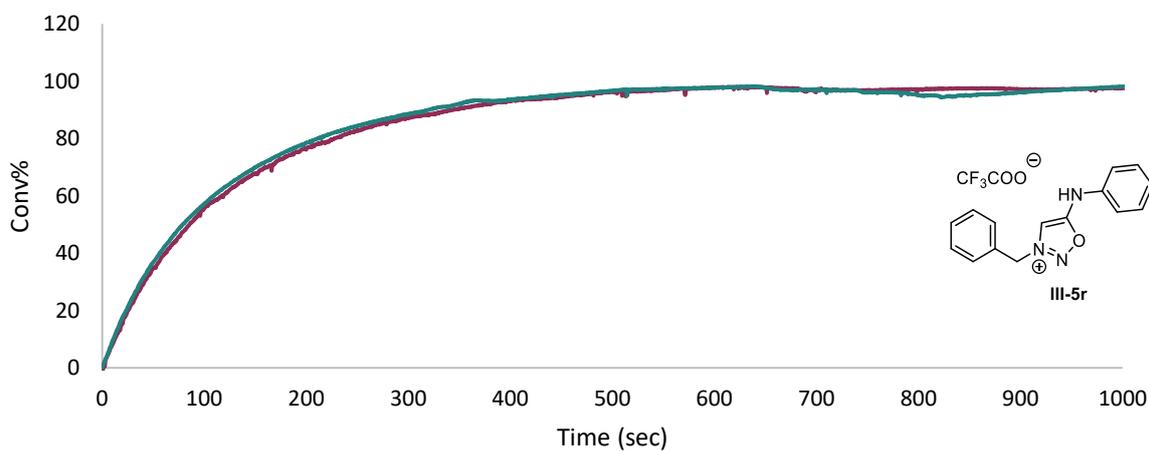


- Influence of the media – III-5r

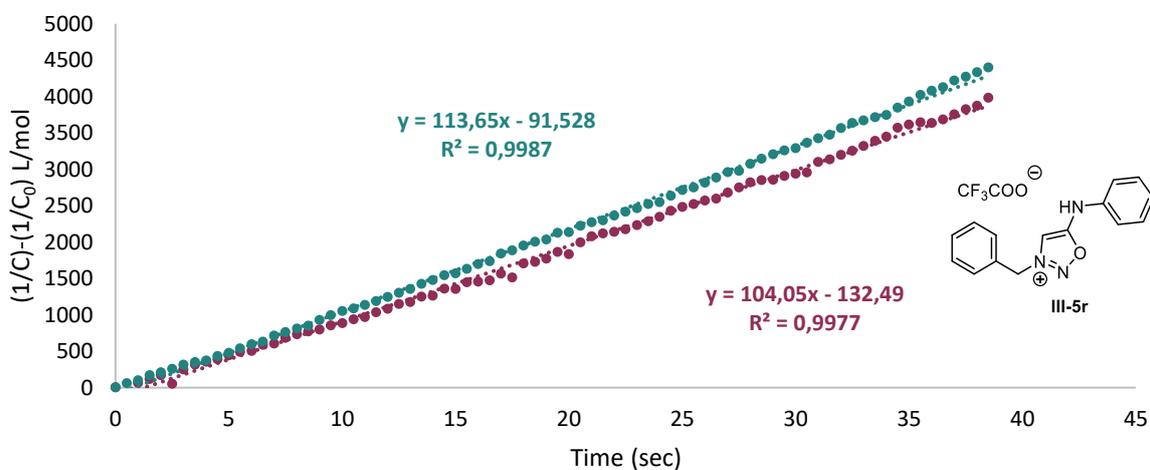
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, Cell lysate



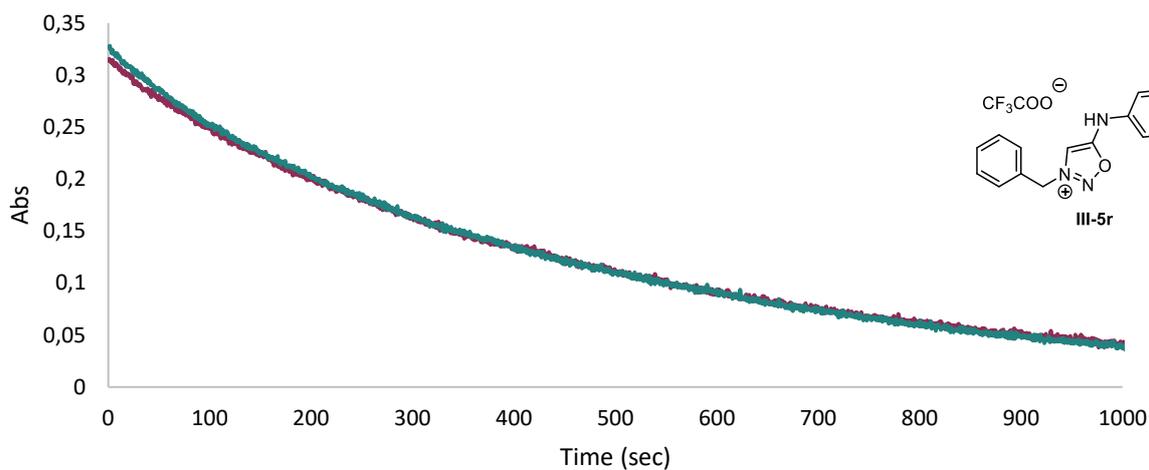
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, Cell lysate



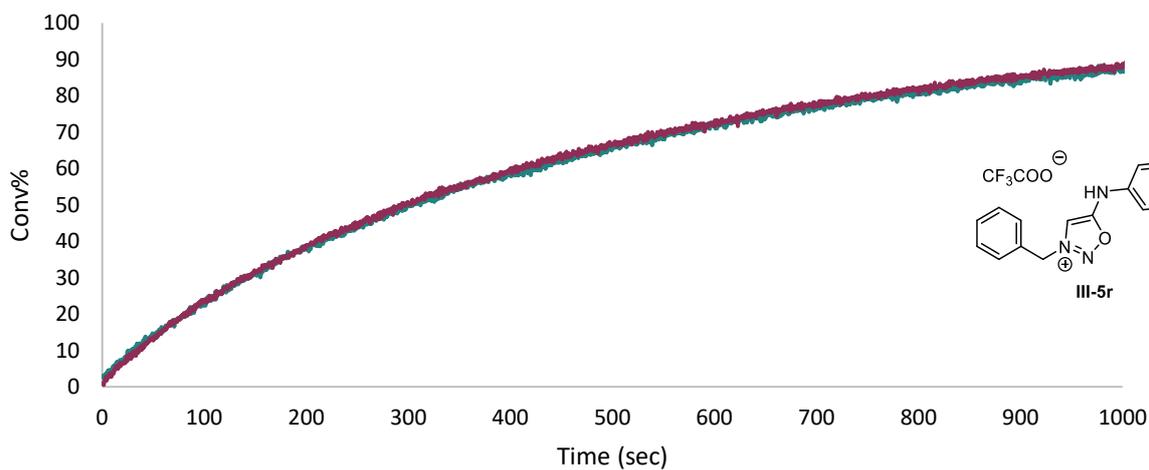
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, Cell lysate



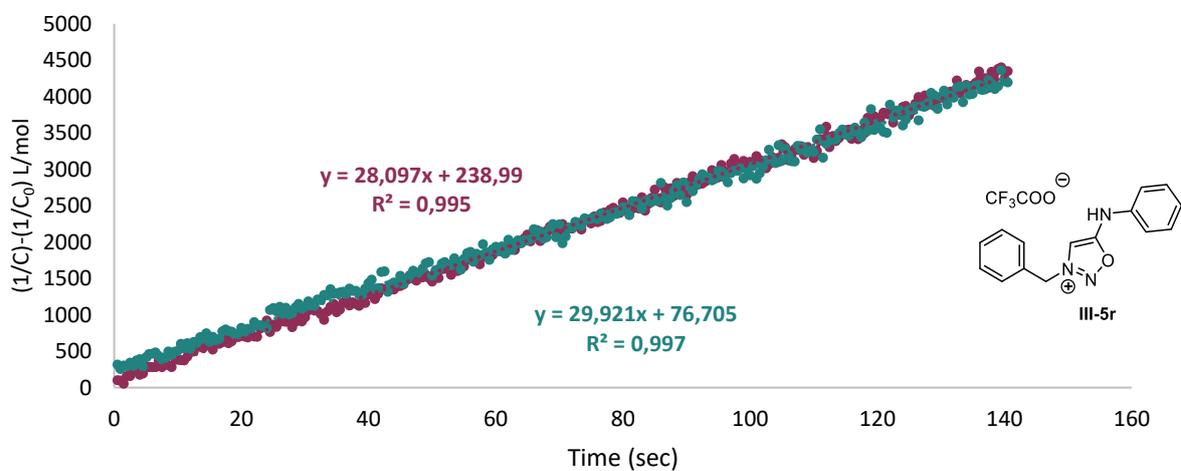
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma



Conv% = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma

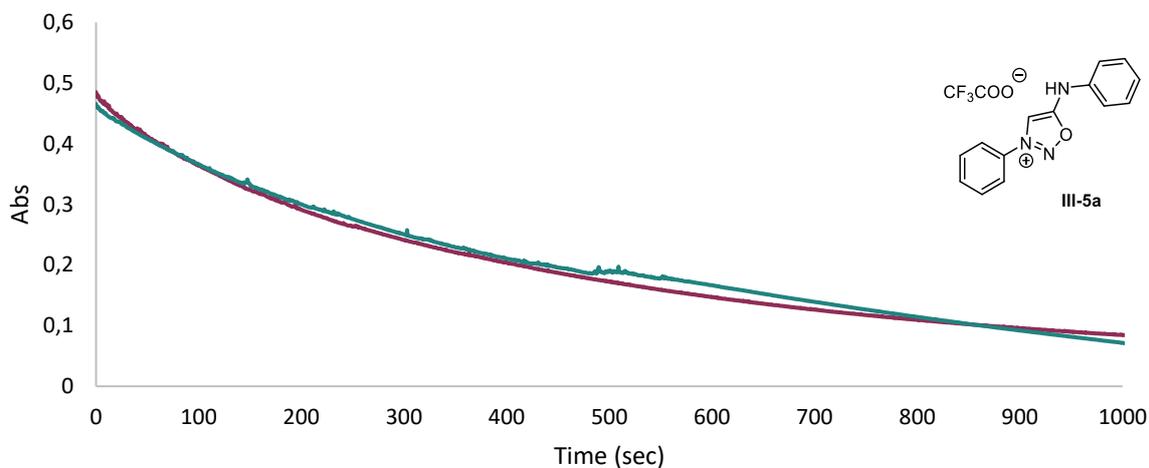


$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma

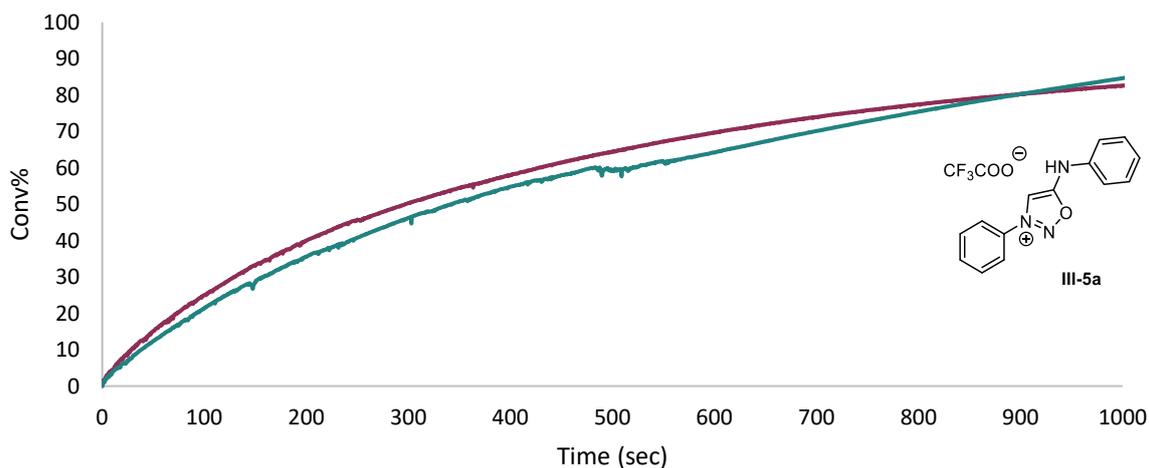


- Influence of the pH – III-5a

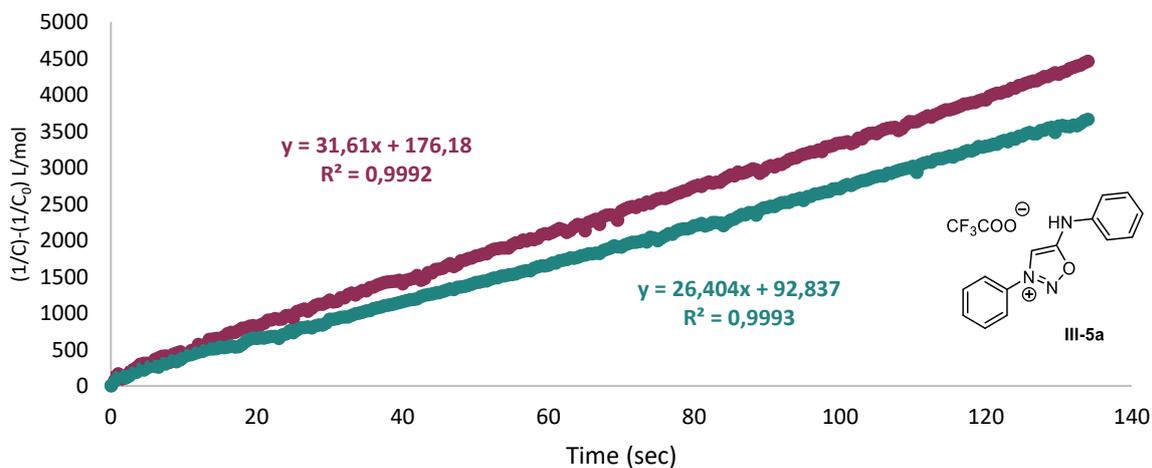
$Abs = f(t)$ ,  $n = 2$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , **pH = 5.0**



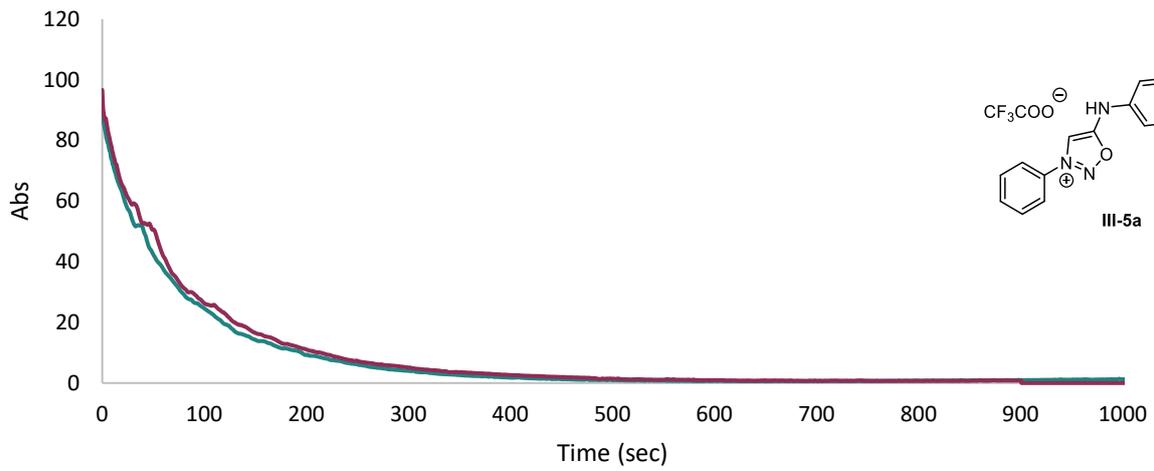
$Conv\% = f(t)$ ,  $n = 2$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , **pH = 5.0**



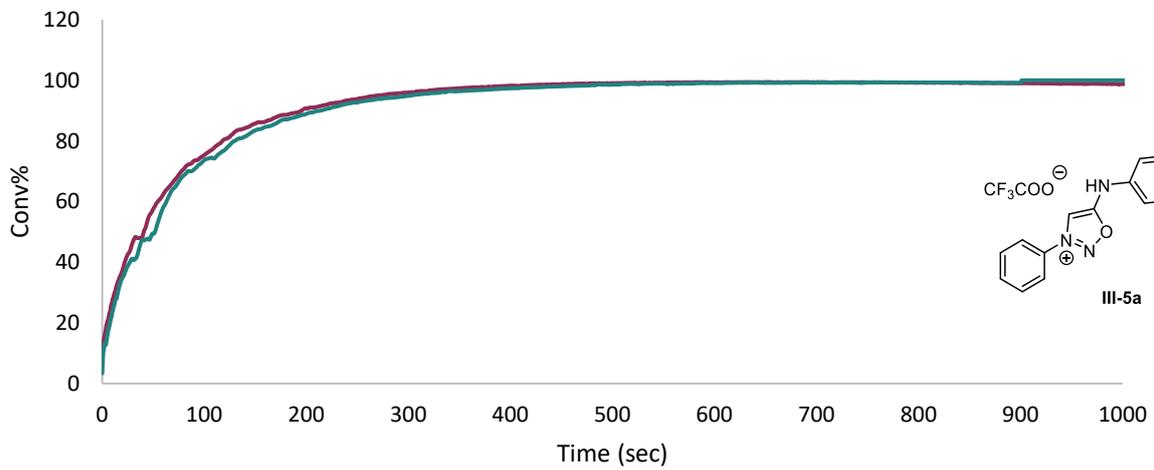
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ ,  $n = 2$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , **pH = 5.0**



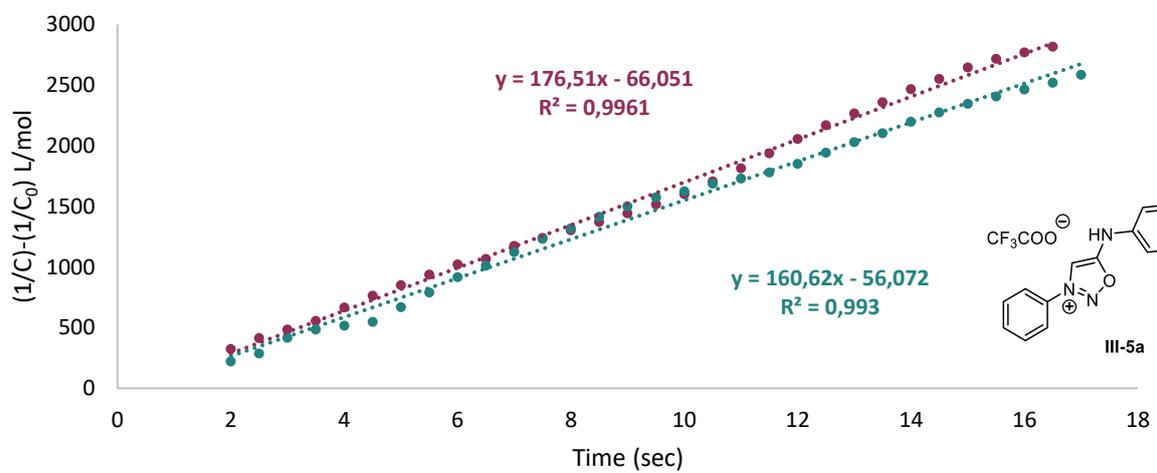
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 6.0



Conv% = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 6.0

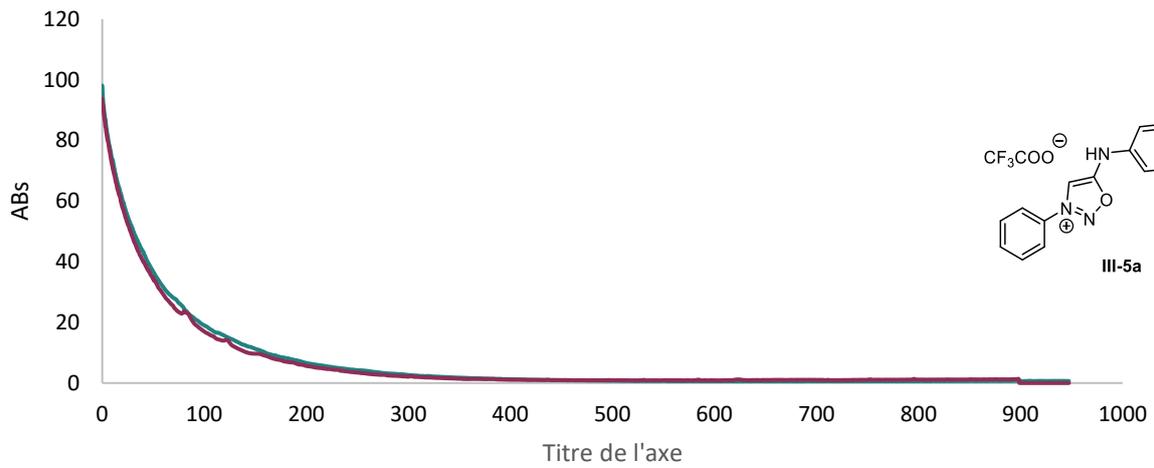


$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M 37  $^{\circ}$ C, pH = 6.0

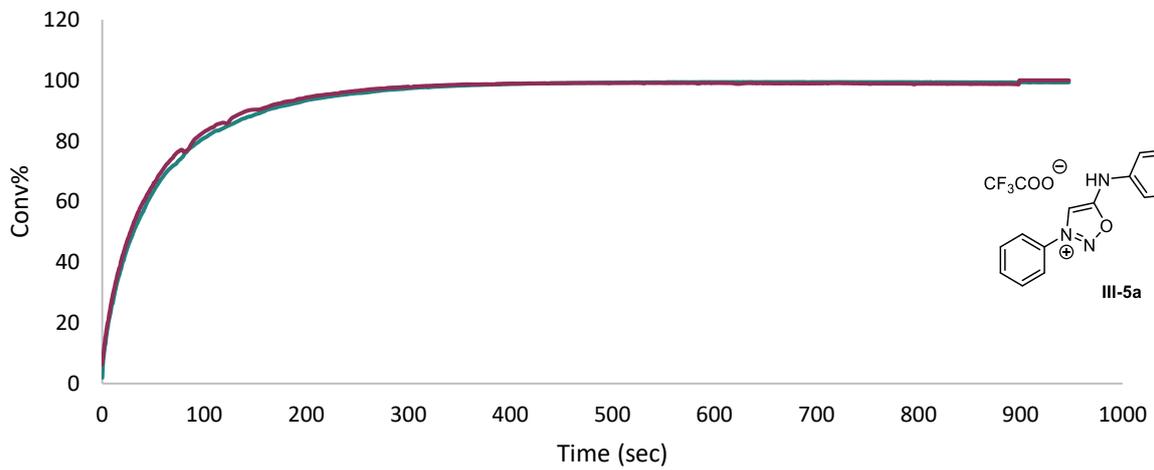




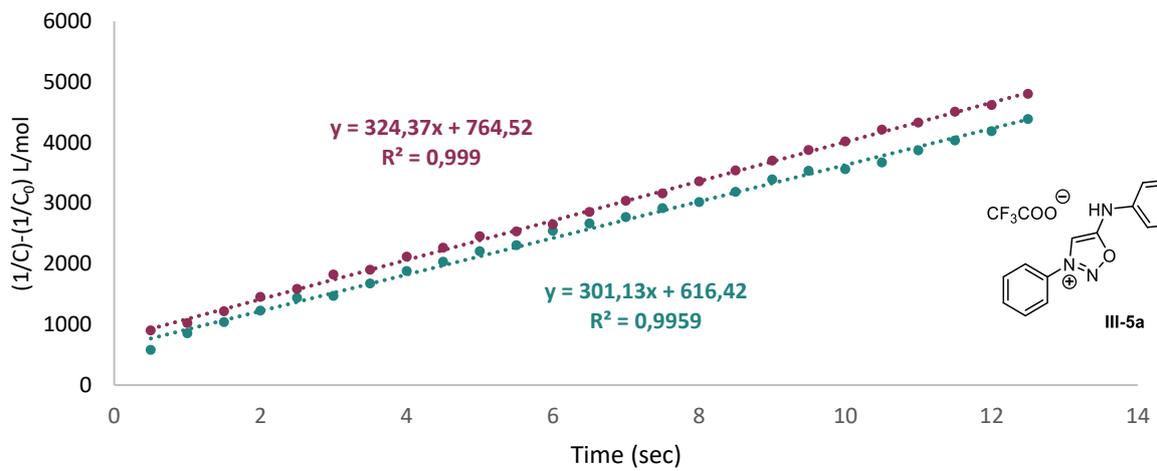
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.0



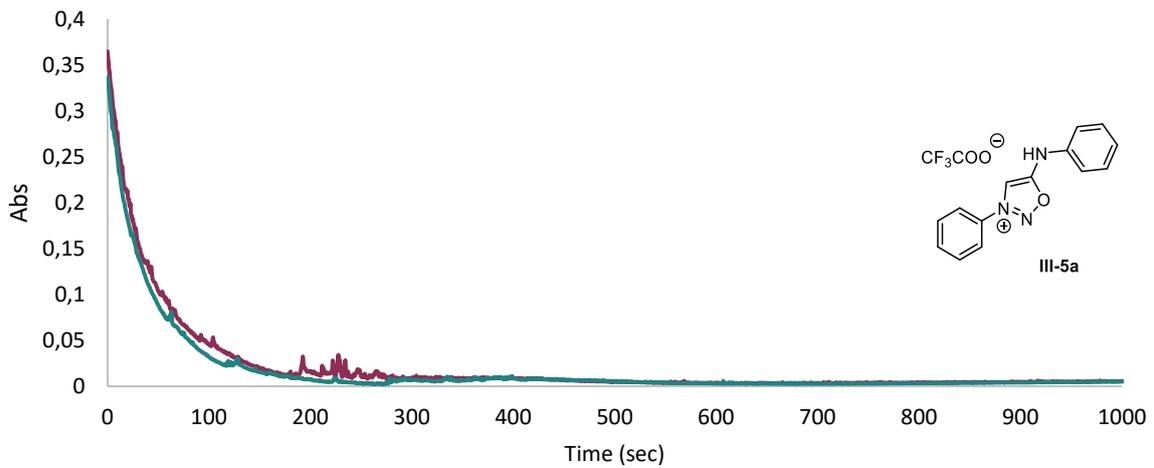
Conv% = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.0



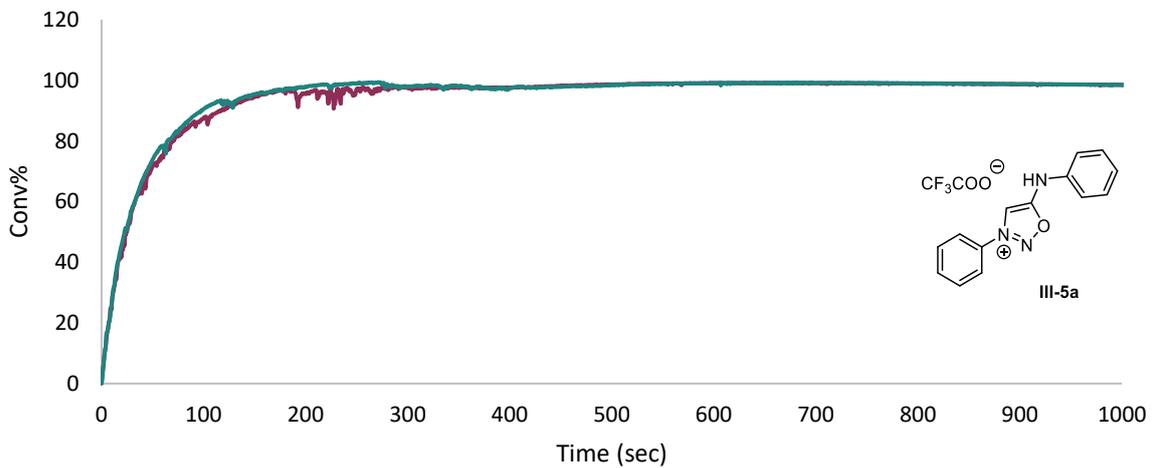
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.0



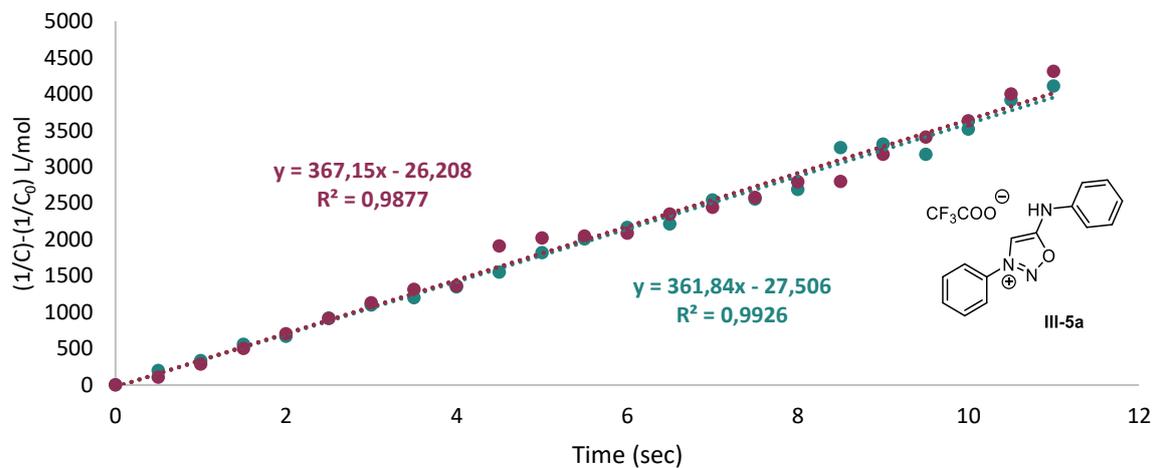
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.8



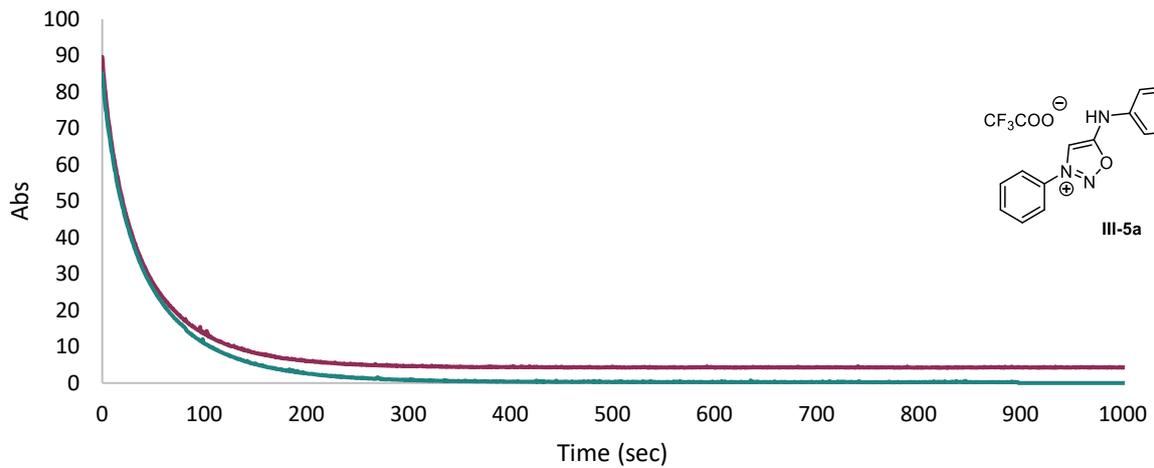
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.8



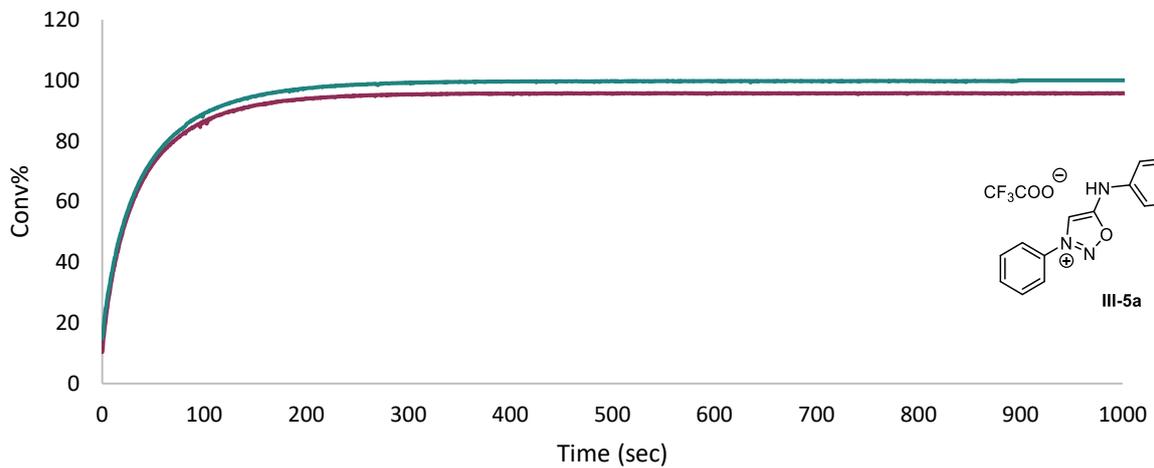
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 8.8



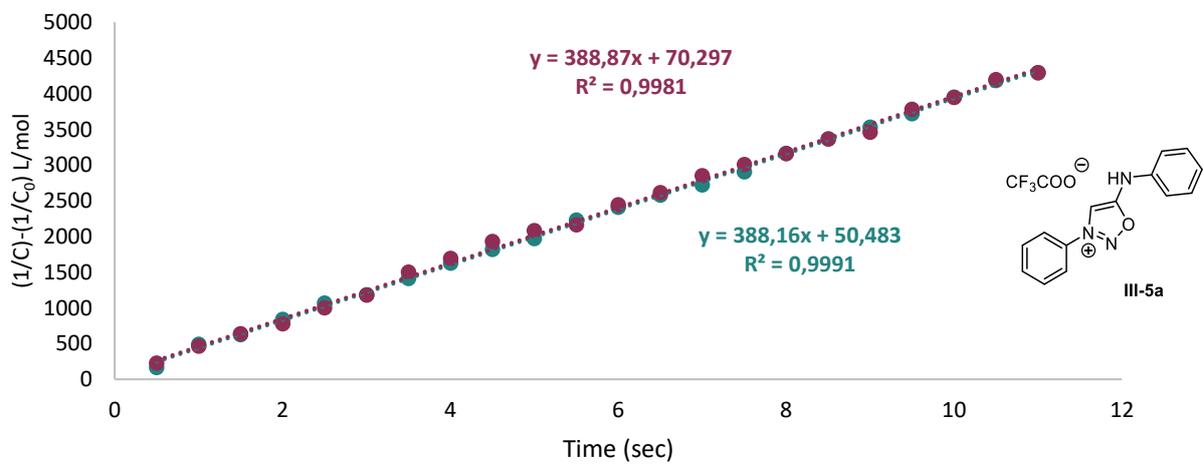
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 9.5



Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 9.5

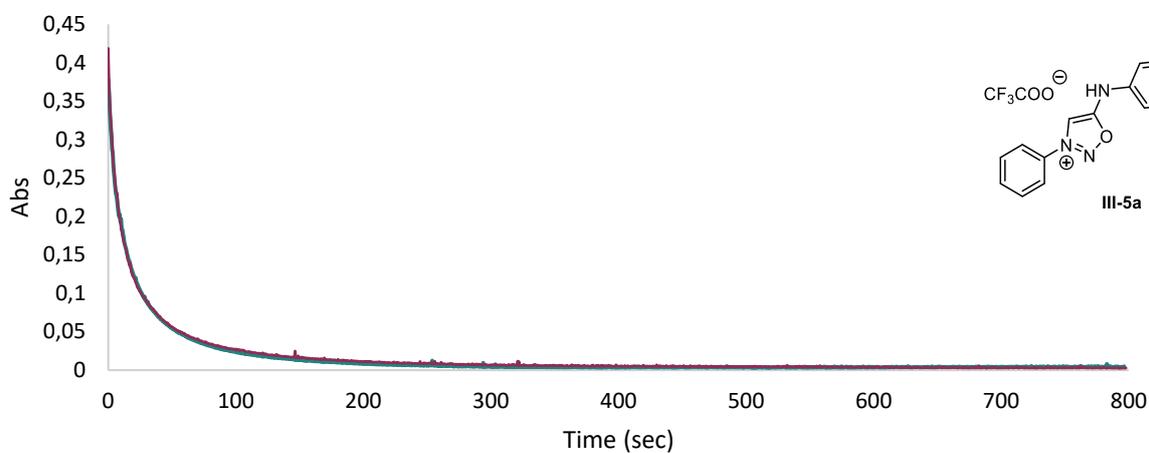


$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 9.5

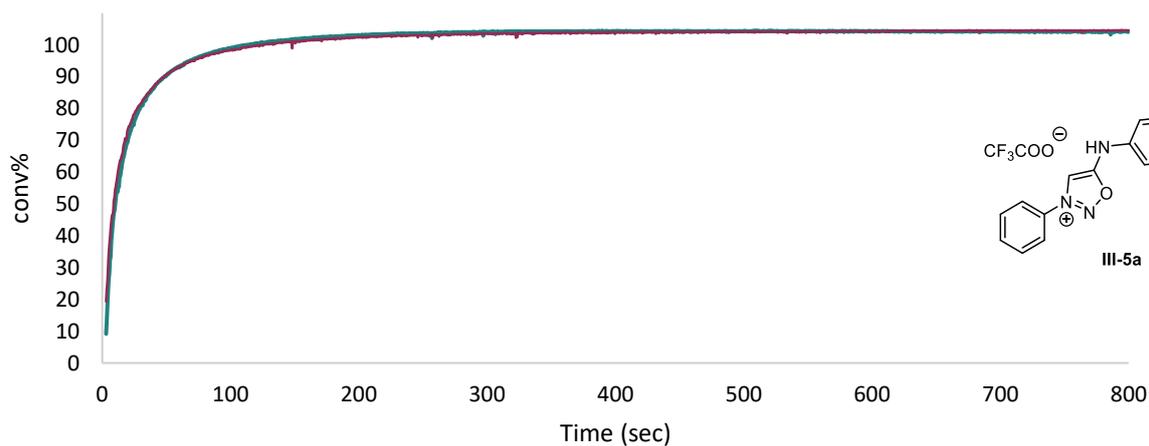


- Influence of the media – III-5a

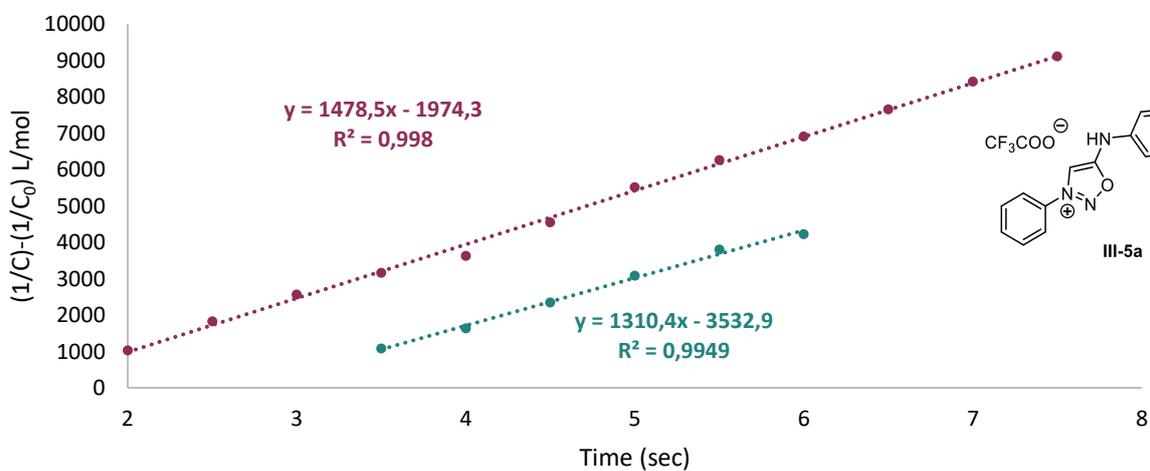
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, cell lysate



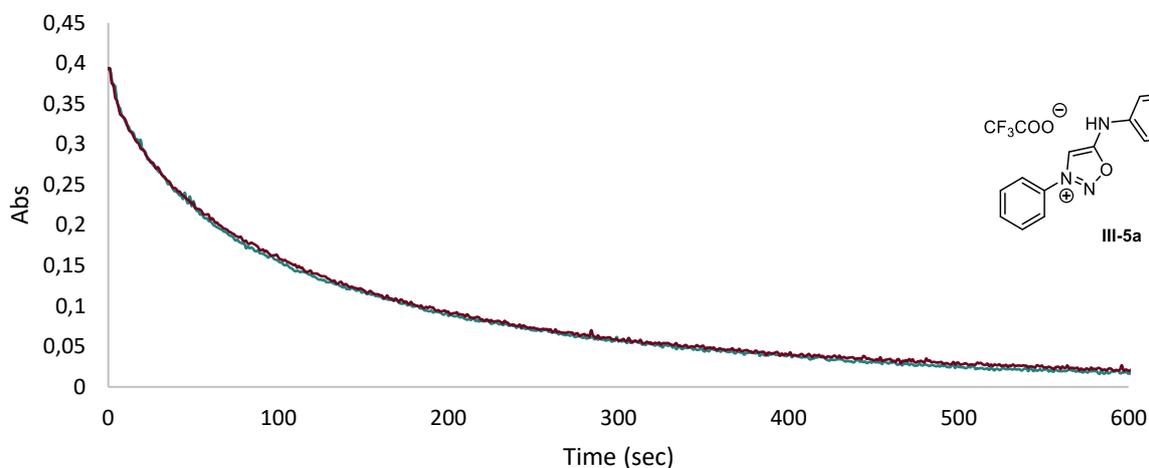
Conv = f(t), n=2, 100 μM, 37 °C, cell lysate



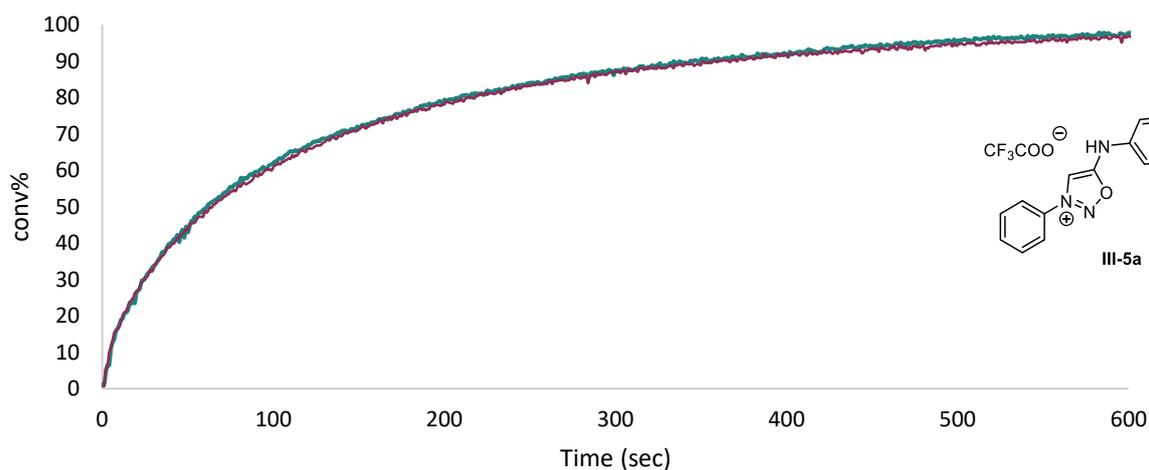
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, cell lysate



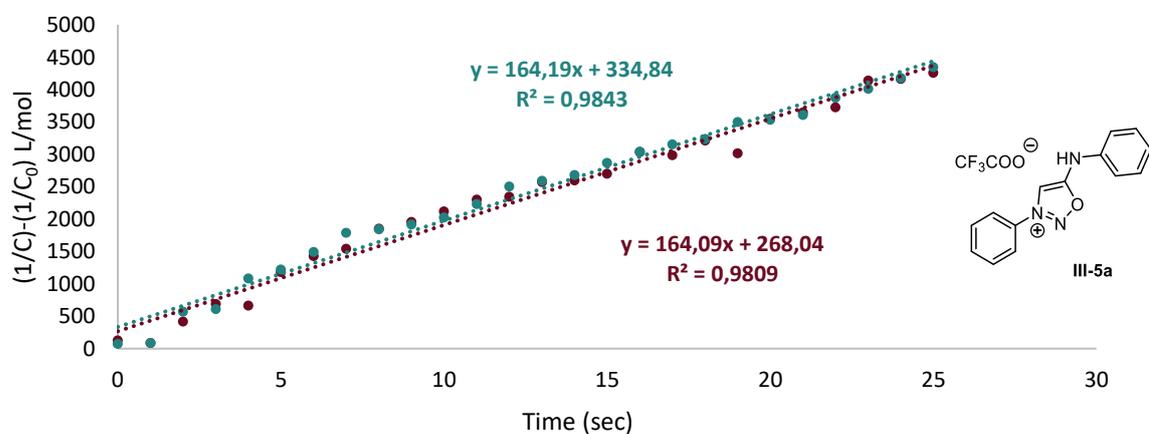
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma



Conv% = f(t), n=2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma

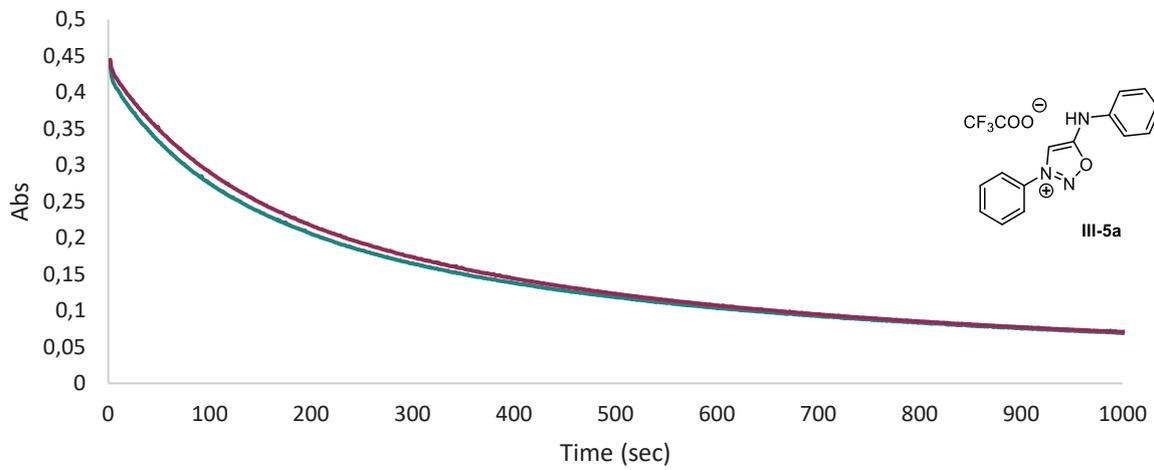


$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, Human Plasma

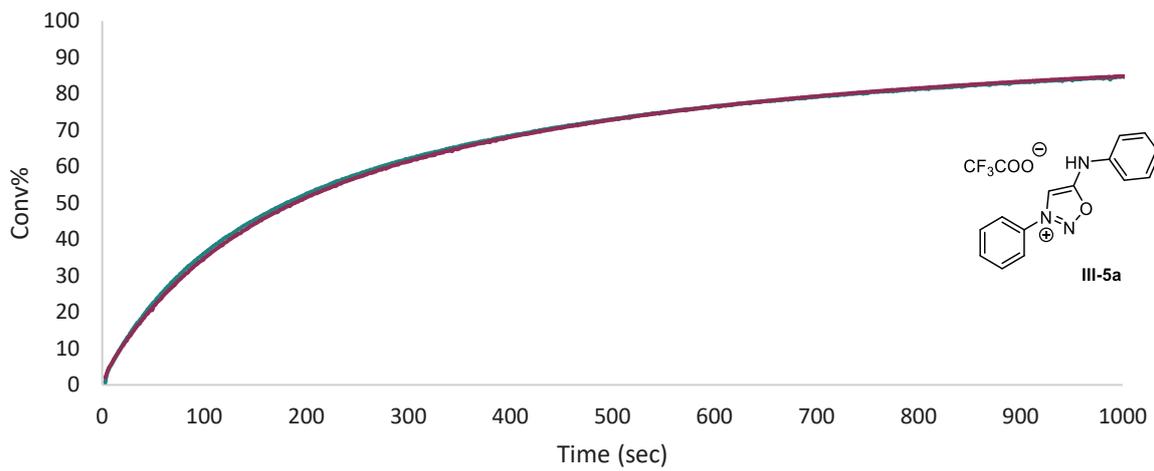


- Influence of the temperature – III-5a

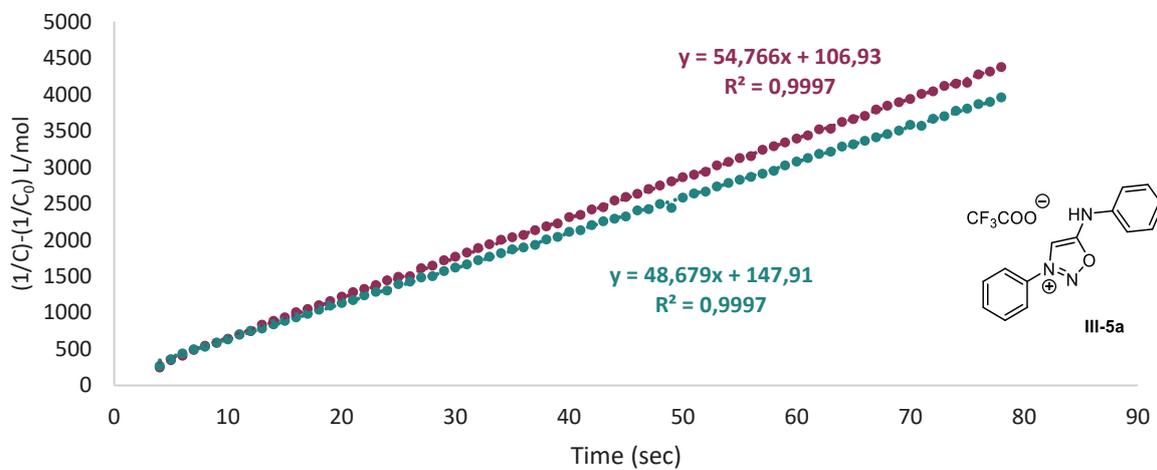
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 10 °C, pH = 7.4



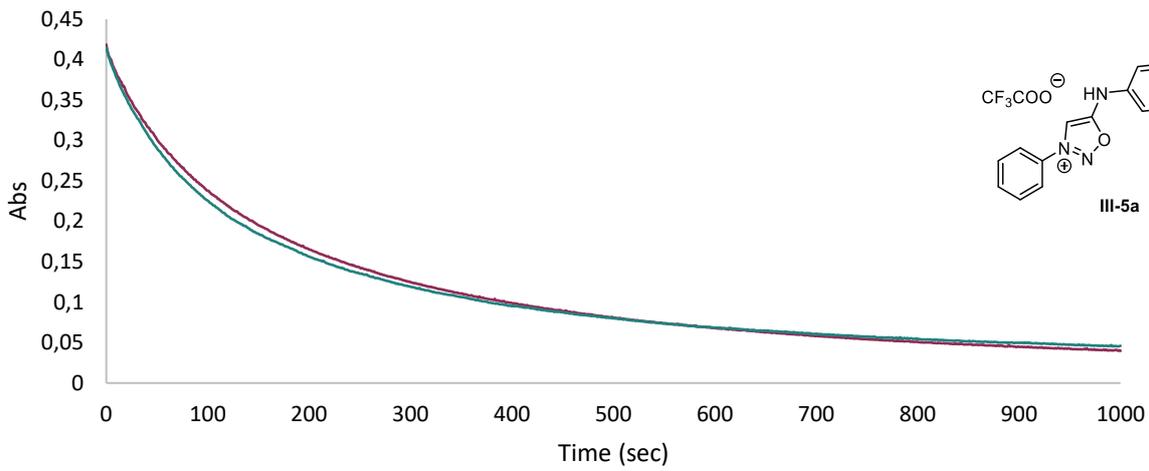
Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 10 °C, pH = 7.4



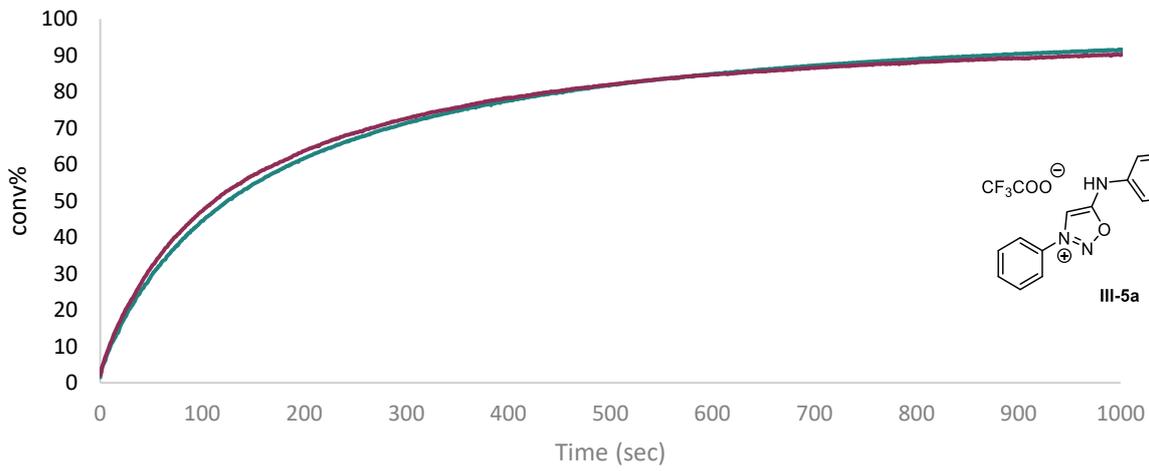
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 10 °C, pH = 7.4



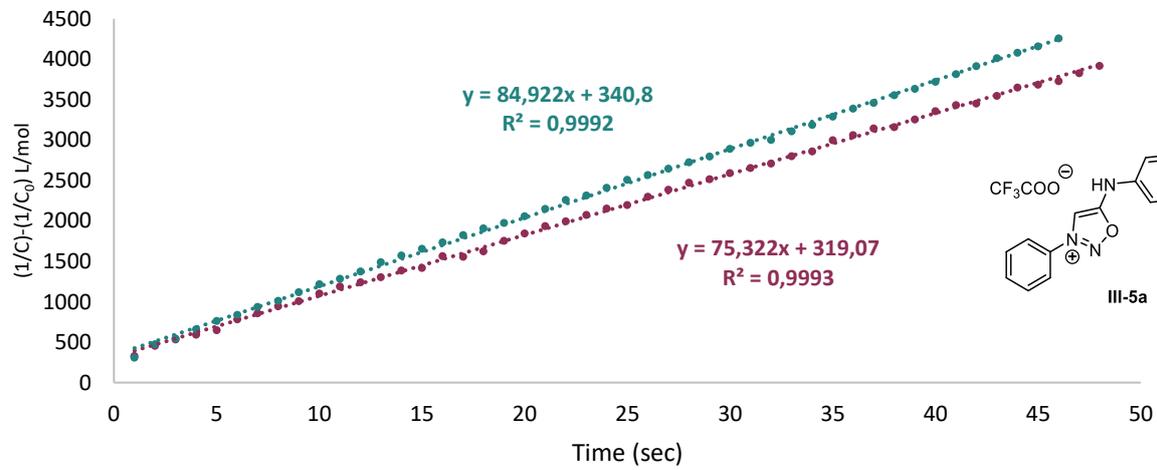
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 15 °C, pH = 7.4



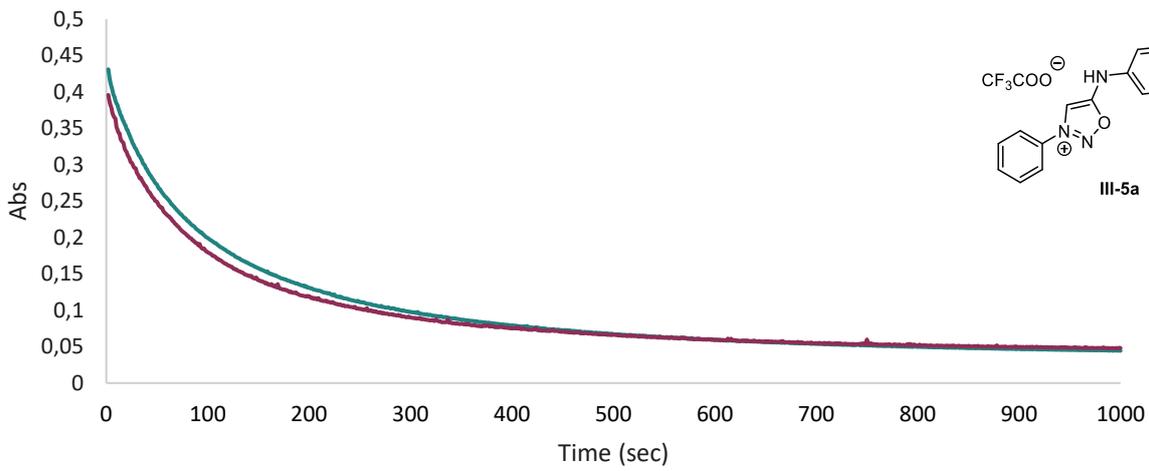
Conv = f(t), n=2, 100 μM, 15 °C, pH = 7.4



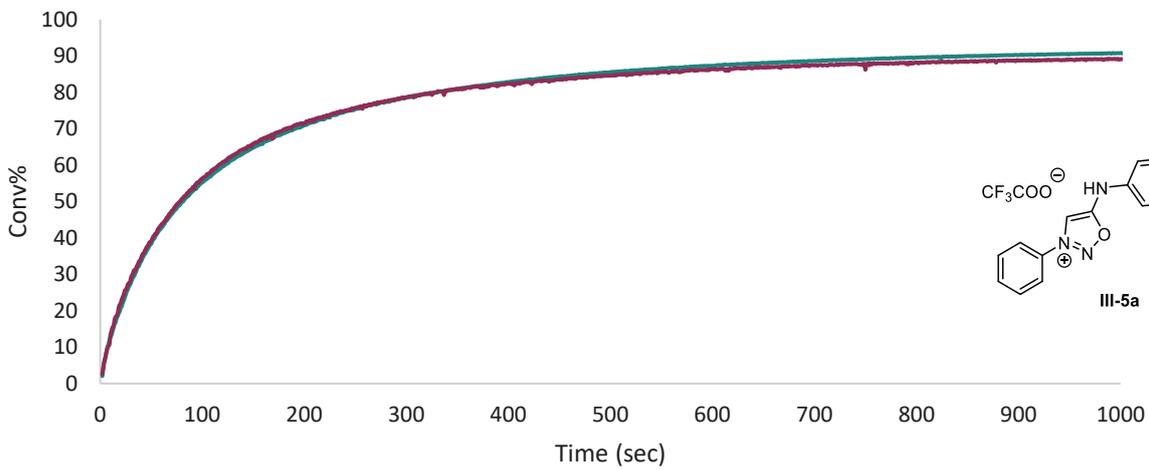
(1/C)-(1/C<sub>0</sub>) = f(t), n = 2, 100 μM, 15 °C, pH = 7.4



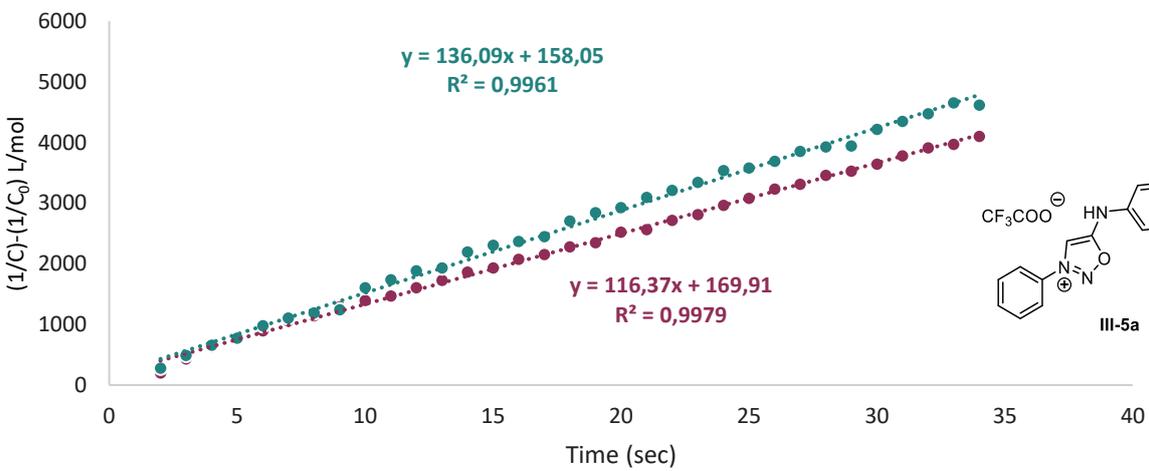
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 25 °C, pH = 7.4



Conv% = f(t), n = 2, 100 μM, 25 °C, pH = 7.4

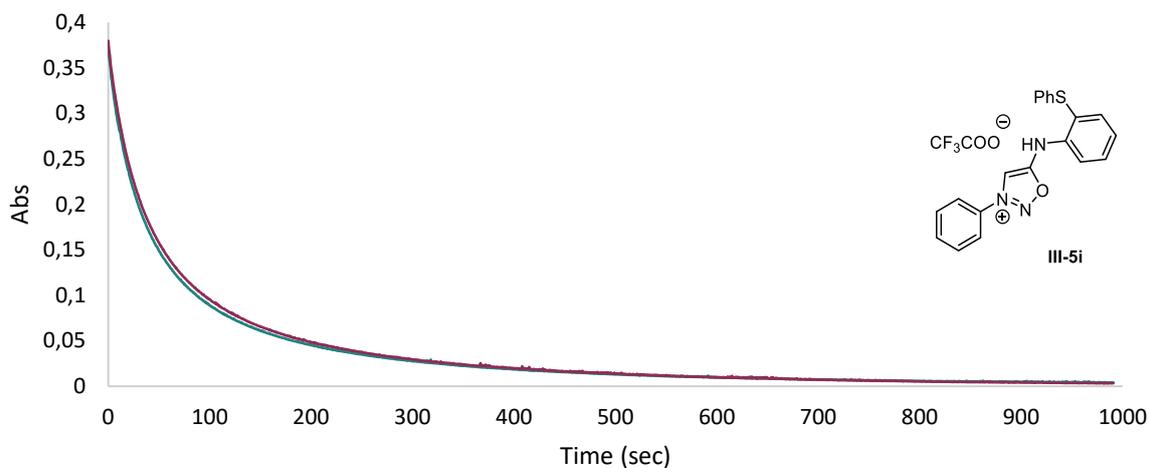


(1/C)-(1/C<sub>0</sub>) = f(t), n = 2, 100 μM, 25 °C, pH = 7.4

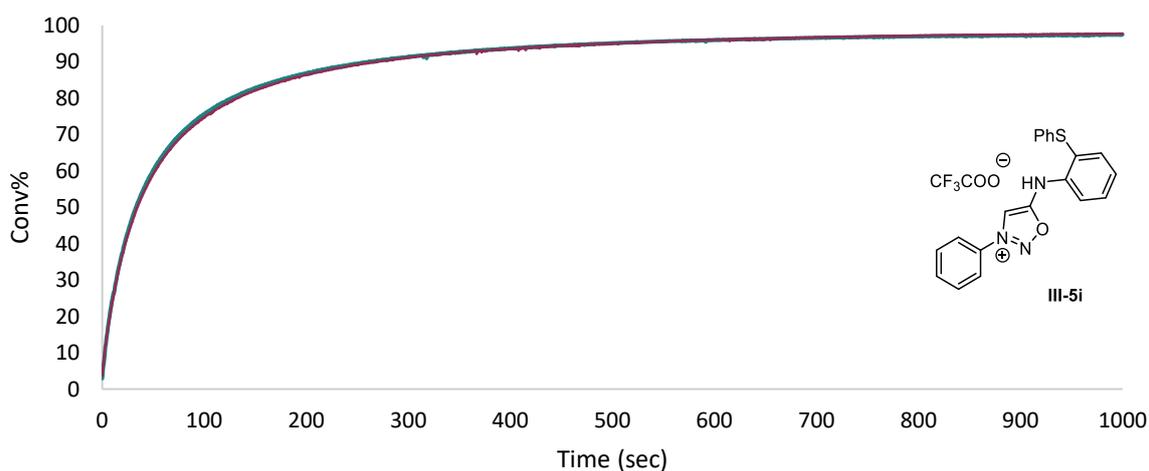


- Influence of the structure

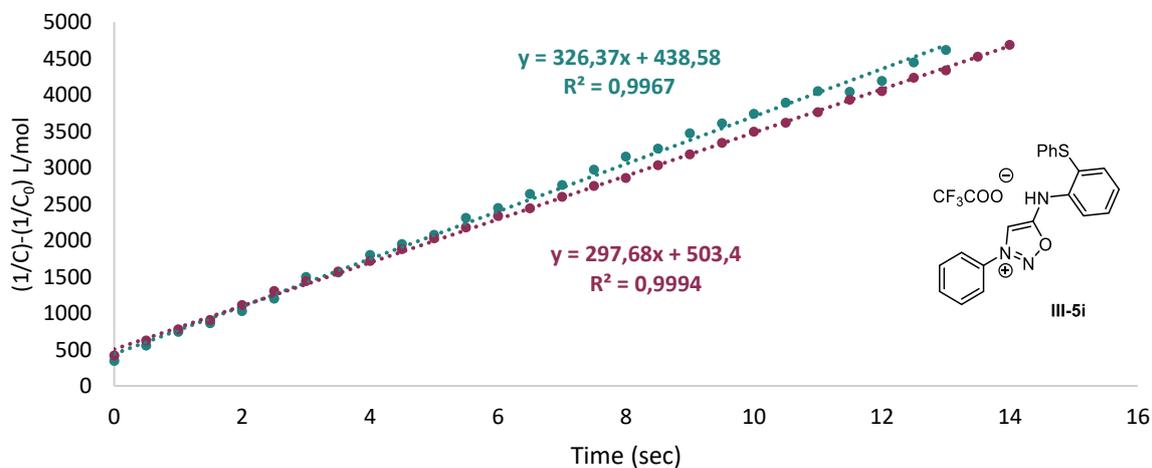
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, PBS/MeCN 75/25



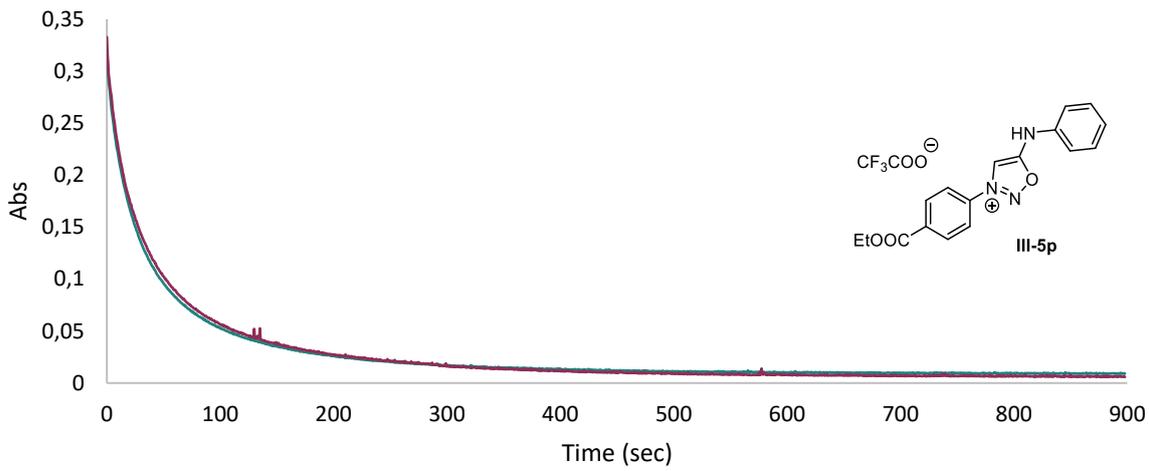
Conv = f(t), n=2, 100 μM, 37 °C, PBS/MeCN 75/25



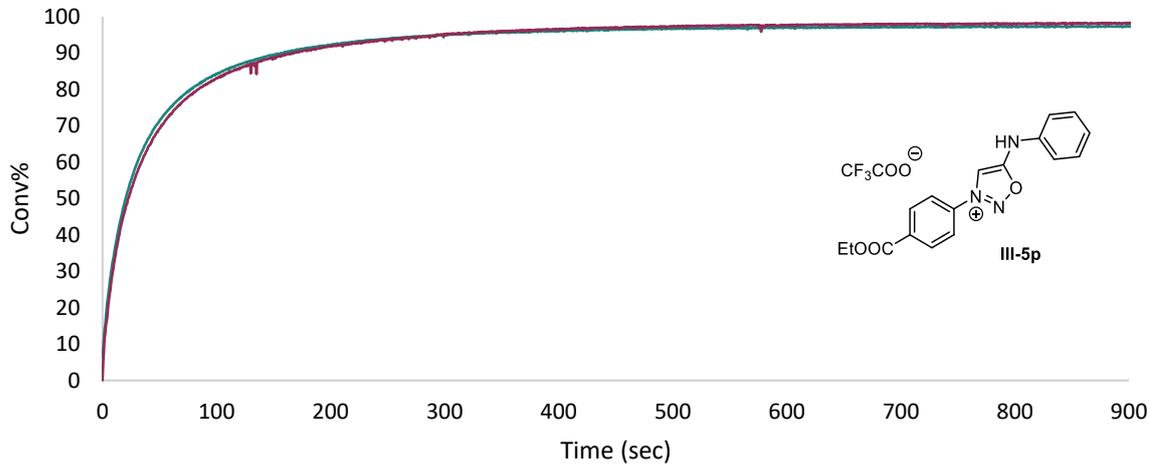
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, PBS/MeCN 75/25



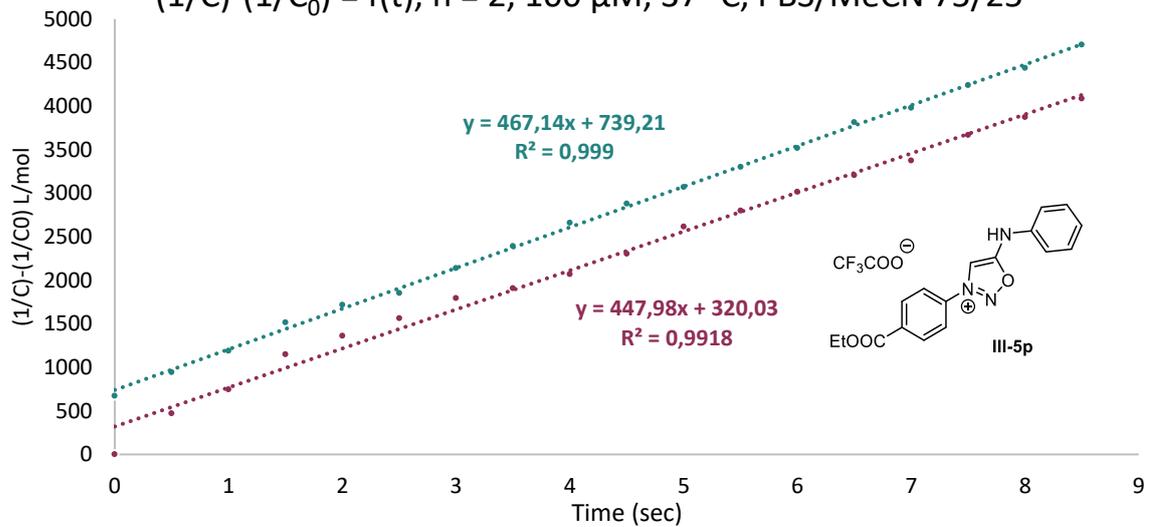
Abs = f(t), n = 2, 100 μM 37 °C, PBS/MeCN 75/25



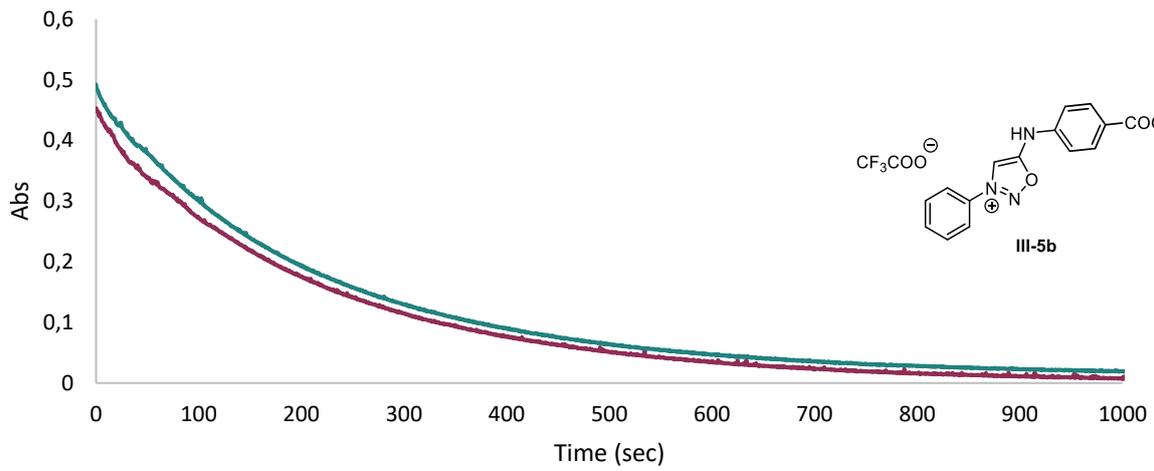
Conv = f(t), n=2, 100 μM, 37 °C, PBS/MeCN 75/25



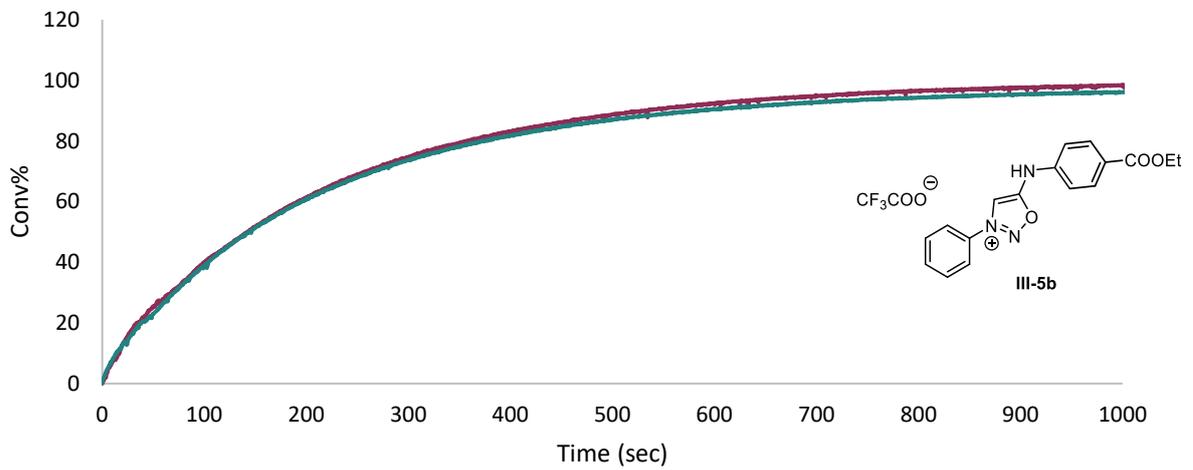
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM, 37 °C, PBS/MeCN 75/25



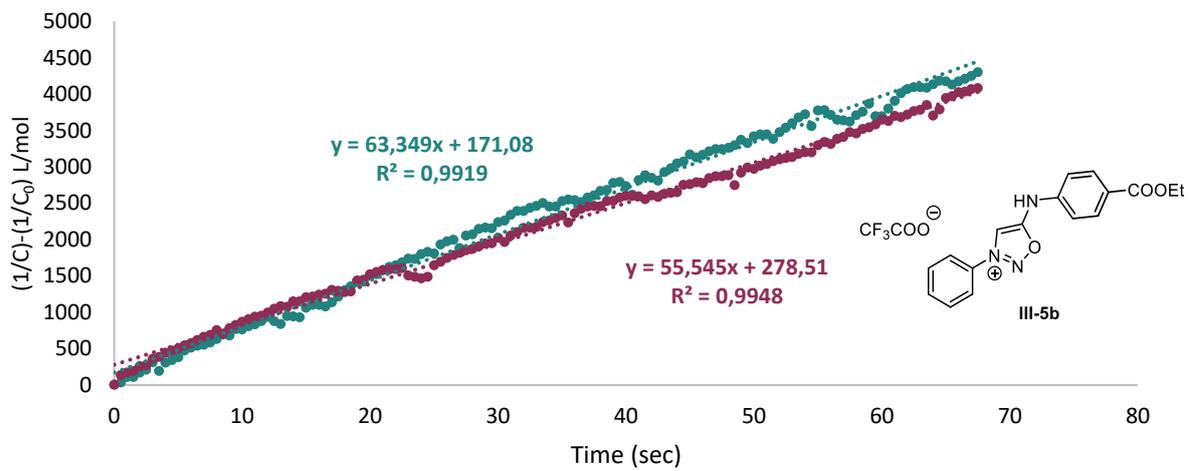
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, PBS/MeCN 75/25



Conv = f(t), n=2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, PBS/MeCN 75/25

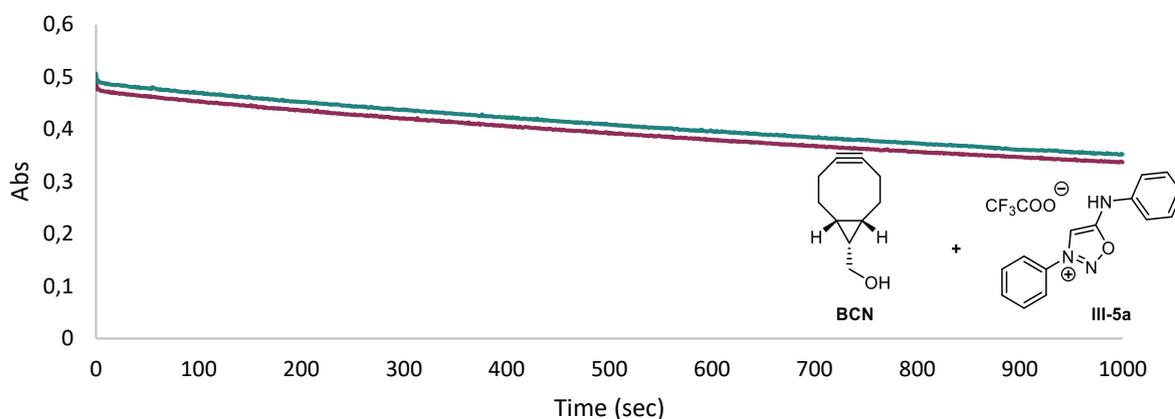


(1/C)-(1/C<sub>0</sub>) = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, PBS/MeCN 75/25

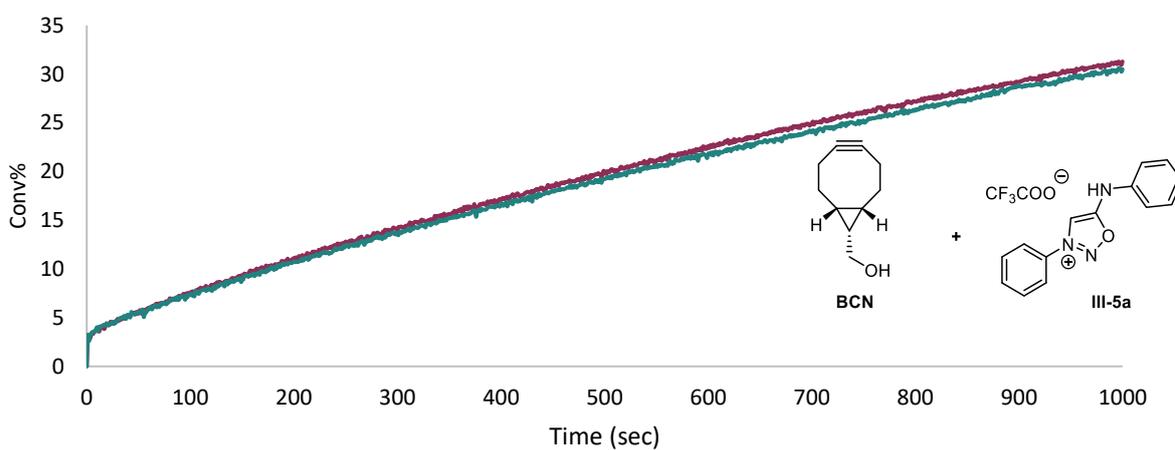


- Influence of the cyclooctyne – III-5a

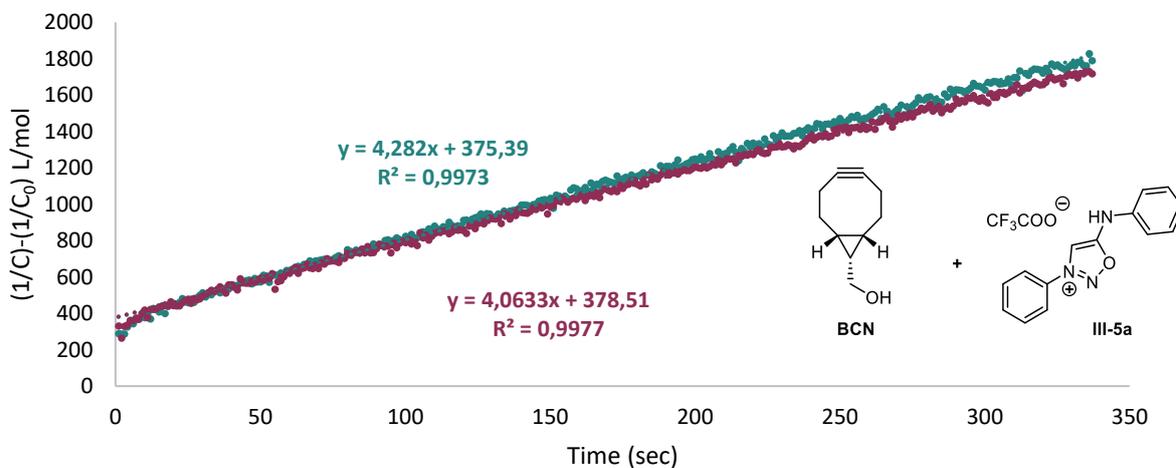
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4, BCN



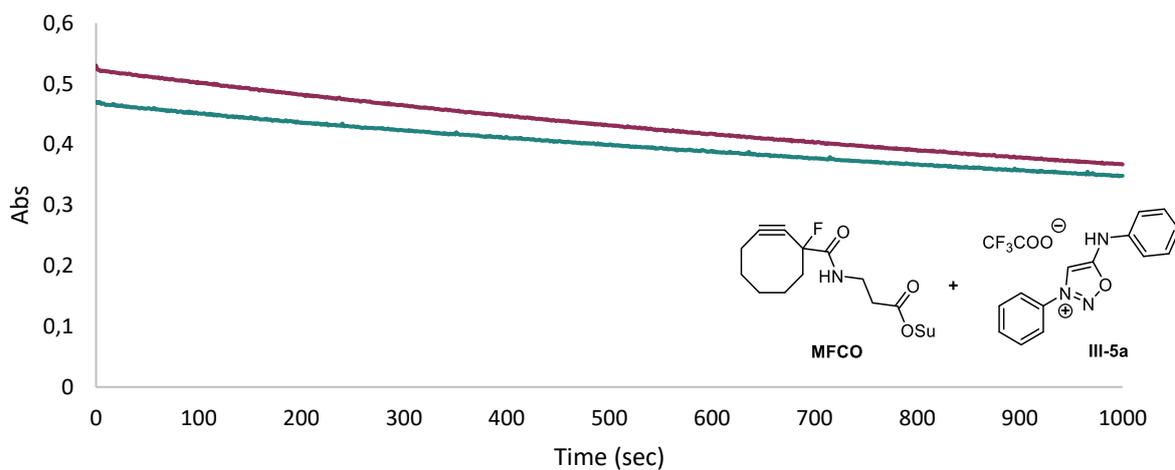
Conv = f(t), n=2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4, BCN



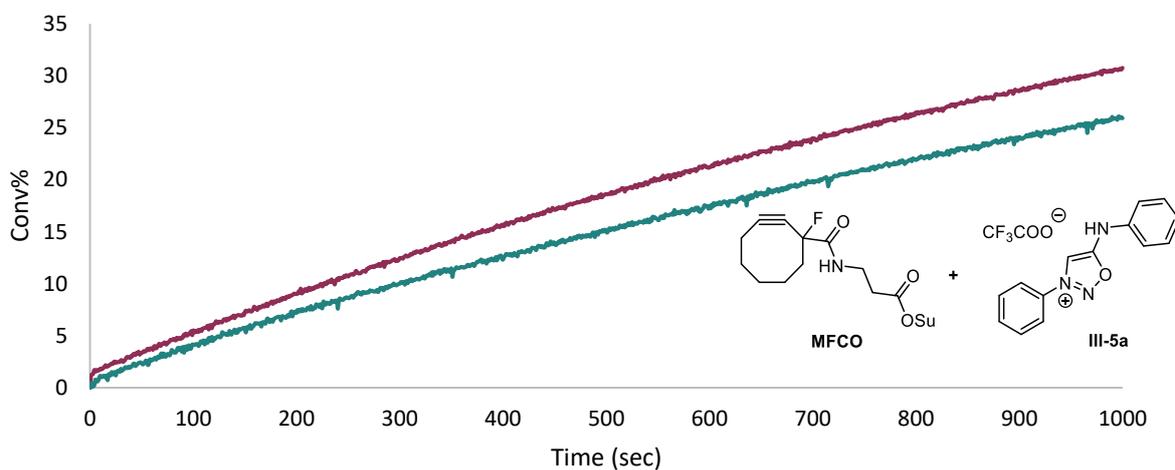
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM 37 °C, pH = 7.4, BCN



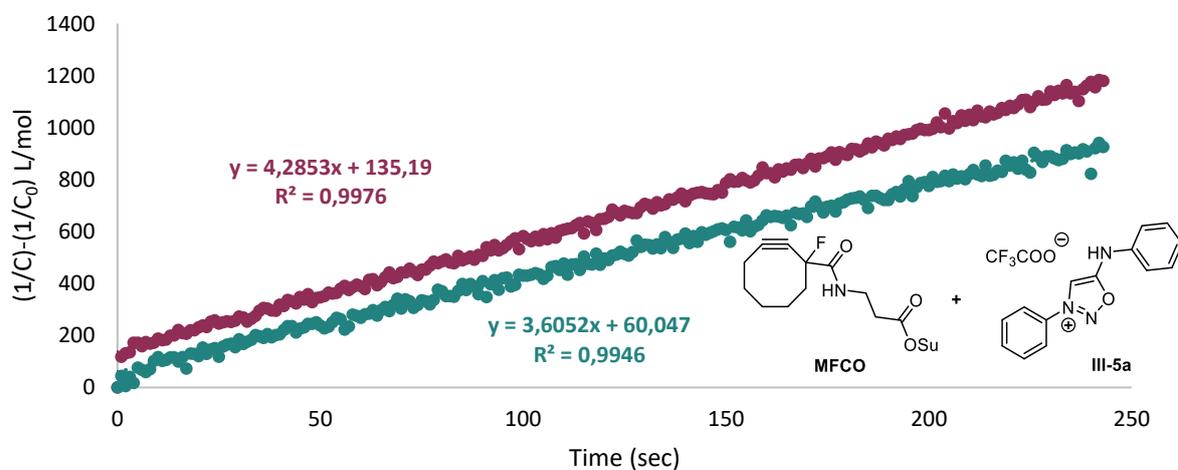
Abs = f(t), n = 2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4, MFCO



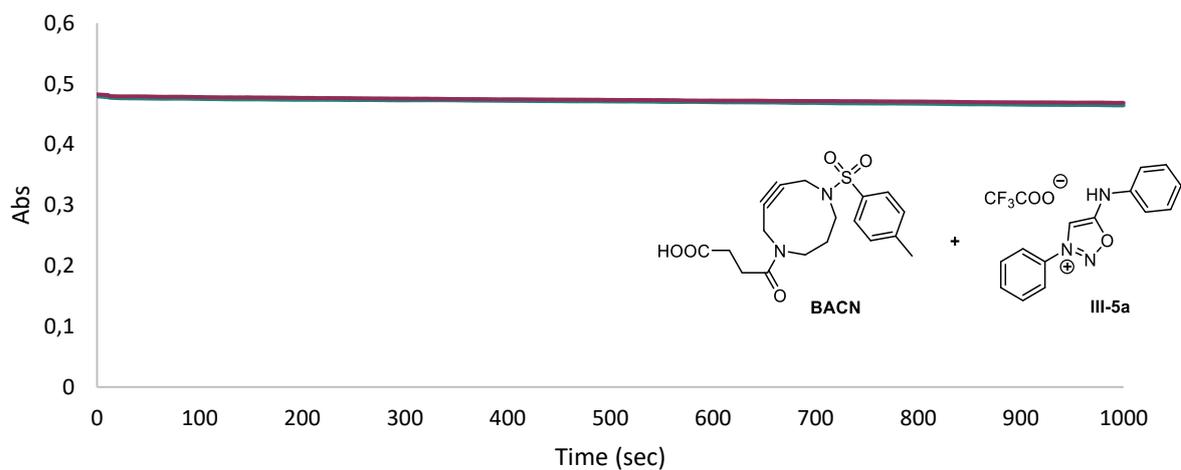
Conv = f(t), n=2, 100 μM, 37 °C, pH = 7.4, MFCO



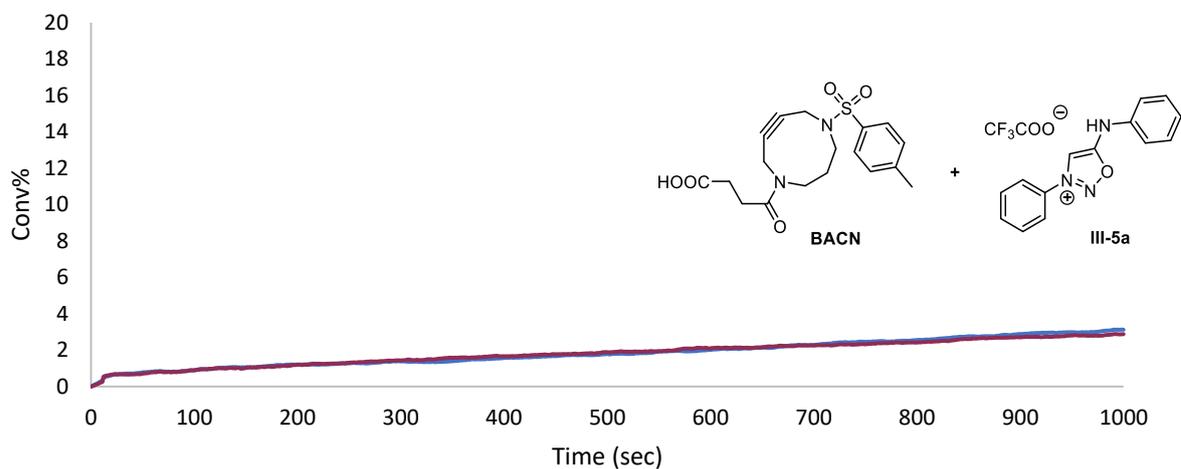
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100 μM 37 °C, pH = 7.4, MFCO



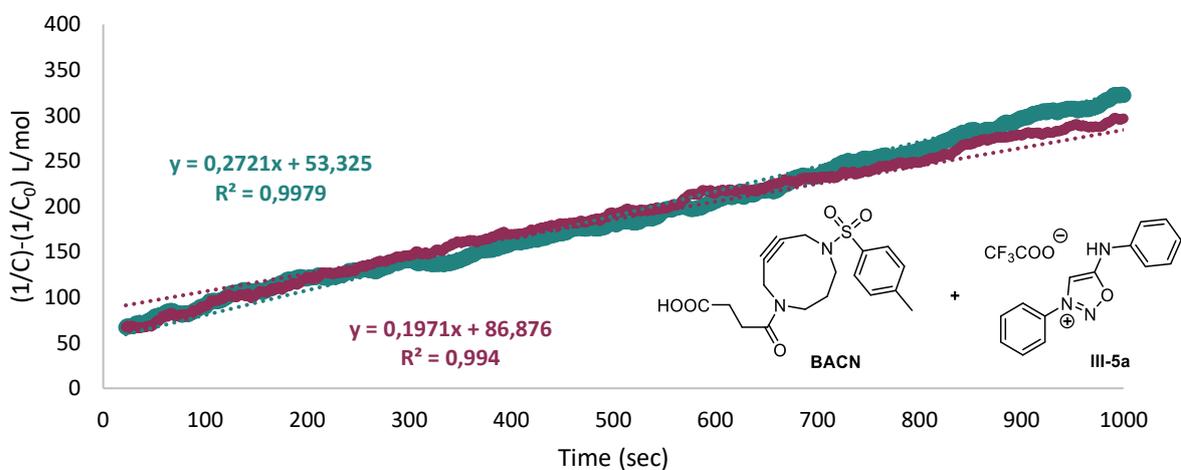
Abs = f(t), n = 2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4, BACN



Conv = f(t), n=2, 100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4, BACN



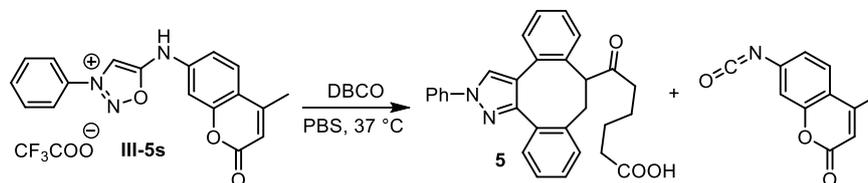
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, 100  $\mu$ M 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4, BACN



## IV.5 In vitro bioconjugation with bio-nucleophiles

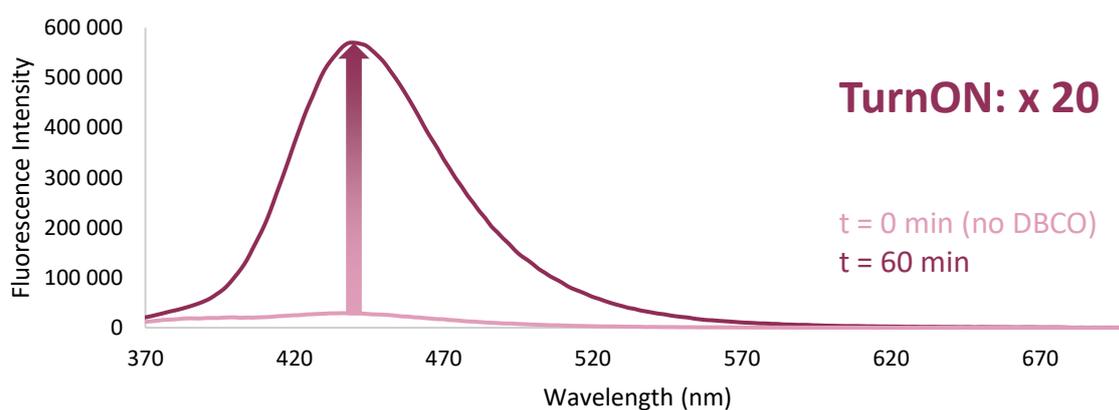
### IV.5.i Isocyanate trapping with GSH

- Probe III-5s

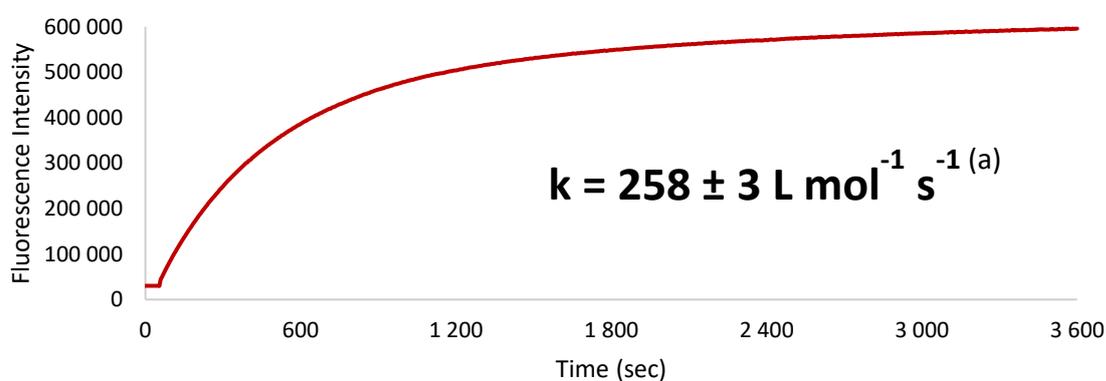


In a quartz cuve equipped with a stirring magnet, PBS (2960  $\mu\text{L}$ ) was added, followed by 30  $\mu\text{L}$  of III-5s (1 mM in DMSO, UV-spectroscopy grade). The cuve was thermostated at 37  $^\circ\text{C}$  with a water circulating thermostate. First, emission and excitation spectra were recorded ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 440 \text{ nm}$ ,  $\text{EmBW} = \text{ExBW} = 1.15 \text{ nm}$ ). Then, the kinetic experiment was started after the addition of 10  $\mu\text{L}$  of DBCO (3.0 mM in UV-spectroscopy DMSO). After 1 hour, emission and excitation spectra were recorded again.

#### A. Emission = $f(\lambda)$ , 10 $\mu\text{M}$ , 37 $^\circ\text{C}$ , PBS/DMSO



#### B. $I = f(t)$ , 10 $\mu\text{M}$ , 37 $^\circ\text{C}$ , PBS/DMSO

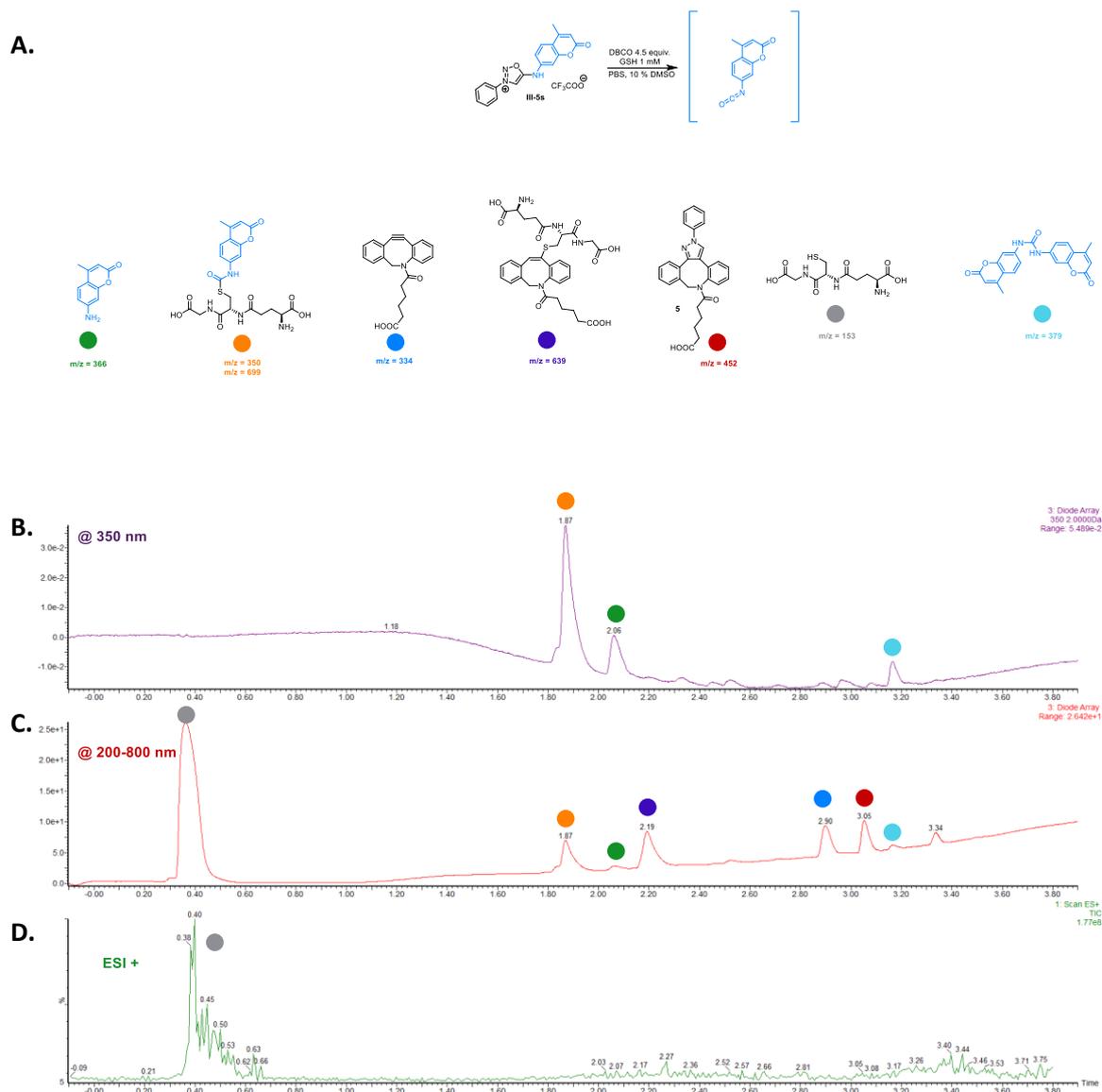


**Figure S15.** (A) Emission as a function of the wavelength of III-5s at 350 nm, at  $t = 0 \text{ min}$  and  $t = 60 \text{ min}$ . (B) Kinetic experiment (Fluorescence Intensity =  $f(t)$ ) of III-5s at 440 nm. (a)  $k = 1/(t_{1/2} * [\text{III-5s}])$  with  $t_{1/2}$  the time at fluorescence (1h)/2.

The turn on phenomenon observed with probe **III-5s** after reaction with cyclooctyne can be explained by coumarin quenching from the iminosydnone core, according to our previous finding.<sup>132</sup>

### Reaction with GSH.

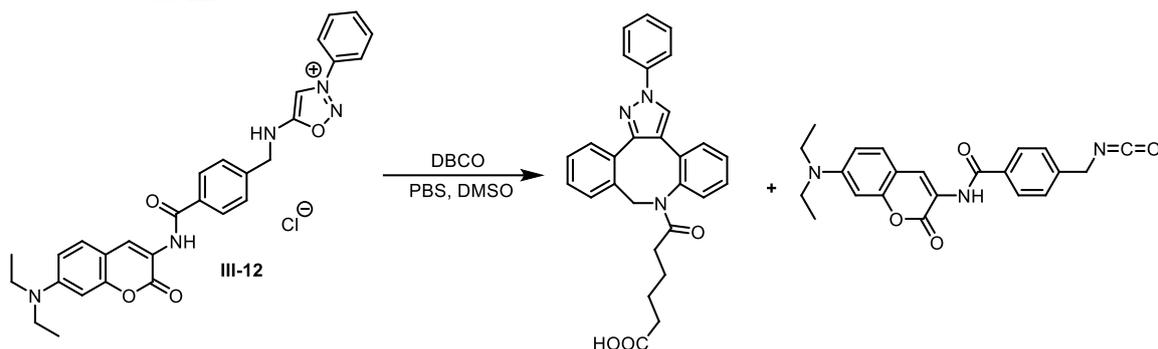
**III-5s** (30  $\mu$ L, 10 mM in DMSO, UV-spectroscopy grade) was first added to 2940  $\mu$ L of PBS, followed by the addition of GSH (30  $\mu$ L, 100 mM in PBS) to the solution, Then DBCO (3  $\mu$ L, 150 mM in DMSO) was added to the solution. The solution was kept at 37  $^{\circ}$ C for 15 h.



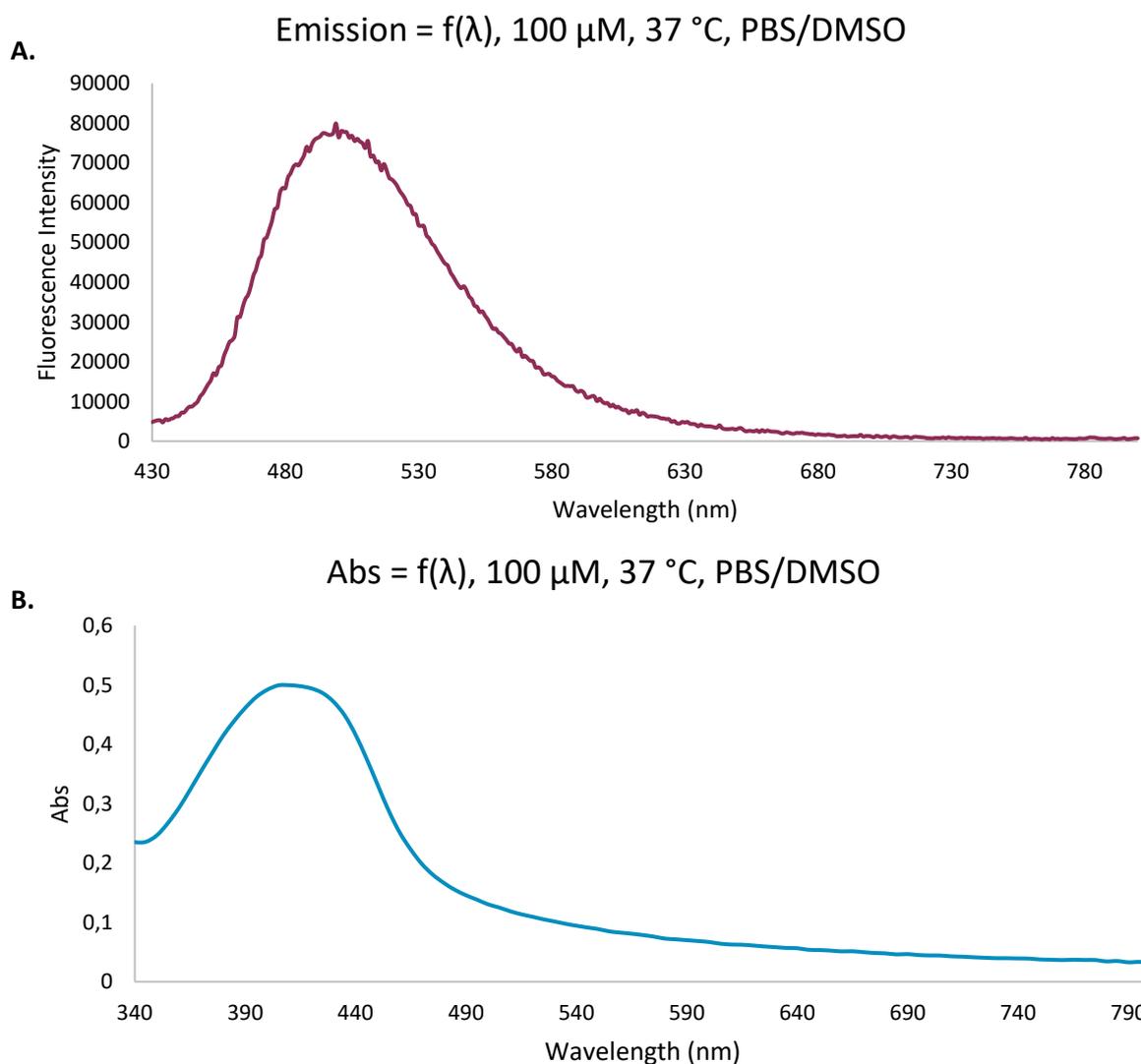
**Figure S16.** (A) Scheme of the reaction and all the product identified by HRMS. (B) Chromatogram using detection at 350 nm (specific of the coumarin moiety). (C) Max Plot chromatogram using detection in complete UV-Vis range from 200-800 nm. (D) TIC in positive mode

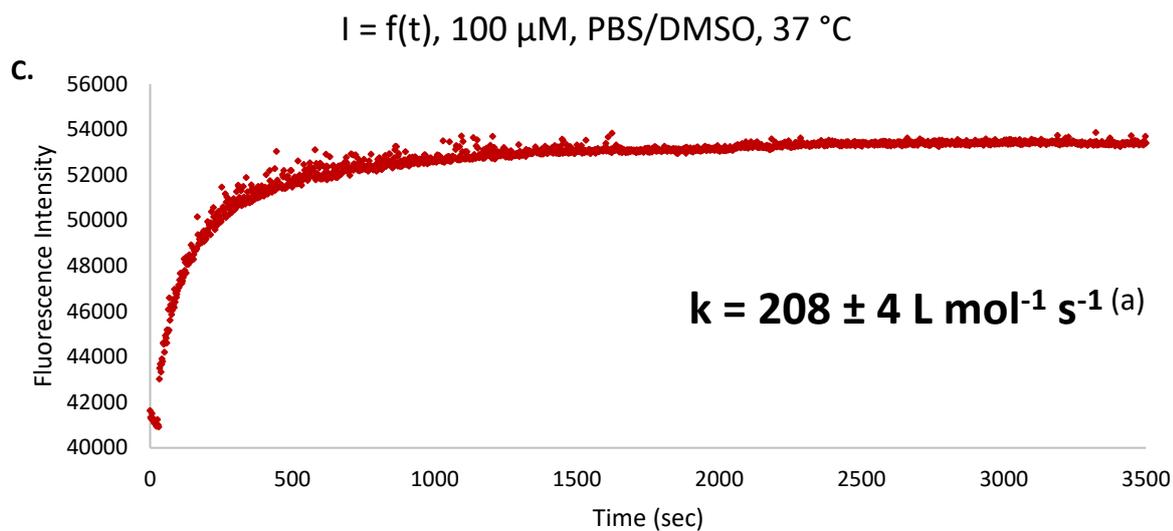
<sup>132</sup> Fluorogenic iminosydnone: bioorthogonal tools for double turn-on click-and-release reactions. Margaux Riomet, Karine Porte, Anne Wijkhuisen, Davide Audisio and Frédéric Taran. *Chem. Commun.* **2020**, 56, 7183 – 7186.

- Probe III-12



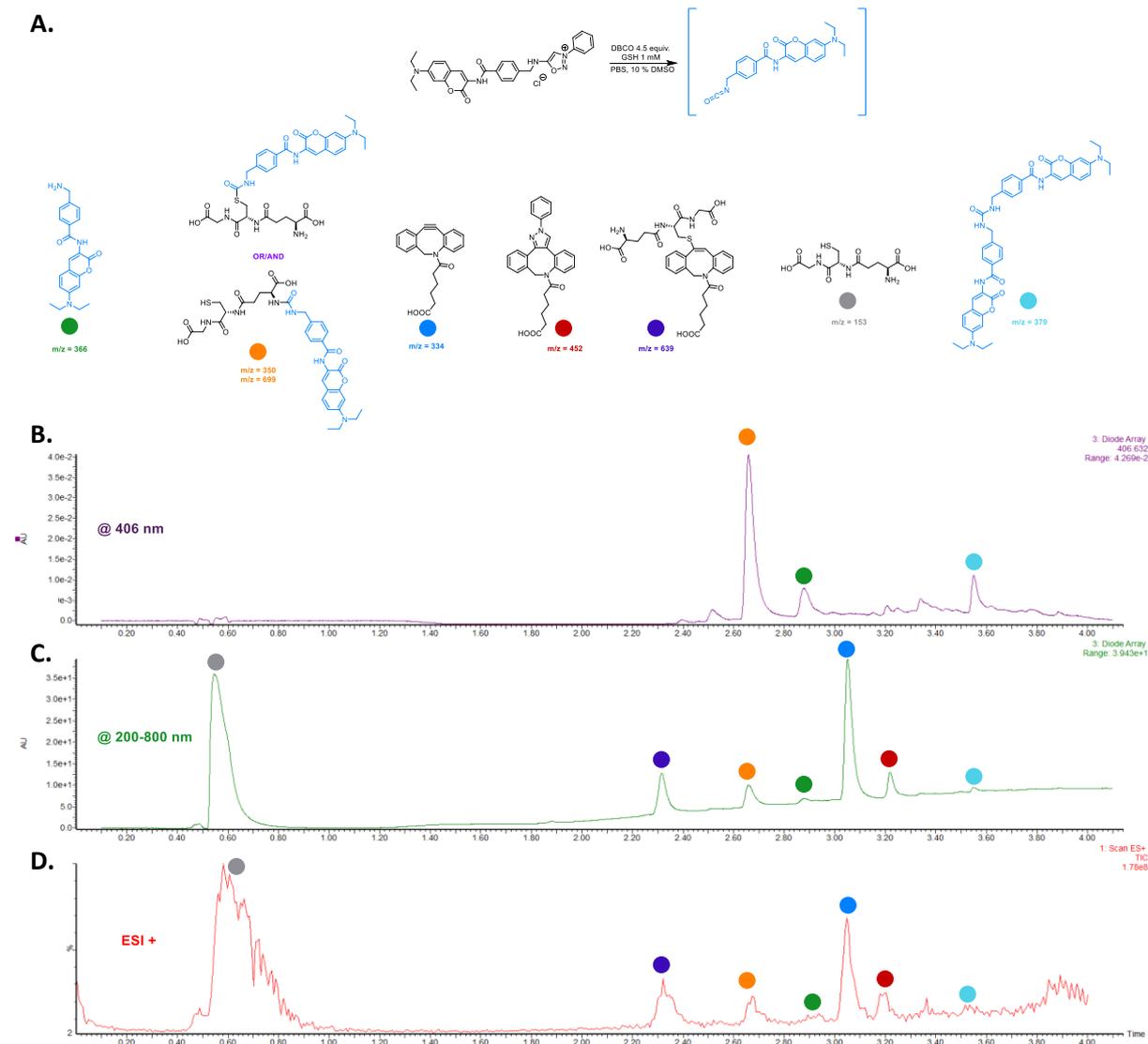
In a quartz cuve equipped with a stirring magnet, PBS (2910  $\mu\text{L}$ ) was added, followed by 30  $\mu\text{L}$  of III-12 (10 mM in DMSO, UV-spectroscopy grade) and 30  $\mu\text{L}$  of GSH (100 mM in PBS). The cuve was thermostated at 37  $^{\circ}\text{C}$  with a water circulating thermostate. First, emission and excitation spectra were recorded ( $\lambda_{\text{ex}} = 411 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 501 \text{ nm}$ ,  $\text{EmBW} = \text{ExBW} = 2.5 \text{ nm}$ ). Then, a kinetic experiment was started after the addition of 30  $\mu\text{L}$  of DBCO (10 mM in UV-spectroscopy DMSO).





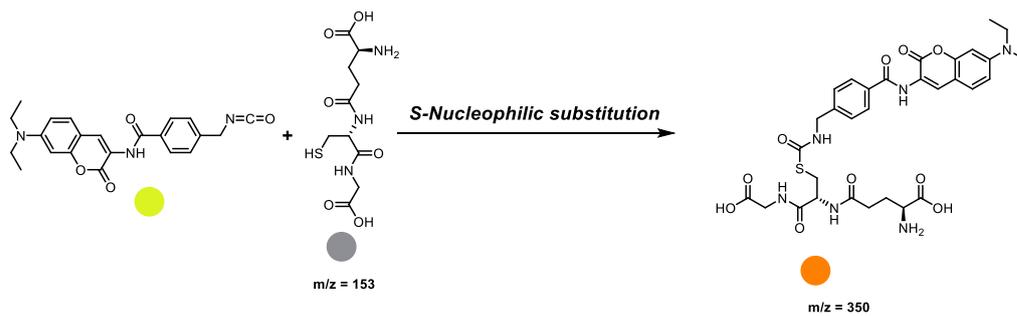
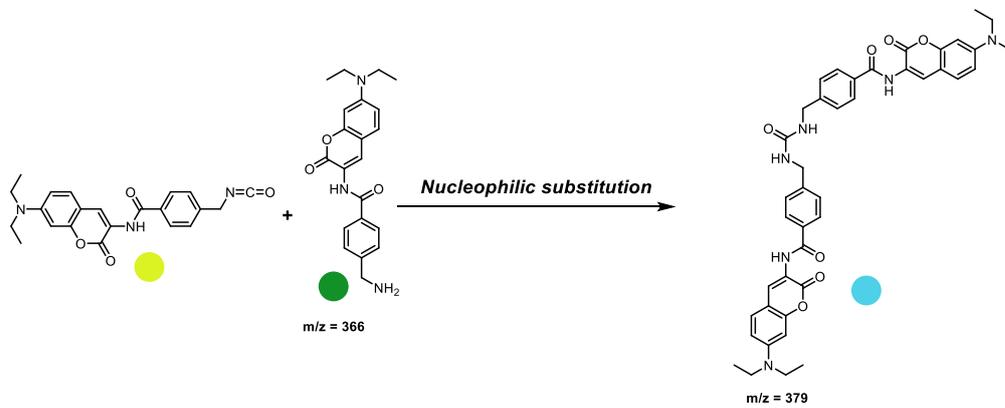
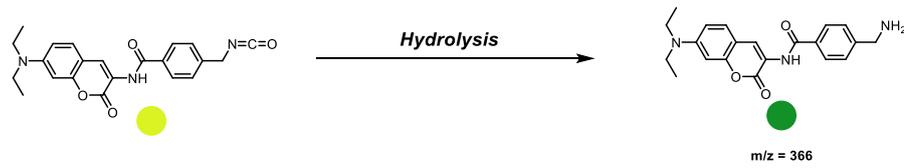
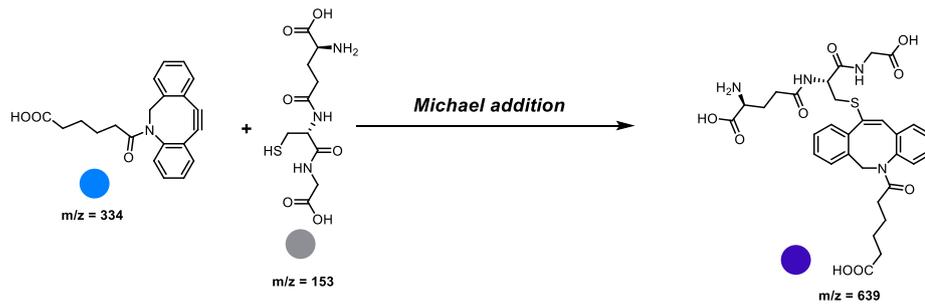
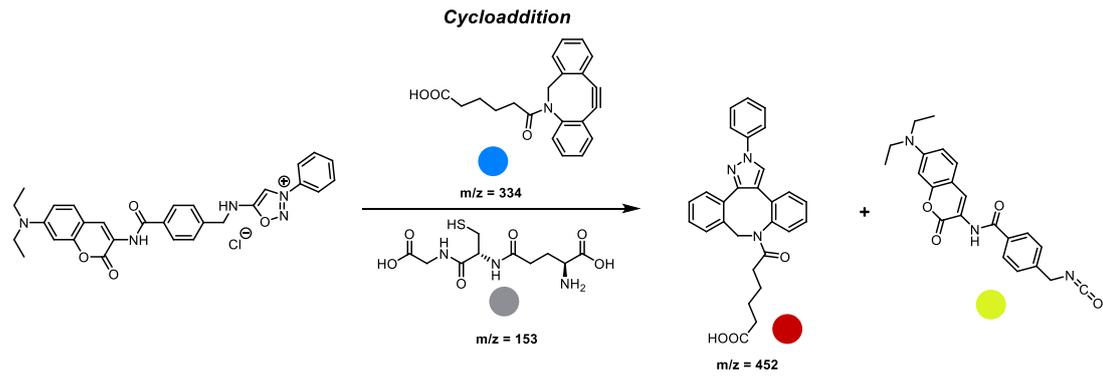
**Figure S17.** (A) Emission as a function of the wavelength of III-12 at 411 nm. (B) Absorbance as a function of the wavelength of III-12. (C) Kinetic experiment (Fluorescence Intensity =  $f(t)$ ) of III-12 at 511 nm. <sup>(a)</sup>  $k = 1/(t_{1/2} * [\text{III-12}])$  with  $t_{1/2}$  the time at fluorescence  $(I_h)/2$ .

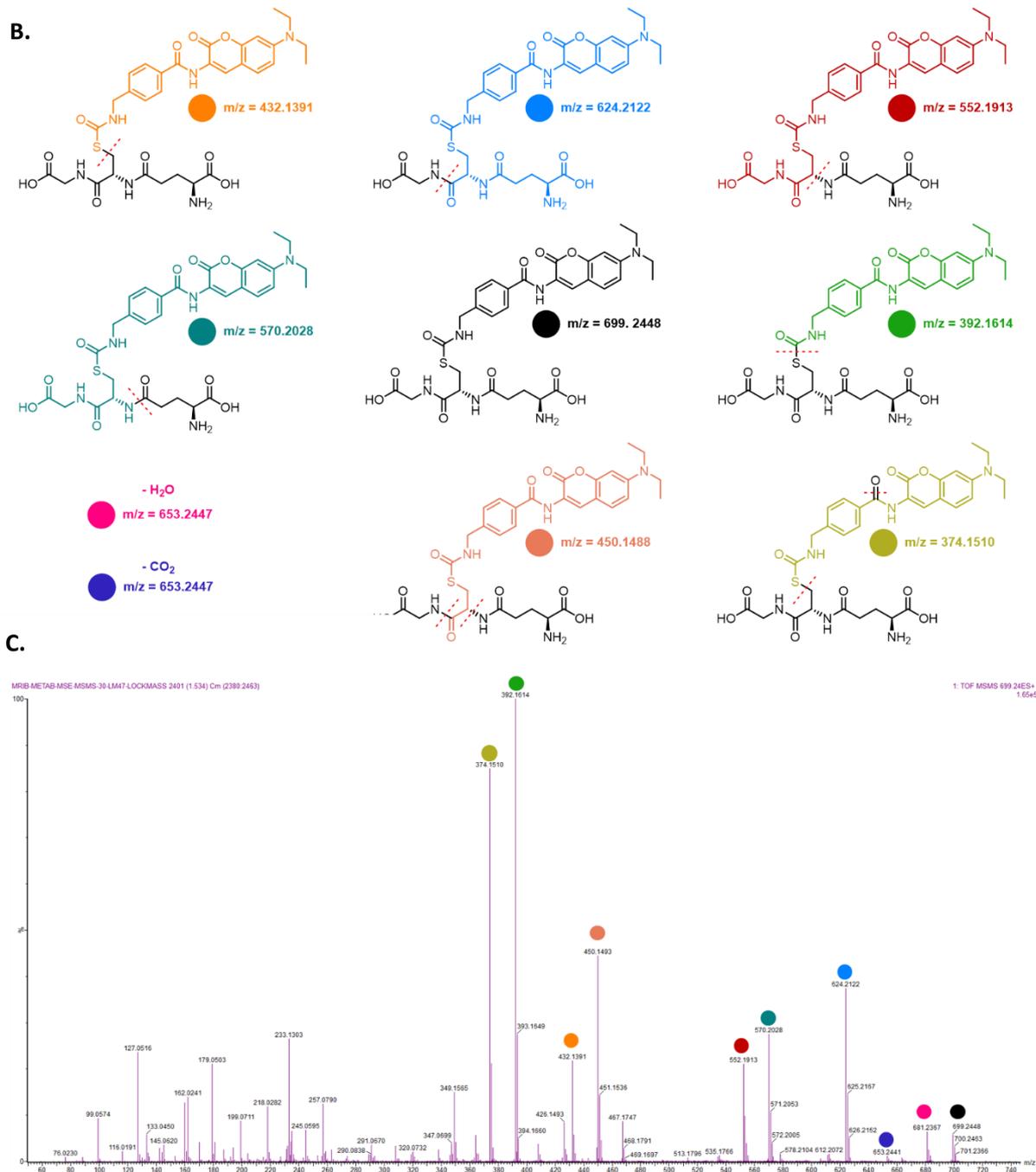
## Reaction with GSH.



**Figure S18.** (A) Scheme of the reaction and structures of all products identified by HRMS. (B) Chromatogram using detection at 406 nm (specific of the DEAC moiety). (C) Max Plot chromatogram using detection in complete UV-Vis range from 200-800 nm. (D) TIC in positive mode

A.





**Figure S19.** (A) Reactions identified by LS/MS. (B) Scheme of all fragmentations of the **GS-III-12** product identified by HRMS. (C) Fragmentation spectrum in HRMS MS/MS of the **GS-III-12** adduct.

#### IV.5.ii Isocyanate trapping with HSA

##### Solution HSA

To a HSA solution (14 mg in 7.0 mL of PBS) were added 92.4  $\mu$ L of DMSO.

**Solution 1** : To a HSA solution (500  $\mu$ L, 2.0 mg/mL in PBS) were added 30,8  $\mu$ L of DMSO. (Incubation : 37  $^{\circ}$ C, 2h)

**Solution 2** : To a HSA solution (500  $\mu$ L, 2.0 mg/mL in PBS) were added 15.4  $\mu$ L of a solution of **III-12** (10 EM, in DMSO, 10 equiv.) followed by 15.4  $\mu$ L of DMSO. (Incubation : 37  $^{\circ}$ C, 2h)

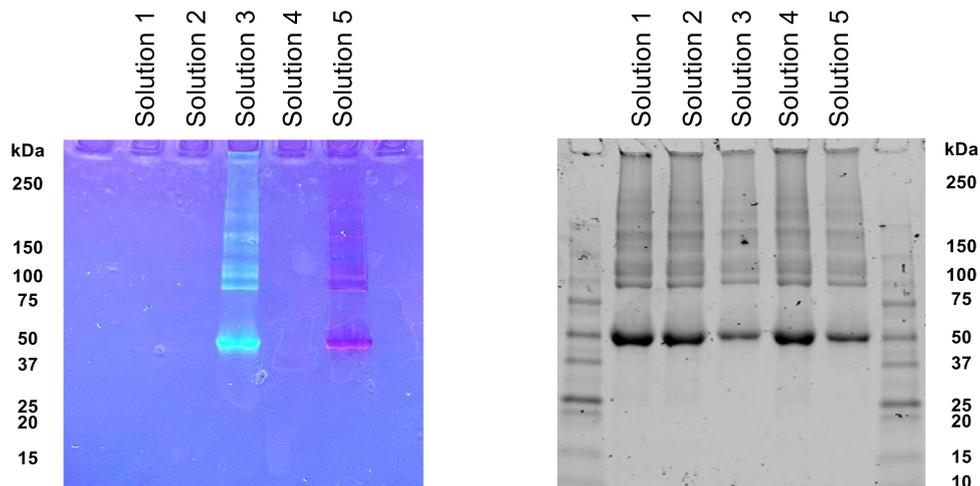
**Solution 3** : To a HSA solution (500  $\mu$ L, 2.0 mg/mL in PBS) were added 15,4  $\mu$ L of a solution of **III-12** (10 EM, in DMSO, 10 equiv.) followed by 15,4  $\mu$ L of DBCO (10 mM in DMSO, 10 equiv.). (Incubation : 37  $^{\circ}$ C, 2h)

**Solution 4** : To a HSA solution (500  $\mu$ L, 2.0 mg/mL in PBS) were added 15,4  $\mu$ L of a solution of **III-5s** (100  $\mu$ M, in DMSO, 10 equiv.) followed by 15.4  $\mu$ L of DMSO. (Incubation : 37  $^{\circ}$ C, 2h)

**Solution 5** : To a HSA-MM solution (500  $\mu$ L, 2.0 mg/mL in PBS) were added 15,4  $\mu$ L of a solution of **III-5s** (10 EM, in DMSO, 10 equiv.) followed by 15,4  $\mu$ L of DBCO (10 mM in DMSO, 10 equiv.). (Incubation : 37  $^{\circ}$ C, 2h)

**Solution 6** : To 500  $\mu$ L of PBS were added 15,4  $\mu$ L of a solution of **III-12** (10 EM, in DMSO, 10 equiv.) followed by 15,4  $\mu$ L of DBCO (10 mM in DMSO, 10 equiv.). (Incubation : 37  $^{\circ}$ C, 2h)

**Solution 7** : To 500  $\mu$ L of PBS were added 15,4  $\mu$ L of a solution of **III-5s** (10 EM, in DMSO, 10 equiv.) followed by 15,4  $\mu$ L of DBCO (10 mM in DMSO, 10 equiv.). (Incubation : 37  $^{\circ}$ C, 2h)



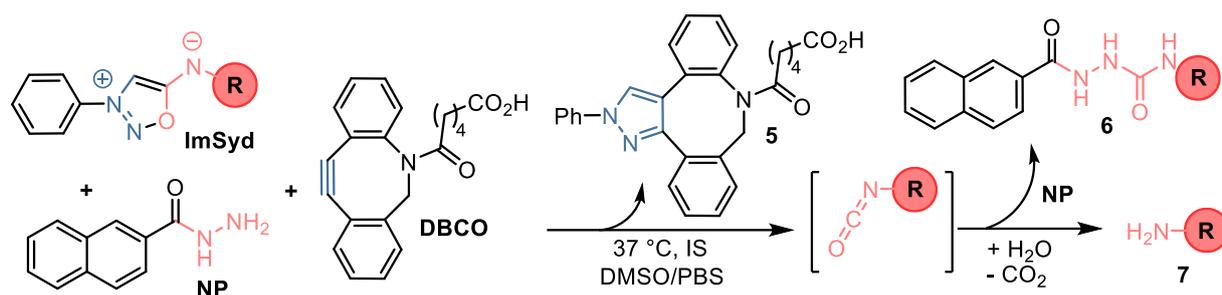
### **Protocol for SDS PAGE**

4x Laemmli Sample buffer (10  $\mu$ L) was added to 90  $\mu$ L of the sample protein. Then, the mixture was loaded (20  $\mu$ g/well) into Bio-Rad mini gels (MINI-Protean TGX, 4-20%) and run with running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3), under 100 volts and 90 mA for 30 min. Then, a picture of the gel was taken under UV light at 312 nm. The staining was performed using a Coomassie blue solution for 3 h and destained with a solution of EtOH/ AcOH/Water 40/50/10 overnight.

### **Protocol for determination of the number of coumarin linked to HSA.**

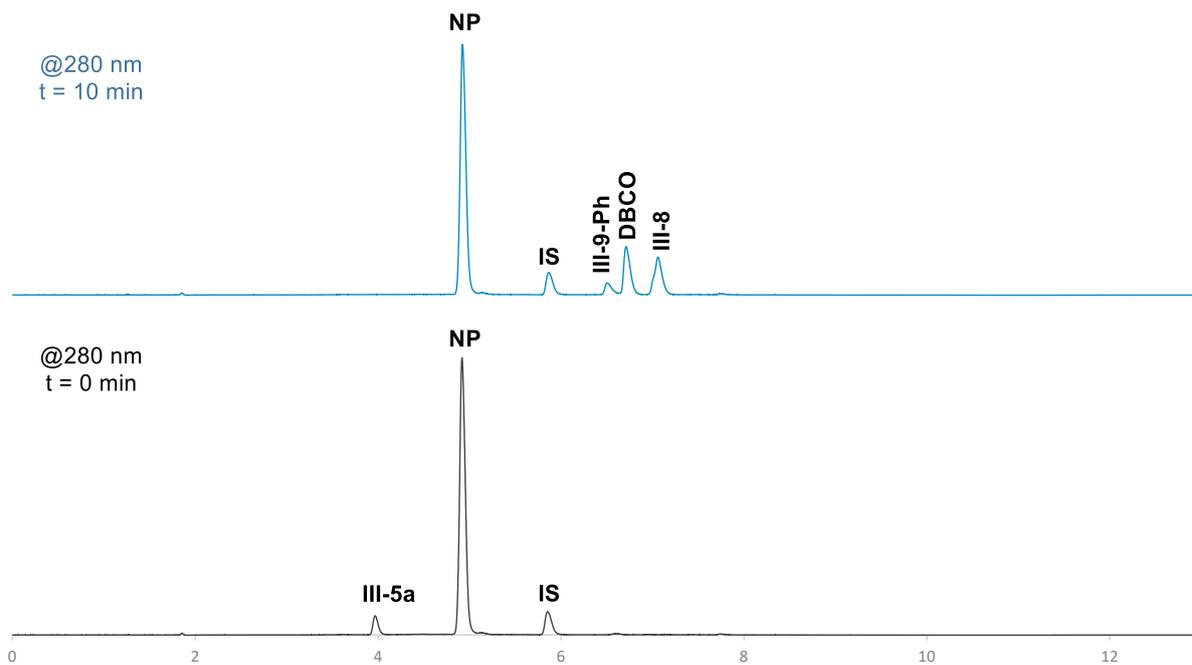
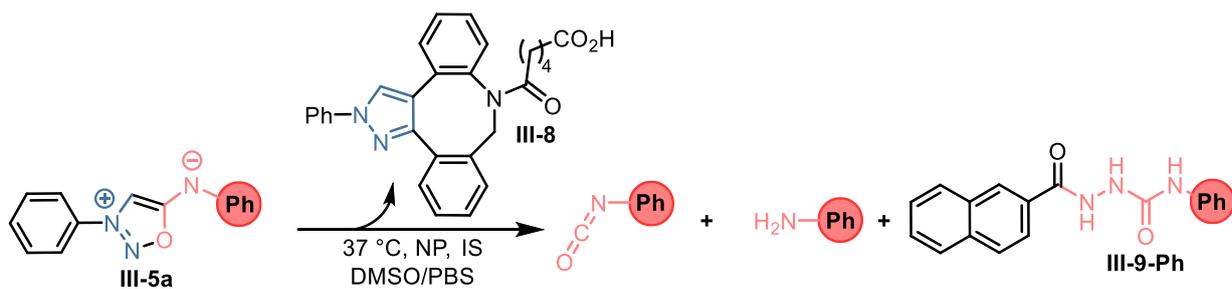
The solution **3** and **5** were purified *via* a minitrap cartridge (500  $\mu$ L loading, 1 mL elution) and the pure proteins quantified by BCA assay. Absorbance at 350 nm for **3** and 411 nm for **5** was determined and the number of coumarin was calculated using the absorbance of solution **6** and **7**.

#### IV.5.iii Isocyanate Trapping with 2-naphthohydrazide NP



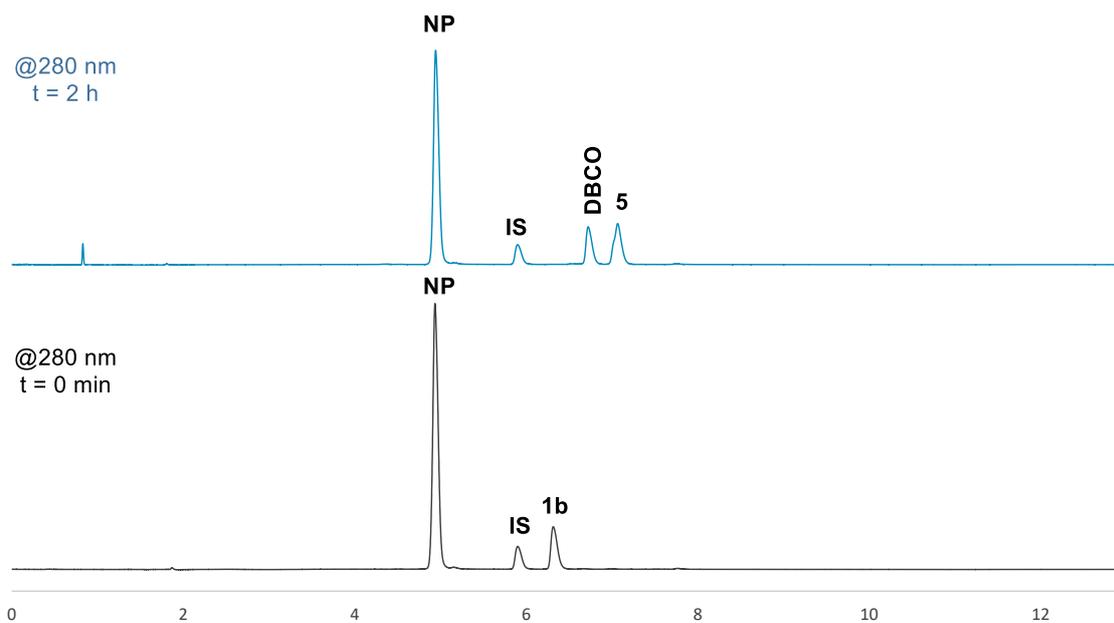
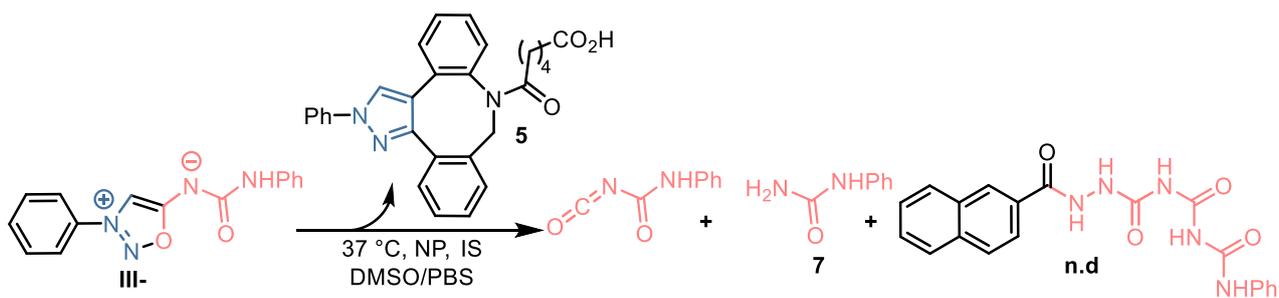
#### General procedure

**ImSyd** (30  $\mu$ L, 10 mM in DMSO, 1.0 equiv.) was added to 788  $\mu$ L of PBS followed by 4-Nitro-2-fluorophenol **IS** (3  $\mu$ L, 100 mM, 1.0 equiv.) and 2-naphthohydrazide **NP** (30  $\mu$ L, 100 mM, 10.0 equiv.). The solution was then completed with 146  $\mu$ L of DMSO. A first injection was made before the addition of **DBCO** (3  $\mu$ L, 150 mM in DMSO, 1.5 equiv.) and the HPLC was recorded after the time indicated on the chromatogram.

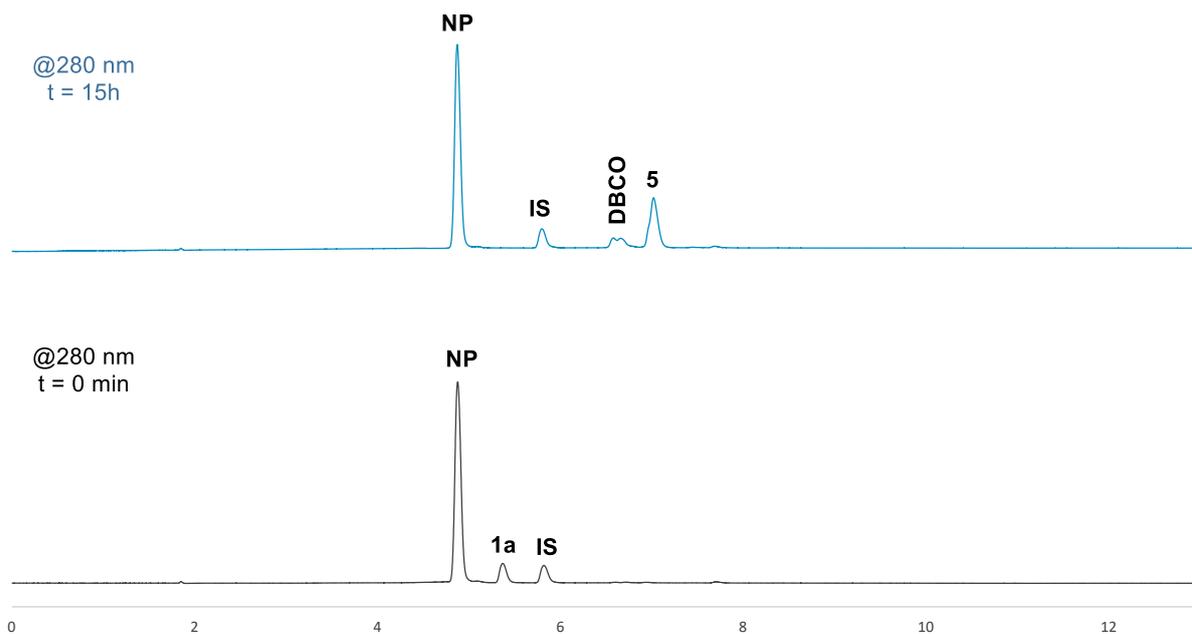
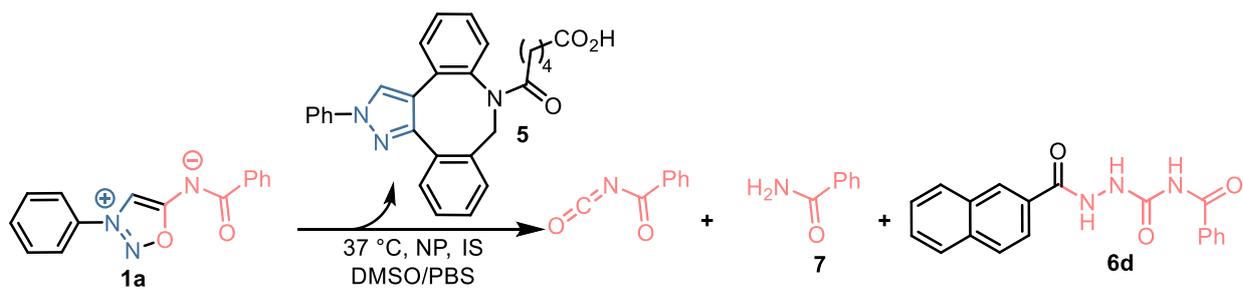


Aniline was observed only by masse at  $m/z$  : 94.10 at 1.27 min.

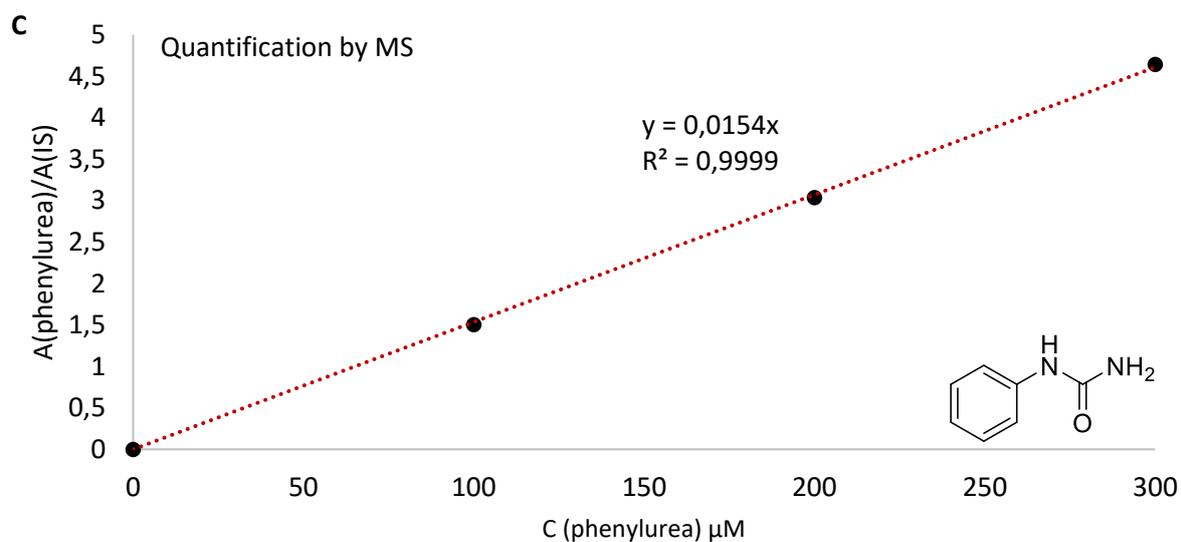
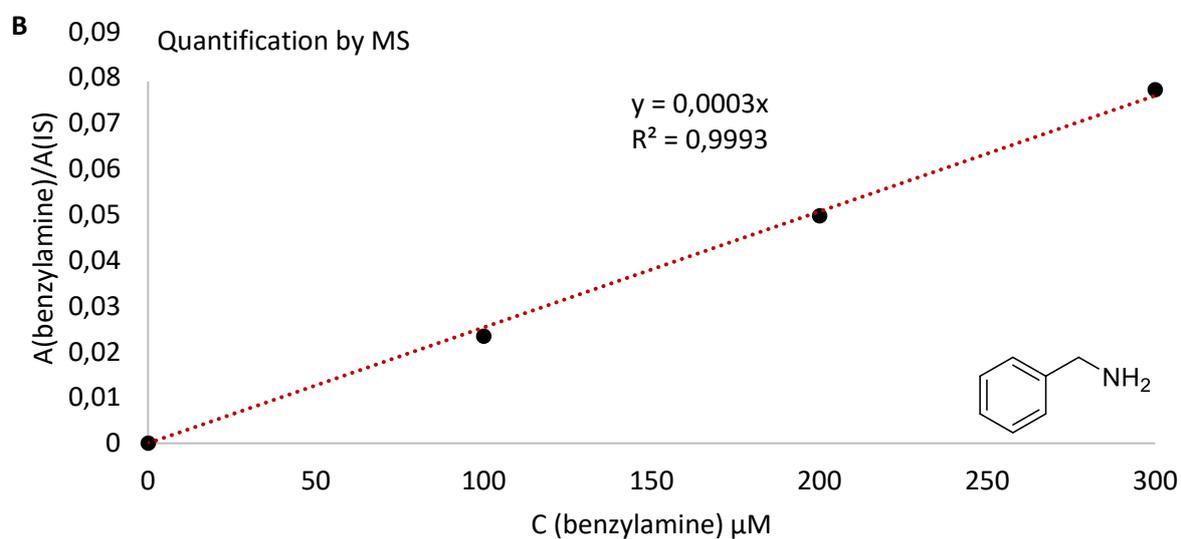
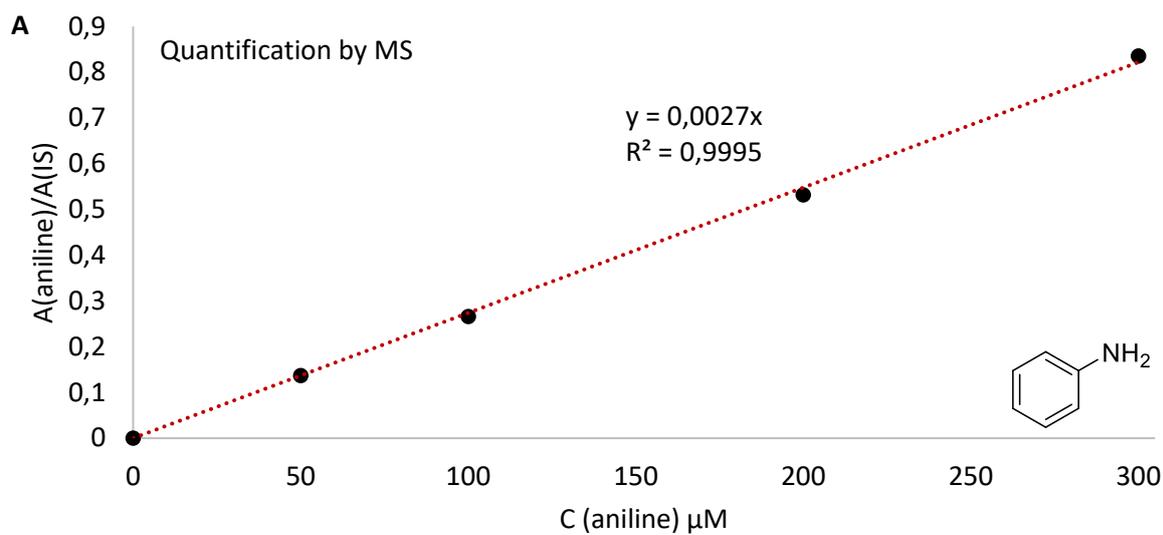


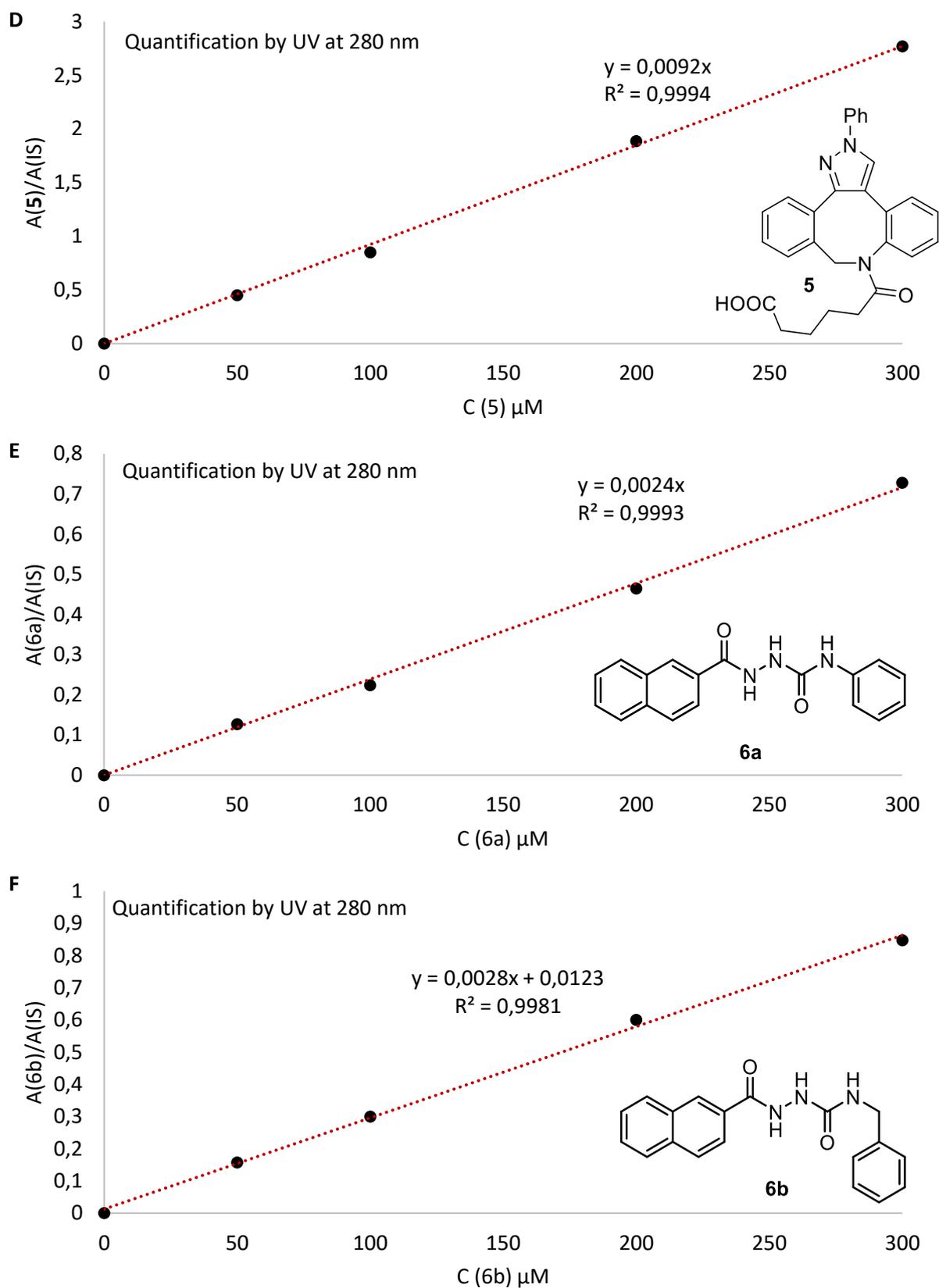


7 was observed only by masse at  $m/z$  : 136.95 at 4.27 min.



**7** was not observed in UV or by MS.





**Figure S20.** Calibration curve of (A) aniline, (B) benzylamine, (C) phenylurea, (D) **5**, (E) **6a**, (F) **6b**

## IV.6 Experiments with cells

### IV.6.i Toxicity assay

#### **A549 cell line:**

A549 cells were cultured in DMEM-Glutamax supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum, Penicillin ( $100 \text{ U mL}^{-1}$ ) and Streptomycin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and maintained in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ .

#### **Cytotoxicity Assessment:**

A549 cells were cultured until they reached approximately 90% confluence before preparing the plates for the cytotoxicity assay. Cells were seeded into the wells of 96-well-plate (Greiner Bio-One, # 655986) at a final density of 7500 cells/well. Plates were then incubated for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  to allow cell adhesion. These conditions were selected to avoid 40-50% confluency after 24h. The tested compound was then diluted in culture medium and immediately layered on top of the culture wells to achieve the indicated final concentrations, the plate was then incubated for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . After 2h, the medium was removed from the wells. DBCO was diluted in culture medium and immediately layered in the wells to reach the final concentrations indicated and the plate were incubated for 48 h at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . After 48 h, cell density should reach 90% confluence in control wells « growth of cells ».

#### **The Alamar Blue assay:**

10  $\mu\text{L}$  of alamarBlue™ cell viability Reagent was added to each well. After 3 h of incubation the fluorescence was recorded (Ex 560 nm, Em 590 nm) using a SpectraMax M5 (Molecular Devices) with the SoftMax Pro software and the result was normalized to% of control. This value was calculated by multiplying the absorbance of a treated well by 100 and dividing it by the average absorbance of a control well, which was considered 100%.

The experiments were performed in triplicate and readings of the cell viability using the Alamar blue assay were performed after 72 h. Moreover, it is important to point out that the whole experiment (in triplicate) has been repeated twice within one-week interval in order to confirm the reproducibility of the observations made.

#### IV.6.ii Imaging and Fishing experiments

##### **Cell culture**

Cell lines were obtained from the American type Culture Collection (Rockville, USA) and were cultured according to the supplier's instructions. A459 cells were grown in RPMI 1640 containing 10% FCS and 1% glutamine. HEK293 were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and were split every 3 or 4 days at a time when enough confluence was obtained. They were tested for mycoplasma before setting 8 wells plates for fluorescence imaging.

##### **Cell uptake and protein extraction experiments**

48 h after seeding, HEK-293 cells were treated for 3 hours in complete DMEM containing either 100 μM iminosydnone or DMSO as control. After a PBS wash, the medium was replaced by complete DMEM supplemented with either 200 μM DBCO, or DMSO as control and cells were incubated for an additional 3 hours.

For pre-incubation experiments, 100 μM iminosydnone and 200 μM DBCO were pre-mixed in an Eppendorf tube for 20 minutes to allow formation of **8** and this solution was added on cells in fresh medium for 3 hours.

After incubation, cells were washed with PBS and total protein extracts were obtained by lysing the cells in a buffer composed of 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.1% SDS, plus anti-proteases.

##### **Protocol for SDS PAGE**

4x Laemmli Sample buffer (10 μL) was added to 90 μL of the cell lysate. Then, the mixture was loaded (60 μg/well) into Bio-Rad mini gels (MINI-Protean TGX, 4-20%) and run with running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3), under 100 volts and 90 mA for 30 min. Then, a picture of the gel was taken under UV light at 312 nm. The staining was performed using a Coomassie blue solution for 3 h and destain with a EtOH/AcOH/Water 40/50/10) solution overnight.

##### **Fluorescence imaging with coumarin based probes:**

An Ibidi® μ-Slide 8 Well high Glass Bottom plate was seeded with 10 000 cells/well and then maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 h to 48 h. After adequate confluence was obtained, the medium was removed and replaced by a solution of coumarin based probe at 10 μM in the appropriate medium, prepared from a stock solution of fluorophore in DMSO, final concentration of DMSO = 1.0%, please note that no solubility issue was observed. The cells were incubated for 3h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The fluorescent probe solution was then removed and the cells were washed twice with pre-warmed PBS (1X). Finally, an appropriate medium was added before imaging.

For "in cell" isocyanate formation, after incubation with the coumarin based probe and PBS washing steps, a 50 μM DBCO solution prepared from a 5 mM stock solution of fluorophore in DMSO (final concentration of DMSO = 1.0%) was added. The cells were incubated for 3 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The DBCO solution was then removed and the cells were washed once with pre-warmed PBS (1X). Finally, an appropriate medium was added before imaging.

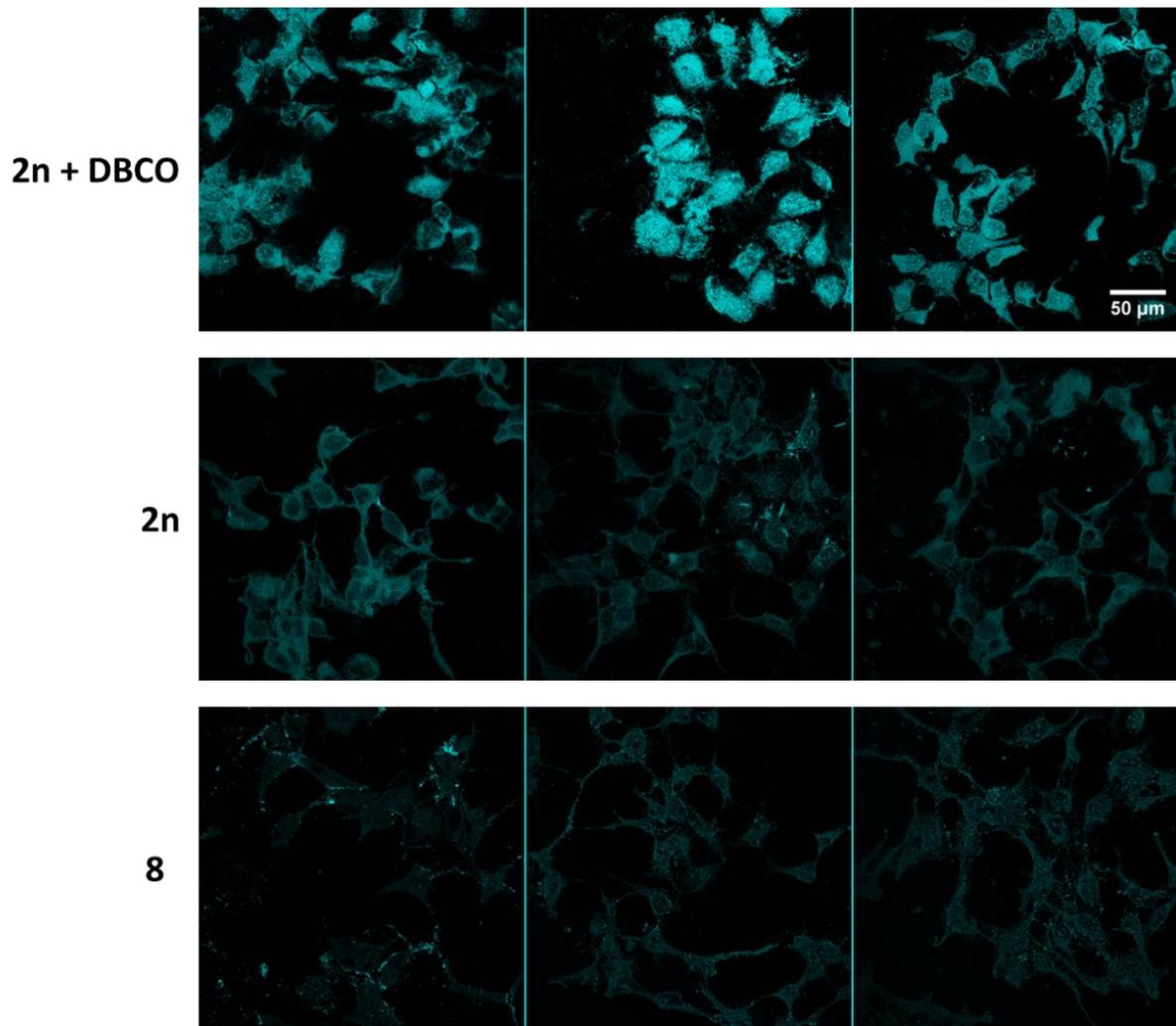
### **Colocalization experiments:**

*LisoView™488, MitoView™ Green and NucSpot® live 650 were purchased from Biotium.*

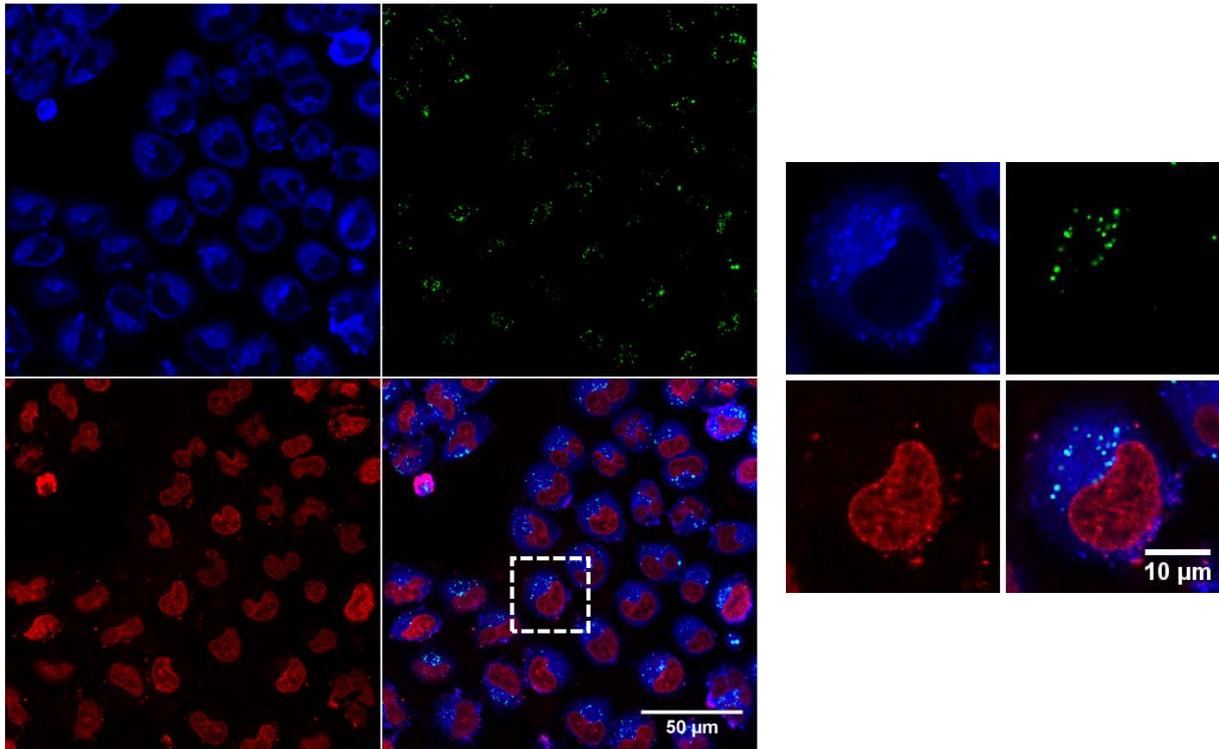
- *Protocol for MitoView™ Green staining:* After 3 h of incubation with the coumarin-based probe **III-12**, the medium was removed and cells were washed once with pre-warmed PBS (1X). A 100 nM MitoView™ Green solution in appropriate medium was then added, and cells were incubated for 15 minutes at 37 °C. The medium was removed, cells were washed once with pre-warmed PBS (1X) then appropriate medium was added before imaging.
- *Protocol for LysoView™ 488 staining:* After 3 h of incubation with coumarin-based probe **III-12**, the medium was removed and cells were washed once with pre-warmed PBS (1X). A 1X LysoView™ 488 solution in an appropriate medium was obtained by dilution of the commercial 1000X solution in DMSO and added to the cells. They were incubated for 30 minutes at 37°C. The medium was removed, cells were washed once with pre-warmed PBS (1X) then appropriate medium or a nucleus staining medium solution was added before imaging
- *Protocol for NucSpot® live 650 staining:* when nucleus staining was needed, the 1X nucleus staining agent solution was obtained by dilution of the commercial 1000X solution in DMSO supplemented with 50 nM of Verapamil. This solution was added to the cells that were then incubated for 30 minutes at 37 °C. The imaging experiments were then directly conducted without washing step.

### **Confocal microscopy Imaging:**

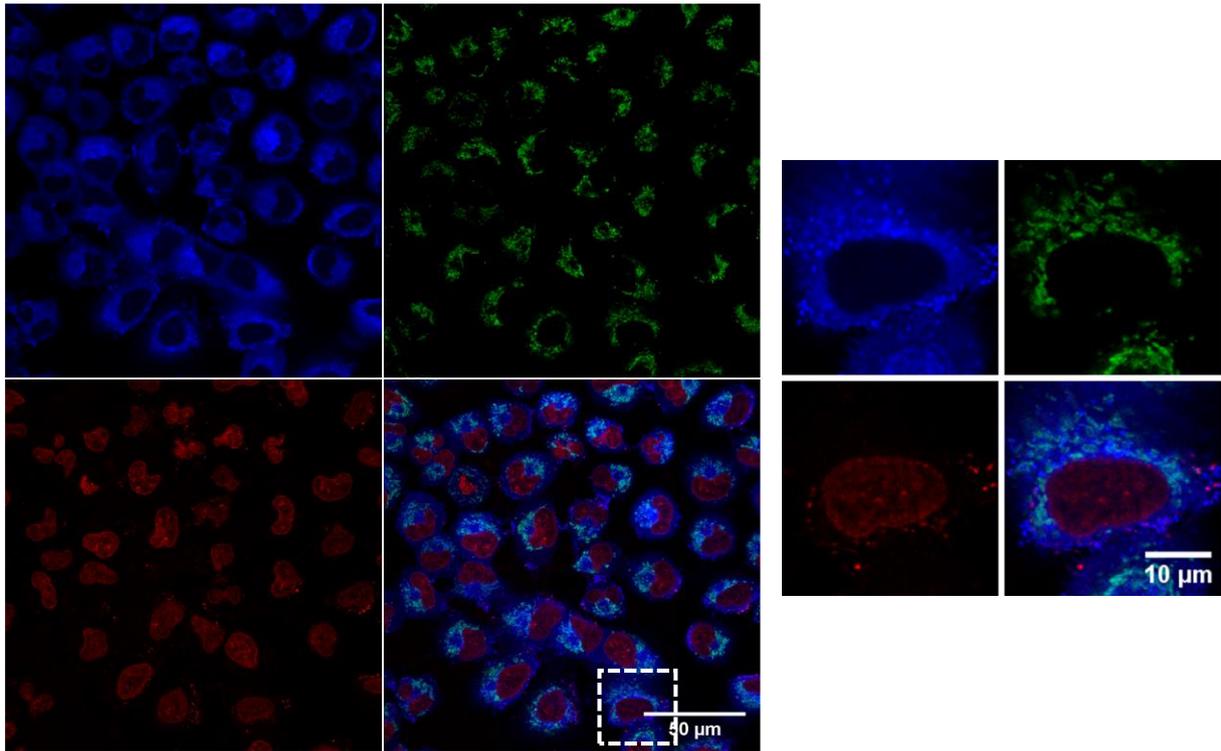
Fluorescence images were acquired using a Leica SP8-X inverted confocal microscope with a 63x PLAN APO oil immersion + DIC (NA: 1.4) (Leica). Excitation was performed using a 440 nm pulsed laser 40 MHz and/or a Metal Halide Fluorescent Lamp (120 W, Leica) set with appropriate excitation wavelength. Detection was performed by using PMT detector (Hamamatsu 6357) collecting photons in the appropriate frame depending on the observed probe.



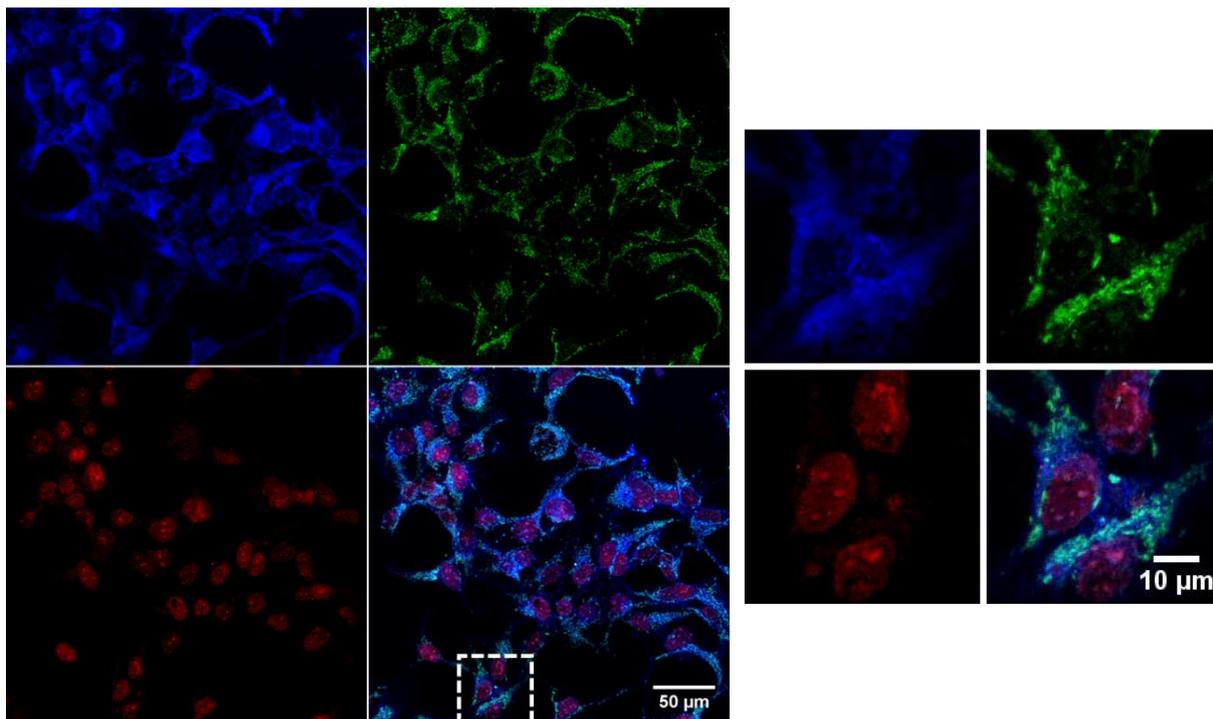
**Figure S21.** Confocal experiments with coumarin-based probes on HEK-293 live cells. Excitation was performed using 440 nm pulsed laser 40 MHz and photons collected with  $\lambda_{Em}$  frame from 460 to 550 nm. Laser power and detection setting were kept constant. Top panel: Formation of isocyanate in cell. Middle panel: Probe III-12. Bottom panel: direct use of isocyanate formed extracellulo beforehand by reaction between III-12 and DBCO.



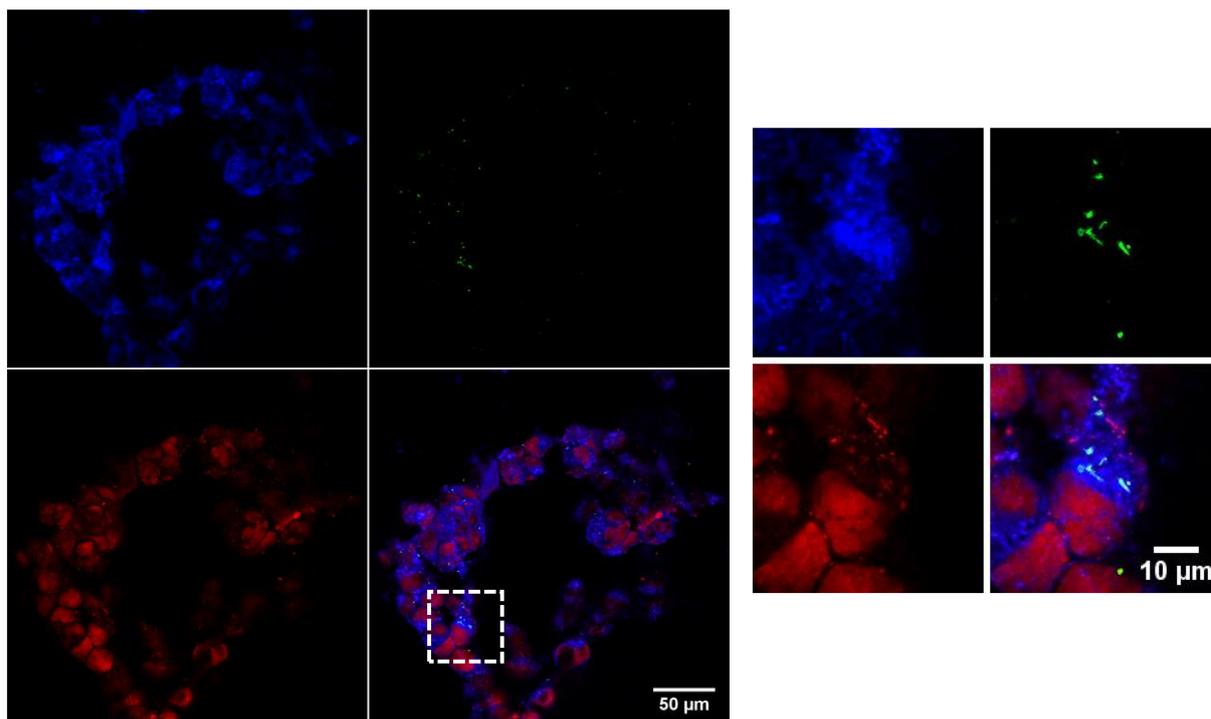
**Figure S22.** Colocalization experiments with probe **III-12** (10  $\mu$ M) and LysoView™ 488 on A549 live cells. Top left blue panel: probe **III-12** ( $\lambda_{Exc}$  440 nm,  $\lambda_{Em}$ : 460 to 500 nm). Top right green panel: LysoView™ 488 ( $\lambda_{Exc}$  490 nm,  $\lambda_{Em}$ : 525 to 575 nm). Bottom left panel: NucSpot® Live 650 ( $\lambda_{Exc}$  650 nm,  $\lambda_{Em}$ : 670 to 750 nm). Bottom right panel: Merge



**Figure S23.** Colocalization experiments with probe **III-12** (10  $\mu$ M) and MitoView™ 488 on A549 live cells. Top left blue panel: probe **III-12** ( $\lambda_{\text{Exc}}$  440 nm,  $\lambda_{\text{Em}}$ : 460 to 500 nm). Top right green panel: MitoView™ 488 ( $\lambda_{\text{Exc}}$  490 nm,  $\lambda_{\text{Em}}$ : 525 to 575 nm). Bottom left panel: NucSpot® Live 650 ( $\lambda_{\text{Exc}}$  650 nm,  $\lambda_{\text{Em}}$ : 670 to 750 nm). Bottom right panel: Merge



**Figure S24.** Colocalization experiments with probe **III-12** (10  $\mu$ M) and MitoView<sup>TM</sup> Green on HEK293 live cells. Top left blue panel: probe **III-12** ( $\lambda_{Exc}$  440 nm,  $\lambda_{Em}$ : 460 to 500 nm). Top right green panel: MitoView<sup>TM</sup> Green ( $\lambda_{Exc}$  490 nm,  $\lambda_{Em}$ : 525 to 575 nm). Bottom left panel: NucSpot<sup>®</sup> Live 650 ( $\lambda_{Exc}$  650 nm,  $\lambda_{Em}$ : 670 to 750 nm). Bottom right panel: Merge

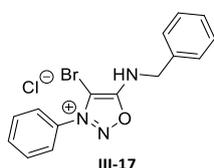


**Figure S25.** Colocalization experiments with probe **III-12** (10  $\mu$ M) and LysoView™ 488 on HEK293 live cells. Top left blue panel: probe **III-12** ( $\lambda_{Exc}$  440 nm,  $\lambda_{Em}$ : 460 to 500 nm). Top right green panel: MitoView™ 488 ( $\lambda_{Exc}$  490 nm,  $\lambda_{Em}$ : 525 to 575 nm). Bottom left panel: NucSpot® Live 650 ( $\lambda_{Exc}$  650 nm,  $\lambda_{Em}$ : 670 to 750 nm). Bottom right panel: Merge

## IV.7 Post-functionalization of N-6-Alkyl/Aryl-iminosydnones.

### IV.7.i Analytical data

#### 5-(benzylamino)-4-bromo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – III-17



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>BrClN<sub>3</sub>O  
MW: 366.64 g mol<sup>-1</sup>  
Off-white solid  
80%

The compound **III-2a** (50 mg, 0.174 mmol, 1 equiv.) was solubilized in dry DCM (3 mL). The mixture was cooled to 0 °C and NBS (31 mg, 0.174 mmol, 1.0 equiv.) was added. The reaction was complete after 30 minutes. The product **III-17** was obtained by precipitation in Et<sub>2</sub>O (50 mg, 0.140 mmol, 80 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 13.5 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.93-7.79 (m, 1H), 7.75-7.65 (m, 6H), 7.42-7.33 (m, 3H), 4.82 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 166.1, 135.4, 134.1, 131.6, 130.8 (2C), 129.2 (2C), 129.1 (2C), 128.6, 125.2 (2C), 89.5, 47.5.

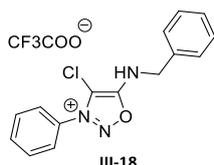
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2987, 1674, 1495, 1454, 1259, 1077, 732, 690.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-Cl]<sup>+</sup> 330.

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 330.0245; found 330.0242

**Mp:** 176 – 177 °C

#### 5-(benzylamino)-4-chloro-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – III-18



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>ClN<sub>3</sub>O  
MW: 399.05  
Off-white solid  
11%

The compound **III-2a** (50 mg, 0.174 mmol, 1.0 equiv.) was solubilized in dry DCM (3 mL). The mixture was cooled to 0 °C and NIS (39 mg, 0.174 mmol, 1.0 equiv.) was added. The reaction was stopped after 2 hours. The product **III-18** was obtained by purification purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.90-7.68 (m, 1H), 7.70-7.68 (m, 6H), 7.40-7.33 (m, 3H), 4.81 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H)

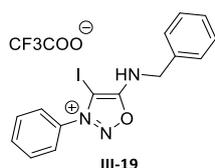
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** Not stable enough for a <sup>13</sup>C NMR

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.17.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 286.

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 286.0747; found 286.0750

## 5-(benzylamino)-4-iodo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – III-19



C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 491.20  
 Off-white sticky solid  
 80%

The compound **III-2a** (50 mg, 0.174 mmol, 1.0 equiv.) was solubilized in AcOH (1 mL). The mixture was cooled to 0 °C and NIS (78 mg, 0.174 mmol, 2.0 equiv.) was added. The reaction was complete after 5 hours. The product **III-19** was obtained by purification purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.32 – 7.23 (m, 3H), 4.65 (s, 2H), NH unobserved.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 170.3, 134.8, 134.0, 132.8, 130.7 (2C), 129.1 (2C), 128.8, 128.7 (2C), 125.4 (2C), 77.4, 47.9. Carbone CF<sub>3</sub>COO not observed

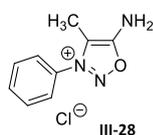
<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): -77.18.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3065, 1654, 1197, 133, 1012.

LCMS (ESI) *m/z*: [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 378.

HRMS (ESI): calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 378.0106; found 378.0103

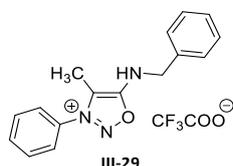
## 5-amino-4-methyl-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride – III-28



C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O  
 MW: 366.64 g mol<sup>-1</sup>  
 Yellow solid  
 72 %

This compound was synthesis as describe in the literature.<sup>133</sup>

## 5-(benzylamino)-4-methyl-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate – III-29



C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 379.11  
 Off-white solid  
 31 %

Starting from the iminosydnone salt **III-28** using general procedure A, the compound **III-29** was obtained in 31% yield by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour and half).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 7,87 (brs, 1H), 7,87-7,79 (m, 3H), 7,53-7,51 (m, 2H), 7,47-7,43 (m, 2H), 7,38-7,32 (m, 1H), 7,27 (brs, 1H), 7,81 (s, 2H), 2,33 (s, 3H), NH unobserved.

<sup>133</sup> V. G. Yashunskii and V. V. Ogorodnikova, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 17/3 (1981), 203–13.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** 167.8, 161.4 (m, Carbonyl CF<sub>3</sub>COO), 137.0, 134.6, 132.9, 131.7 (2C), 130.1 (2C), 129.5, 129.2 (2C), 126.4 (2C), 115.4 (q, *J* = 287 Hz, CF<sub>3</sub> CF<sub>3</sub>COO), 113.01, 48.7, 7.79.

**<sup>19</sup>F NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm):** -77.14.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3066, 2918, 1663, 1490, 1455, 1197, 1133, 798.

**LCMS (ESI) *m/z*:** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> 266.

**HRMS (ESI):** calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 266.1293; found 266.1295

#### IV.7.ii Kinetics

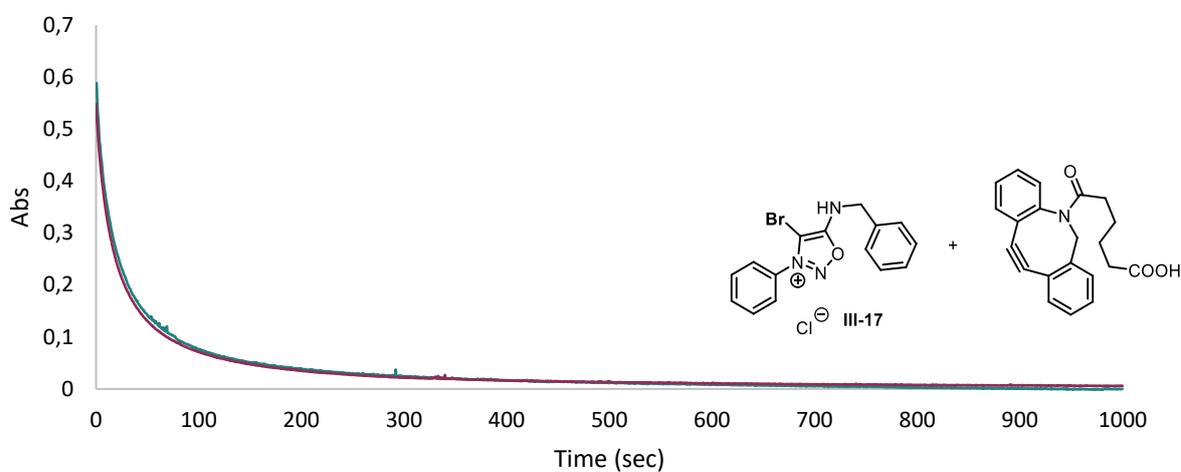
Procedure in IV.4 page 223

**Table S12.** Results of the calibration curves for compounds **III-17**, **III-18**, **III-19** and **III-29** in PBS

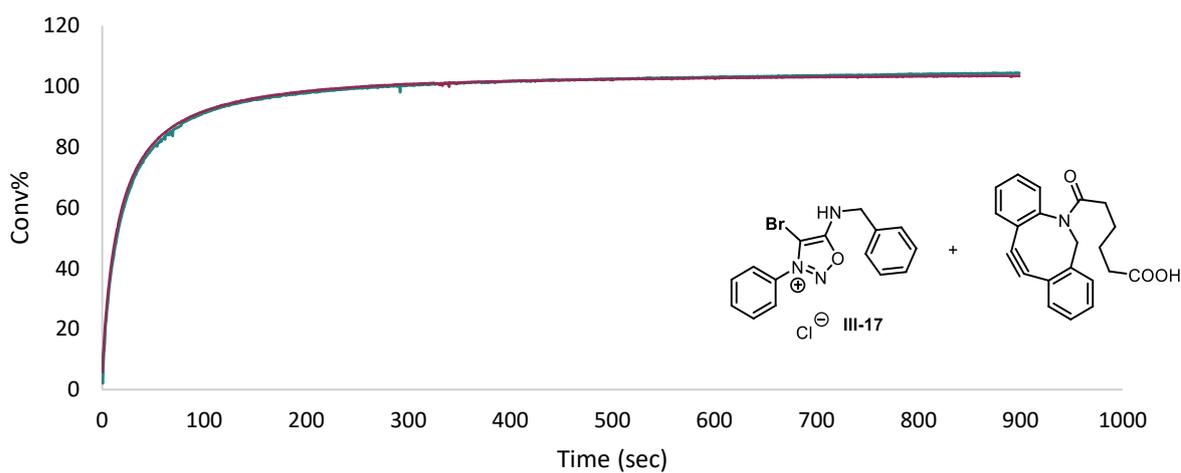
	<b>III-17</b>	<b>III-18</b>	<b>III-19</b>	<b>III-29</b>
Wave-length	336 nm	335 nm	338nm	320 nm
Calibration curve	A = 4704C	A = 1515C	A = 5174C	A = 7249C

IV.7.iii Graphs

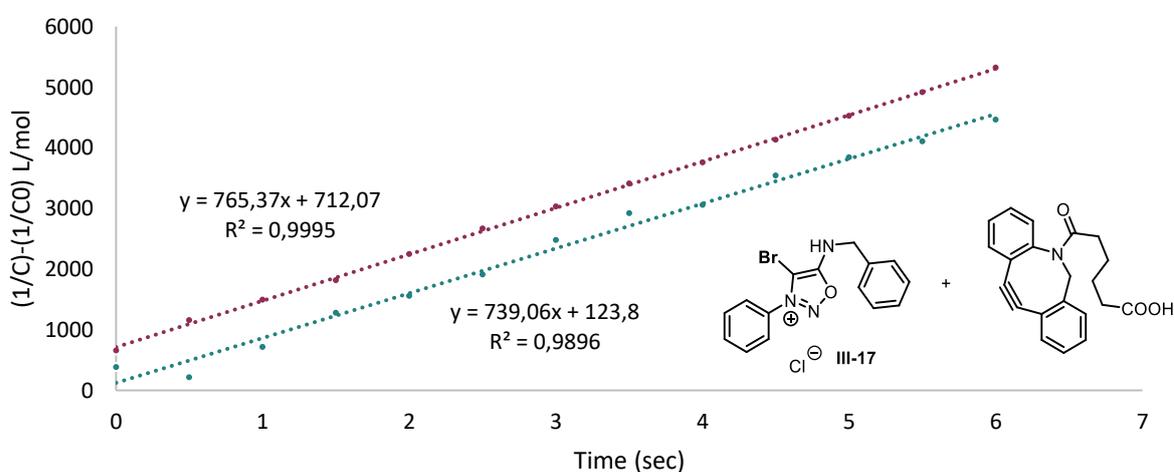
Abs = f(t), n = 2, @100 μM, 37 °C, pH = 7.4



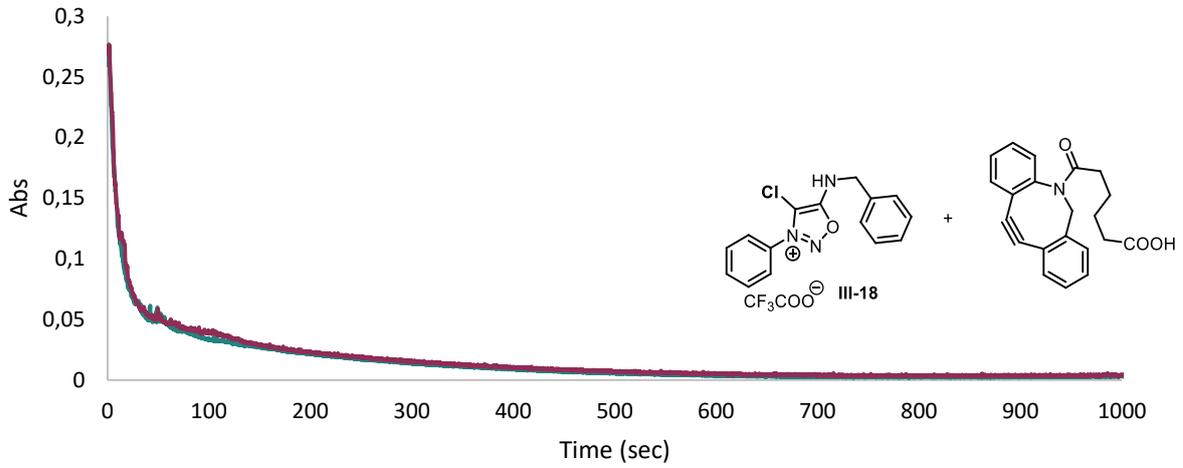
Conv% = f(t), n = 2, @100 μM, 37 °C, pH = 7.4



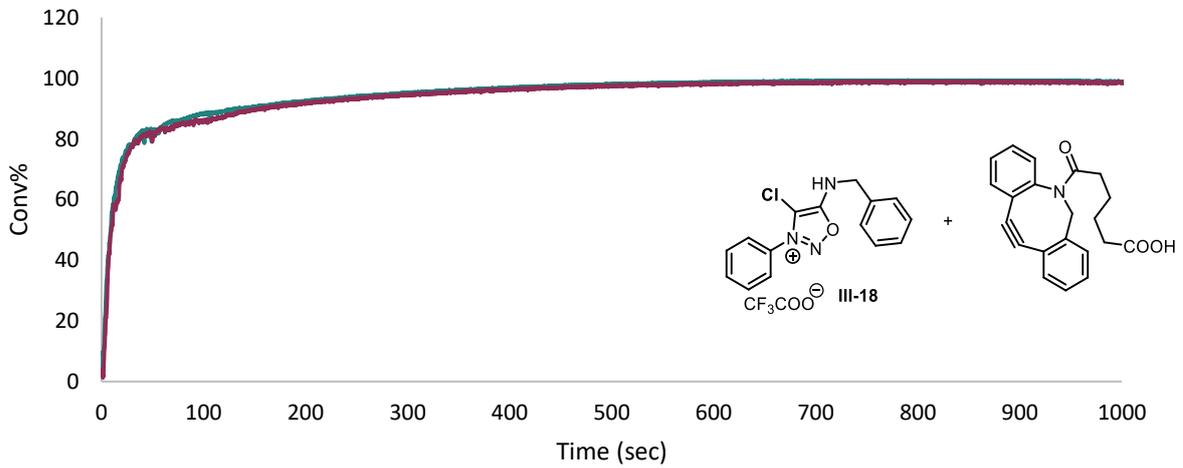
(1/C)-(1/C0) = f(t), n = 2, @100 μM, 37 °C, pH = 7.4



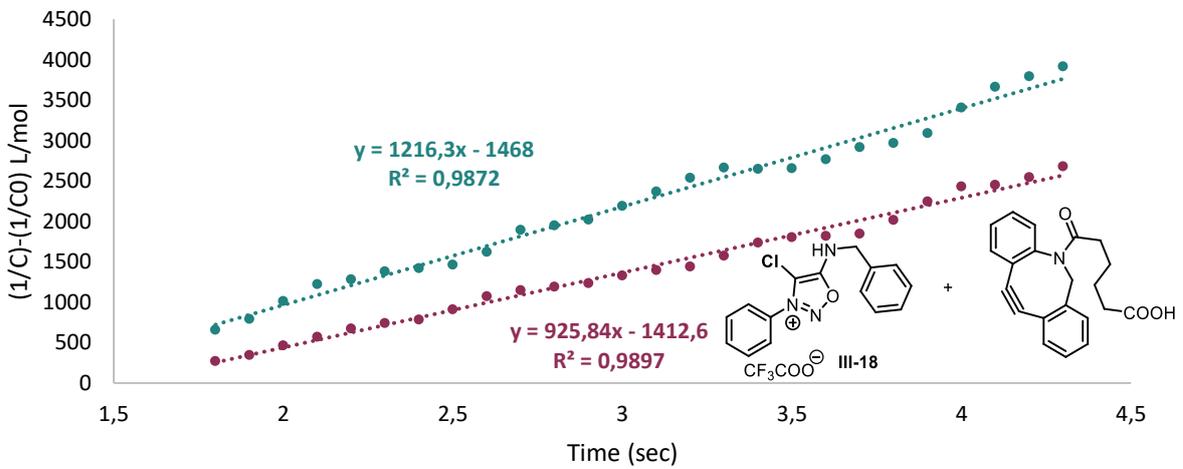
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



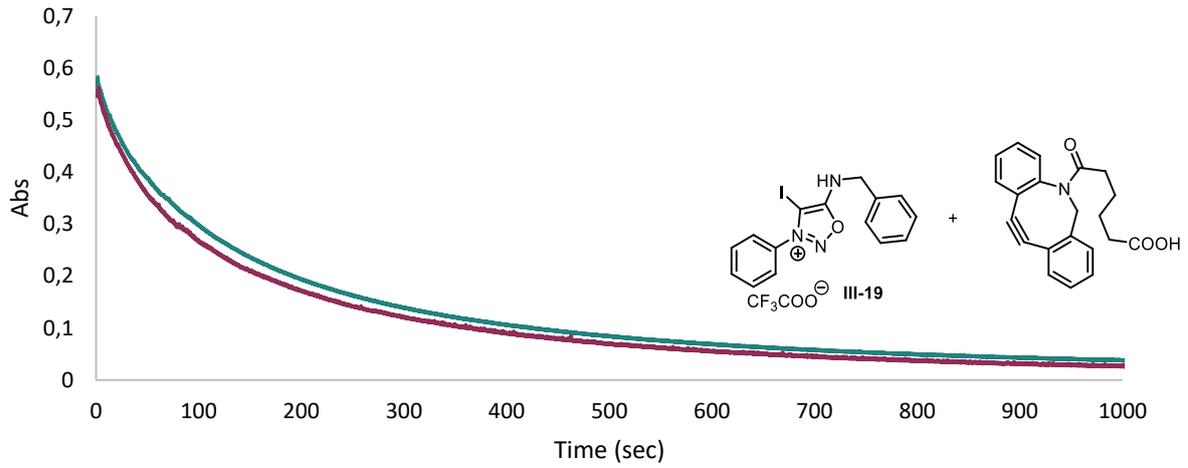
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



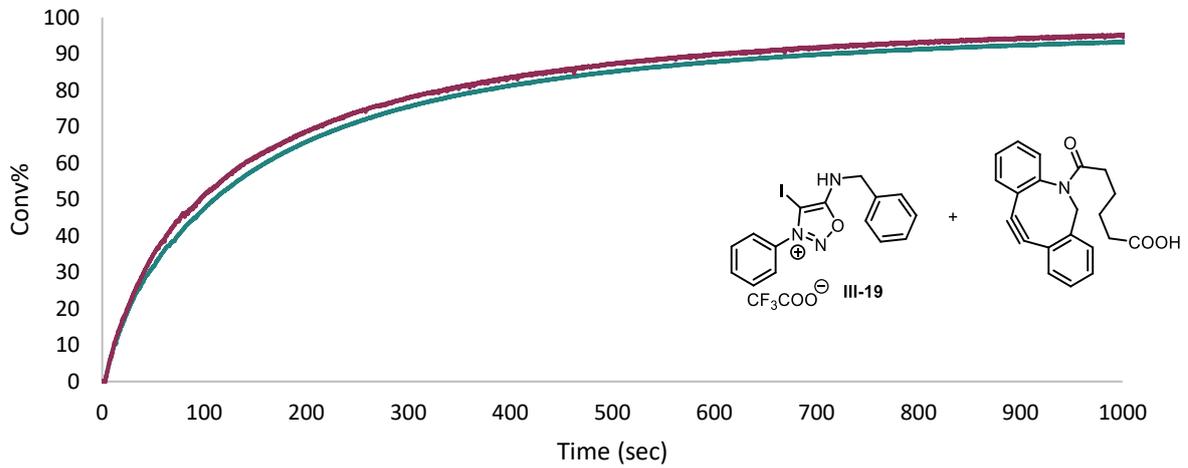
(1/C)-(1/C0) = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



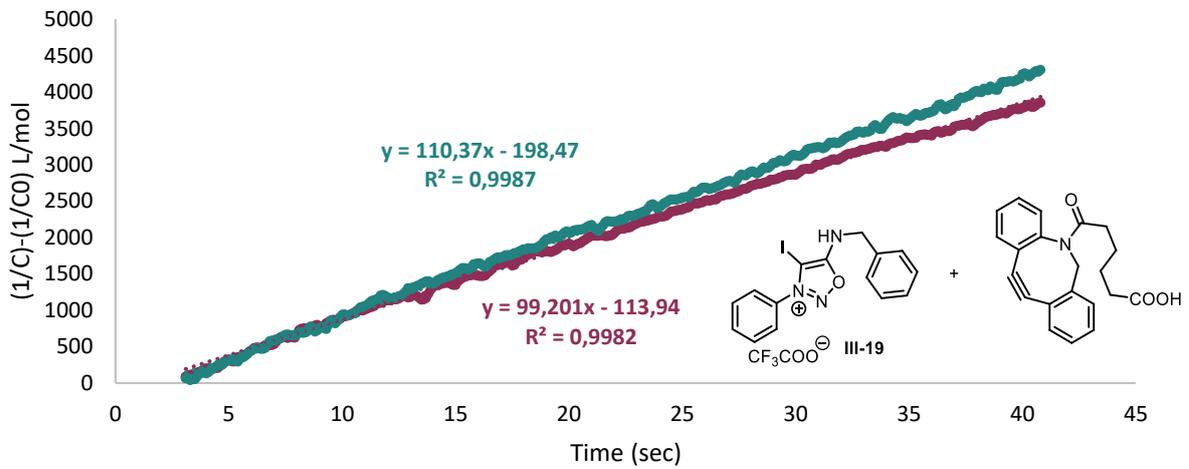
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



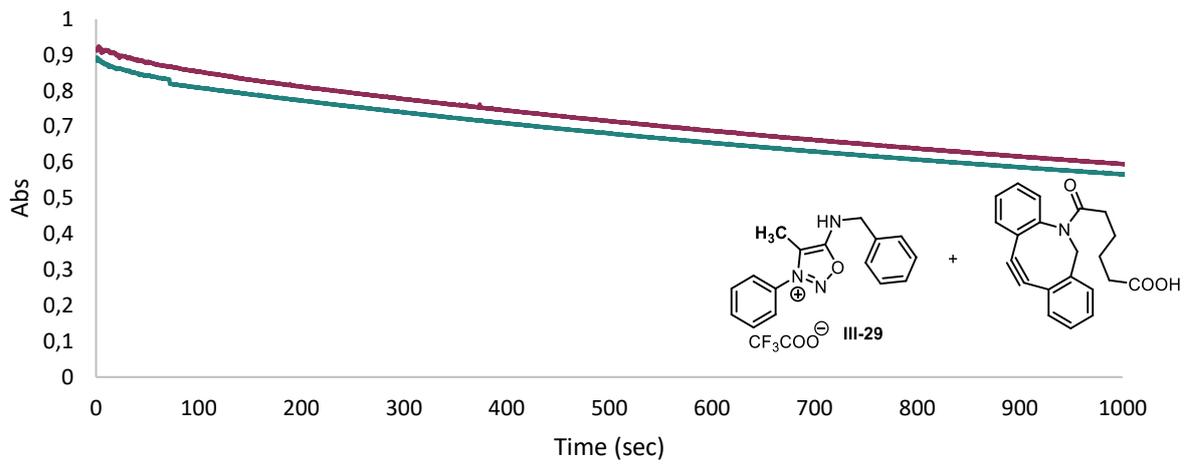
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



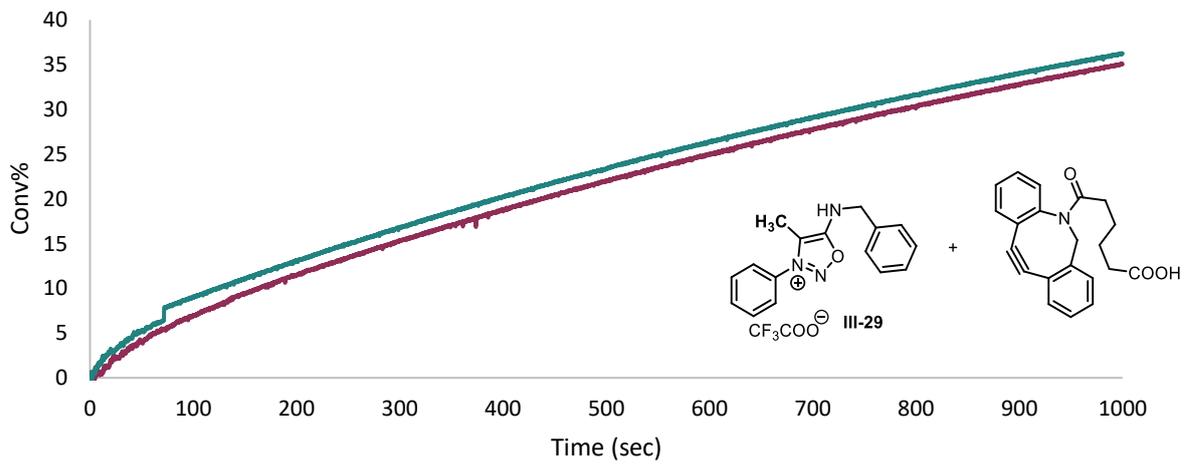
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



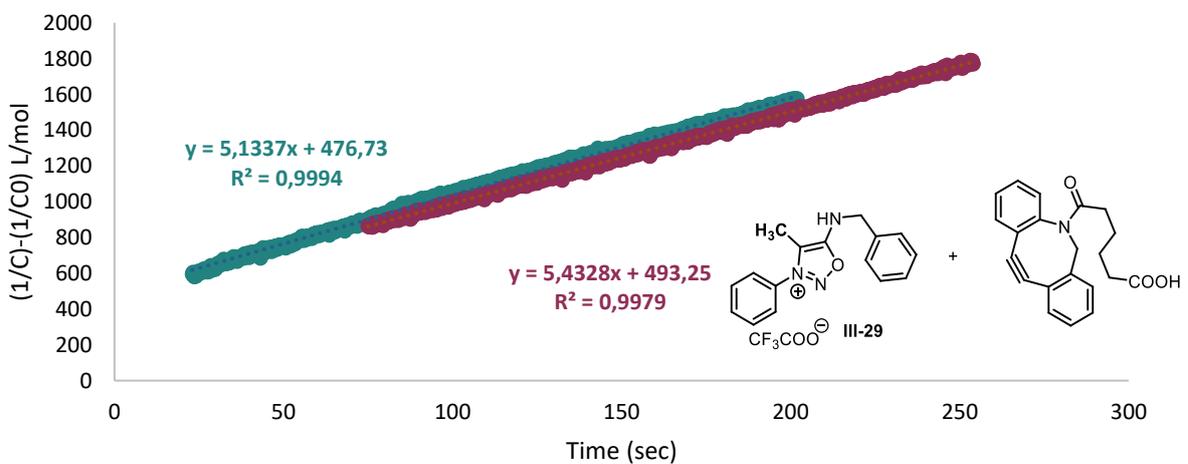
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



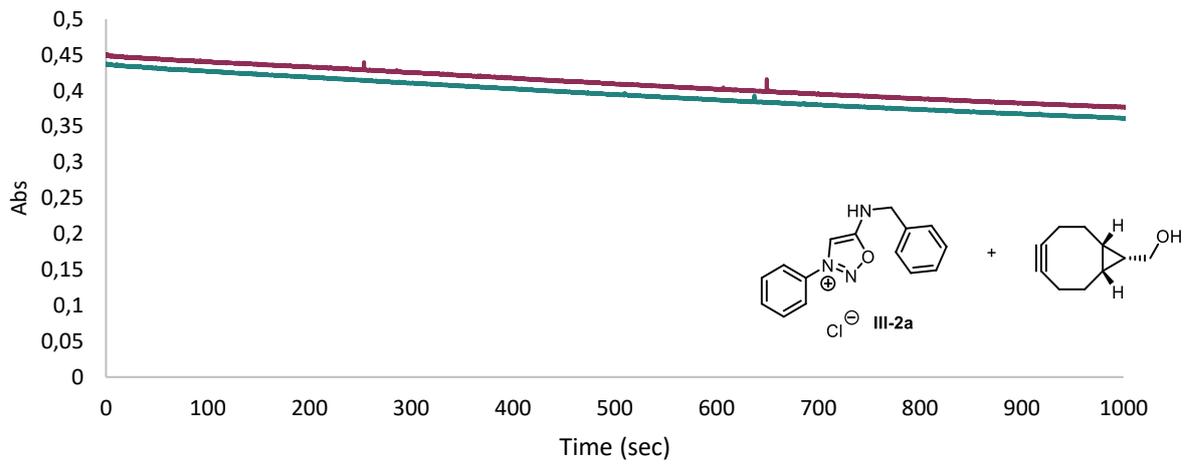
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



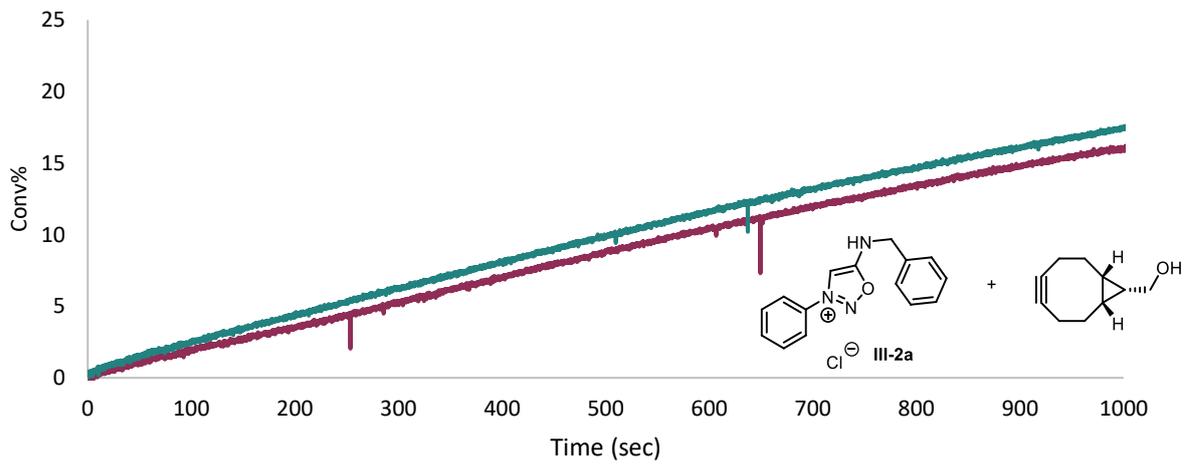
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



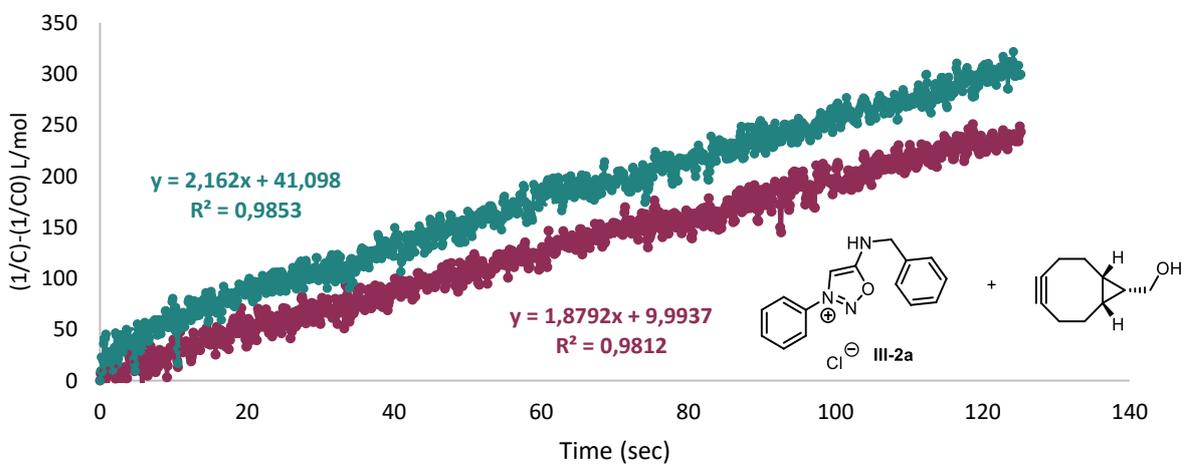
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



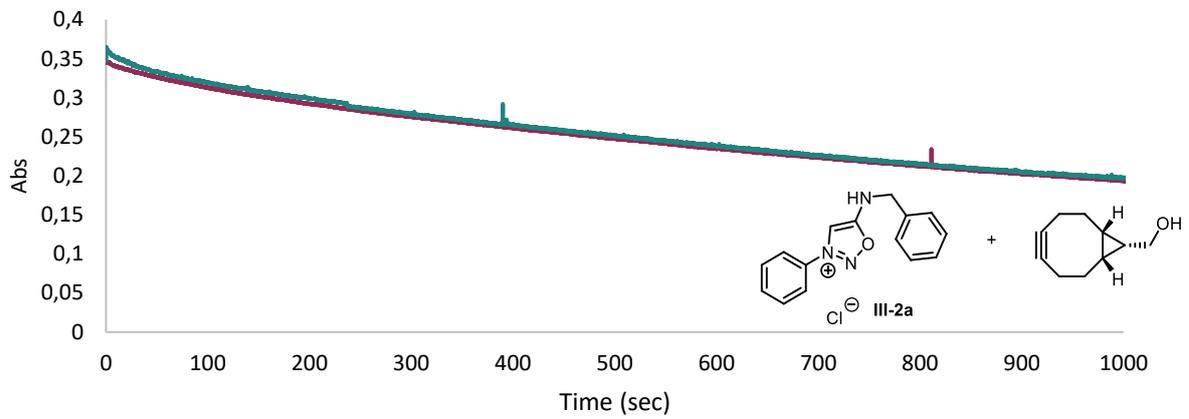
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



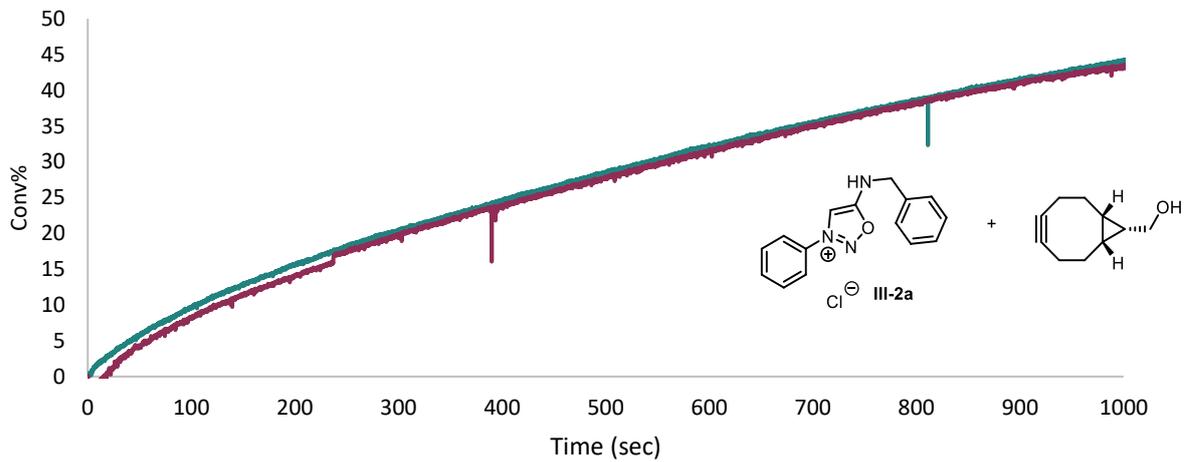
$(1/C)-(1/C_0)$ , = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



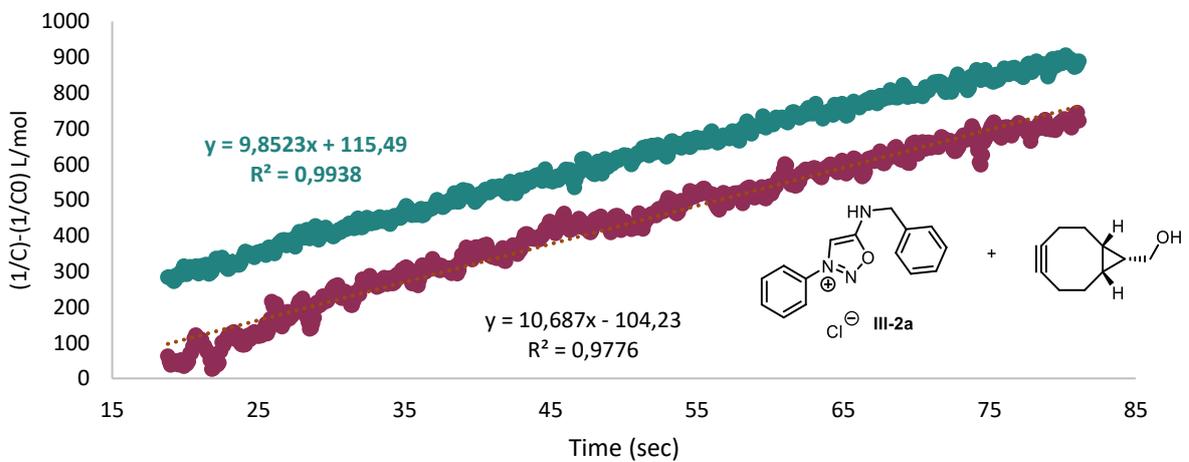
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.0



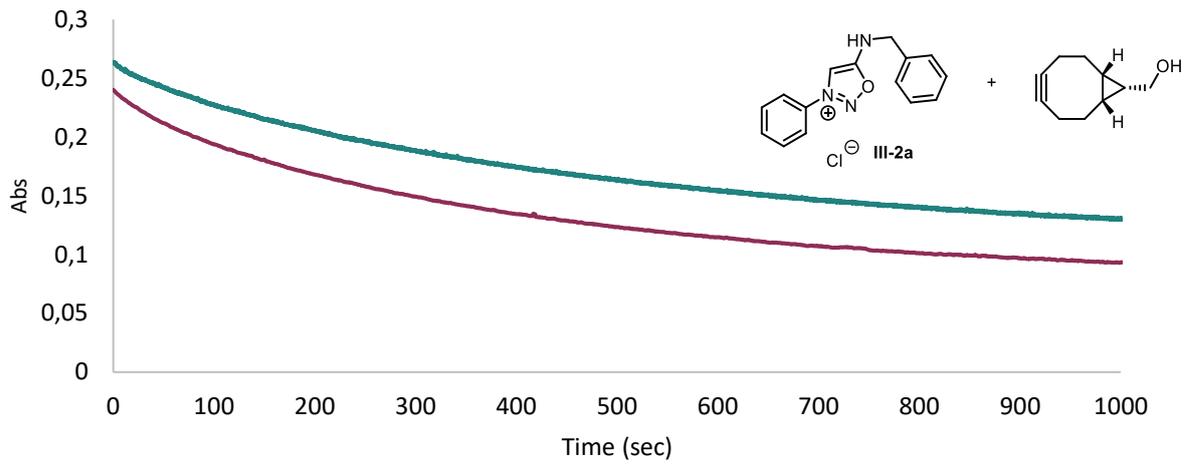
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.0



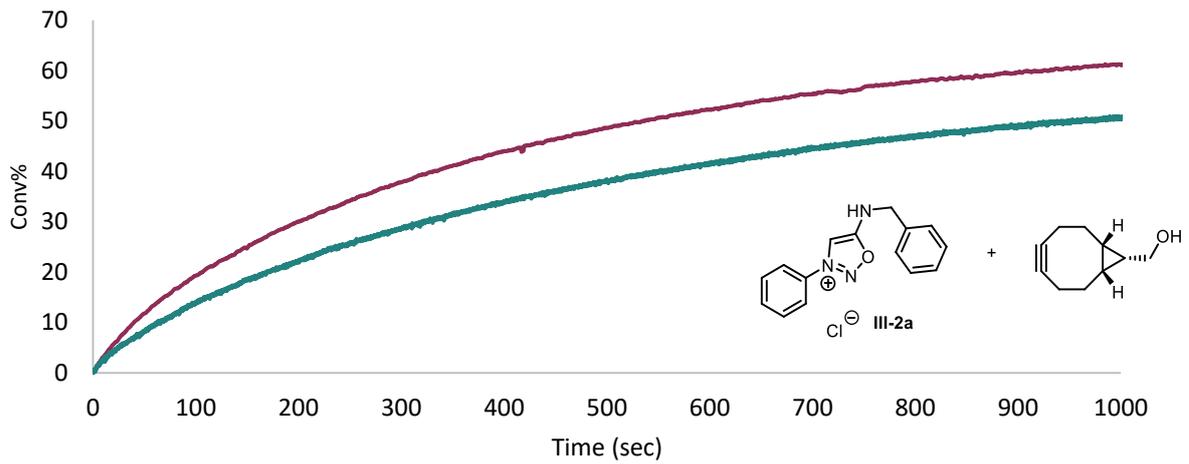
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 8.0



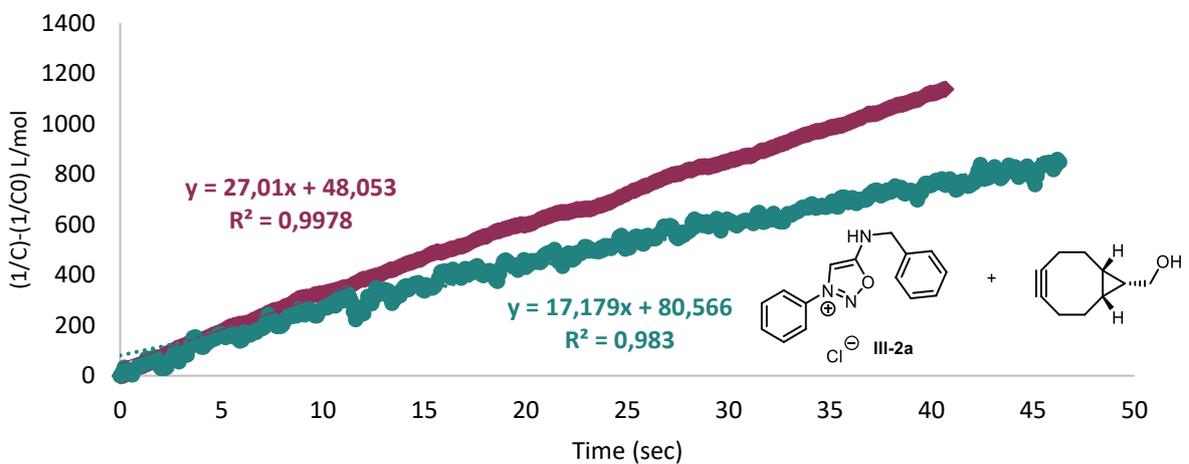
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 9.0



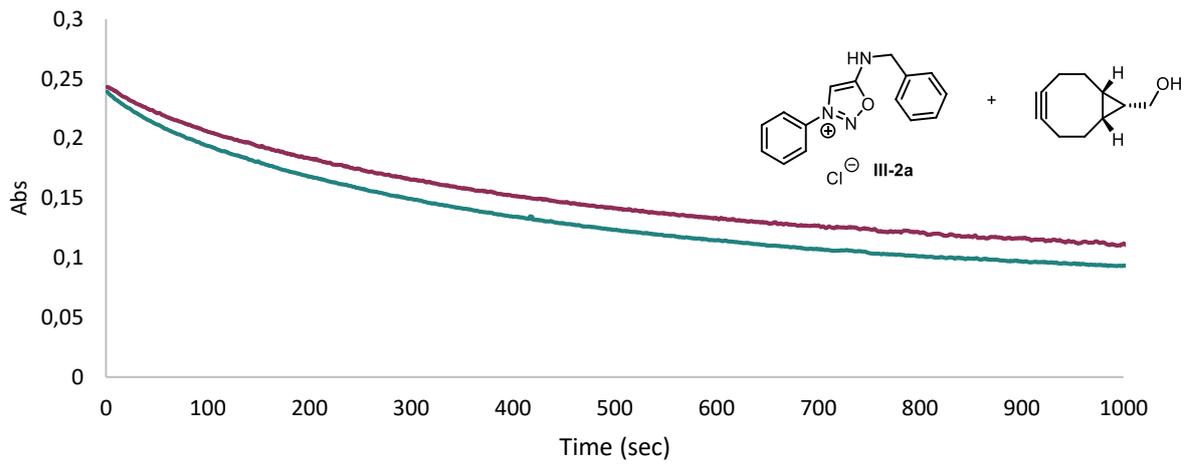
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 9.0



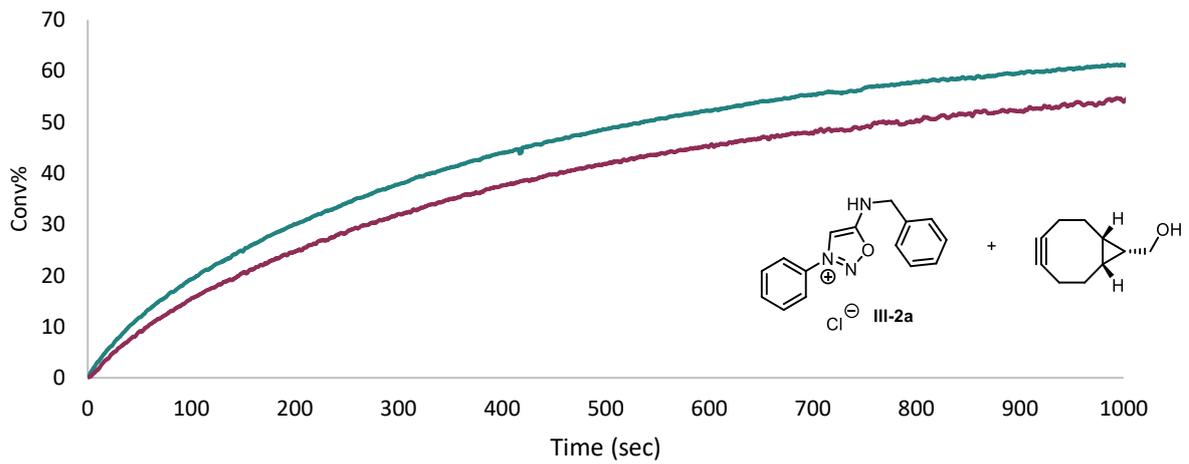
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 9.0



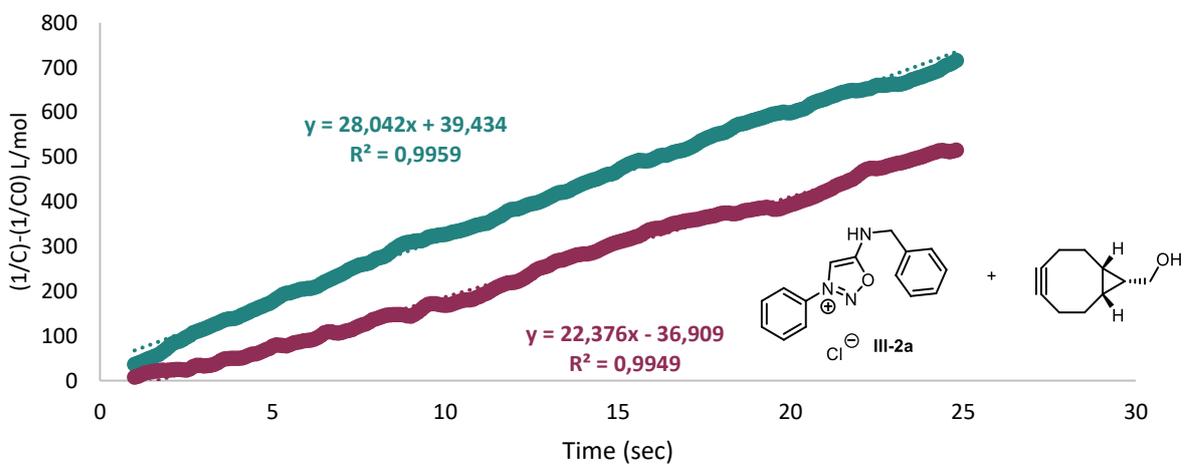
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 9.5



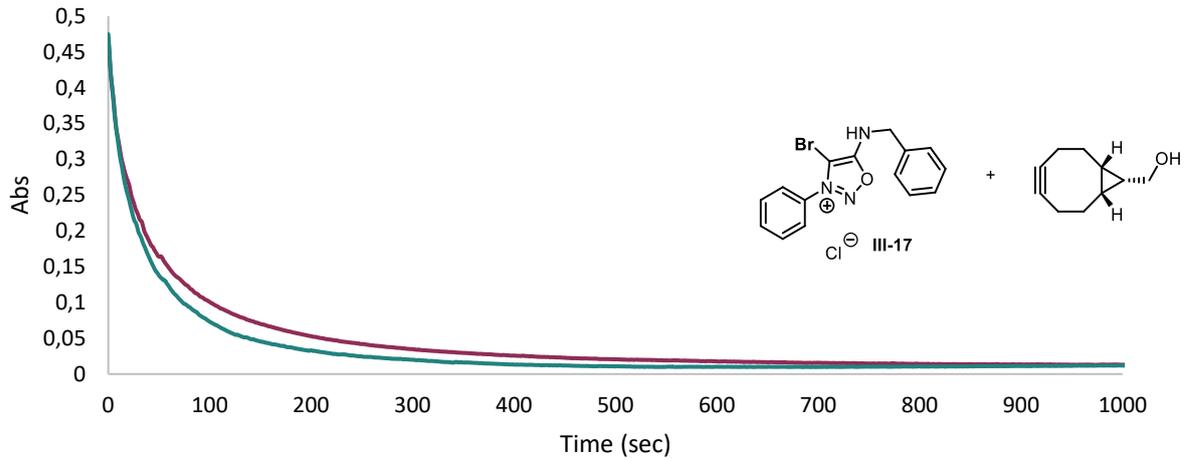
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 9.5



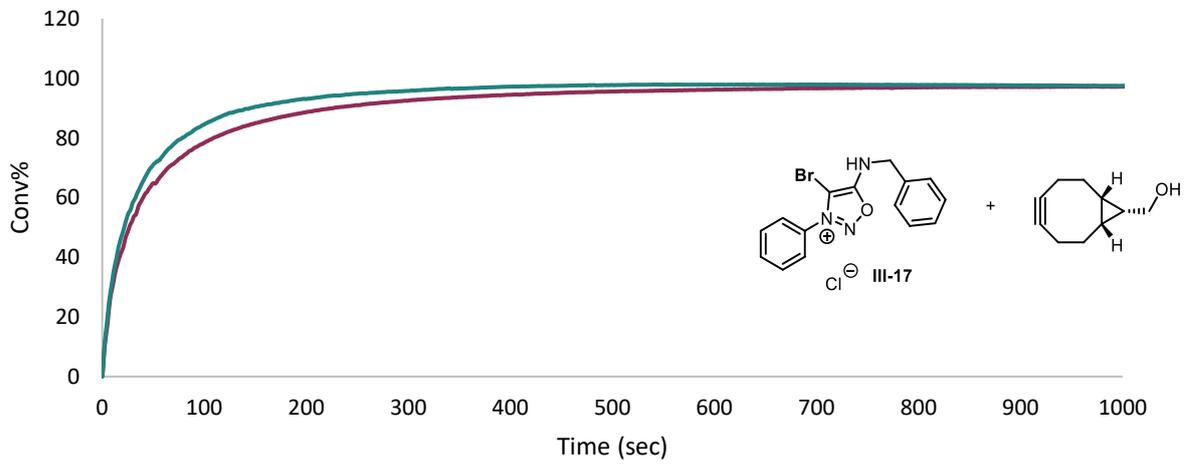
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 9.5



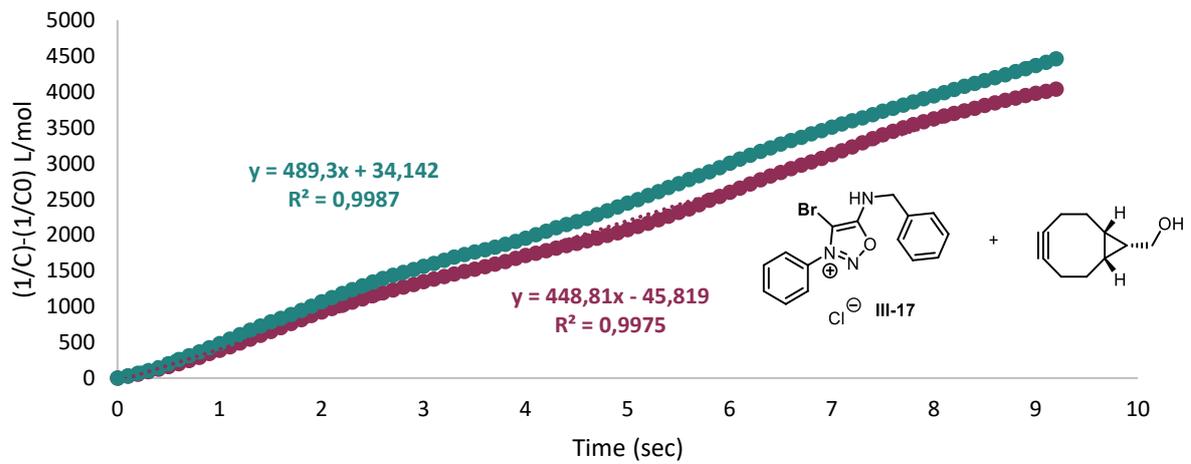
Abs = f(t) n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



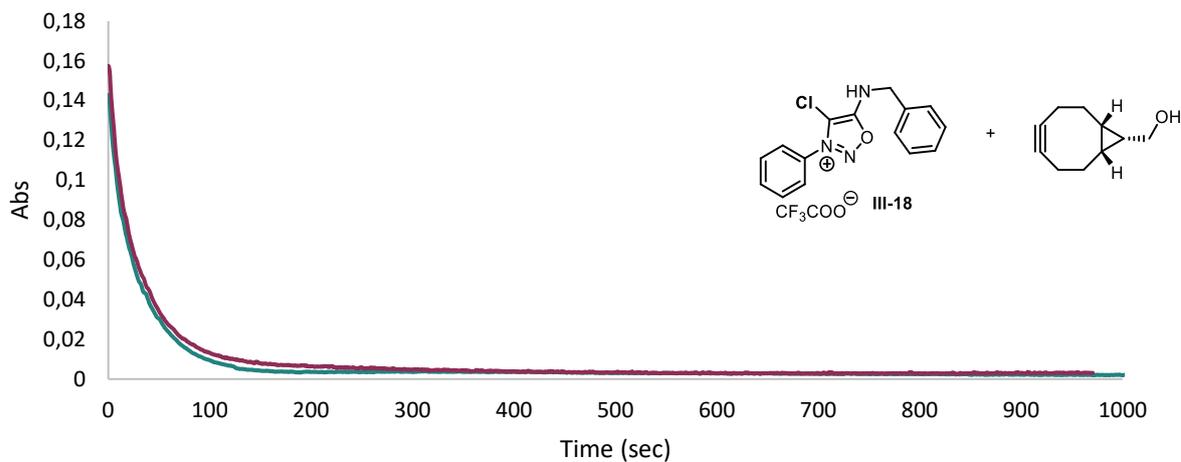
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



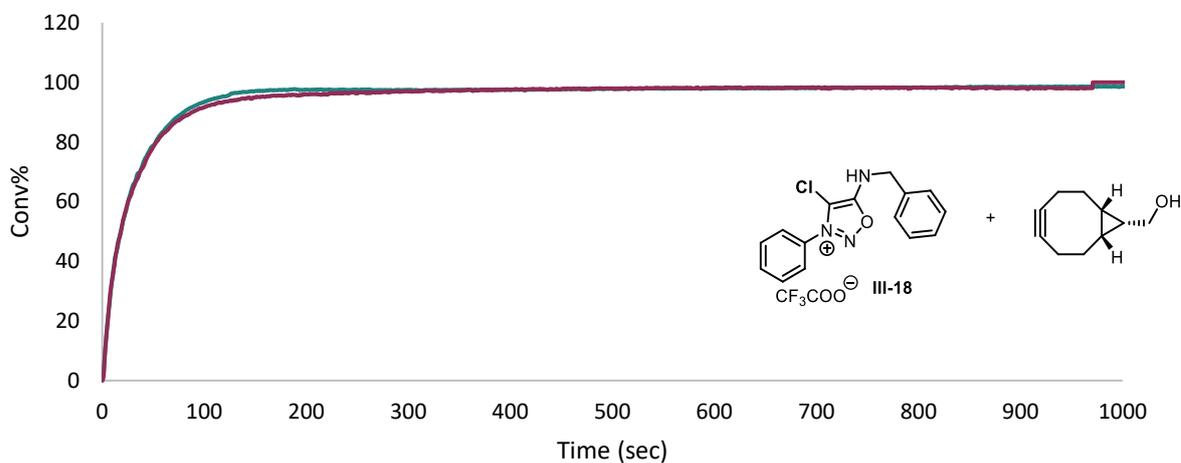
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



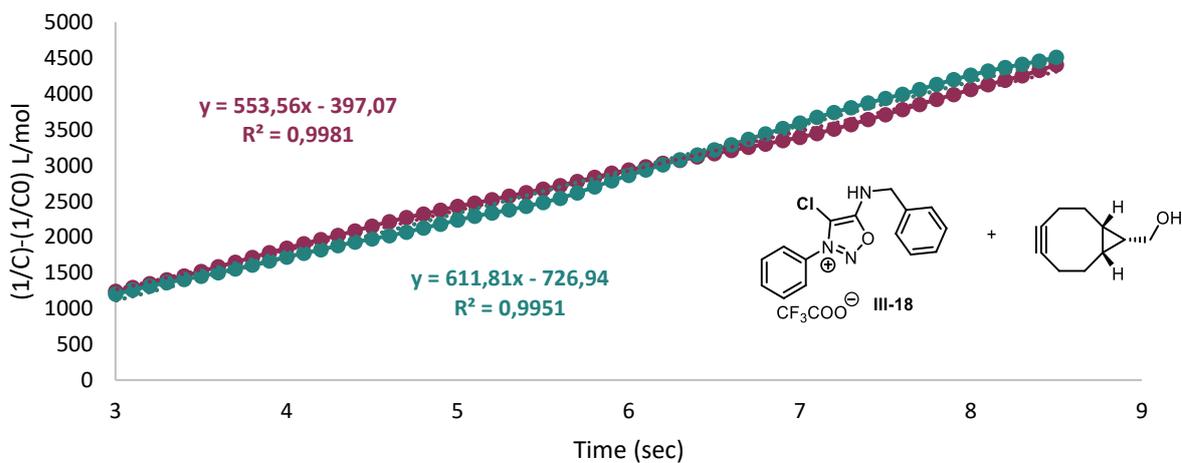
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



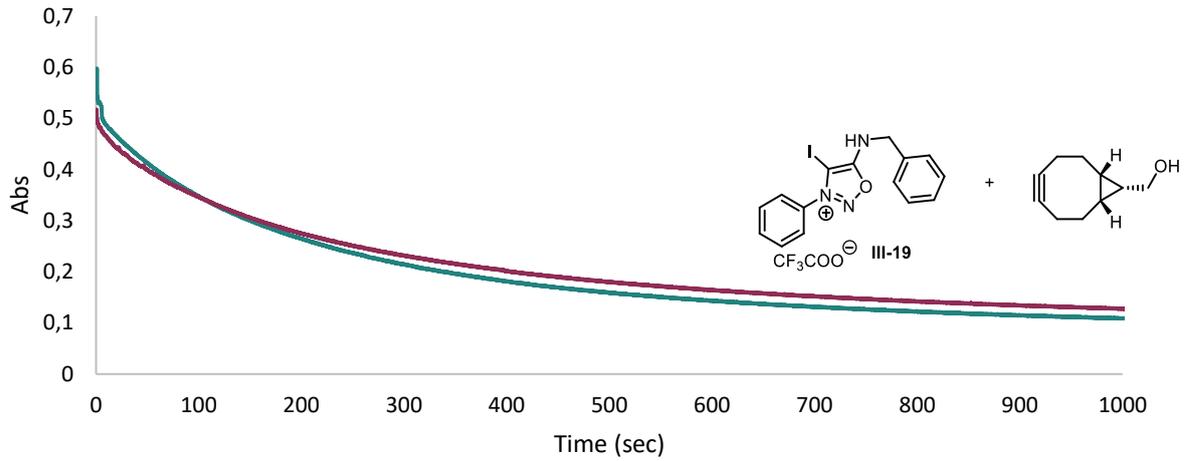
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7,4



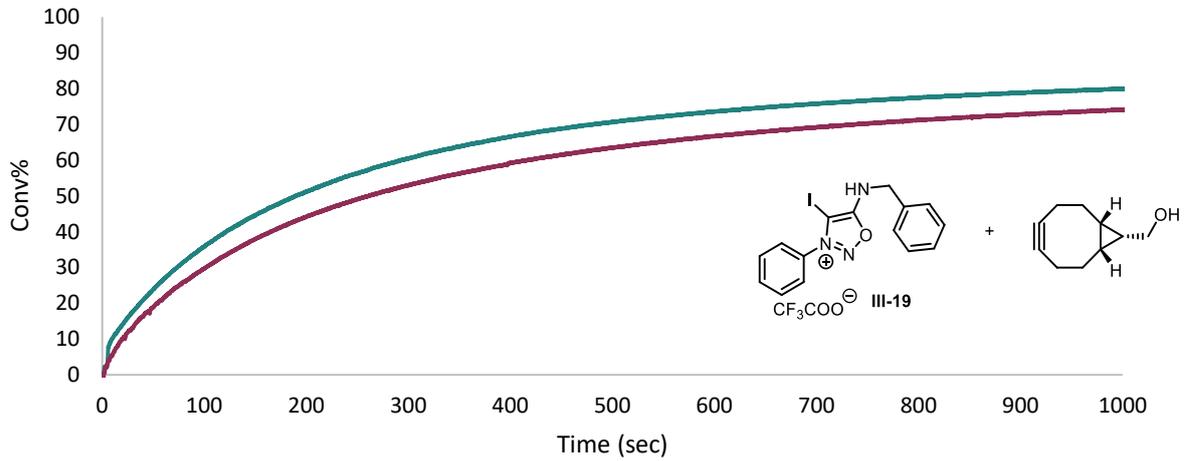
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



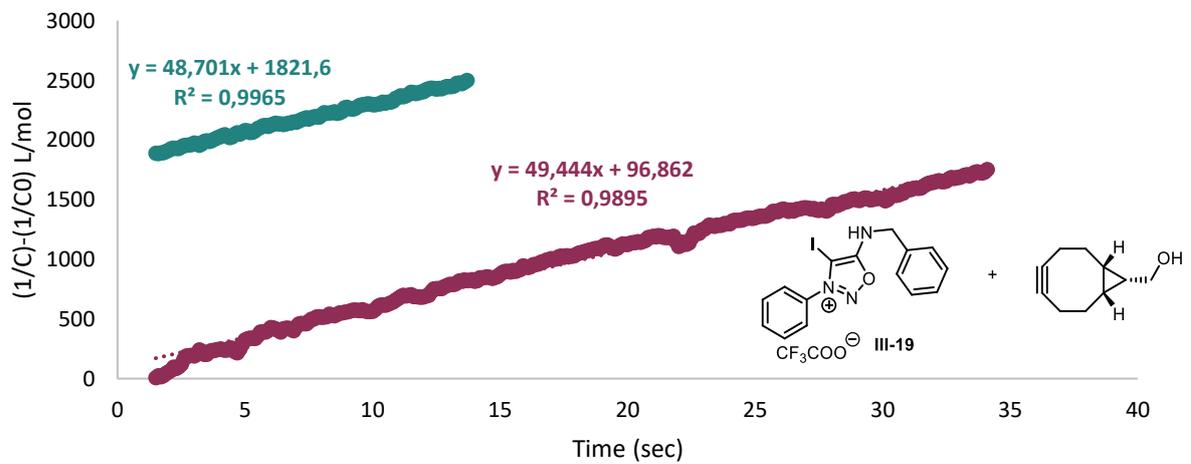
Abs = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



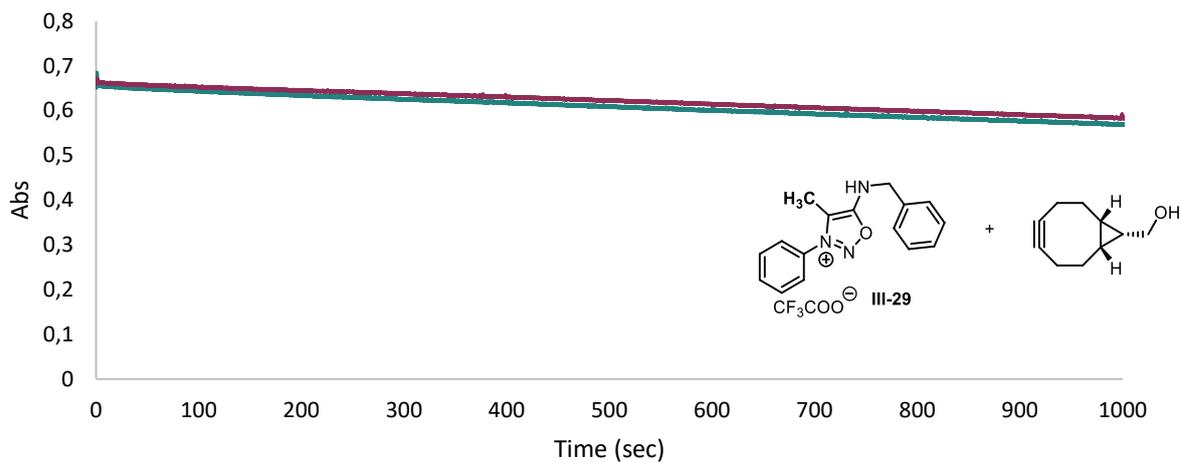
Conv% = f(t), n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7,4



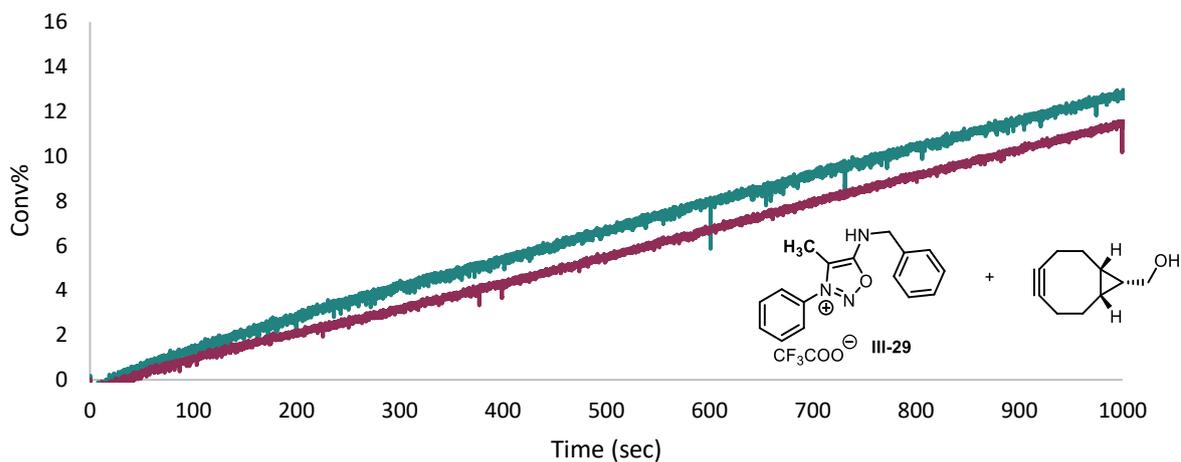
$(1/C)-(1/C_0) = f(t)$ , n = 2, @100  $\mu$ M, 37  $^{\circ}$ C, pH = 7.4



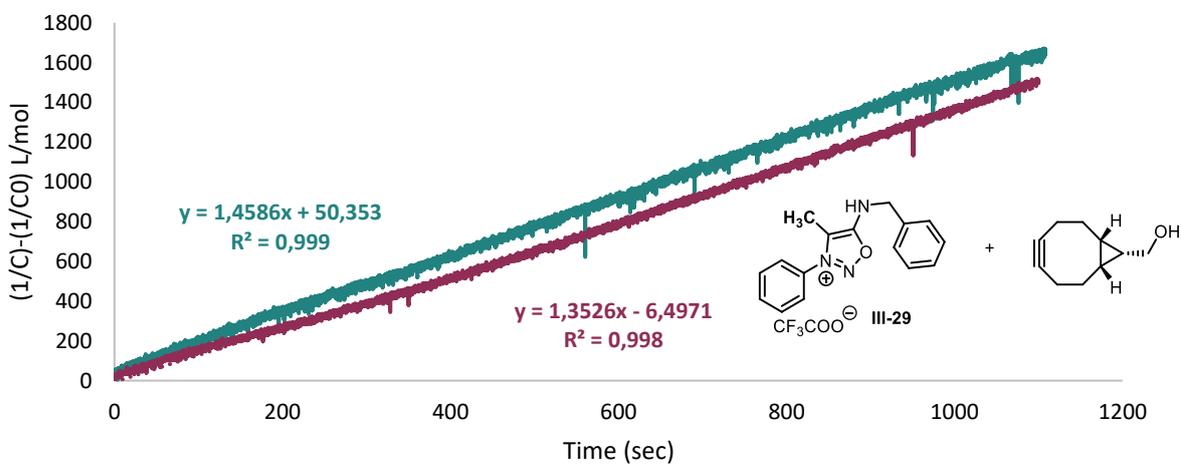
Abs = f(t), n = 2, @100 μM, 37 °C, pH = 7.4



Conv% = f(t), n = 2, @100 μM, 37 °C, pH = 7,4

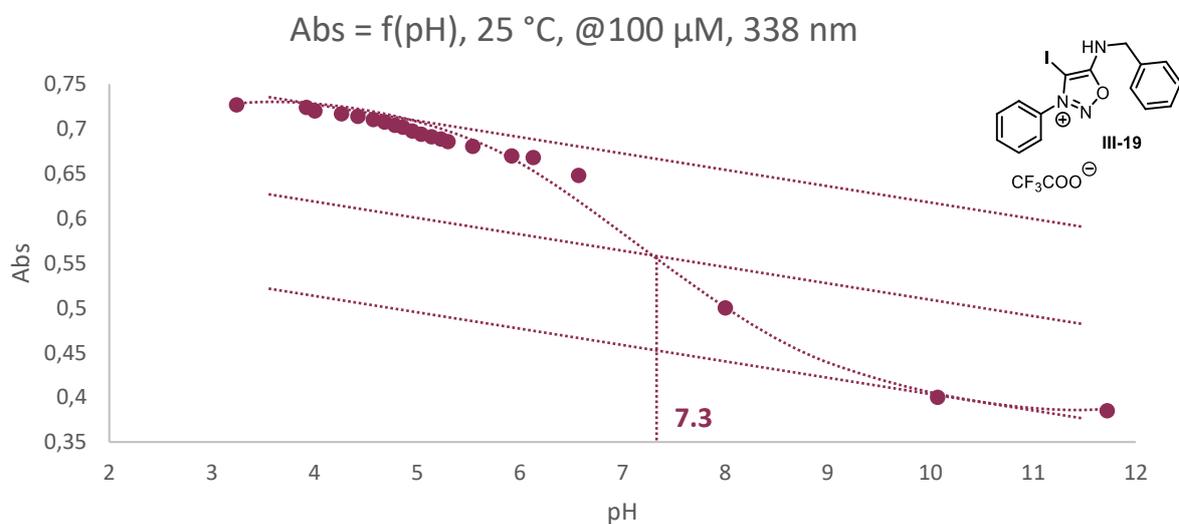
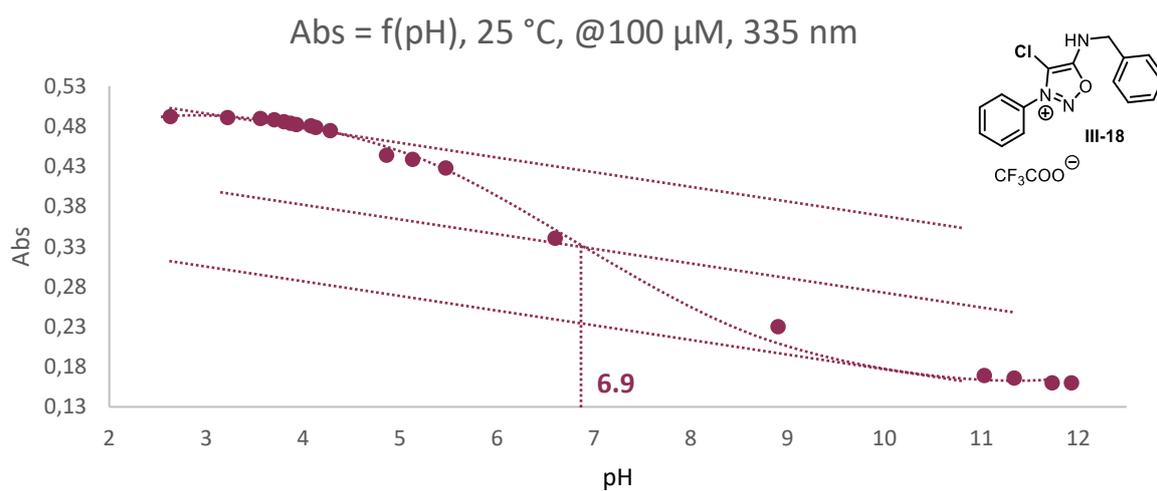
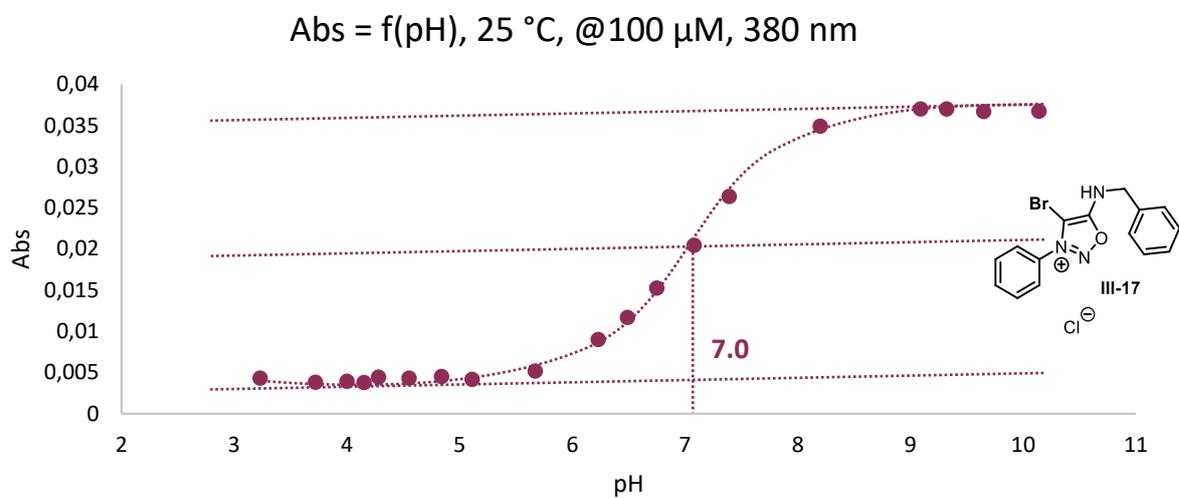


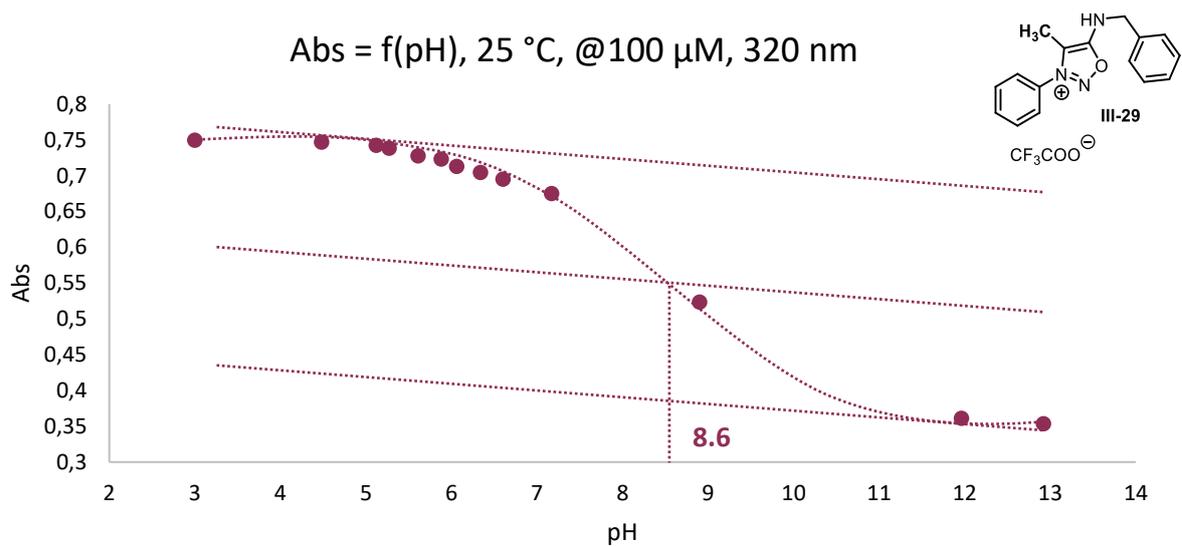
(1/C)-(1/C0) = f(t), n = 2, @100 μM, 37 °C, pH = 7.4



#### IV.7.iv pKa determination

Procedure in IV.3.iii page 221





**Figure S26.** A. Absorbance in function of the pH of **III-17** at 380 nm. B. Absorbance in function of the pH of **III-18** at 335 nm. C. Absorbance in function of the pH of **III-19** at 338 nm. D. Absorbance in function of the pH of **III-29** at 320 nm.

# Bibliographie

---

1. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition*, 40/11 (2001), 2004–21.
2. K. Porte, M. Riberaud, R. Châtre, D. Audisio, S. Papot, and F. Taran, *ChemBioChem*, 22/1 (2021), 100–113.
3. E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 48/38 (2009), 6974–98.
4. P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, and C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110/1 (2013), 46–51.
5. E. Saxon and C. R. Bertozzi, *Science*, 287/5460 (2000), 2007–10.
6. B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, and R. T. Raines, *Organic Letters*, 2/13 (2000), 1939–41.
7. E. Saxon, J. I. Armstrong, and C. R. Bertozzi, *Organic Letters*, 2/14 (2000), 2141–43.
8. C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, and S. Bräse, *Chemical Society Reviews*, 40/9 (2011), 4840–71.
9. R. Huisgen, G. Szeimies, and L. Möbius, *Chemische Berichte*, 100/8 (1967), 2494–2507.
10. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition*, 41/14 (2002), 2596–99.
11. C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry*, 67/9 (2002), 3057–64.
12. Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor, and P. Marchot, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101/6 (2004), 1449–54.
13. M. Whiting, J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, and V. V. Fokin, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45/9 (2006), 1435–39.

14. V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, and M. G. Finn, *Bioconjugate Chemistry*, 21/10 (2010), 1912
15. V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, and M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society*, 129/42 (2007), 12705–12.
16. T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin, *Organic Letters*, 6/17 (2004), 2853–55
17. C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, and A. Y. Ting, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 51/24 (2012), 5852–56.
18. V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, and F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition*, 53/23 (2014), 5872–76.
19. H. Jiang, T. Zheng, A. Lopez-Aguilar, L. Feng, F. Kopp, F. L. Marlow, and P. Wu, *Bioconjugate Chemistry*, 25/4 (2014), 698–706.
20. Z.-G. Wu, X.-J. Liao, L. Yuan, Y. Wang, Y.-X. Zheng, J.-L. Zuo, and Y. Pan, *Chemistry – A European Journal*, 26/25 (2020), 5694–5700.
21. D. Barolet, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 27/4 (2008), 227–38
22. G. Wittig and A. Krebs, *Chemische Berichte*, 94/12 (1961), 3260–75.
23. N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, 'A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems', *Journal of the American Chemical Society*, 126/46 (2004), 15046–47.
24. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, and C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104/43 (2007), 16793–97.
25. X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, and G.-J. Boons, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 47/12 (2008), 2253–55.
26. J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, and F. L. van Delft, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 49/49 (2010), 9422–25.

27. G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, and C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie International Edition*, 51/10 (2012), 2443–47.
28. J. Weterings, C. J. F. Rijcken, H. Veldhuis, T. Meulemans, D. Hadavi, M. Timmers, M. Honing, H. Ippel, and R. M. J. Liskamp, *Chemical Science*, 11/33 (2020), 9011–16.
29. S. Wallace and J. W. Chin, *Chemical Science*, 5/5 (2014), 1742–44.
30. L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuypere, C. Créminon, D.-A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Chemical Communications*, 50/66 (2014), 9376–78.
31. H. Tao, F. Liu, R. Zeng, Z. Shao, L. Zou, Y. Cao, J. M. Murphy, K. N. Houk, and Y. Liang, *Chemical Communications*, 54/40 (2018), 5082–85.
32. R. A. Carboni and R. V. Lindsey, *Journal of the American Chemical Society*, 81/16 (1959), 4342–46.
33. M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, *Journal of the American Chemical Society*, 130/41 (2008), 13518–19.
34. Y. Fang, J. C. Judkins, S. J. Boyd, C. W. am Ende, K. Rohlfing, Z. Huang, Y. Xie, D. S. Johnson, and J. M. Fox, *Tetrahedron*, 75/32 (2019), 4307–17.
35. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin, and J. M. Fox, *Chemical science*, 5/10 (2014), 3770–76.
36. Novianti, T. Kowada, and S. Mizukami, *Organic Letters*, 24/17 (2022), 3223–26.
37. Li and P. R. Chen, *Nature Chemical Biology*, 12/3 (2016), 129–37.
38. P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, and J. Wirz, *Chemical Reviews*, 113/1 (2013), 119–91.
39. C. Streu and E. Meggers, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45/34 (2006), 5645–48.
40. X. Wang, Y. Liu, X. Fan, J. Wang, W. S. C. Ngai, H. Zhang, J. Li, G. Zhang, J. Lin, and P. R. Chen, *Journal of the American Chemical Society*, 141/43 (2019), 17133–41.
41. A. Kislukhin, V. P. Hong, K. E. Breitenkamp, and M. G. Finn, *Bioconjugate Chemistry*, 24/4 (2013), 684–89.

42. R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Sánchez-Martín, and M. Bradley, *Nature Chemistry*, 3/3 (2011), 239–43.
43. C. Vidal, M. Tomás-Gamasa, A. Gutiérrez-González, and J. L. Mascareñas, *Journal of the American Chemical Society*, 141/13 (2019), 5125–29.
44. J. T. Weiss, J. C. Dawson, K. G. Macleod, W. Rybski, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E. E. Patton, M. Bradley, N. O. Carragher, and A. Unciti-Broceta, *Nature Communications*, 5/1 (2014), 3277.
45. M. Pérez-López, B. Rubio-Ruiz, V. Sebastián, L. Hamilton, C. Adam, T. L. Bray, S. Irusta, P. M. Brennan, G. C. Lloyd-Jones, D. Sieger, J. Santamaría, and A. Unciti-Broceta, *Angewandte Chemie International Edition*, 56/41 (2017), 12548–52.
46. R. van Brakel, R. C. M. Vulders, R. J. Bokdam, H. Grüll, and M. S. Robillard, *Bioconjugate Chemistry*, 19/3 (2008), 714–18.
47. X. Ji, Z. Pan, B. Yu, L. K. D. L. Cruz, Y. Zheng, B. Ke, and B. Wang, *Chemical Society Reviews*, 48/4 (2019), 1077–94.
48. M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, and J.-C. Florent, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16/12 (2006), 3147–49.
49. R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, and M. S. Robillard, *Angewandte Chemie International Edition*, 52/52 (2013), 14112–16.
50. R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen, and M. S. Robillard, *Bioconjugate Chemistry*, 27/7 (2016), 1697–1706.
51. X. Fan, Y. Ge, F. Lin, Y. Yang, G. Zhang, W. S. C. Ngai, Z. Lin, S. Zheng, J. Wang, J. Zhao, J. Li, and P. R. Chen, *Angewandte Chemie International Edition*, 55/45 (2016), 14046–50.
52. J. C. T. Carlson, H. Mikula, and R. Weissleder, *Journal of the American Chemical Society*, 140/10 (2018), 3603–12.
53. H. A. M. van Onzen, R. M. Versteegen, F. J. M. Hoeben, I. A. W. Filot, R. Rossin, T. Zhu, J. Wu, P. J. Hudson, H. M. Janssen, W. ten Hoeve, and M. S. Robillard, *Journal of the American Chemical Society*, 142/25 (2020), 10955–63.

54. L. Liu, D. Zhang, M. Johnson, and N. K. Devaraj, *Nature Chemistry*, (2022), 1–8.
55. K. Wu, N. A. Yee, S. Srinivasan, A. Mahmoodi, M. Zakharian, J. M. M. Oneto, and M. Royzen, *Chemical Science*, 12/4 (2021), 1259–71.
56. W. Baker, W. D. Ollis, and V. D. Poole, *Journal of the Chemical Society*, 0 (1949), 307–14.
57. H. Kato, M. Hashimoto, M. Ohta, *Nippon Kagaku zasshi*, (1957), 78, 707–13
58. E. N. Beal, K. Tumbull, *synth. commun.*, (1992), 22, 673–76
59. K. Masuda, Y. Imashiro, T. Kaneko, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 18/1 (1970), 128–32.
60. L. J. Ignarro, C. Napoli, and J. Loscalzo, 'Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview', *Circulation Research*, 90/1 (2002), 21–28.
61. L. Soulère, P. Hoffmann, and F. Bringaud, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 40/5 (2003), 943–47.
62. M. L. Gettings, E. F. C. Byrd, M. Zeller, and D. Piercey, *New Journal of Chemistry*, 45/4 (2021), 2228–36.
63. S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. N. Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition*, 56/49 (2017), 15612–16.
64. M. Riomet, E. Decuypere, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, and F. Taran, 'Design and Synthesis of Iminosydones for Fast Click and Release Reactions with Cycloalkynes', *Chemistry – A European Journal*, 24/34 (2018), 8535–41.
65. L. E. Kholodov, E. V. Borisov, and V. G. Yashunskii, 'Sydones and sydone imines', *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 4/4 (1971), 514–16.
66. L. E. Kholodov, E. V. Borisov, and V. G. Yashunskii, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 1/1, (1966), 215–18.
67. M. Goetz, K. Grozinger, and J. T. Oliver, *Journal of Medicinal Chemistry*, 16/6 (1973), 671–73.
68. M. Feng, L. Madegard, M. Riomet, M. Louis, P. A. Champagne, G. Pieters, D. Audisio, and F. Taran, *Chemical Communications*, (2022).

69. Dovgan, A. Hentz, O. Koniev, A. Etkirch, S. Hessmann, S. Ursuegui, S. Delacroix, M. Riomet, F. Taran, S. Cianféroni, S. Kolodych, and A. Wagner, *Chemical Science*, 11/5 (2020), 1210–15.
70. M. Riomet, K. Porte, A. Wijkhuisen, D. Audisio, and F. Taran, *Chemical Communications*, 56/52 (2020), 7183–86.
71. Porte, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, B. Eddhif, P. Poinot, E. Gravel, E. Doris, A. Wijkhuisen, D. Audisio, S. Papot, and F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition*, 58/19 (2019), 6366–70.
72. Jean-Christophe FRICAIN, *Oncologie*, (2016).
73. M. Ignatiadis, G. W. Sledge, and S. S. Jeffrey, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18/5 (2021), 297–312.
74. ‘NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI’, (2011).
75. So-Woon Kim, Jin Roh, Chan-Sik Park, *Journal of Pathology and Translational Medicine*, (2016) 50(6): 411-418.
76. G. Buono, L. Gerratana, M. Bulfoni, N. Provinciali, D. Basile, M. Giuliano, C. Corvaja, G. Arpino, L. Del Mastro, S. De Placido, M. De Laurentiis, M. Cristofanilli, and F. Puglisi, *Cancer Treatment Reviews*, 73 (2019), 73–83.
77. T. Lee, T. Z. J. Teng, and V. G. Shelat, *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12/12 (2020), 468–90.
78. M. J. Gerdes, C. J. Sevinsky, A. Sood, S. Adak, M. O. Bello, A. Bordwell, A. Can, A. Corwin, S. Dinn, R. J. Filkins, D. Hollman, V. Kamath, S. Kaanumalle, K. Kenny, M. Larsen, M. Lazare, Q. Li, C. Lowes, C. C. McCulloch, E. McDonough, M. C. Montalto, Z. Pang, J. Rittscher, A. Santamaria-Pang, B. D. Sarachan, M. L. Seel, A. Seppo, K. Shaikh, Y. Sui, J. Zhang, and F. Ginty, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110/29 (2013), 11982–87.
79. J.-R. Lin, M. Fallahi-Sichani, and P. K. Sorger, *Nature Communications*, 6/1 (2015), 8390.
80. W. Schubert, B. Bonnekoh, A. J. Pommer, L. Philipsen, R. Böckelmann, Y. Malykh, H. Gollnick, M. Friedenberger, M. Bode, and A. W. M. Dress, *Nature Biotechnology*, 24/10 (2006), 1270–78.

81. M. Angelo, S. C. Bendall, R. Finck, M. B. Hale, C. Hitzman, A. D. Borowsky, R. M. Levenson, J. B. Lowe, S. D. Liu, S. Zhao, Y. Natkunam, and G. P. Nolan, *Nature Medicine*, 20/4 (2014), 436–42.
82. S. K. Saka, Y. Wang, J. Y. Kishi, A. Zhu, Y. Zeng, W. Xie, K. Kirli, C. Yapp, M. Cicconet, B. J. Beliveau, S. W. Lapan, S. Yin, M. Lin, E. S. Boyden, P. S. Kaeser, G. Pihan, G. M. Church, and P. Yin, *Nature Biotechnology*, 37/9 (2019), 1080–90.
83. F. J. Hartmann and S. C. Bendall, *Nature Reviews. Rheumatology*, 16/2 (2020), 87–99.
84. M. Mondal, R. Liao, L. Xiao, T. Eno, and J. Guo, *Angewandte Chemie International Edition*, 56/10 (2017), 2636–39.
85. J. Ko, J. Oh, M. S. Ahmed, J. C. T. Carlson, and R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition*, 59/17 (2020), 6839–46.
86. J. Ko, M. Wilkovitsch, J. Oh, R. H. Kohler, E. Bolli, M. J. Pittet, C. Vinegoni, D. B. Sykes, H. Mikula, R. Weissleder, and J. C. T. Carlson, *Nature Biotechnology*, (2022), 1–9.
87. Diane Damotte, Karen Leroy, livre, *IMMUNITE ANTI-TUMORALE* (2019).
88. J. Deng, G. Zhang, F.-K. Huang, and T. A. Neubert, *Proteomic Profiling: Methods and Protocols*, (2015), pp. 249–58.
89. U. Krishnamurti and J. F. Silverman, *Advances in Anatomic Pathology*, 21/2 (2014), 100–107.
90. Y. Han, D. Liu, and L. Li, *American Journal of Cancer Research*, 10/3 (2020), 727–42.
91. R. S. Apte, D. S. Chen, and N. Ferrara, *Cell*, 176/6 (2019), 1248–64.
92. S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. N. Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition*, 56/49 (2017), 15612–16.
93. K. Tsuchikama and Z. An, *Protein & Cell*, 9/1 (2018), 33–46.
94. M. Richard, C. Truillet, V. L. Tran, H. Liu, K. Porte, D. Audisio, M. Roche, B. Jégo, S. Cholet, F. Fenaille, B. Kuhnast, F. Taran, and S. Specklin, *Chemical Communications*, 55/70 (2019), 10400–403.
95. W. M. H. S., and T. A., *Journal of Chemical Research*, 2 (1985), 38–39.
96. Protopopov, I. S.; Kraft, M. Y. Zh. *Obschch. Khim.* (1963), 33, 3050–3052’.

97. O. Fischer, A. Hubert, and M. R. Heinrich, *The Journal of Organic Chemistry*, 85/18 (2020), 11856–66.
98. W. Li, M.-M. Wang, Y. Hu, and T. Werner, *Organic Letters*, 19/21 (2017), 5768–71.
99. T. R. B. Jones, J. M. Miller, J. L. Peterson, and D. W. Meek, *Canadian Journal of Chemistry*, 54/9 (1976), 1478–86.
100. D. J. Hnatowich, F. Virzi, and M. Rusckowski, *Journal of Nuclear Medicine*, 28/8 (1987), 1294–1302.
101. D. J. Vugts, A. Vervoort, M. Stigter-van Walsum, G. W. M. Visser, M. S. Robillard, R. M. Versteegen, R. C. M. Volders, J. (Koos) D. M. Herscheid, and G. A. M. S. van Dongen, *Bioconjugate Chemistry*, 22/10 (2011), 2072–81.
102. S. M. van den Bosch, R. Rossin, P. Renart Verkerk, W. Ten Hoeve, H. M. Janssen, J. Lub, and M. S. Robillard, *Nuclear Medicine and Biology*, 40/3 (2013), 415–23.
103. S. B. Lee, H. L. Kim, H.-J. Jeong, S. T. Lim, M.-H. Sohn, and D. W. Kim, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 52/40 (2013), 10549–52.
104. K. M. Au, A. Tripathy, C. P.-I. Lin, K. Wagner, S. Hong, A. Z. Wang, and S. I. Park, *ACS Nano*, 12/2 (2018), 1544–63.
105. R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Volders, I. Verel, J. Lub, and M. S. Robillard, *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 49/19 (2010), 3375–78.
106. R. Rossin, T. Läppchen, S. M. van den Bosch, R. Laforest, and M. S. Robillard, *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 54/11 (2013), 1989–95.
107. M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* (1993), 365, 566–568
108. M. Richard, F. Hinnen, and B. Kuhnast, *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 7/1 (2022), 7.
109. M. Riomet, E. Decuypere, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, and F. Taran, *Chemistry – A European Journal*, 24/34 (2018), 8535–41.
110. P. A. Champagne and K. N. Houk, *The Journal of Organic Chemistry*, 82/20 (2017), 10980–88.

- 111.** S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. N. Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, and F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition*, 56/49 (**2017**), 15612–16.
- 112.** Greco, C. V.; Nyberg, W. H.; Cheng, C. C. J. *Med. Chem.* (**1962**), 5, 899.
- 113.** D. Warther, E. Dursun, M. Recher, S. Ursuegui, M. Mosser, J. Sobska, W. Krezel, G. Chaubet, and A. Wagner, 'Plasma induced acceleration and selectivity in strain-promoted azide–alkyne cycloadditions', *Organic & Biomolecular Chemistry*, 19/23 (**2021**), 5063–67.
- 114.** D. Svatunek, N. Houszka, T. A. Hamlin, F. M. Bickelhaupt, and H. Mikula, *Chemistry – A European Journal*, 25/3 (**2019**), 754–58.
- 115.** Tao, Liu, Zeng, Shao, Zou, Cao, Murphy, Houk, and Liang.
- 116.** E. Yen-Pon, F. Buttard, L. Frédéric, P. Thuéry, F. Taran, G. Pieters, P. A. Champagne, and D. Audisio, *JACS Au*, 1/6 (**2021**), 807–18.
- 117.** W. E. Brown, A. H. Green, T. E. Cedel, and J. Cairns, 'Biochemistry of protein-isocyanate interactions: a comparison of the effects of aryl vs. alkyl isocyanates', *Environmental Health Perspectives*, 72 (**1987**), 5–11.
- 118.** D. E. Mason and D. C. Liebler, *Journal of Proteome Research*, 2/3 (**2003**), 265–72.
- 119.** J.-B. Béquignat, N. Ty, A. Rondon, L. Taiariol, F. Degoul, D. Canitrot, M. Quintana, I. Navarro-Teulon, E. Miot-Noirault, C. Boucheix, J.-M. Chezal, and E. Moreau, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 203 (**2020**), 112574.
- 120.** Z. Liu and X. Chen, *Chemical Society Reviews*, 45/5 (**2016**), 1432–56.
- 121.** J. M. Peters, *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 63/4 (**1970**), 372–75.
- 122.** Y. Kumagai and Y. Abiko, *Chemical Research in Toxicology*, 30/1 (**2017**), 203–19.
- 123.** P. R. A. Zanon, L. Lewald, and S. M. Hacker, *Angewandte Chemie International Edition*, 59/7 (**2020**), 2829–36.
- 124.** T. Zhang, J. M. Hatcher, M. Teng, N. S. Gray, and M. Kostic, *Cell Chemical Biology*, 26/11 (**2019**), 1486–1500.

- 125.** K. M. Backus, B. E. Correia, K. M. Lum, S. Forli, B. D. Horning, G. E. González-Páez, S. Chatterjee, B. R. Lanning, J. R. Teijaro, A. J. Olson, D. W. Wolan, and B. F. Cravatt, *Nature*, 534/7608 (**2016**), 570–74.
- 126.** M. Abo and E. Weerapana, *Journal of the American Chemical Society*, 137/22 (**2015**), 7087–90.
- 127.** A.-D. Guo, D. Wei, H.-J. Nie, H. Hu, C. Peng, S.-T. Li, K.-N. Yan, B.-S. Zhou, L. Feng, C. Fang, M. Tan, R. Huang, and X.-H. Chen, *Nature Communications*, 11/1 (**2020**), 5472.
- 128.** Z. Huang, Z. Liu, X. Xie, R. Zeng, Z. Chen, L. Kong, X. Fan, and P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, (**2021**), 7.
- 129.** L. Pala, H. M. Senn, S. T. Caldwell, T. A. Prime, S. Warrington, T. P. Bright, H. A. Prag, C. Wilson, M. P. Murphy, and R. C. Hartley, *Frontiers in Chemistry*, 8 (**2020**), 783.
- 130.** Protopopov, *Obshch. Khim.*(**1963**), 33, 3050–3052
- 131.** 128. C. Favre, L. de Cremoux, J. Badaut, and F. Friscourt, *The Journal of Organic Chemistry*, 83/4 (**2018**), 2058–66.
- 132.** Fluorogenic iminosydnone: bioorthogonal tools for double turn-on click-and-release reactions. Margaux Riomet, Karine Porte, Anne Wijkhuisen, Davide Audisio and Frédéric Taran. *Chem. Commun.* (**2020**), 56, 7183 – 7186.
- 133.** V. G. Yashunskii and V. V. Ogorodnikova, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 17/3 (**1981**), 203–

