

THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Chimie organique – Radiochimie*

Par
Laurent Navarro

Applications de la chimie bio-orthogonale au radiomarquage de vecteurs immunologiques à l'iode et à l'astate pour l'oncologie nucléaire

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12 décembre 2018
Unité de recherche : CRCINA, UMR 1232 Inserm, ERL 6001 CNRS
Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Marie-Claude VIAUD-MASSUARD
Bertrand KUHNAST

Professeure d'Université - UFR Pharmacie, Université de Tours
Docteur / Ingénieur - CEA - Service Hospitalier Frédéric Joliot

Composition du Jury :

Présidente : Cécile PERRIO

Directeur de Recherche - ISTCT, LDM - TEP, centre Cyceron

Dir. de thèse : Jean-François GESTIN

Directeur de Recherche - CRCINA, UMR 1232 Inserm, ERL 6001 CNRS

Co-dir. de thèse : Frédéric PECORARI

Chargé de Recherche - CRCINA, UMR 1232 Inserm, ERL 6001 CNRS

Co-encadrant : François GUERARD

Chargé de Recherche - CRCINA, UMR 1232 Inserm, ERL 6001 CNRS

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères :

À Madame la Professeure Marie-Claude VIAUD-MASSUARD et Monsieur le Docteur Bertrand KUHNAST, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

À Madame la Docteur Cécile PERRIO, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et d'avoir fait partie de mon jury de thèse en tant que présidente.

À mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Jean-François GESTIN, qui m'a encadré et orienté tout au long de cette thèse. Merci Jean-François pour tous tes conseils, qu'ils soient scientifiques ou personnels, ton humour et l'écoute que tu m'as accordés au cours de ces trois années. Je n'oublierai pas nos discussions endiablées sur un sujet qui nous est cher, le football.

À mon co-directeur de thèse, Monsieur le Docteur Frédéric PECORARI, d'avoir accepté avec enthousiasme de co-encadrer cette thèse. Merci Frédéric pour ta bonne humeur, tes conseils sur les affinités et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir autour de ce magnifique fromage qu'est la Tête de Moine.

À mon encadrant, Monsieur le Docteur François GUERARD, pour sa confiance et son encadrement qui a su m'orienter judicieusement au cours de ces années de recherches. Merci François pour tes conseils, ta patience et l'autonomie que tu m'as accordés qui m'ont permis de réaliser cette thèse de la meilleure des manières. Tu es en grande partie responsable de la maturité que j'ai acquise durant cette thèse donc pour cela, merci encore.

À Madame la professeure Françoise KRAEBER-BODERE et Monsieur le Professeur Michel CHEREL, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci Michel pour t'être intéressé à moi et à mes recherches. Je garderai un très bon souvenir des nombreuses discussions que l'on a pu avoir ensemble sur un grand nombre de sujets.

À Monsieur le Professeur Alain FAIVRE-CHAUVET, pour sa sympathie, sa disponibilité, et ses conseils au cours de ces années qui m'ont permis d'envisager certains de mes travaux sous un autre angle. Je te remercie aussi particulièrement pour l'aide que tu m'as apportée lors de ma rédaction de thèse.

À Mesdames Patricia REMAUD-LE-SAEC, Marie MOUGIN-DEGRAEF et Latifa RBAH-VIDAL pour la gentillesse et la bonne humeur qu'elles m'ont témoignées au cours de cette thèse. Une pensée particulière pour Patricia qui est sûrement l'une des personnes qui m'a permis de me sentir si

bien dans cette équipe, donc merci encore. Je n'oublierai pas ton écoute et le nombre de fois où tu m'as nourri en sucreries.

À Madame la Professeure Joëlle GASCHET, Monsieur le Professeur Yannick Guilloux et Monsieur Sébastien Gouard pour leur disponibilité, leur gentillesse et l'écoute qu'ils m'ont accordées sur des sujets qui attiraient ma curiosité. Un merci particulier à Sébastien pour la production de l'anticorps utilisé dans mes recherches et pour ses nombreux conseils donnés lors de mes expériences.

À Monsieur le Professeur Ferid HADDAD et toute l'équipe du cyclotron Arronax pour la production de l'astate-211 utilisé au cours de cette thèse.

À tous les membres de l'équipe 13 de l'unité 1232 Inserm ainsi qu'au plateau technique de radioactivité de l'IRS-UN (Agnès de France, Valérie Bossé) qui m'ont apporté leur aide, leurs compétences et leurs conseils et avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler.

De plus, je souhaite exprimer mes amitiés à Aurélia Roumesy, François Davodeau, Catherine Maurel, Mickaël bourgeois, Marie-Hélène Gaugler, Stéphanie Olivo, Françoise Léost, Nicolas Chouin et Barbara Mauratou pour leur grande sympathie au cours de ces années.

À tous mes compagnons de laboratoire et particulièrement à Anne-Sophie Navarro, Justine Perrin, Liyan Ouyang, Marion Berdal, Marisa Fernandes Capitaio, Zainab Tabaja, Benjamin Chapolin et Romain Eychenne pour m'avoir supporté, aidé et fait rire durant ces années. Mention spéciale pour Marion et Romain qui m'ont précieusement aidé lors de la relecture de mon manuscrit, encore merci à eux.

Enfin mes pensées vont naturellement,

À mes amis, toujours présents à mes côtés, et **à ma famille** et particulièrement à ma maman qui m'a été d'une aide plus que précieuse en toutes circonstances.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
I. LA VECTORISATION DES RADIOIMMUNOCONJUGUÉS EN MÉDECINE NUCLEAIRE	3
I-1. LA MEDECINE NUCLEAIRE.....	3
I-2. LES VECTEURS IMMUNOLOGIQUES.....	4
<i>I-2.1. Les anticorps et leurs dérivés.....</i>	<i>4</i>
I-2.1.1. Ingénierie des anticorps.....	5
I-2.1.2. Digestion des anticorps et pharmacocinétique	6
<i>I-2.2. Les affinitines</i>	<i>8</i>
<i>I-2.3. L'immunociblage</i>	<i>9</i>
I-2.3.1. Ciblage direct.....	9
I-2.3.2. Ciblage en deux étapes.....	10
I-3. LE RADIONUCLEIDE.....	12
<i>I-3.1. Les radionucléides en imagerie</i>	<i>13</i>
I-3.1.1. Emetteurs de rayonnements gamma (γ)	13
I-3.1.2. Emetteurs de rayonnements bêta plus (β^+).....	15
<i>I-3.2. Les radionucléides en thérapie</i>	<i>17</i>
I-3.2.1. Emetteurs de rayonnements bêta moins (β^-)	17
I-3.2.2. Emetteurs de rayonnements alpha (α).....	19
I-3.2.3. Emetteurs d'électrons Auger (e^- Auger)	20
I-4. METHODES CONVENTIONNELLES DE MARQUAGE DE PROTEINES.....	21
II. LES HALOGENES LOURDS EN MEDECINE NUCLEAIRE	25
II-1. LES HALOGENES.....	25
<i>II-1.1. Les isotopes radioactifs de l'iode.....</i>	<i>25</i>
II-1.1.1. L'iode-123	26
II-1.1.2. L'iode-124.....	26
II-1.1.3. L'iode-125	26
II-1.1.4. L'iode-131	27
<i>II-1.2. L'astate-211</i>	<i>27</i>
II-1.2.1. Caractéristiques physiques et chimiques.....	28
II-1.2.2. Production de l'astate-211	28
II-2. RADIOMARQUAGE DE PROTEINES A L'IODE ET A L'ASTATE-211.....	30
<i>II-2.1. Radiomarquage à l'iode radioactif.....</i>	<i>30</i>
II-2.1.1. Radiomarquage par substitution électrophile.....	30
II-2.1.2. Radiomarquage par substitution nucléophile.....	33

II-2.2. Radiomarquage à l'astate-211.....	34
I-2.2.1. Radiomarquage par substitution électrophile et nucléophile	35
II-2.3. Limites des couplages conventionnels.....	36
III. APPORT DE LA CHIMIE CLICK DANS LE DEVELOPPEMENT DES RADIOPHARMACEUTIQUES	39
III-1. HISTORIQUE	39
III-1.1. La chimie click.....	39
III-1.2. La chimie bio-orthogonale.....	40
III-2. LES PREMIERES REACTIONS BIO-ORTHOAGONALES	41
III-3. LES REACTIONS DE CYCLOADDITIONS BIO-ORTHOAGONALES.....	42
III-3.1. Cycloadditions entre azoture et alcyne	42
III-3.1.1. Cycloaddition de Huisgen 1,3-dipolaire	42
III-3.1.2. Cycloaddition catalysée au cuivre (CuAAC).....	43
III-3.1.3. Cycloaddition assistée par contrainte stérique (SPAAC).....	45
III-3.2. Réactions de Diels-Alder.....	47
III-3.2.1. Alcènes et alcynes contraints	48
III-3.2.2. Tétrazines	50
III-3.3. Autres réactions bio-orthogonales.....	51
III-4. APPORT DE LA CHIMIE BIO-ORTHOAGONALE DANS LE DEVELOPPEMENT DES RADIOPHARMACEUTIQUES	53
III-4.1. Radiomarquage à partir de groupements prosthétiques.....	53
III-4.1.1. CuAAC	54
III-4.1.2. SPAAC	55
III-4.1.3. IEDDA.....	56
III-4.2. Radiomarquage en deux étapes – préciblage	58
III-5. BIOCONJUGAISON « SITE-SPECIFIQUE » SUR DES PROTEINES.....	59
III-5.1. Réduction et repontage de ponts disulfures.....	60
III-5.1.1. Les bisulfones	60
III-5.1.2. Les maléimides 1,2 disubstitués	62
III-5.2. Insertion d'acides aminés non naturels	64
III-5.3. Réactions enzymatiques.....	66
RESULTATS ET DISCUSSIONS	69
INTRODUCTION DU SUJET DE RECHERCHE	71
1. Développement du radiomarquage d'anticorps à l'iode-125 et à l'astate-211 à partir de réactions bio-orthogonales	71
2. Développement d'un linker trifonctionnel pour le radiomarquage site-spécifique et bio-orthogonal de vecteurs immunologiques.....	73
IV. DEVELOPPEMENT DU RADIOMARQUAGE D'ANTICORPS A L'IODE-125 ET A L'ASTATE-211 A PARTIR DE REACTIONS BIO-ORTHOAGONALES	77

IV-1. MISE AU POINT DU RADIOMARQUAGE SUR UN MODELE SIMPLE.....	77
IV-1.1. Synthèses des précurseurs bifonctionnels	77
IV-1.2. Mise au point du radiomarquage des précurseurs bifonctionnels cliquables	81
IV-1.2.1. Radiomarquage par démétallation électrophile aromatique	82
IV-1.2.2. Radiomarquage par substitution nucléophile aromatique.....	83
IV-1.3. Synthèses des peptides modèles cliquables	90
IV-1.3.1. Synthèse du peptide modèle.....	91
IV-1.3.2. Synthèses des linkers cliquables.....	92
IV-1.3.3. Couplages des linkers cliquables sur le peptide modèle	93
IV-1.4. Génération des peptides modèles cliquables - références iodées froides	94
IV-1.5. Etude comparative des différents systèmes bio-orthogonaux.....	95
IV-2. RADIOMARQUAGE D'UN VECTEUR IMMUNOLOGIQUE D'INTERET PAR REACTIONS BIO-ORTHOAGONALES.....	100
IV-2.1. Modifications chimiques de l'anticorps monoclonal (mAb) 9E7.4 anti CD138 murin	101
IV-2.1.1. Modifications chimiques par des groupements TCO	101
IV-2.1.2. Modifications chimiques par des groupements DIBAC	102
IV-2.2. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 - système IEDDA.....	103
IV-2.2.1. Mise au point du radiomarquage de l'anticorps 9E7.4-TCO.....	103
IV-2.2.2. Optimisation des conditions de radiomarquage à l'astate-211 du précurseur 4_N à « haute activité / haut volume de solution mère d'astate »	105
IV-2.2.3. Radiomarquage à haute activité de l'anticorps 9E7.4-TCO	108
IV-2.2.4. Test d'immunoréactivité et de stabilité sérique.....	109
IV-2.3. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 - système SPAAC.....	110
IV-2.3.1. Mise au point du radiomarquage de l'anticorps 9E7.4-TCO.....	110
IV-2.3.2. Test d'immunoréactivité	111
IV-3. CONCLUSION	111
V. DEVELOPPEMENT D'UN LINKER TRIFONCTIONNEL POUR LE RADIOMARQUAGE SITE SPECIFIQUE ET BIO-ORTHOAGONAL DE VECTEURS IMMUNOLOGIQUES	113
V-1. SYNTHÈSE DU LINKER TRIFONCTIONNEL	114
V-1.1. Synthèse de la 1,4-dichlorotétrazine.....	114
V-1.2. Synthèse du 2-aminoéthylmaléimide	115
V-1.3. Couplage entre la 1,4-dichlorotétrazine et le 2-aminoéthylmaléimide.....	116
V-2. SYNTHÈSE DU PRECURSEUR RADIOMARQUABLE TCO	116
V-2.1. Synthèses du précurseur stannique-TCO et sa référence iodée froide	116
V-3. EVALUATION ET OPTIMISATION DU COUPLAGE DE THIOLS SUR LE LINKER TRIFONCTIONNEL TETRAZINE	117
V-3.1. Tests de couplage de thiols sur le linker trifonctionnel	117
V-3.2. Tests de compétition en présence d'amines	119
V-4. COUPLAGE ENTRE LE LINKER TRIFONCTIONNEL ET L'AFFITINE C5	121
V-5. CONCLUSION	122
CONCLUSION GENERALE.....	123

PARTIE EXPERIMENTALE	131
PARTIE 1 : DEVELOPPEMENT DU RADIOMARQUAGE D'ANTICORPS A L'IODE ET A L'ASTATE-211 A PARTIR DE REACTIONS BIO-ORTHOgonALES	133
<i>I. Synthèses organiques</i>	133
<i>II. Radiochimie</i>	169
II-1. Radiomarquages précurseurs bifonctionnels	169
II-2. Radiomarquages peptides cliquables – Etude cinétique	180
<i>III. Modifications d'anticorps et radiomarquages</i>	186
III-1. Anticorps 9E7.4-TCO	187
III-2. Anticorps 9E7.4-DIBAC.....	188
PARTIE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN LINKER TRIFONCTIONNEL POUR LE RADIOMARQUAGE SITE-SPECIFIQUE ET BIO-ORTHOgonAL DE VECTEURS IMMUNOLOGIQUES	189
<i>I. Synthèses organiques</i>	189
<i>II. Couplage sur l'affinité C5</i>	202
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	205
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	223

LISTE DES ABREVIATIONS

Ach	Anticorps chimérique
AcM	Anticorps monoclonal
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADC	Antibody drug conjugate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AES	Affinity enhancement system
Alk	Alcyne
AMM	Autorisation de mise sur le marché
anti-Ach	Anticorps anti anticorps chimérique
ARN	Acide ribonucléique
BCA	Agent chélatant bifonctionnel
BCN	Bicyclo[6.1.0]non-4-yne
Bn	Benzyle
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle
BPS	Acide bathophénantrolinedisulfonique
Bq	Becquerel
BSA	Albumine de sérum bovin
CCM	Chromatographie sur couche mince
CEA	Antigène carcino-embryonnaire
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CHCl₃	Chloroforme
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CuAAC	Cycloaddition catalysée au cuivre entre un azoture et un alcyne
BARAC	Biarylazacyclooctynone
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DFO	Déféroxamine

DFT	Théorie de la fonctionnelle de la densité
DIBAC	Dibenzoazacyclooctyne
DIBO	Dibenzocyclooctynone
DIFO	Difluorocyclooctyne
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DRO	Dérivé réactif de l'oxygène
DTT	Dithiothréitol
EDC,HCI	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochlorate
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ESI	Ionisation par électronébulisation
Fab	Fragment d'anticorps
FBS	Sérum de veau foetal
Fc	Fragment cristallisable
FDA	Food and Drug Administration's
FDG	Fluorodésoxyglucose
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone
GP	Groupe prosthétique
H₂O	Eau distillée
HCl	Acide chlorhydrique
Hept	Heptane
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HOMO	Orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée
HRMS	Détection à haute résolution et masse exacte
Hz	Hertz
IEDDA	Cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse d'électron
IgG	Immunoglobuline
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITLC-SG	Chromatographie instantanée sur couche mince de gel de silice

K₂CO₃	Carbonate de calcium
kcal	Kilocalorie
kD	Kilodalton
keV	Kiloélectronvolt
LiAlH₄	Tétrahydroaluminure de lithium
LUMO	Orbitale moléculaire la plus basse en énergie non occupée
mAb	Anticorps monoclonal
m-CPBA	Acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque
MeOH	Méthanol
MeV	Mégaélectronvolt
MgSO₄	Sulfate de magnésium
MIBG	<i>Mé</i> ta-iodobenzylguanidine
Na₂SO₃	Sulfite de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium (soude)
ncAA	Acide aminé non canonique
NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimide
NEDDA	Cycloaddition de Diels-Alder à demande normale d'électron
NH₄HCO₃	Bicarbonate d'ammonium
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NOTA	Acide 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacétique
OCT	Cyclooctyne
OMF	Théorie des orbitales moléculaires frontières
PBS	Tampon phosphate salin
PEG	Polyéthylène glycol
pH	Potentiel hydrogène
Ph	Phényle
ppm	Partie par million
PSMA	Antigène membranaire spécifique de la prostate

RIT	Radio-immunothérapie
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RRC	Rendement radiochimique
RuAAC	Cycloaddition catalysée au ruthénium entre un alcyne et un azoture
SAB	Ester d'astatobenzoate de <i>N</i> -succinimidyle
ScFv	Fragment variable à chaîne unique
sCT	Calcitonine de saumon
S_EAr	Substitution électrophile aromatique
SGMIG	Ester de <i>mé</i> ta-iodobenzylguanidine de <i>N</i> -succinimidyle
SIB	Ester d'iodobenzoate de <i>N</i> -succinimidyle
SIPC	Ester de 5-iodo-3-pyridinecarboxylate de <i>N</i> -succinimidyle
S_NAr	Substitution nucléophile aromatique
SPAAC	Cycloaddition assistée par contrainte stérique entre azoture et alcyne tendu
TBTA	Tris(benzyltriazolylmethyl)amine
<i>t</i>-BuOK	<i>Tert</i> -butylate de potassium
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TCO	<i>Trans</i> -cyclooctène
TEL	Transfert d'énergie linéique
TEMP	Tomoscintigraphie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positons
TFA	Acide trifluoroacétique
THPTA	Tris-hydroxypropyltriazolylmethylamine
TMSOAc	Acétate de triméthylsilyle
TMSOTFA	Trifluoromethanesulfonate de triméthylsilyle
uAA	Acide aminé non naturel
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA VECTORISATION DES RADIOIMMUNOCONJUGUÉS EN MÉDECINE NUCLEAIRE

I-1. La médecine nucléaire

La médecine nucléaire est une spécialité médicale basée sur l'utilisation de médicaments radioactifs à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Elle a vu le jour dans les années 1900 après la découverte par Pierre et Marie Curie de l'effet des radiations et de la possibilité de les utiliser pour des applications médicales en mettant des substances radioactives en contact de tumeurs facilement accessibles (curiethérapie). Ces expériences se basaient sur l'utilisation d'aiguilles à base de radium (^{226}Ra) appliquées dans les tissus malades pour le traitement des cancers des organes génitaux, du sein et de la peau. Cependant l'importante exposition aux radiations pour l'opérateur et pour les patients a mené au développement de nouvelles sources radioactives.

En 1934, Frédéric et Irène Joliot-Curie apportent une avancée majeure pour cette discipline en découvrant comment produire artificiellement des radionucléides (^{32}P , ^{131}I). Toutefois, il faut attendre 1936 pour voir apparaître leurs premiers essais thérapeutiques avec l'utilisation du phosphore-32 comme traitement des leucémies, puis en 1941 de l'iode-131 pour traiter l'hyperthyroïdie. Grâce aux progrès en radiochimie et en radiophysique, la médecine nucléaire a connu un grand essor ces 50 dernières années, avec une gamme de radionucléides beaucoup plus large caractérisés par différents types de rayonnements (gamma, bêta plus, bêta moins, alpha).

Aujourd'hui, la médecine nucléaire est une discipline qui joue un rôle important non seulement dans le diagnostic des pathologies humaines et animales mais aussi dans le traitement de certains cancers. Elle utilise des médicaments appelés radiopharmaceutiques (Figure 1) qui sont administrés au patient par ingestion, inhalation ou injection intraveineuse.

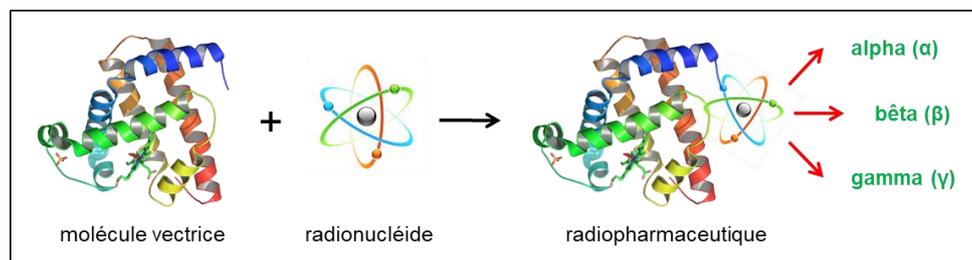


Figure 1 : Principe d'un radiopharmaceutique

Le terme radiopharmaceutique est utilisé pour désigner une famille de médicaments allant du simple radionucléide à des préparations plus complexes où les radionucléides sont

liés à des molécules vectrices. Dans ce dernier cas, le vecteur doit être capable de cibler spécifiquement l'organe ou les cellules d'intérêt, et le radionucléide doit permettre leur détection (imagerie ou scintigraphie) ou leur destruction (radiothérapie vectorisée) selon le type de rayonnement émis.

I-2. Les vecteurs immunologiques

Les vecteurs immunologiques sont des molécules chimiques, des peptides ou encore des protéines, qui peuvent stimuler ou inhiber le système immunitaire des organismes vivants. Ne seront présentés dans ce travail que les vecteurs type anticorps, dérivés d'anticorps et affinités.

I-2.1. Les anticorps et leurs dérivés

Les anticorps sont des glycoprotéines (ou immunoglobulines) produites naturellement par les plasmocytes du système immunitaire. Ils sont présents sous forme soluble dans le plasma et sous forme membranaire comme récepteurs de l'antigène à la surface des cellules B (lymphocytes B). En effet, face à un corps étranger (bactérie, virus, toxine, etc.) les lymphocytes B vont être activés par le biais d'une liaison entre le corps étranger ou l'antigène et les récepteurs membranaires spécifiques représentés par les anticorps membranaires. Les complexes antigènes-anticorps membranaires sont alors internalisés pour être dégradés par les lysosomes, sous forme de petits fragments qui vont ensuite être réexposés sur la membrane cellulaire par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type II. Le lymphocyte B activé va se multiplier sous forme de clone pour faciliter la réponse immunitaire. Une partie des cellules clonales va se transformer en plasmocytes qui vont sécréter des anticorps, l'autre partie restera sous forme de lymphocytes B mémoire.

En 1972, Rodney Robert Porter¹, biochimiste anglais, a obtenu le prix Nobel de médecine pour avoir déterminé la structure chimique des anticorps. Ces macromolécules aux structures et aux propriétés particulières se divisent en cinq classes : les IgG (immunoglobulines G), les IgD, les IgA, les IgE et les IgM. Elles diffèrent par leur poids moléculaire, leur charge, leur composition en acides aminés et en sucres et leur structure tertiaire. Les IgG sont les immunoglobulines les plus utilisées aussi bien en médecine nucléaire qu'en immunothérapie. Elles possèdent une unité de base composée de quatre chaînes : deux chaînes légères (notées Light ou L) identiques (23 kD) et deux chaînes lourdes (notées Heavy ou H) identiques ([50-70] kD). Les chaînes lourdes et légères sont reliées entre elles par des ponts-disulfures dits « inter-chaînes » ainsi que par des liaisons non-covalentes qui leurs donnent une forme de Y. Le nombre de ponts inter-chaînes varie en

fonction de la nature de l'immunoglobuline. On trouve également des ponts disulfures dits « intra-chaînes » au sein de chaque chaîne polypeptidique. L'étude des séquences chimiques des chaînes lourdes et légères permet de distinguer différentes régions basées sur la variabilité des séquences d'acides aminés. Les chaînes légères (régions V_L et C_L) comportent chacune 110 acides aminés, et les chaînes lourdes (régions V_H et C_H) comportent 110 (V_H) et 340 (C_H) acides aminés (Figure 2).

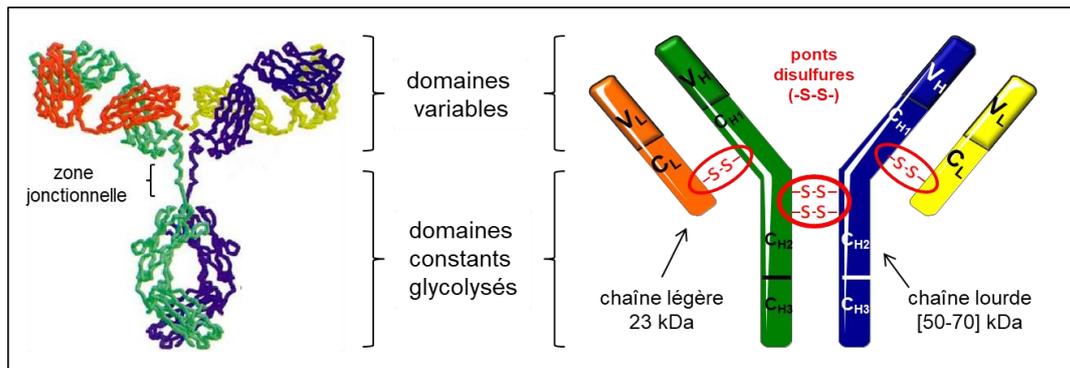


Figure 2 : Structure cristallographique et schématique d'une immunoglobuline IgG₁

Chacune de ces régions peut être groupée selon deux domaines : le domaine variable constitué des régions V_L et V_H représentant le site de reconnaissance de l'anticorps capable de cibler des antigènes spécifiques, et le domaine constant, constitué des régions C_L et C_H (C_{H1} / C_{H2} / C_{H3}), composant la plus grande partie de l'anticorps servant de déclencheur lors d'une réaction immunitaire.

I-2.1.1. Ingénierie des anticorps

La production d'anticorps a longtemps été une difficulté due à la faible durée de vie des cellules les sécrétant (plasmocytes). Les premiers traitements d'immunothérapie ont consisté à injecter chez les malades des séra humains de personnes connues pour avoir été exposées à un antigène. Ces séra étaient composés d'un ensemble d'anticorps issus de plusieurs clones B ayant réagi contre l'antigène. Ils ont été utilisés en l'état ou après isolation spécifique des gamma-protéines (immunoglobulines). Dans tous les cas, les préparations étaient composées d'anticorps polyclonaux (anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné) difficilement caractérisables.

Il a fallu attendre les années 1970 pour voir naître la première méthode de production d'anticorps monoclonaux (anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné) basée sur la technique des « hybridomes ». Pour produire des lignées stables de cellules productrices d'anticorps, en 1975, Köhler et Milstein² ont élaboré une méthode de production visant à fusionner des lymphocytes B (cellules productrices

d'anticorps monoclonaux) issus de souris, avec des cellules myélomateuses (cellules cancéreuses immortelles). Cette fusion donna naissance aux hybridomes, cellules capables de sécréter à la fois des anticorps et de se diviser indéfiniment. Cette technique permit l'obtention de clones cellulaires produisant des anticorps monoclonaux (mAb) utilisables pour de nombreuses applications médicales.

Bien que ces méthodes d'hybridation aient permis de simplifier grandement leur production, lors de l'administration chez l'homme, l'origine murine de ces anticorps a rapidement généré des réponses immunitaires néfastes pouvant aller jusqu'à la mort du patient. Pour résoudre ces problèmes de réactions immunologiques, de nouveaux anticorps dits chimériques (Ach) « souris-homme » ont été développés (Figure 3).

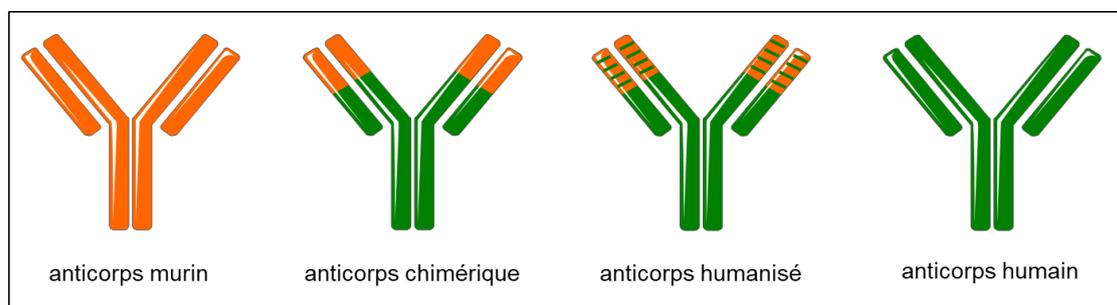


Figure 3 : Différents types d'anticorps monoclonaux

Ces vecteurs présentent un domaine variable issu de la souris et un domaine constant issu de l'homme, diminuant ainsi la réponse immunitaire après injection. Toutefois, le risque de production d'anticorps « anti-Ach » par l'organisme humain n'a pas été totalement éliminé. C'est pourquoi des anticorps humanisés ont ensuite été développés (90% humains) où seules les parties hypervariables nécessaires à la reconnaissance des antigènes tumoraux ont été incorporées à l'anticorps. Aujourd'hui, les progrès technologiques font qu'il est possible de produire des anticorps monoclonaux humains à partir de cellules modifiées en culture.

I-2.1.2. Digestion des anticorps et pharmacocinétique

Pour comprendre les relations « structure-fonction » des immunoglobulines, les biochimistes ont développé de nouveaux vecteurs immunologiques issus d'anticorps murins afin d'étudier les différences de biodistribution et de doses fixées à la tumeur. Puisque seul le domaine variable des immunoglobulines est utile comme vecteur en médecine nucléaire, des méthodes de digestion enzymatique ont été imaginées afin de diminuer la taille des vecteurs et faciliter ainsi leur accès aux cibles antigéniques. Selon l'enzyme utilisée, les fragments obtenus ont des poids moléculaires différents et ont donc des applications

médicales différentes. Les deux méthodes décrites dans ce travail sont celles faisant intervenir la papaine et la pepsine.

La digestion par la papaine coupe l'immunoglobuline au-dessus de sa zone de jonction avant le pont disulfure inter-chaîne. Ce clivage produit trois fragments : deux fragments identiques appelés « Fab » (Fragment antigen bond) contenant la zone de reconnaissance de l'immunoglobuline, et un autre fragment dit « Fc » (Fragment cristallisable), effecteur de l'immunité mais n'intervenant pas dans le processus de vectorisation (Figure 4a). Dans le cas de la pepsine, la scission s'effectue en dessous du pont disulfure inter-chaîne. Ce clivage produit alors un fragment appelé « $(Fab)'_2$ » comportant la double zone de reconnaissance de l'immunoglobuline, et un fragment « Fc » coupé en petits morceaux peptidiques sans action biologique (Figure 4b).

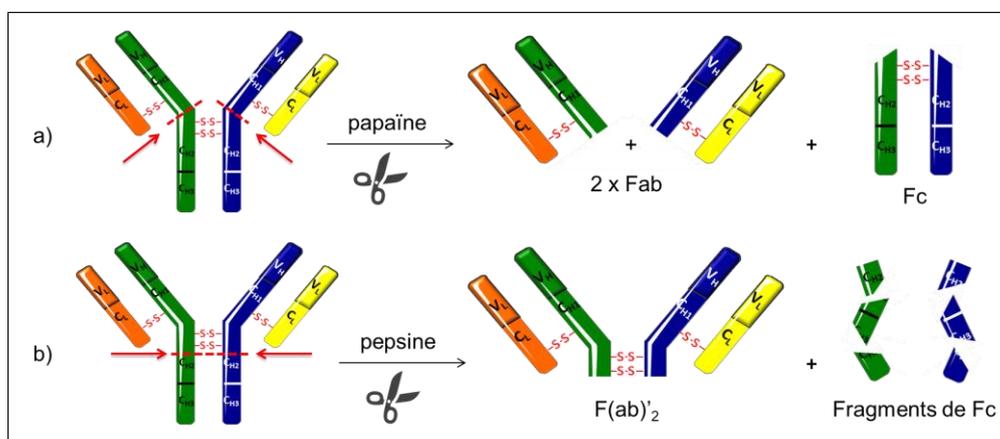


Figure 4 : Production de fragments d'anticorps par digestion (papaine / pepsine)

Suivant le poids moléculaire, ces vecteurs vont avoir des affinités tumorales et des caractéristiques de biodistribution différentes. Au fur et à mesure des avancées apportées par le génie génétique, il a été possible de développer de nouveaux vecteurs³ encore plus petits constitués seulement des domaines variables V_L et V_H (fragment ScFv). L'association de ces deux fragments, liés entre eux par un linker, présente une biodistribution rapide vers la tumeur et une élimination rapide de la circulation sanguine. Toutefois, leur faible avidité pour l'antigène se traduit généralement par une vitesse de dissociation rapide des complexes antigènes-dérivés d'anticorps.

Pour augmenter cette avidité et donc le temps de résidence dans la tumeur, des combinaisons entre fragments ScFv et fragments de région constante (C_{H2} et C_{H3}) ont été effectuées afin de moduler leurs cinétiques d'élimination. De plus, l'association de plusieurs fragments ScFv entre eux a permis la génération d'espèces bivalentes, trivalentes voire tétravalentes aux affinités accrues pour l'antigène considéré. (Figure 5).

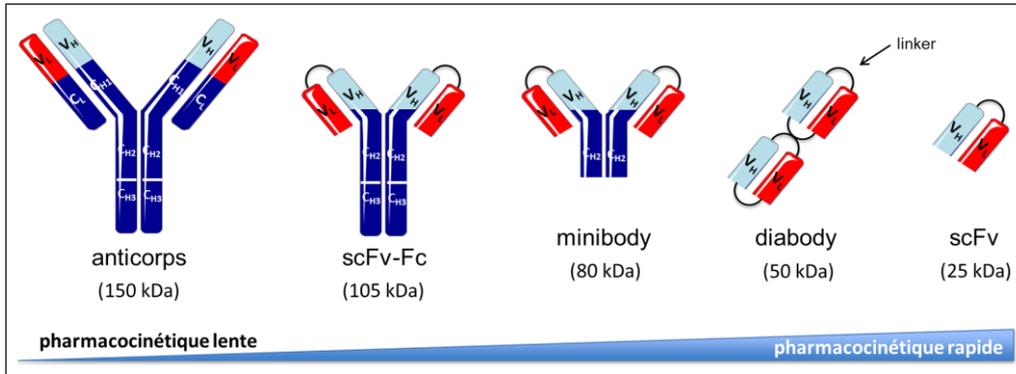


Figure 5 : Différents vecteurs immunologiques issus des anticorps

De par leur faible poids moléculaire, ces fragments considérés comme des nanovecteurs, vont ainsi cibler plus rapidement les tumeurs et accéder plus facilement aux tissus cancéreux profonds ou avancés, difficiles d'accès pour les macrovecteurs de type anticorps.

I-2.2. Les affitines

Les affitines (nom commercial Nanofitines[®]) sont des polypeptides artificiels issus des protéines archées « Sac7d et Sso7d » découvertes en 1974 dans les geysers du Parc national de Yellowstone. Ces polypeptides, composés de 66 (Sac7d) et 64 (Sso7d) aminoacides, appartiennent aux protéines chromosomiques de l'archéobactérie hyperthermophile « *Sulfolobus acidocaldarius*⁴ et *Sulfolobus solfataricus*⁵ ». L'environnement drastique dans lequel évoluent ces bactéries a provoqué des processus adaptatifs, avec une production de protéines qui présentent une très grande stabilité à la chaleur (90 - 100 °C)⁶ et aux fortes variations de pH (0 < pH < 12)⁷.

Souvent assimilées à la famille des histones (protéines localisées dans le noyau des cellules eucaryotes et représentant le principal constituant des chromosomes), Sac7d et Sso7d se lient à l'ADN pour créer un complexe augmentant sa compaction et sa résistance à la déshybridation thermique de 40 °C, protégeant ainsi le génome contre la dénaturation thermique (Figure 6).

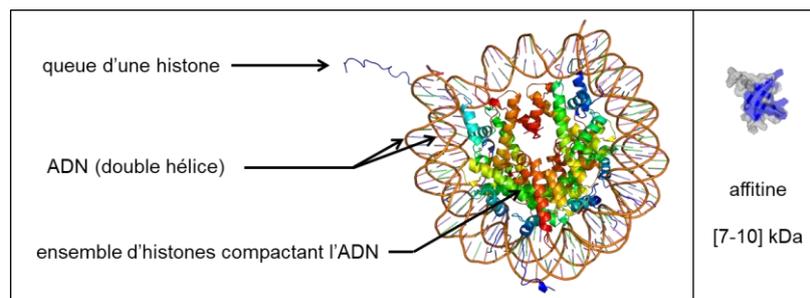


Figure 6 : Représentation du complexe formé entre un fragment d'ADN et différentes protéines histones

Après avoir découvert ces protéines aux caractéristiques prometteuses, les chercheurs se sont intéressés aux modifications possibles pouvant être effectuées sur leur site de fixation afin qu'elles ciblent, non pas l'ADN, mais d'autres cibles biologiques comme des antigènes surexprimés dans différents cancers. C'est ainsi que la technique du ribosome display a permis la conception de banques d'affinités capables de cibler des antigènes, laissant ainsi entrevoir de nouveaux outils pour la lutte contre le cancer⁸.

Ces affinités ainsi générées combinent, avec leur capacité à former des liaisons spécifiques de haute affinité, leurs caractéristiques initiales (thermorésistance et acidorésistance) très utiles pour le radiomarquage même sous conditions dures. Ces vecteurs, comme les anticorps, seront aussi étudiés au cours de ce projet de recherche.

I-2.3. L'immunociblage

L'immunociblage est la capacité qu'ont les vecteurs immunologiques de reconnaître spécifiquement des antigènes présents sur une cible biologique. Plus le vecteur possède une vitesse d'association élevée, et une vitesse de dissociation faible avec l'antigène, et plus son ciblage sera efficace. Par ailleurs, plus la densité antigénique de la cible (organes, cellules tumorales) est importante, et plus la qualité de l'image obtenue (imagerie) ou l'efficacité du traitement (thérapie) seront élevées.

Pour cibler une tumeur en cancérologie, on utilise le plus souvent des antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales. Ces antigènes sont très souvent présents également sur des cellules ou tissus non cancéreux puisque les lignées cancéreuses dérivent forcément de lignées cellulaires saines. Les principales différences qui vont influencer un ciblage immunologique sont le niveau d'expression des antigènes, fort pour la tumeur et faible pour les tissus sains, et l'accessibilité de l'antigène, qui peut varier entre cellules tumorales et cellules saines. Des techniques de ciblage en une ou plusieurs étapes ont été développées en exploitant ces particularités.

I-2.3.1. Ciblage direct

Le ciblage direct consiste à administrer au patient le vecteur radiomarqué par voie intraveineuse ou loco-régionale. Après injection, le vecteur se diffuse dans l'organisme et une partie se fixe sur la tumeur, le reste étant métabolisé et éliminé par différents organes (foie, reins, Figure 7). L'acquisition d'images en radio-immunodiagnostic se fait lorsque le ratio anticorps circulant/anticorps fixé est le plus bas, afin d'obtenir le meilleur contraste possible. Le temps d'attente entre l'injection et l'imagerie dépend de la demi-vie effective de l'anticorps (> 24 h).

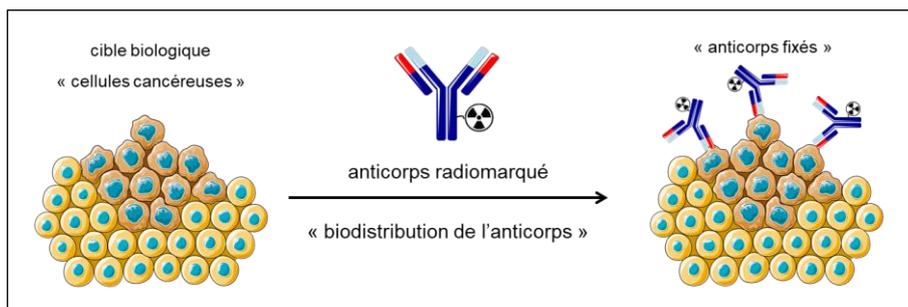


Figure 7 : Exemple de ciblage direct de cellules tumorales par un anticorps radiomarqué

Cependant, certains isotopes de courte période, tels que le bismuth-213 ($t_{1/2} = 45,6$ min), le fluor-18 ($t_{1/2} = 109,8$ min) ou le gallium-68 ($t_{1/2} = 67,7$ min) ne sont pas adaptés sauf cas particulier à la biodistribution lente des anticorps qui induit le dépôt de la radioactivité en dehors de l'environnement tumoral. De plus, en radioimmunothérapie, cette biodistribution lente des anticorps peut être à l'origine d'évènements indésirables liés à l'irradiation non sélective de tissus sains au cours de la circulation de l'anticorps dans l'organisme. Afin de résoudre ces limites, de nouveaux systèmes de ciblage utilisant des nanovecteurs ou des techniques dites de ciblage multi-étapes ont été développés.

I-2.3.2. Ciblage en deux étapes

Ces méthodes consistent à administrer au patient un anticorps non radiomarqué qui possède, en plus de ses sites de reconnaissance à l'antigène (régions V_L et V_H), des sites de fixation pour une autre petite molécule. Lorsque le taux minimal d'anticorps circulants et le taux maximal d'anticorps fixés sur la tumeur est atteint, une petite molécule préalablement radiomarquée est injectée. Celle-ci est choisie pour se distribuer très rapidement dans l'organisme et se fixer sur l'anticorps prélocalisé sur la cible biologique. La fraction de molécule non fixée est éliminée rapidement de l'organisme. Cette méthode permet de minimiser la dose reçue par les tissus sains, et d'éviter les inconvénients liés à l'élimination d'un anticorps radiomarqué.

L'une des premières méthodes développées repose sur le système « (strept)avidine-biotine ». La biotine, aussi appelée vitamine B, est une molécule hétérocyclique possédant une très forte affinité pour deux autres protéines : l'avidine et la (strept)avidine. Il s'agit de l'une des plus fortes interactions non covalentes connues ($K_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Ce système en deux étapes consiste d'abord à injecter un anticorps couplé à la (strept)avidine. Après distribution à la tumeur, la biotine radiomarquée est ensuite injectée et se couple sur la (strept)avidine (Figure 8). Le système inverse (anticorps-biotine puis (strept)avidine radiomarquée) a aussi été utilisé.

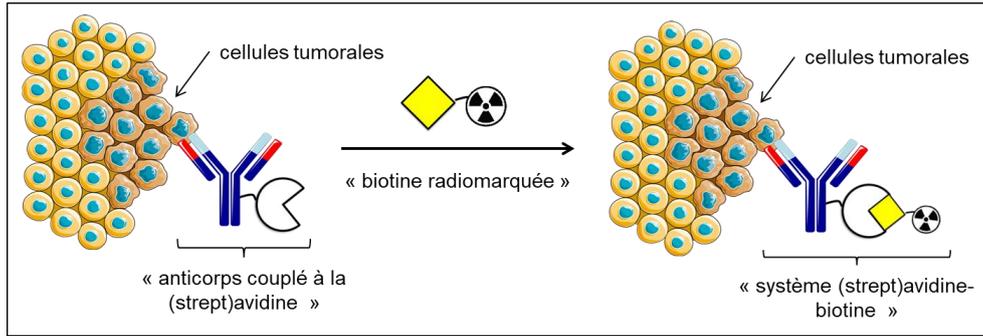


Figure 8 : Principe du système (strep)avidine/biotine en deux temps

Bien que toutes ces stratégies se soient révélées prometteuses dans le domaine préclinique, leur mise en œuvre clinique a été quelque peu limitée par des problèmes intrinsèques tels que l'immunogénicité des bioconjugués modifiés à la (strept)avidine.

Dans les années 1980, une autre méthode de ciblage en deux étapes appelée AES (Affinity Enhancement System) a été développée⁹. Cette voie alternative consiste à injecter d'abord un anticorps non radiomarqué présentant une double affinité : une spécifique à l'antigène tumoral, et une autre pour un haptène radiomarqué injecté après fixation de l'anticorps sur la tumeur (Figure 9a). Pour augmenter l'affinité entre l'anticorps et l'haptène, de nouveaux haptènes bivalents capables de former un complexe entre deux anticorps ont été conçus (Figure 9b).

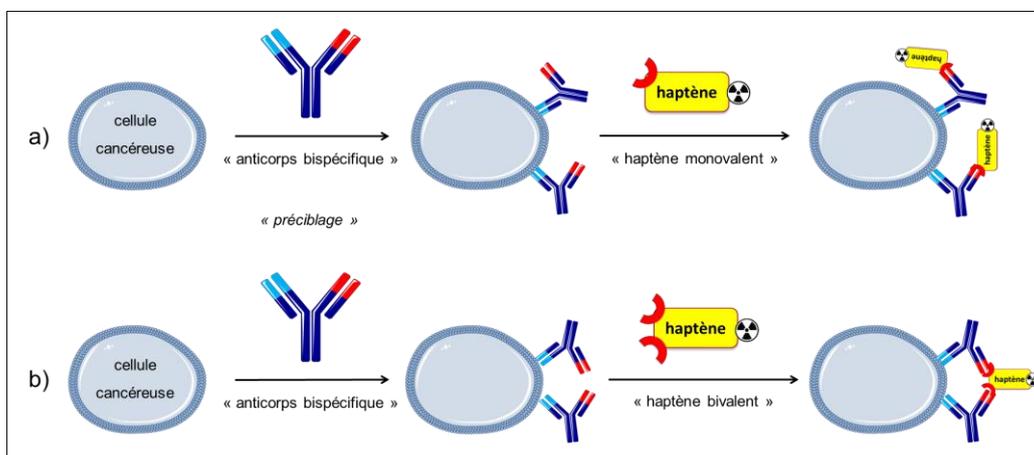


Figure 9 : Méthode de couplage en deux temps AES (Affinity Enhancement System) avec haptènes mono/bivalents

En 1990, les premiers essais cliniques utilisant la méthode AES sur des tumeurs associées à l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), une protéine surexprimée dans certains cancers colorectaux ou carcinomes, ont été décrits⁹. Ces études ont montré l'efficacité de ce ciblage en diagnostic, avec une sensibilité et un ratio tissus tumoraux/ tissus sains bien supérieurs aux méthodes conventionnelles d'immunoscintigraphie. Puis en 2007, des

résultats supplémentaires et tout aussi prometteurs ont été publiés pour des applications en imagerie ou en thérapie¹⁰.

Ces dix dernières années, de nombreuses techniques de ciblage basées sur l'utilisation de nouvelles fonctions de couplage issues de la *chimie click* ont vu le jour¹¹. Ces fonctions, présentant une forte chimiosélectivité, ont permis d'éliminer un nombre important de réactions parasites observées lors des méthodes précédemment citées. Cela a permis notamment le développement de nouvelles méthodes de préciblage par couplages bio-orthogonaux. Ce sujet sera développé plus en détail dans la partie III-4-2.

Après avoir décrit les vecteurs immunologiques et leur fonctionnement, nous allons maintenant nous intéresser au radionucléide et à ses caractéristiques physiques.

I-3. Le radionucléide

Il existe dans la nature des atomes instables que l'on appelle radioisotopes ou radionucléides. Ces isotopes radioactifs existent naturellement à la surface de la terre (l'uranium par exemple) mais peuvent aussi être produits artificiellement par l'homme selon différents moyens (centrales nucléaires, accélérateurs de particules, générateurs). Leur instabilité s'explique par un excès de protons ou de neutrons, voire des deux.

Afin de retrouver leur état stable, ces isotopes émettent différents rayonnements (alpha (α), bêta (β), gamma (γ), e^- Auger, X), amenant à différentes applications pour la médecine nucléaire (Figure 10).

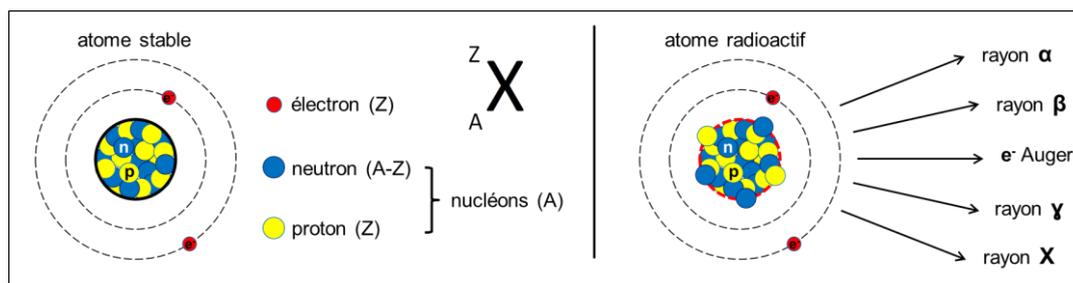


Figure 10 : Structure chimique d'un atome stable et d'un atome radioactif avec les différents types de rayonnements utilisés en médecine nucléaire

Outre les particules qu'ils émettent, ces isotopes sont aussi sélectionnés par rapport à leurs caractéristiques physiques, et notamment leur période radioactive et leur disponibilité. Il est essentiel que leur période soit assez longue pour permettre l'acheminement, la préparation et la vectorisation du radiopharmaceutique à la tumeur, mais qu'elle ne soit pas non plus trop longue afin d'éviter l'irradiation non spécifique de tissus

sains. La disponibilité est aussi un paramètre important car certains radionucléides demandent des conditions de production particulièrement inadaptées pour des applications médicales. Peu de radionucléides répondent à tous ces critères, mais plusieurs s'approchent des caractéristiques idéales pour des applications en médecine nucléaire.

I-3.1. Les radionucléides en imagerie

L'imagerie nucléaire a permis l'émergence de nouvelles techniques de diagnostic plus précises donnant des images internes sur le fonctionnement du corps humain. Ces avancées ont notamment vu le jour grâce aux progrès du numérique. L'élaboration de nouvelles caméras, munies de détecteurs de plus en plus sensibles, ont permis de diminuer les doses injectées par patient tout en améliorant la qualité du diagnostic.

Les radionucléides utilisés pour ces applications doivent émettre des particules très pénétrantes pour pouvoir être détectées hors du patient, mais peu ionisantes pour réduire au maximum les dégâts infligés aux tissus sains. Deux types d'imagerie sont utilisés de nos jours : la Tomoscintigraphie par Emission Monophotonique (TEMP) qui utilise des radionucléides émetteurs de particules γ , et la Tomographie par Emission de Positons (TEP) qui utilise des radionucléides émetteurs de particules β^+ .

Ces deux techniques reposent sur le principe général de la scintigraphie. Elle consiste à injecter au patient un traceur radioactif, dont les caractéristiques physiques et biologiques sont connues, pour obtenir une image du fonctionnement physiologique d'un organe. A la différence des techniques d'imagerie dite morphologique (rayons X, imagerie par résonance magnétique (IRM)), ces techniques permettent d'étudier la fonctionnalité des organes et/ou tissus afin d'y déceler les altérations physiologiques que ceux-ci peuvent présenter, notamment dans le cas de cancers.

I-3.1.1. Emetteurs de rayonnements gamma (γ)

Découverts en 1900 par le chimiste français Paul Villard, les rayonnements gamma (γ) sont des ondes électromagnétiques constituées de photons de faible longueur d'onde ($\lambda < 10^{-12}$) émis lors de la désexcitation de certains noyaux radioactifs. Afin de pouvoir détecter ces rayonnements (photons) émis après injection d'un radionucléide chez le patient, des gamma-caméras (ou caméras à scintillation) ont été développées, donnant après traitements numériques des images appelées « scintigraphies ». Les scintigraphies tirent leur nom de la faculté de certains cristaux, comme l'iodure de sodium dopé avec du thallium, à scintiller sous l'effet des rayonnements, ici les rayonnements gamma.

En 1957, Hal Oscar Anger¹², biophysicien américain, améliora cette technique en développant la Tomoscintigraphie par Emission Monophotonique » (TEMP ou SPECT en anglais). Cette technique de scintigraphie permet d'effectuer des images et des reconstructions métaboliques en trois dimensions à l'aide de gamma caméras tournant autour du patient (Anger camera, Figure 11).

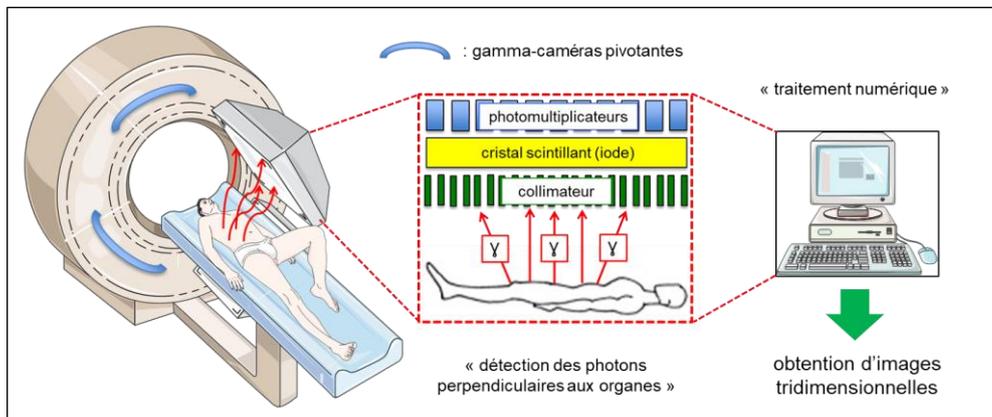


Figure 11 : Principe de la caméra Anger (TEMP) développée par Anger

Le premier radionucléide utilisé chez l'homme a été l'iode-131 pour son faible coût, sa bonne accessibilité et sa facilité à former des liaisons covalentes avec les protéines vectrices. Il présente une émission γ énergétique (364 keV) de grande pénétration tissulaire, et un rayonnement β^- de 606 keV utilisé en radiothérapie interne vectorisée. L'indium-111 a aussi trouvé son application en scintigraphie gamma, notamment pour le marquage des cellules immunitaires (globules blancs/rouges, plaquettes) afin de détecter les foyers infectieux récents¹³. Il possède deux émissions γ de 171 et 245 keV et une période relativement longue ($t_{1/2} = 2,8$ jrs) qui rend son utilisation efficace pour l'obtention d'images tardives, comme dans le cas des cancers hématologiques.

Malgré tout, le radioisotope le plus utilisé pour l'imagerie TEMP reste le technétium-99m. Ce radioisotope, produit à partir d'un générateur ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), présente des caractéristiques physiques ($t_{1/2} = 6,0$ h et $E_\gamma = 141$ keV) idéales pour l'imagerie médicale. Il représente plus de 95% des examens TEMP réalisés en milieu hospitalier¹⁴, particulièrement dans le cas de scintigraphies osseuses et cardiaques (Tableau 1).

Tableau 1 : Emetteurs γ les plus utilisés pour l'imagerie TEMP

radionucléide	période	$E_{\text{rayonnement } \gamma}$
technétium-99m	6,0 h	141 KeV
indium-111	2,8 jrs	171 KeV – 245 KeV
iode-131	8,0 jrs	364 KeV

Toutefois, la TEMP seule devient de moins en moins utilisée à cause de la concurrence faite par les méthodes alternatives associant cette technique d'imagerie aux rayons X ou à l'imagerie par résonance magnétique qui permettent d'améliorer grandement les performances d'imagerie (sensibilité et spécificité).

I-3.1.2. Emetteurs de rayonnements bêta plus (β^+)

Découverts en 1898 par Ernest Rutherford lors de ses recherches sur l'atome d'uranium, les rayonnements bêta plus (β^+) sont issus de noyaux instables présentant trop de protons. Ils naissent par transformation d'un proton en neutron suivie de l'émission d'un neutrino et d'un positon, l'antiparticule des électrons possédant la même masse et le même spin mais de charge opposée. Le neutrino, n'ayant que très peu d'interaction avec la matière, ne joue pas de rôle en médecine nucléaire. L'isotope qui en résulte possède un numéro atomique réduit (Z-1) mais une masse quasi inchangée. Après son expulsion du noyau, le positon (β^+) perd son énergie cinétique dans la matière, puis s'associe à un électron. Le couple électron-positon s'annihile pour donner deux photons (émissions γ) de 511 keV dans une même direction mais en sens opposé.

Pour localiser précisément le lieu de collision entre le positon et l'électron, une couronne de détection est placée autour du patient. Chaque désintégration émise à partir d'une source radioactive représentée, dans le cas de patients, par un organe ou un tissu où le radiopharmaceutique s'est concentré, va être à l'origine de plusieurs directions d'annihilation qui vont se croiser dans l'espace, là où est localisée la source radioactive. De plus, pour éviter l'enregistrement de photons non issus d'une annihilation par les détecteurs, l'appareil ne va enregistrer que les événements qui vont toucher simultanément deux détecteurs au même instant t. On peut dans ces conditions, tracer dans l'espace des lignes dites de coïncidence entre les détecteurs qui sont activés simultanément. Le croisement dans l'espace des lignes de coïncidence va permettre de générer une image reconstruite par ordinateur.

Cependant, cette méthode de détection, bien que très précise, ne donne qu'une image des points d'annihilation et non celle de l'origine de l'émission. En effet, certains positons de haute énergie peuvent parcourir plusieurs millimètres avant de rencontrer un électron, induisant ainsi une erreur relative sur la position de l'émetteur. L'analyse des lignes de coïncidence représente la base de la technique d'imagerie nommée Tomographie par Emission de Positons (TEP, Figure 12). Bien que plus complexe à mettre en œuvre, cette technique se montre de meilleure résolution et plus sensible que l'imagerie TEMP.

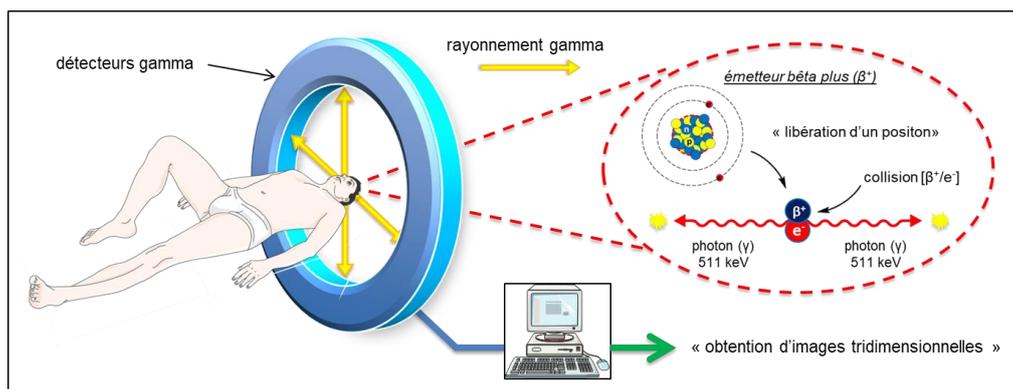


Figure 12 : Principe de la Tomographie par Emission de Positons (TEP)

Contrairement aux isotopes utilisés en scintigraphie TEMP comme l'iode-131 ou le technétium-99m, les radionucléides émetteurs de positons sont pour la grande majorité des éléments chimiques légers et abondants dans la matière vivante (oxygène, carbone, azote, fluor, etc.) et donc facilement incorporables à des molécules.

Actuellement, le radioisotope le plus utilisé est le fluor-18 avec environ 85% des imageries TEP faites en milieu hospitalier¹⁵. Il possède des caractéristiques physiques ($t_{1/2} = 109.8$ min) en adéquation avec l'utilisation de vecteurs à distribution tissulaire et élimination rapide. Parmi les examens réalisés, la plupart concernent un seul radiopharmaceutique : le FDG ou [¹⁸F]-fluorodésoxyglucose. Le métabolisme rapide des cellules sur-consommatrices de glucose que sont les cellules cancéreuses, le cœur, le cerveau mais aussi les tissus inflammatoires et les muscles en activité, font que ce traceur peut servir dans de nombreuses applications d'imagerie médicale, et notamment en cancérologie^{16,17}.

D'autres émetteurs β^+ comme le carbone-11¹⁸, l'azote-13 (imagerie du myocarde), ou encore l'oxygène-15 couplé à l'eau, sont utilisés en imagerie TEP pour l'étude métabolique de certains organes cibles. Cependant ils restent peu appropriés pour l'imagerie de clusters tumoraux à cause de leur très courte période radioactive.

De façon à augmenter les performances de la TEP, d'autres vecteurs, plus spécifiques des tumeurs, et d'autres radionucléides, mieux adaptés à leur pharmacocinétique ont été proposés. Par leurs caractéristiques de biodistribution, les anticorps font partie des vecteurs immunologiques étudiés dans ce but. Lorsque l'on associe à des fins d'imagerie un émetteur de positon à un anticorps, la technique prend le nom d'immuno-TEP. Comme nous l'avons signalé précédemment, les anticorps présentent des paramètres de pharmacocinétique particuliers, avec notamment des clairances sanguines faibles, des temps de distribution tissulaires longs et des demi-vies plasmatiques longues également. Dans ce cas, de nouveaux isotopes β^+ aux périodes radioactives plus

importantes que celle du fluor-18 ont été utilisés. On peut citer, à titre d'exemple, l'utilisation en essai clinique de l'anticorps anti-HER2 « trastuzumab » marqué au cuivre-64, pour la visualisation de tumeurs mammaires primitives ou métastatiques¹⁹, ainsi que l'anticorps anti-CD20 « obinutuzumab » humanisé, marqué au zirconium-89, pour imager les lymphomes réfractaires ou en rechute²⁰.

Tableau 3 : Emetteurs β^+ les plus utilisés en thérapie

radionucléide	période	$E_{\text{rayonnement } \gamma}$
fluor-18	109,8 min	633 KeV
carbone-11	20,4 min	960 KeV
azote-13	10,0 min	1199 KeV
oxygène-15	2,0 min	1732 KeV
gallium-68	67,7 min	1899 KeV
zirconium-89	3,3 jrs	902 KeV
cuivre-64	12,7 h	653 KeV

I-3.2. Les radionucléides en thérapie

La radio-immunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie interne vectorisée basée sur l'utilisation d'anticorps radiomarqués pour traiter des tumeurs. Le choix du radionucléide repose sur plusieurs critères tels que son coût, son type d'émission, son transfert d'énergie linéique (TEL : quantité d'énergie transférée déposée par particule par unité de longueur en keV/ μm) et sa période radioactive. Cette dernière doit être en accord avec la pharmacocinétique du vecteur utilisé afin de pouvoir délivrer la plus grande dose radioactive possible à la tumeur. Une période trop courte entraînera une perte significative de radioactivité avant fixation sur la cellule, et à l'inverse, une période trop longue engendrera une irradiation non sélective des tissus sains lors de l'élimination du vecteur radiomarqué. La RIT privilégie donc l'utilisation de radionucléides émetteurs de particules très énergétiques pour détruire les cellules traversées, mais peu pénétrantes pour ne pas irradier les tissus sains présents autour des amas tumoraux. Trois types de particules présentent ces caractéristiques : les particules bêta moins (β^-), alpha (α) et les électrons Auger (e^-).

I-3.2.1. Emetteurs de rayonnements bêta moins (β^-)

Les rayonnements bêta moins (β^-) sont issus de noyaux instables présentant trop de neutrons. Ils naissent par transformation d'un neutron en proton suivi de l'émission d'un anti-neutrino et d'un électron. Ces particules présentent des énergies allant de 30 keV à 2,3 MeV

et une pénétration tissulaire suffisamment grande (50 μm à 12 mm soit quelques dizaines de cellules) pour permettre d'ioniser plusieurs cellules à partir leur point d'émission. Lorsqu'une particule bêta traverse une cellule, elle va interagir avec les différents organites cellulaires en les ionisant. Ces ionisations, lorsqu'elles dépassent les capacités de réparation cellulaire, vont être à l'origine de plusieurs mécanismes d'induction de mort cellulaire. Le mécanisme le plus souvent cité est représenté par l'induction de cassures irréparables au niveau de l'ADN ou de l'ARN des cellules touchées. De plus, en raison de leur faible masse, ces particules ont un parcours non rectiligne dans la matière, notamment lorsque leur énergie est faible (Figure 13). Ce phénomène est appelé pic de Bragg.

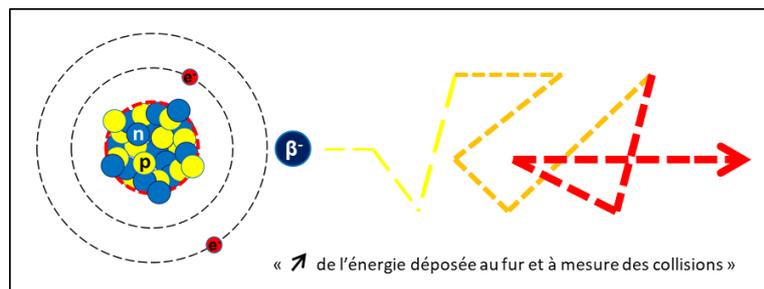


Figure 13 : Schéma de la trajectoire avec collisions d'une particule β^- (TEP)

L'efficacité du rayonnement bêta en thérapie sera meilleure lorsque les cellules à traiter seront situées dans la zone correspondant au pic de Bragg de la particule. Ces particules sont donc peu adaptées aux petits amas tumoraux mais plutôt aux tumeurs de taille moyenne, de l'ordre de quelques millimètres, où le dépôt maximal d'énergie transmis aux cellules cancéreuses est atteint.

Actuellement, plusieurs radiopharmaceutiques utilisant des émetteurs β^- (tableau 3) ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) par la FDA (Food and Drug Administration) ou l'Agence Européenne du Médicament comme les anticorps monoclonaux anti-CD20 (antigènes exprimés à la surface des lymphocytes B) couplés à l'yttrium-90 (Zevalin[®]) ou à l'iode-131 (Bexxar[®]), utilisés dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens²¹.

Tableau 3 : Emetteurs β^- les plus utilisés en thérapie

Radionucléide	période	Distance (mm)	$E_{\text{rayonnement } \beta^-}$
iode-131	8,0 jrs	2,9	610 KeV
yttrium-90	2,7 jrs	11,0	2250 KeV
rhénium-188	17,0 h	10,0	2120 KeV
cuivre-67	2,5 jrs	1,8	181 à 577 KeV
lutétium-177	6,7 jrs	2,0	498 KeV

Bien que les émetteurs β^- aient prouvé leur efficacité lors des traitements de clusters tumoraux (quelques millimètres), il reste le cas des plus petites tumeurs, non visibles en imagerie médicale, mais à l'origine de récives. Ces petites tumeurs disséminées dans l'organisme sont bien plus sensibles aux caractéristiques physiques que présentent les émetteurs alpha.

I-3.2.2. Emetteurs de rayonnements alpha (α)

Découverts en 1908 par Ernest Rutherford, les rayonnements alpha (α) sont des particules issues de noyaux lourds instables ($Z > 82$) présentant une grande énergie cinétique (5 à 9 MeV). Elles sont chargées positivement et constituées de deux protons et deux neutrons identiques au noyau d'hélium (${}^4\text{He}^{2+}$). Du fait de leur charge associée, elles vont interagir de façon très importante avec les électrons de la matière et sont donc très peu pénétrantes (50 à 100 μm soit 2 à 6 cellules). Ces particules sont idéales pour l'irradiation sélective de cellules tumorales isolées ou d'amas tumoraux résiduels après chirurgie.

Par la faible pénétration tissulaire de ces particules, la radioimmunothérapie alpha (RIT α) impose que ces radionucléides soient vectorisés au plus proche des cellules cancéreuses. Comme les particules β^- mais à un niveau encore supérieur, ces particules très ionisantes vont pouvoir infliger des dégâts irréversibles sur les brins d'ADN conduisant à la mort des cellules touchées. Pour induire la mort d'une cellule, il faut seulement 1 à 3 particules α contre 1000 à 5000 pour les particules β^- (Figure 14)^{22,23}.

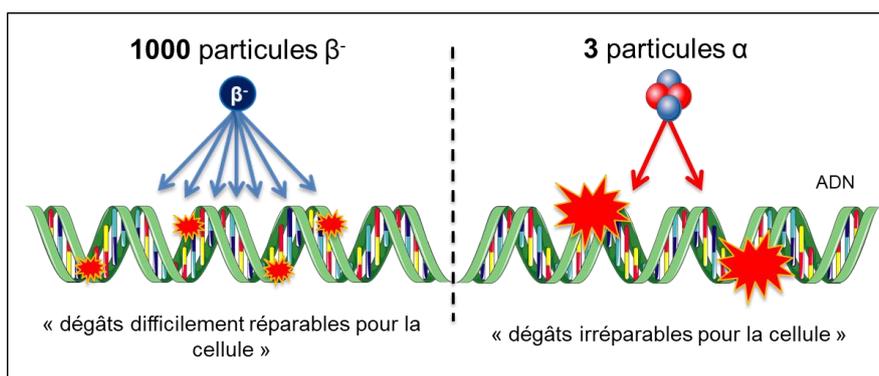


Figure 14 : Influence des particules β^- et α sur les brins d'ADN

Actuellement, plus de cent radioisotopes α (dont la plupart produits artificiellement par l'homme) ont été identifiés mais seul un petit nombre d'entre eux est considéré comme utilisable en médecine nucléaire, à cause de leur faible disponibilité et des périodes radioactives inappropriées de certains²⁴. Comme pour les émetteurs β^- , leur période

généralement courte implique des processus de radiomarquage rapides et automatisés sur des vecteurs immunologiques présentant des pharmacocinétiques appropriées à leurs caractéristiques physiques. Ils sont pour la plupart produits par purification radiochimique de produits issus de fission nucléaire, ou par l'intermédiaire de générateur (bismuth-212, bismuth-213, radium-223), mais peuvent aussi être produits par des accélérateurs de particules (astate-211, actinium-225).

Le bismuth-213 couplé à des anticorps monoclonaux fut le premier isotope utilisé dans des études cliniques de RIT α . C'est l'équipe de Scheinberg²⁵ en 2002 qui réalisa les premières études cliniques avec l'anticorps anti-CD33 (spécifique des lignées myéloïdes) couplé au bismuth-213, sur des patients atteints de leucémies myéloïdes. Ces études ont prouvé l'efficacité du concept de la RIT α dans le traitement de cancers disséminés, montrant un ciblage rapide et efficace des zones leucémiques. Le rapport de la dose absorbée entre les sites tumoraux et le reste du corps est 1000 fois supérieur à celui observé avec les émetteurs β^- . D'autres essais cliniques réalisés avec différents émetteurs α (astate-211, actinium-225) et différents vecteurs (AcM ou peptides), ont tous montré la faisabilité de la RIT α associée à une faible toxicité comme thérapie anticancéreuse. Aujourd'hui, le concept a été étendu au traitement adjuvant des tumeurs solides. Les résultats obtenus chez les premiers patients traités à titre compassionnel de récurrence de cancer de la prostate sont impressionnants et montrent des rémissions complètes de la maladie sur des petits effectifs, au prix d'une toxicité acceptable²⁶.

Tableau 4 : Emetteurs α les plus utilisés en thérapie

Radionucléide	période	Distance (μm)	$E_{\text{rayonnement } \beta^-}$	Méthode prod.
bismuth-212	60,6 min	40-100	6,1 à 8,8 MeV	générateur
bismuth-213	45,6 min	40-100	5,9 à 8,4 MeV	générateur
radium-223	11,4 jrs	60	5,7 à 7,6 MeV	générateur
astate-211	7,2 h	68	5,9 à 7,5 MeV	cyclotron
actinium-225	10,0 jrs	70	5,8 à 8,4 MeV	cyclotron

I-3.2.3. Emetteurs d'électrons Auger (e^- Auger)

Découverts en 1922 par Lise Meitner et étudiés dans ses travaux de thèse par Pierre Auger, les électrons Auger (e^- Auger) sont des électrons émis par un atome durant sa désexcitation. Lors du bombardement d'un atome par des rayonnements ionisants (photon X, électrons de fortes énergies), il arrive qu'un électron d'une couche profonde soit éjecté. Un électron d'une couche supérieure va alors descendre pour occuper la place vacante et

l'énergie associée à cette transition conduira à l'émission, soit d'un photon X (fluorescence X), soit d'un électron que l'on nomme électron Auger (Figure 15).

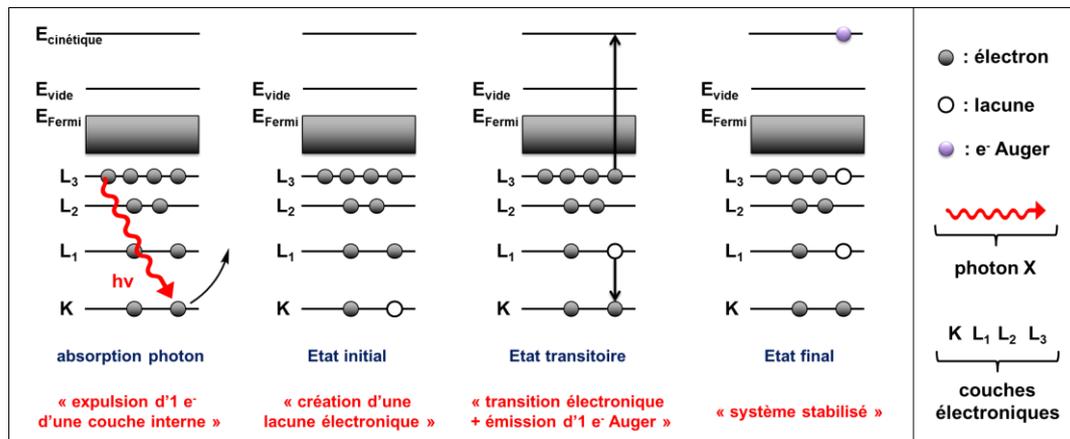


Figure 15 : Principe d'émission d'un électron Auger par activation de photons X

Ces particules présentent de faibles énergies cinétiques (10 eV - 10 keV) impliquant un parcours très faible dans la matière (quelques dizaines de nanomètres) inférieur à la taille d'une cellule. Cependant, leur transfert d'énergie linéique très élevé (supérieur à celle des particules β^-) leur permet d'endommager la cellule traversée de manière irréversible. L'utilisation de telles particules en thérapie impose donc de pouvoir cibler l'ensemble des cellules tumorales avec des radiopharmaceutiques pouvant être internalisés, et dans ce cas, toute l'énergie de la particule sera déposée en intracellulaire, sans effet sur les cellules adjacentes.

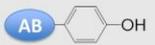
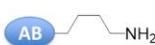
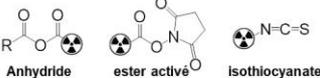
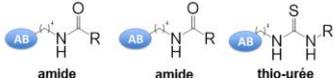
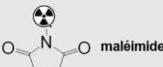
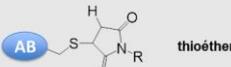
Cependant, si les propriétés physiques de ces émissions semblent idéales pour la RIT, il n'existe pas d'émetteurs Auger à proprement parler. Les radionucléides les plus utilisés pour leurs émissions Auger sont l'iode-125 et l'indium-111. Toutefois, les résultats obtenus en thérapie vectorisée avec ces deux radionucléides ont été décevants et inférieurs à ceux obtenus avec des émetteurs bêta, ce qui explique qu'aujourd'hui aucun protocole de RIT n'ait été mis en place, même si quelques publications précliniques mentionnent leur intérêt potentiel^{27,28}.

I-4. Méthodes conventionnelles de marquage de protéines

Dans le cas des isotopes de l'iode, il est possible de les fixer directement par substitution électrophile sur les tyrosines de l'anticorps. Mais dans le cas des autres halogènes et de la plupart des radiométaux, ce couplage direct n'est pas possible. Il faut donc passer par une molécule bifonctionnelle composée d'une fonction permettant la fixation du radionucléide, et d'une autre capable de se lier de façon stable sur l'anticorps. L'ordre

dans lequel les deux réactions s'enchaînent est variable, mais la plupart du temps pour les radiométaux, l'agent bifonctionnel est couplé avant son radiomarquage. A l'inverse, pour les halogènes, le radiomarquage de l'agent bifonctionnel est effectué avant sa fixation sur l'anticorps (Tableau 5).

Tableau 5 : Fonctions de couplage des anticorps les plus utilisées

Fonction de l'anticorps (AB)	Fonction de la molécule bifonctionnelle radiomarquée	Liaison formée
 « tyrosines »		
 « lysines »	 Anhydride ester activé isothiocyanate	 amide amide thio-urée
 « cystéines » (obtenu par réduction de ponts disulfures ou par modification de lysines)	 maléimide	 thioéther

Pour lier des radiométaux sur une protéine d'intérêt, de nombreux agents chélatants ont été conçus²⁹. Aussi appelées agents chélatants bifonctionnels (BCA), ces molécules possèdent dans leur structure des hétéroatomes porteurs de doublets permettant la complexation du radiométal. Il s'agit pour la plupart d'hétérocycles de taille adaptée au rayon ionique du métal qui doit être chélaté. Ces BCA doivent permettre la formation de complexes métalliques stables afin d'éviter la dissociation in vivo du métal et son accumulation dans certains des tissus non ciblés. La nature du BCA (lipophilie, charge globale, taille) peut avoir une influence sur la biodistribution du vecteur et sur sa capacité à reconnaître sa cible et à s'y lier (Figure 16).

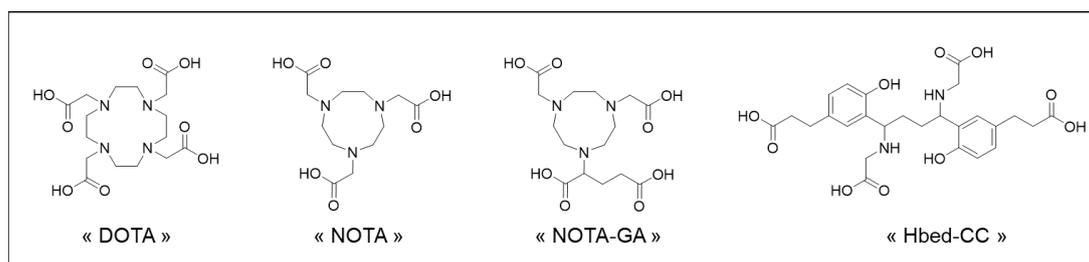


Figure 16 : Exemples de BCAs développés pour la complexation de radiométaux (cuivre-64, gallium-68)

Dans le cas des non-métaux d'intérêt pour le ciblage immunologique, des précurseurs permettant la formation d'une liaison covalente avec le radionucléide sont nécessaires. Pour les halogènes, qui sont les plus utilisés, des méthodes de substitution sur des noyaux aromatiques sont généralement employées.

Dans le cas des radiométaux, deux procédures de radiomarquage sont applicables pour les anticorps (Figure 17). La première, appelée marquage direct, consiste à coupler sur l'anticorps le BCA avant radiomarquage. La fixation du radionucléide s'effectue alors directement sur l'anticorps modifié. Lorsque les conditions nécessaires sont trop drastiques pour permettre un radiomarquage direct (température élevée, pH ou solvants organiques susceptibles d'altérer l'anticorps), la méthode de marquage indirecte est utilisée. Elle consiste à fixer le radionucléide sur le BCA (ou la molécule bifonctionnelle) avant couplage à l'anticorps. Cette méthode présente l'inconvénient d'être plus longue à réaliser et n'est pas adaptée pour les radioisotopes de trop courte période.

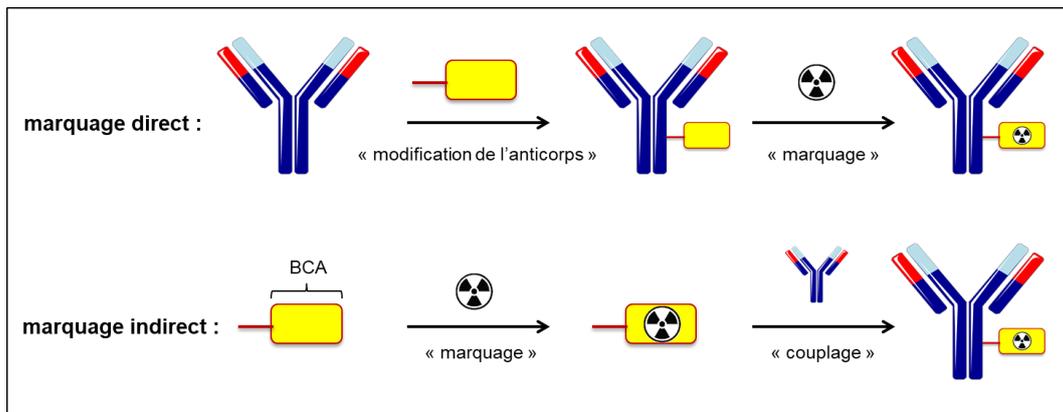


Figure 17 : Méthodes directe et indirecte de marquage d'anticorps

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement à l'utilisation des halogènes lourds (iode et astate) en médecine nucléaire et aux méthodes utilisées pour coupler ces isotopes radioactifs sur des protéines d'intérêt.

II. LES HALOGENES LOURDS EN MEDECINE NUCLEAIRE

II-1. Les halogènes

Les halogènes sont une famille de cinq éléments à savoir le fluor (F), le chlore (Cl), le brome (Br), l'iode (I) et l'astate (At). Chacun d'entre eux présente des isotopes radioactifs mais seuls certains sont utilisés à ce jour en imagerie ou en thérapie selon la nature de leurs émissions³⁰ (Tableau 6). Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux cas de l'iode et de l'astate.

Tableau 6 : Halogènes radioactifs les plus utilisés en médecine nucléaire

radiohalogène	période	type d'émission	application
fluor-18	109,8 min	β^+	imagerie TEP
iode-123	13,2 h	γ / e- Auger	imagerie TEMP
iode-124	4,2 jrs	β^+ / e- Auger	imagerie TEP
iode-125	59,4 jrs	γ / X / e- Auger	thérapie
iode-131	8,0 jrs	β^-	thérapie
astate-211	7,2 h	α	thérapie

II-1.1. Les isotopes radioactifs de l'iode

Découvert en 1811 par Bernard Courtois dans des cendres d'algues marines, l'iode est un élément chimique de numéro atomique 53 et de symbole I. On le trouve à l'état naturel surtout sous forme d'iodure et de diiode (I_2), un solide gris aux vapeurs violettes. Après le tungstène, c'est l'oligoélément le plus lourd observé chez les organismes vivants.

Chez les êtres vivants, il est apporté par la nourriture sous forme iodure et est capté par les cellules dont les membranes sont pourvues de systèmes spécifiques dits pompe à iodure. Une fois internalisé dans les cellules spécifiques, notamment au niveau de la thyroïde, les iodures sont oxydés en iodate par des peroxydases et incorporés sur la thyroglobuline. La métabolisation de cette protéine engendre la formation des hormones thyroïdiennes indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. A ce jour, on dénombre 37 isotopes connus, dont un seul stable, l'iode-127, représentant la quasi-totalité de l'iode naturel présent sur Terre. Parmi ces isotopes, seuls quatre sont couramment utilisés en médecine nucléaire : ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , et ^{131}I .

II-1.1.1. L'iode-123

L'iode-123 est un émetteur de rayonnement γ et d'électrons Auger qui se désintègre par capture électronique en Tellure-123 (^{123}Te) avec une période de 13,2 heures. Malgré son coût de production élevé, sa courte période lui permet d'être un candidat de choix pour l'étude diagnostique par imagerie TEMP de maladies thyroïdiennes. L'énergie des photons émis (159 keV) est parfaitement adaptée aux détecteurs des caméras gamma (cristaux NaI) actuellement implantés dans les services de médecine nucléaire. L'iode-123 est principalement administré par voie injectable, sous forme d'iodure de sodium lors de scintigraphies thyroïdiennes³¹. Il peut aussi être couplé à différentes molécules vectrices : le MIBG (meta-iodo-benzyl-guanidine) utilisé pour les diagnostics de neuroblastomes³², ou sous forme d'ioflupane pour les diagnostics de syndromes parkinsoniens³³.

II-1.1.2. L'iode-124

L'iode-124 est un émetteur de rayonnement β^+ et d'électrons Auger se désintégrant par capture électronique (74,4 %) ou par émission de positons (β^+ , 25,6 %) en ^{124}Te avec une période de 4,17 jours. Lors de sa désintégration il émet 46 % de photons d'annihilation de 511 keV accompagnés de 62,9 % de photons de 604 keV et 14 % de photons très énergétiques d'énergie supérieure à 1500 keV difficile à atténuer en radioprotection. L'iode-124 est un isotope prometteur pour l'imagerie TEP grâce à sa longue période radioactive qui permet l'obtention d'images tardives. Bien qu'il soit moins adapté, l'iode-124 peut être directement employé comme ^{123}I sous forme de sel d'iodure (Na^{124}I) en imagerie thyroïdienne (TEP)³⁴, mais il est plus généralement utilisé sous forme de radiopharmaceutique, couplé à une molécule vectrice³⁵.

II-1.1.3. L'iode-125

L'iode-125 est un émetteur de rayonnement γ , X et d'électrons Auger se désintégrant par capture électronique en ^{125}Te avec une période de 59,4 jours. Lors de sa désintégration l'iode-125 émet des photons de faible énergie (raie principale : 35,5 keV), des rayons X (raie principale : 27,4 keV) ainsi que des électrons Auger de 3,7 keV (79 %) et 22 à 34 keV (33,9 %). L'iode-125, à cause de ses rayonnements γ de faible énergie, est bien moins adapté pour l'imagerie médicale que l'iode-123, ce qui explique sa très faible utilisation en médecine nucléaire. Grâce à sa période plus longue et à son spectre gamma moins pénétrant, l'iode-125 est souvent préféré pour les tests de laboratoire en radio-immunologie, ou couplé à l'albumine humaine pour évaluer le volume plasmatique. Malgré cela, sa longue période peut

devenir très utile (voire primordiale) pour des tests physiologiques nécessitant une observation sur plusieurs jours, (scans fibrinogènes pour la détection de caillots sanguins).

II-1.1.4. L'iode-131

L'iode-131 est un émetteur de rayonnements γ , X et β^- qui se désintègre par émission d'électrons en ^{131}Xe avec une période de 8,02 jours. Lors de sa désintégration il émet non seulement des particules β^- moyennement énergétiques (606 keV, 90 %) pouvant pénétrer une épaisseur de tissus de 0,3 à 2 mm, mais aussi des photons γ de 365 keV (81 %). Du fait de la forte énergie de ses rayonnements β^- , l'iode-131 est certainement le plus cancérigène des isotopes de l'iode. Son abondance, avec le césium-137, dans les produits de fission de l'uranium, associée à son tropisme pour la thyroïde font que ce radionucléide a été reconnu comme responsable de la majorité des cancers de la thyroïde survenus suite aux accidents nucléaires.

Grâce à ces deux types d'émissions (γ et β^-), l'iode-131 peut aussi bien être utilisé en imagerie qu'en thérapie. A faible dose, il est administré sous forme de gélules de Na^{131}I comme traceur pour les scintigraphies thyroïdiennes (TEMP), mais il a rapidement été remplacé par l'iode-123, émetteur gamma de période beaucoup plus faible (13,2 heures) et s'éliminant plus rapidement après diagnostic. À plus forte dose, l'iode-131 est administré sous forme de radiopharmaceutiques comme le ^{131}I -métaiodobenzylguanidine (^{131}I -MIBG) utilisé pour le traitement de neuroblastomes³⁶. Malgré cela, son utilisation reste à ce jour très focalisée sur les traitements de cancers thyroïdiens. Aujourd'hui, sa seule utilisation comme produit de diagnostic est avec le ^{131}I -norcholestérol qui permet de détecter des pathologies surrénaliennes visibles uniquement plusieurs jours après l'administration de dérivés du cholestérol.

II-1.2. L'astate-211

Découvert en 1940 par Corson, l'astate ($_{85}\text{At}$) est l'élément chimique naturel le plus rare de la croûte terrestre³⁷. Il est issu de la désintégration d'éléments chimiques plus lourds (uranium, thorium) et ne présente aucun isotope stable, d'où son nom issu du grec *astatos* (ἀστατος) signifiant « instable ». Il est prédit dès 1869 par Mendeleïev dans son tableau périodique sous le nom d'« *eka-iode* » pour refléter sa position en dessous de l'iode. Il possède 32 isotopes radioactifs connus, qui sont à 90% des émetteurs alpha (α) allant de ^{191}At à ^{233}At , avec des périodes oscillant entre 125 nanosecondes (^{213}At) et 8,1 heures (^{210}At). Parmi ces nombreux isotopes, seul l'astate-211 présente des caractéristiques physiques adaptées aux applications en radioimmunothérapie.

II-1.2.1 Caractéristiques physiques et chimiques

L'astate-211 est un émetteur de particules alpha et de rayons X qui se désintègre en plomb-207 selon deux modalités, avec une période de 7,21 heures. Dans environ 42 % des cas, l'astate se désintègre en bismuth-207 de très longue période (32,9 ans) qui émet une particule alpha de 5,9 MeV. Le bismuth-207 se désintègre ensuite par capture électronique pour aboutir au plomb-207. Dans l'autre cas, l'astate se transforme par capture électronique en polonium-211 de très courte période (inférieure à la seconde) qui émet quasi instantanément une particule alpha de 7,5 MeV pour engendrer du plomb-207 (Figure 18).



Figure 18 : Schéma des deux branches de décroissance de l'astate-211

Quel que soit le mode initial de désintégration de l'astate, il y aura émission d'une particule alpha. C'est pourquoi l'astate-211 est considéré comme un émetteur 100% alpha, même si les énergies des particules alpha émises sont différentes suivant la voie de décroissance. Lors de la désintégration en polonium-211, outre les particules alpha, l'astate-211 émet aussi des rayons X qui peuvent être mesurés par les détecteurs gamma classiquement utilisés en laboratoire ou en clinique pour l'imagerie TEMP.

L'absence d'isotope stable et la difficulté à produire l'astate-211 ont rendu l'étude de ses caractéristiques chimiques et physiques très complexes pour les chercheurs. En effet, malgré plusieurs décennies d'étude, la plupart de ses propriétés ont été estimées par extrapolation à l'aide de méthodes théoriques ou semi-empiriques. Toutefois de nombreuses propriétés de l'astate ont pu être déduites par analogie avec l'iode, son homologue halogène le plus proche. Grâce à l'étude de l'astate en chimie inorganique, des propriétés propres aux halogènes ainsi que d'autres propres aux métaux ont pu être mises en évidence. L'astate sous forme monoatomique a tendance à former une espèce diatomique (At-At), comportement caractéristiques des halogènes. De plus, son caractère métallique est confirmé par sa complexation sous forme oxydée (At^+) par le chélatant EDTA³⁸ couramment utilisés pour les métaux³⁹.

II-1.2.2. Production de l'astate-211

Le premier isotope de l'astate est synthétisé pour la première fois en 1940 par Dale R. Corson, K. R. MacKenzie et Emilio Segrè au cyclotron de l'université de Californie à

Berkeley par bombardement, avec un faisceau de particules alpha, d'une cible de bismuth naturel (^{209}Bi)⁴⁰. La réaction s'accompagne de l'émission de deux neutrons et aboutit à l'astate 211 (Figure 19).

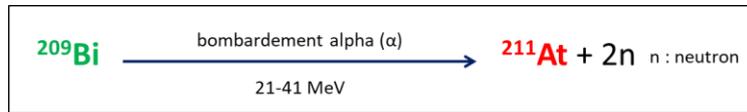


Figure 19 : Production d'astate-211 par bombardement alpha de bismuth-209

Pour obtenir l'astate-211, l'énergie du faisceau de particules alpha doit être comprise entre 21 et 40 MeV, avec une section efficace maximale de production de 31 MeV. Cependant, à partir de cette valeur, on observe aussi la formation d'astate-210 et de polonium-210, deux radionucléides aux caractéristiques physiques incompatibles avec des applications pharmaceutiques⁴¹. Lors de l'extraction, il est possible de séparer l'astate du polonium mais pas l'astate-210 de l'astate-211. C'est pourquoi, afin d'éliminer la production d' ^{210}At , l'énergie d'irradiation choisie est inférieure à 30 MeV pour la synthèse de l'astate-211. Cette valeur permet de limiter la présence d'astate-210 tout en préservant un bon rendement de production.

De nombreuses études in vitro^{22,42}, précliniques^{43,44} et cliniques^{45,46} ont prouvé l'efficacité de l'astate-211 (et plus généralement des émetteurs alpha) dans différents types de tumeurs localisées ou micrométastatiques. Le premier essai clinique de phase 1 effectué dans le cadre du traitement de tumeurs résiduelles cérébrales (gliome) a été publié en 2007 par Zalutsky⁴⁶. Il montre l'intérêt d'associer la radiothérapie aux traitements classiques (radiothérapie externe et chimiothérapie) utilisés après résection chirurgicale d'une tumeur. En plus des traitements classiques, l'injection d'anticorps radiomarqués (ch81C6, anticorps chimérique) à l'astate-211, a permis d'élever la médiane de survie des patients de 31 à 54 semaines, prouvant ainsi l'utilité de la radioimmunothérapie alpha.

Bien que ces études montrent le fort potentiel de l'astate-211 pour ce type de cancers, les essais cliniques sont aujourd'hui encore trop rares. Les raisons en sont surtout le manque de disponibilité de l'astate-211, mais aussi les difficultés à obtenir les autorisations d'essais cliniques sur les émetteurs alpha encore trop peu connus. En effet, très peu de cyclotrons dans le monde sont capables d'accélérer des particules alpha à des énergies supérieures à 25 MeV, rendant de fait son utilisation limitée à un nombre restreint de centres de médecine nucléaire.

II-2. Radiomarquage de protéines à l'iode et à l'astate-211

Pour coupler l'iode ou l'astate à une protéine d'intérêt médical, différentes voies (électrophiles / nucléophiles) ont été développées et choisies en fonction des vecteurs biologiques sélectionnés (anticorps, polypeptides, petites molécules). Les deux voies principales évoquées précédemment sont : le « marquage direct » qui consiste à fixer directement l'isotope sur la protéine, et le « marquage indirect » qui consiste à coupler au préalable l'isotope à une molécule dite bifonctionnelle, elle-même couplée ensuite à la protéine. La stabilité *in vivo* du couple « halogène-vecteur » est un paramètre très important afin d'assurer la bonne vectorisation du radionucléide et d'éviter la déshalogénéation dans l'organisme.

II-2.1. Radiomarquage à l'iode radioactif

Les voies de radioiodation s'inspirent des méthodes développées en chimie organique pour l'iodation de petites molécules. Toutefois, ces voies doivent tenir compte de plusieurs paramètres tels que la période du radionucléide et les concentrations utilisées à petite échelle. L'insertion de l'iode, qu'elle soit directement faite sur une protéine (voie directe) ou sur une molécule intermédiaire (voie indirecte), procède toujours par substitution électrophile ou nucléophile d'un groupe partant, présent sur un atome de carbone⁴⁷.

En fonction de l'environnement électronique de ce carbone (caractère activé ou désactivé), la liaison formée peut présenter une faible stabilité *in vivo*, amenant à la libération d'iode libre dans l'organisme et à son accumulation dans des organes spécifiques, en particulier la thyroïde et l'estomac. Afin de minimiser ce clivage, les méthodes développées favorisent la formation de liaisons aromatiques carbone-iode, plus stables que les liaisons aliphatiques. Les méthodes de radioiodation de protéines sont généralement très rapides et donnent des rendements radiochimiques (RRC) très élevés.

II-2.1.1. Radiomarquage par substitution électrophile

Les premières réactions de radioiodation électrophile consistaient à coupler directement l'iode sous forme oxydée (I^+) sur les résidus tyrosines des protéines. Ces marquages s'effectuaient par ajout *in situ* d'oxydants tels que la chloramine-T, l'Iodogen® ou encore le *N*-chlorosuccinimide (NCS)⁴⁸ permettant, après oxydation, l'insertion de l'iode sur l'un des carbones situés en position *ortho* de la fonction phénol des tyrosines (Figure 20)⁴⁹.

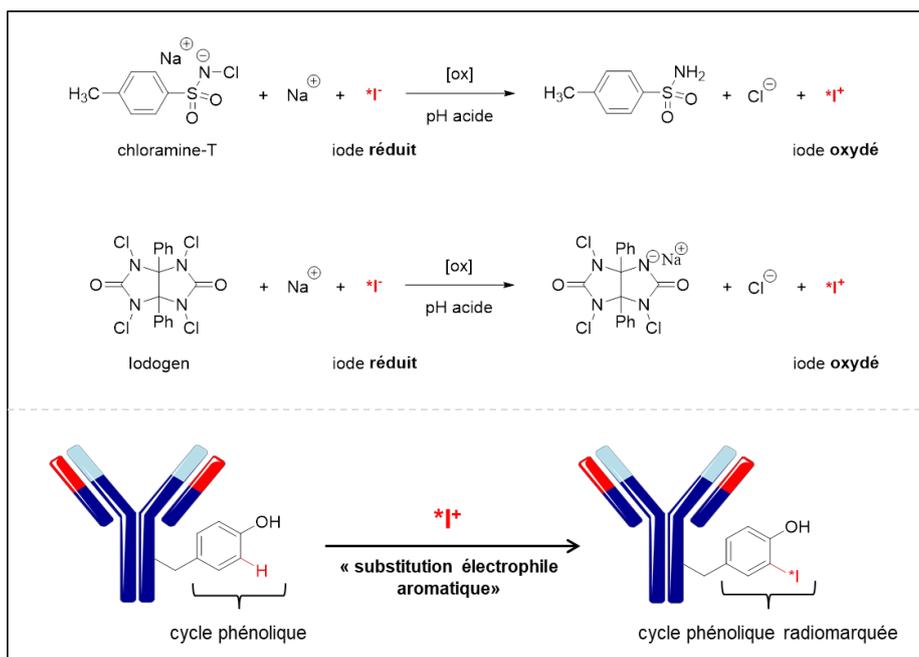


Figure 20 : Exemple de radioiodation directe d'anticorps sur les tyrosines par les techniques Iodogen / chloramine-T

Le réactif de Bolton Hunter a été ensuite développé^{50,51} pour les protéines ne présentant pas de tyrosines accessibles. Le couplage entre l'ester activé du réactif de Bolton-Hunter et les lysines des protéines permet l'insertion d'un groupement phénol sur la protéine (Figure 21).

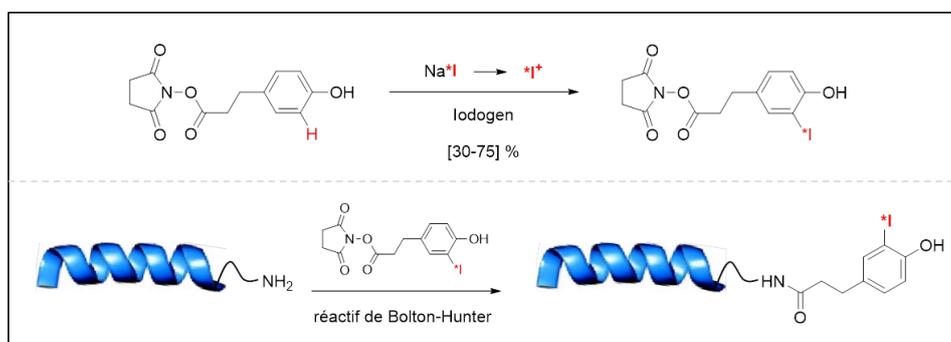


Figure 21 : Radioiodation indirecte d'une protéine par le réactif de Bolton-Hunter

Toutefois, que ce soit dans le cas direct ou indirect, le caractère activé du cycle phénol de la tyrosine entraîne la formation d'une liaison carbone-iode peu stable en milieu biologique, et donc au relargage systématique d'iode libre⁵². De plus, certaines enzymes thyroïdiennes (désiodases) spécialisées dans l'organisme ont pour rôle spécifique de métaboliser ce type de liaison tyrosine-iode⁵³.

Bien que très facile à mettre en œuvre et conduisant à de très bons rendements radiochimiques, ces méthodes non compatibles avec des applications in vivo, ont

rapidement été remplacées au bénéfice d'autres méthodes de substitutions électrophiles utilisant des molécules bifonctionnelles capables de former des liaisons carbone-iode plus résistantes aux clivages observés en milieu biologique. Malgré tout, ces voies de marquages (et notamment la voie Iodogen) restent encore très utilisées par les biologistes pour des tests in vitro.

Le trialkylstannylbenzoate de *N*-succinimidyle est, à ce jour, l'un des composés bifonctionnels les plus utilisés dans le développement de radiopharmaceutiques marqués à l'iode⁵⁴. Il se compose d'une fonction trialkylétain comme site de radioiodation et d'un ester activé permettant son couplage sur les protéines (Figure 22). Après halodéstannylation électrophile, on obtient l'iodobenzoate de *N*-succinimidyle (SIB) qui peut se coupler à la protéine en conditions basiques.

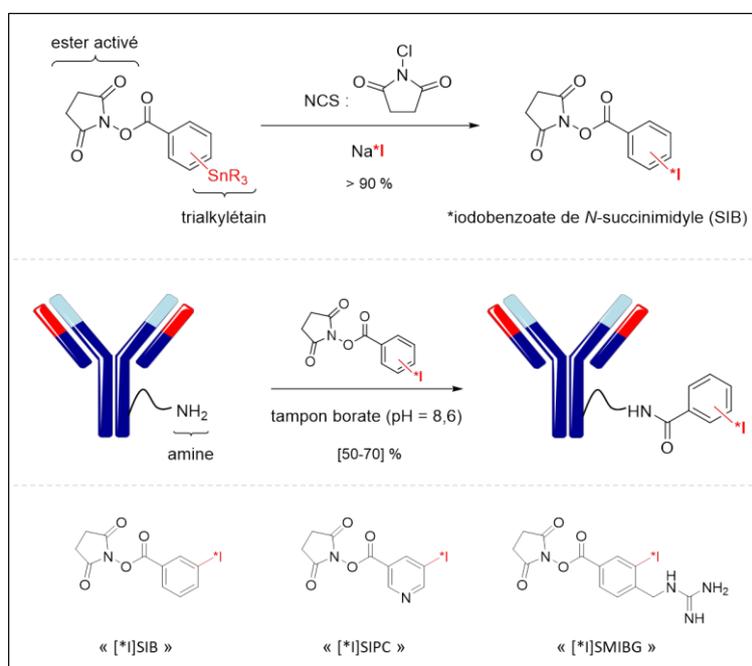


Figure 22 : Radioiodation indirecte d'une protéine par la méthode « SIB » et structures chimiques des différents esters activés utilisés en médecine nucléaire

De la même façon que le [¹²⁵I]-SIB, d'autres esters activés comme le [¹²⁵I]-SIPC⁵⁵ ou encore le [¹²⁵I]-SGMIB⁵⁶ (Figure 22) ont été conjugués à des protéines et ont prouvé leur efficacité en termes de stabilité in vivo par comparaison avec des couplages directs à l'Iodogen[®]. Ces études montrent, plusieurs heures après injection, une très faible accumulation d'iode libre au niveau de la thyroïde, conséquence d'une stabilité accrue de la liaison carbone-iode. Toutefois, l'utilisation de composés à base d'étain (substance hautement toxique pour l'organisme) oblige à effectuer obligatoirement, après chaque marquage, une étape de purification par chromatographie liquide haute performance (CLHP) afin d'éliminer toute trace d'étain avant couplage. Cette purification s'accompagne de fortes

perles radioactives dues à l'adsorption non contrôlée du composé radiomarqué dans les tubulures de la CLHP. Malgré cet inconvénient, les composés organostanniques sont à ce jour les plus utilisés pour le radiomarquage de vecteurs immunologiques à l'iode.

II-2.1.2. Radiomarquage par substitution nucléophile

Les méthodes de radioiodation par substitutions nucléophiles sont bien moins développées que les voies électrophiles. On peut citer la méthode par échange d'halogène utilisée lors de la synthèse du *m*-[^{*}I]benzylguanidine ([^{*}I]-MIBG)^{57,58}, traceur radioactif employé pour le diagnostic ou le traitement de certaines tumeurs cérébrales (Figure 23).

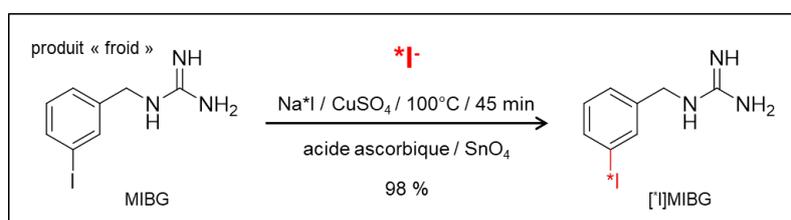


Figure 23 : Exemple de radiomarquage du MIBG par échange d'halogène

Bien qu'elle puisse être effectuée avec tous les isotopes de l'iode, cette méthode ne permet pas de séparer le produit de départ du produit radiomarqué. Elle oblige donc à injecter un mélange de produits amenant à une faible activité spécifique.

Plus récemment, une nouvelle méthode de radioiodation s'inspirant de la chimie des sels d'iodonium a été développée⁵⁹ (Figure 24).

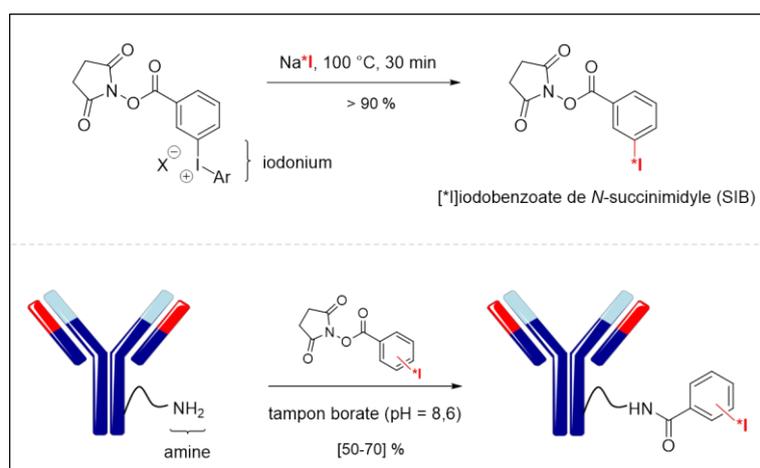


Figure 24 : Synthèse du SIB par la voie des sels d'iodonium et couplage du SIB sur une protéine

Utilisée au départ pour le marquage de molécules au fluor-18, cette chimie, consiste à remplacer la fonction stannique du précurseur radiomarquable par une fonction arylidonium pouvant réagir avec les halogènes sous leur état réduit (^{*}F⁻ ou ^{*}I⁻). A l'inverse de la voie électrophile, celle-ci permet la synthèse du [^{*}I]-SIB sans étape de purification par

CLHP grâce à la grande différence de polarité entre le précurseur iodonium et la molécule radiomarquée, entraînant une séparation rapide et efficace sur simple cartouche de gel de silice. L'absence d'étape CLHP permet ainsi de réduire significativement les pertes radioactives et le temps écoulé entre l'étape de marquage et de couplage. Cette technique, développée au sein de notre laboratoire, sera décrite plus en détail dans ce projet de recherche.

En 2016, Zhang et son équipe ont publié une nouvelle méthode de radioiodation nucléophile basée sur l'utilisation d'acides boroniques et de catalyseur à base de cuivre⁶⁰. Cette méthode, s'effectuant à basse température et ne nécessitant que des quantités infimes de catalyseur couplé à un ligand de type phénantroline, donne accès à de très bons rendements radiochimiques mais nécessite toujours une d'étape de purification par CLHP comme la voie stannique (Figure 25).

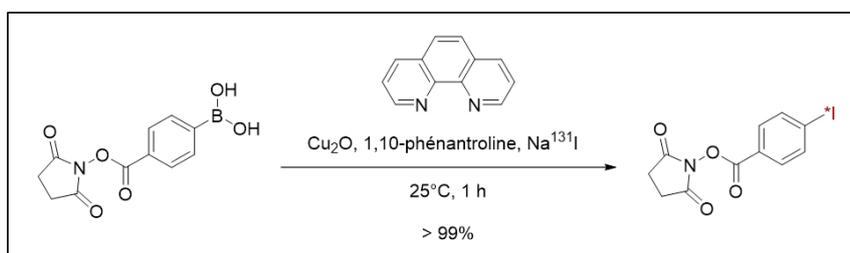


Figure 25 : Synthèse du SIB à partir d'acides boroniques décrite par Zhang

Cette nouvelle voie de marquage permet la synthèse du [^{131}I]-SIB à température ambiante sans dégradation de la fonction NHS, la rendant très intéressante pour des applications biologiques.

II-2.2. Radiomarquage à l'astate-211

Les premiers marquages de protéines à l'astate-211 se sont inspirés des procédures développées pour la radioiodation. Coenen⁶¹, dans ses études sur les halogènes, a montré que la stabilité chimique de la liaison carbone-astate était sensiblement plus faible que celle d'une liaison carbone-iode (Tableau 7). Ce qui entraîne certaines adaptations des méthodes utilisées à l'iode, notamment celle visant à coupler directement l'isotope sur une protéine.

En 1975, Aaij⁶² a émis l'hypothèse d'introduire l'astate sous forme oxydée (At^+) sur les résidus tyrosines des protéines, par ajout in situ de l'oxydant chloramine-T. Des tests de stabilité démontreront, comme pour l'iode mais dans des proportions encore plus importantes, que le marquage sur les tyrosines n'est pas stable in vivo⁶³. Un peu plus tard, Visser⁶⁴⁻⁶⁶ a suggéré qu'en réalité les conditions de « marquage direct » employées dans les études précédentes permettaient l'introduction de l'astate, non pas sur les tyrosines, mais

sur les résidus cystéines des protéines, par formation de liaisons soufre-astate très peu stables⁶⁷. Une méthode de marquage indirect s'avère donc indispensable pour obtenir des stabilités satisfaisantes in vivo.

Tableau 7 : Energies de liaisons entre halogènes et groupements alkyle ou phényle

Halogènes (X)	E_{liaison} (kJ/mol) - phényle-X	E_{liaison} (kJ/mol) - alkyle-X
hydrogène (ref)	460	398
fluor	523	444
chlore	398	339
brome	335	285
iode	268	222 ± 12
astate	197 ± 20	163 ± 12

I-2.2.1. Radiomarquage par substitution électrophile et nucléophile

Comme avec l'iode, le réactif le plus couramment utilisé à ce jour pour le radiomarquage de protéines à l'astate-211 est l'ester d'astatobenzoate de *N*-succinimidyle (SAB) issu des deux méthodes décrites précédemment et faisant intervenir des précurseurs stanniques^{68,69} ou iodoniums^{59,70} (Figure 26).

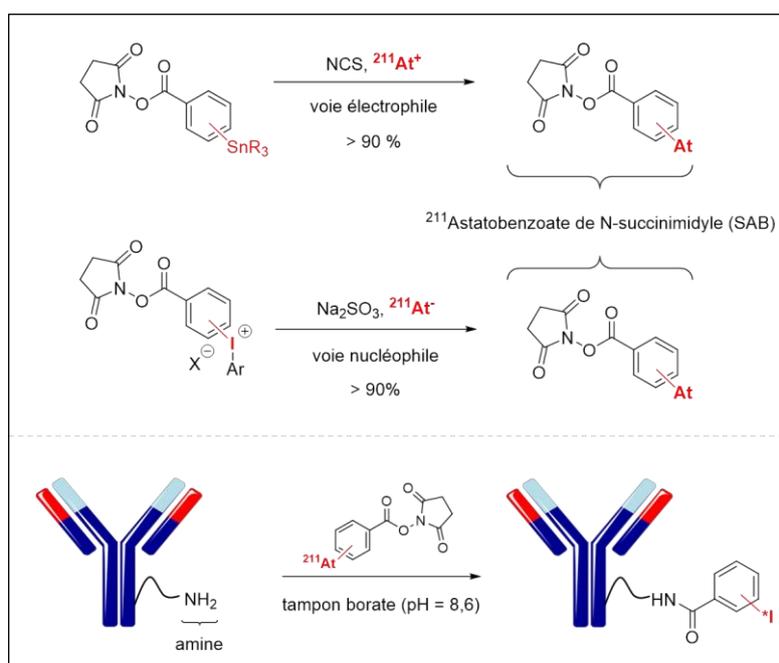


Figure 26 : Synthèse du SAB à partir d'un organostannique ou d'un sel d'iodonium / Couplage du SAB sur un anticorps

Actuellement, les méthodes de radiomarquage à l'iode et à l'astate procèdent de la manière suivante. L'isotope est greffé sur une molécule portant groupement stannique ou iodonium, et celle-ci est ensuite conjuguée sur la protéine par le biais de fonctions présentes naturellement sur les protéines (lysines, cystéines, etc.).

II-2.3. Limites des couplages conventionnels

L'étape de couplage est souvent beaucoup plus restrictive à cause de la nature chimique des fonctions de couplage impliquées. Comme présenté dans le paragraphe I-4, les lysines sont utilisées comme site préférentiel d'accroche dans la plupart des méthodes visant à coupler une molécule d'intérêt à un vecteur immunologique. Le couplage entre un ester activé et une lysine est initié par l'attaque nucléophile de l'amine sur le carbonyle de l'ester activé, pour former une fonction amide (Figure 27).

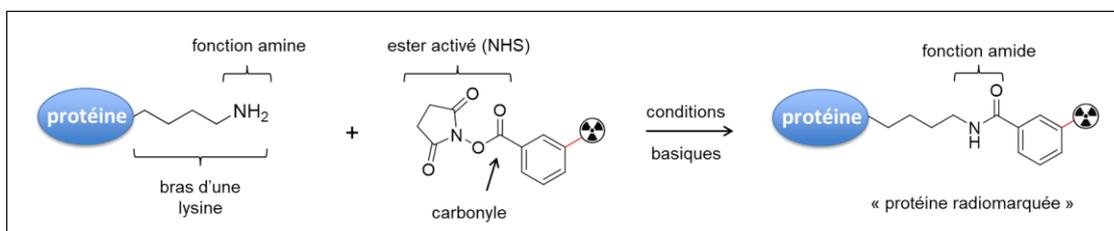


Figure 27 : Exemple de couplage entre une amine et un ester activé

Cependant, pour rendre réactive l'amine vis-à-vis de cet ester, ce couplage nécessite l'utilisation de conditions basiques ($8 < \text{pH} < 9$) qui induisent la présence d'ions hydroxydes qui vont eux aussi réagir compétitivement avec l'ester activé et ainsi hydrolyser le synthon radiomarqué (Figure 28).

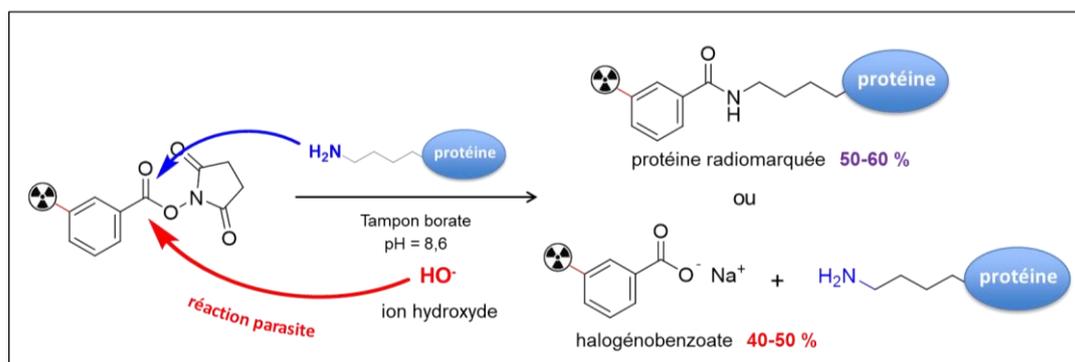


Figure 28 : Réaction parasite d'hydrolyse intervenant lors du couplage « amine - ester activé »

Cette réaction d'hydrolyse a pour conséquence des rendements de couplage non optimaux, généralement compris entre 50 et 70% (bien que des rendements jusqu'à 75 % aient pu être atteints avec certains anticorps) et seulement si la protéine est engagée à une

concentration suffisamment élevée (généralement ≥ 5 mg/mL). Il en résulte donc jusqu'à 50 % d'activité perdue sous forme d'halogénobenzoate.

Toutefois, ces gammes de concentrations et de pH ne sont pas toujours compatibles avec les protéines, certaines pouvant, dans ces conditions, aller jusqu'à s'agréger ou précipiter. Une autre limite de ces hautes concentrations est la faible activité spécifique obtenue après couplage.

Outre ce problème d'hydrolyse, l'utilisation des lysines, présentes en grand nombre à la surface des protéines, mènent à deux autres inconvénients non négligeables en médecine nucléaire (Figure 29). Le premier est l'impossibilité de contrôler précisément le nombre de radionucléides que l'on fixe. En effet, lors du couplage, un nombre aléatoire de molécules radiomarquées est fixé sur chaque vecteur, conduisant à une solution hétérogène d'anticorps radiomarqués. Ainsi, certains traceurs posséderont deux voire quatre radionucléides, alors que d'autres n'en posséderont aucun. Le second inconvénient est la possible modification chimique du site de reconnaissance de la biomolécule, impliquant cette fois-ci une perte d'affinité potentielle envers l'antigène ciblé et donc à l'inactivité de la molécule vectrice (Figure 29).

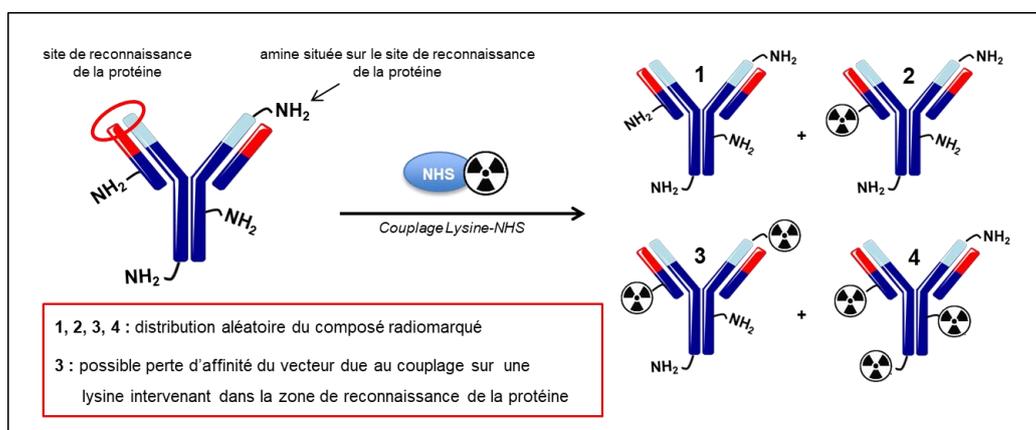


Figure 29 : Marquage hétérogène d'un vecteur immunologique selon la méthode Lysine/NHS

Ces inconvénients apportent une part non négligeable d'aléas lors du radiomarquage, rendant ces méthodes peu reproductibles et peu transférables à des applications cliniques. Afin de résoudre ces limites, nous allons maintenant nous intéresser à de nouvelles fonctions de couplage dites bio-orthogonales. Ces fonctions, issue de la *chimie click* et de plus en plus utilisées dans le domaine de la médecine nucléaire, présentent des avantages permettant de pallier ces différents inconvénients (pertes radioactives, hétérogénéité du marquage, possible perte d'affinité du vecteur).

III. APPORT DE LA CHIMIE CLICK DANS LE DEVELOPPEMENT DES RADIOPHARMACEUTIQUES

III-1. Historique

III-1.1. La chimie click

Le terme *chimie click* décrit un ensemble de processus chimiques permettant de joindre rapidement et sélectivement deux molécules entre elles. Ce concept, introduit pour la première fois en 2001 par Sharpless, Kolb et Fin⁷¹, est développé au cours du XXI^e siècle pour répondre aux limites de la chimie conventionnelle. Au départ, ce concept s'inspire des divers processus chimiques observés dans la nature permettant le couplage entre carbones de molécules différentes.

Lors de la synthèse d'une molécule d'intérêt (médicament, polymères, etc.), l'une des étapes clés est la formation de liaisons carbone-carbone ou carbone-hétéroatome. Lorsque l'on étudie les processus chimiques se déroulant dans la nature, une nette préférence apparaît, d'un point de vue énergétique, pour la formation de liaisons C-X-C, où X est un hétéroatome ou un groupe d'hétéroatomes. C'est de cette observation que naît le concept de *chimie click* dont le rôle est de répertorier et développer des processus chimiques capables de lier rapidement et efficacement de petites unités organiques pour la formation de molécules plus complexes.

Au XX^e siècle, un bon nombre de chimistes réalisaient déjà des réactions de *chimie click* bien avant la création du concept lui-même. L'importance de ce concept est notamment liée aux caractéristiques adaptatives de ces processus chimiques en milieu biologique qui ont permis l'essor de nombreux domaines comme les biosciences^{72,73}, la chimie médicinale⁷⁴ ou encore la chimie des matériaux⁷⁵. Selon Sharpless, pour qu'une réaction soit apparentée à ce concept, elle doit répondre à certains critères. Elle doit :

- être thermodynamiquement favorable ($> 20 \text{ kcal.mol}^{-1}$),
- avoir une cinétique de couplage rapide ainsi qu'un haut rendement chimique,
- impliquer des réactifs faciles d'accès et des sous-produits non toxiques,
- former des adduits ne nécessitant pas de purifications lourdes (chromatographies),
- présenter une grande stabilité en milieux physiologiques (pH, milieux aqueux, températures, pressions).

A partir de ces conditions, plusieurs classes de transformations chimiques ont été répertoriées. Il s'agit des réactions de cycloaddition d'espèces insaturées (1-3 dipolaire, Diels-Alder), de certaines substitutions nucléophiles (ouverture d'hétérocycles électrophiles) ou encore d'additions de liaisons carbone-carbone (époxydations, dihydroxylations, addition de Michael).

III-1.2. La chimie bio-orthogonale

Dès l'apparition de la médecine moderne au XIX^e siècle, les biologistes et les biochimistes se sont intéressés aux modifications pouvant être effectuées sur des molécules bioactives (enzymes, acides nucléiques) afin de mieux comprendre leurs implications dans les processus biologiques. Les premières techniques consistaient à greffer, sur des biomolécules impliquées dans des processus cellulaires, une molécule fluorescente permettant l'étude physiologique de la cellule. Toutefois à cette époque, certaines classes de biomolécules (acides nucléiques, lipides, glycanes) voyaient leurs comportements biologiques altérés après greffage, rendant ces procédés chimiques inadaptés.

C'est en 2003, deux ans après l'introduction du concept de *chimie click*, que Carolyn Bertozzi invente le terme de chimie bio-orthogonale⁷⁶. Ce nouveau concept, fortement inspiré de la *chimie click*, regroupe un ensemble de fonctions chimiques, dites bio-orthogonales, pouvant interagir en milieu biologique (cellules, sang, etc.) sans interférence avec les processus biochimiques naturels^{77,78}. Cette chimie, extrêmement polyvalente, permettant un choix illimité de molécules sondes et potentiellement applicable à tous types de biomolécules, a permis de nombreuses études fonctionnelles sur les protéines, allant de la visualisation de l'expression de ces protéines jusqu'à leur localisation dans les systèmes vivants.

Deux étapes successives sont nécessaires pour la mise en œuvre de cette chimie. La première consiste à incorporer une fonction bio-orthogonale sur la biomolécule et la seconde à la coupler avec une molécule sonde portant une fonction bio-orthogonale complémentaire. Ces fonctions présentent en général : (i) une forte chimiosélectivité limitant les réactions parasites avec les groupements endogènes ; (ii) des cinétiques de réactions élevées permettant d'étudier, en temps réel, tous types de processus biologiques (rapides ou lents) ; (iii) et une très bonne réactivité en milieu aqueux, condition indispensable pour toute réaction chimique faisant intervenir des biomolécules incompatibles avec les solvants organiques (protéines, anticorps, etc.). Compte tenu du grand nombre de réactions bio-orthogonales développées au cours de la dernière décennie, ne seront présentées ici que celles ayant fait l'objet d'applications concrètes dans les domaines médicaux.

III-2. Les premières réactions bio-orthogonales

Découverte par Hermann Staudinger en 1919, la réaction de Staudinger⁷⁹ est l'une des premières réactions bio-orthogonales utilisées dans le domaine de la santé. Dans cette réaction, un groupement azoture réagit avec une phosphine pour former un intermédiaire iminophosphorane qui, après hydrolyse, donne une amine primaire (Figure 30a).

En 2000, Bertozzi⁸⁰ décrit une méthode alternative appelé « Traceless Staudinger-Bertozzi », qui vise à faciliter l'élimination du sous-produit de réaction (phosphine oxydée) en passant par un intermédiaire « aza-ylure » qui, après hydrolyse, libère la phosphine oxydée et donne l'amide correspondant (Figure 30b). Cette réaction hautement sélective a été adaptée dans les années 2000 pour la modification de protéines et l'ingénierie de surfaces cellulaires⁸¹ à la fois *in vitro*⁸² et *in vivo*⁸³. Cependant les faibles cinétiques de couplage ($k = 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), et l'oxydation rapide des phosphines en milieu biologique demeurent des obstacles pour son transfert vers des applications *in vivo*.

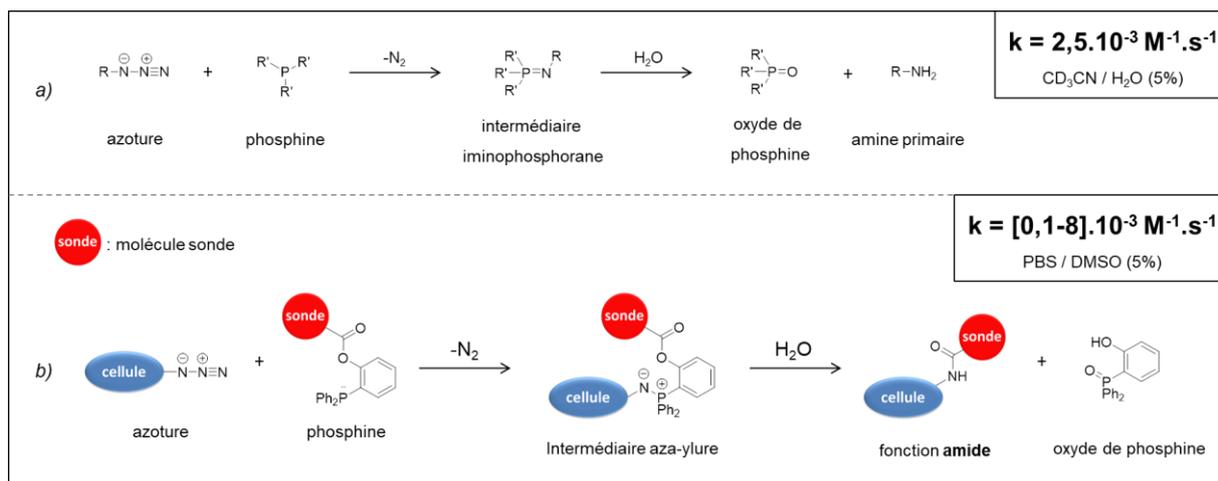


Figure 30 : a) Réduction de Staudinger développée par Hermann Staudinger en 1919 / b) Réaction de Staudinger-Bertozzi Traceless développée par Carolyn Bertozzi pour le marquage cellulaire

Quelques années auparavant, d'autres réactions de bioconjugaison faisant intervenir cette fois les cétones et les aldéhydes ont été développées^{84,85}. Ces groupements carbonyles réagissent sous conditions acides (pH = 4-6) avec des amines (hydrazides, alcoxyamines) pour donner un adduit imine (Figure 31). Pratiquement inertes vis-à-vis des autres groupes fonctionnels endogènes, ces fonctions sont facilement incorporables à la surface des biomolécules/cellules grâce notamment à leur petite taille. Rideout⁸⁶ en 1986 ainsi que Bertozzi⁸⁷ en 1997, ont prouvé l'efficacité de ce type de réactions *in vitro*. Cependant, les conditions acides nécessaires, difficiles à obtenir dans la plupart des

compartiments cellulaires, ainsi que les fortes concentrations de réactifs requises ont rendu ces couplages inadaptés pour des applications de bioconjugaison *in vivo*.

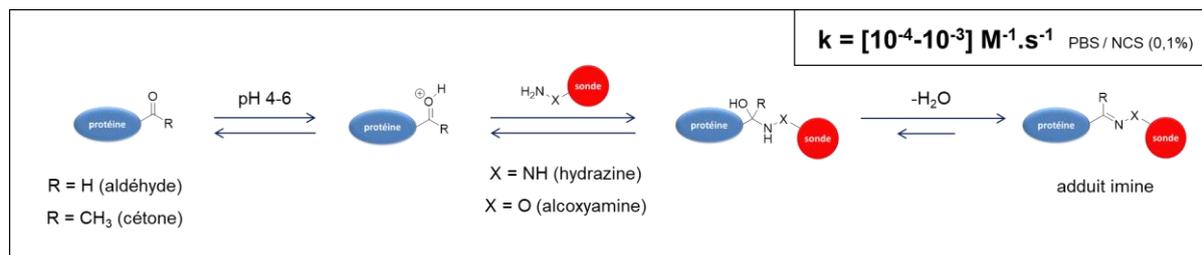


Figure 31 : Réaction de condensation « aldéhyde/cétone » utilisée pour le marquage de protéine

III-3. Les réactions de cycloadditions bio-orthogonales

L'évolution de la *chimie click* a permis de grandes révolutions dans presque tous les domaines de la chimie, et notamment dans celui de la santé et de la radiochimie pour la préparation de radiopharmaceutiques. Les raisons en sont qu'à ce jour, de nombreuses réactions de radiomarquage nécessitent encore des températures de réaction élevées et des solvants organiques incompatibles avec la plupart des protéines. De plus, la décroissance radioactive des isotopes mis en jeu requière des réactions rapides et efficaces en milieu biologique.

Pour résoudre les limites *in vivo* des méthodes de couplages citées précédemment, de nombreuses réactions ont été développées. Parmi elles, les réactions de cycloadditions [p+q]. Elles impliquent la création de deux liaisons σ entre les carbones impliqués, accompagnée de la disparition concertée de deux liaisons π . On admet que ces réactions sont concertées, c'est-à-dire qu'elles se font toutes au cours d'un même processus élémentaire. Seront présentées ici les trois grandes classes de cycloadditions les plus utilisées à ce jour dans le développement d'applications biomédicales, à savoir les cycloadditions entre azoture et alcyne (Huisgen, CuAAC, SPAAC), les cycloadditions de Diels-Alder à demande inverse d'électron entre alcène et tétrazine (IEDDA), ainsi que les réactions bio-orthogonales développées au cours de ces dernières années.

III-3.1. Cycloadditions entre azoture et alcyne

III-3.1.1. Cycloaddition de Huisgen 1,3-dipolaire

La cycloaddition 1,3-dipolaire, aussi appelée réaction de Huisgen, est une réaction chimique appartenant à la grande famille des cycloadditions péricycliques concertées. Elle est rapportée pour la première fois en 1893 par Michael⁸⁸ puis décrite en détail par Huisgen⁸⁹

en 1963. Elle fait intervenir un dipôle 1,3 (azoture) et un dipôlarophile (alcyne) permettant après couplage la formation de composés hétérocycles à 5 chaînons (Figure 32).

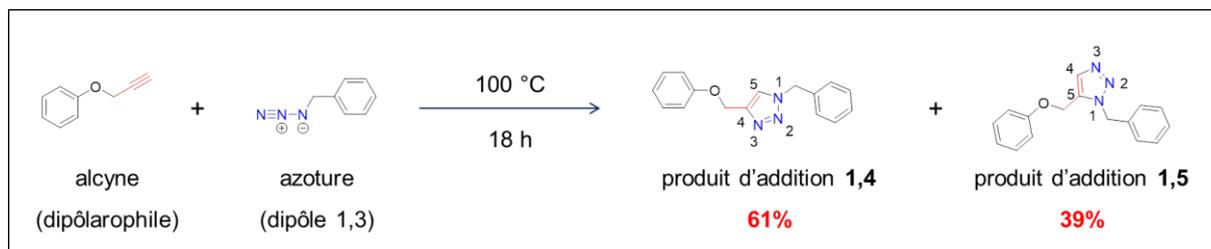


Figure 32 : Réaction de Huisgen entre un alcyne terminal et un azoture

Bien qu'utilisée dans de nombreux domaines de la chimie pour la synthèse de composés cycliques, cette réaction a été peu employée pour des applications biologiques à cause de ses cinétiques lentes, de ses conditions réactionnelles drastiques (températures élevées, pressions) inadaptées à la plupart des systèmes biologiques, et de sa faible régiospécificité amenant à différents adduits (produit 1,4 et 1,5).

III-3.1.2. Cycloaddition catalysée au cuivre (CuAAC)

Au début des années 2000, Sharpless⁹⁰ et Meldal⁹¹ rapportent chacun la possibilité d'accélérer considérablement la cinétique de cette réaction en milieu aqueux par ajout d'une quantité catalytique de cuivre (I). D'après les calculs DFT (théorie de la fonctionnelle de la densité) effectués par l'équipe de Sharpless⁹², cette accélération est attribuée à la formation d'un métallacycle à six chaînons entre l'alcyne et le cuivre permettant de réduire considérablement la barrière d'activation de ce couplage ($E = 14.9\text{ kcal.mol}^{-1}$) comparativement à celle observée lors de la réaction de Huisgen ($E = 26.0\text{ kcal mol}^{-1}$).

Cette nouvelle réaction présente un mécanisme en six étapes décrit en 2013 par Worrell⁹³ (Figure 33). Elle n'est plus vraiment considérée comme une véritable cycloaddition concertée à cause de l'action du cuivre lors de la formation du produit 1,4. De ce fait, elle fut appelée cycloaddition catalysée au cuivre entre un azoture et un alcyne (en anglais Copper-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC)).

Par ses cinétiques rapides ($k = [10-200]\text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et sa grande régiospécificité (formation adduit 1,4 seulement), la CuAAC est utilisée de nos jours dans de nombreuses études biologiques comme la modification de virus⁹⁴ ou la modification sélective de protéines in vitro et in vivo^{95,96}. Cependant, l'utilisation de cuivre, composé hautement toxique pour les cellules⁹⁴, est un frein au transfert de cette réaction vers des applications cellulaires. En effet l'utilisation de cuivre au contact de cellules a montré une cytotoxicité importante due à

l'altération de la division cellulaire ou encore à la perturbation du métabolisme lipidique des cellules.

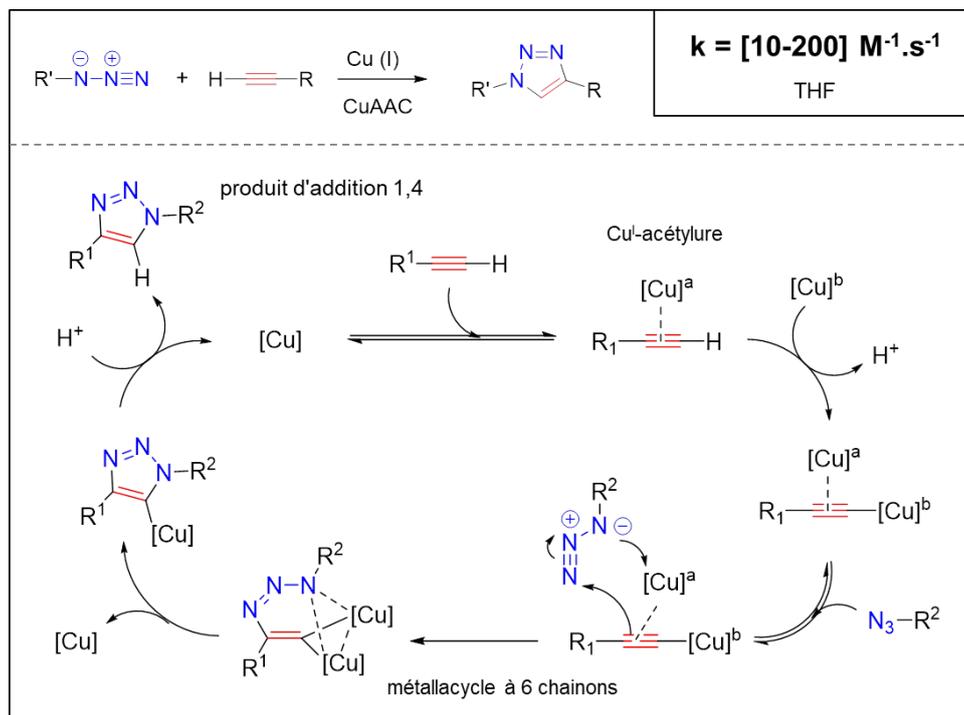


Figure 33 : Mécanisme de la CuAAC décrit par Worrell

Pour contourner cette cytotoxicité associée au cuivre, plusieurs ligands augmentant la réactivité du cuivre(I) ont été développés⁹⁷. Ces ligands, par leur cycle triazole (TBTA, THPTA) ou phénantroline (BPS), permettent de stabiliser le cuivre sous sa forme (Cu^I) en milieu aqueux, et réduisent ainsi les quantités de cuivre nécessaires (Figure 34).

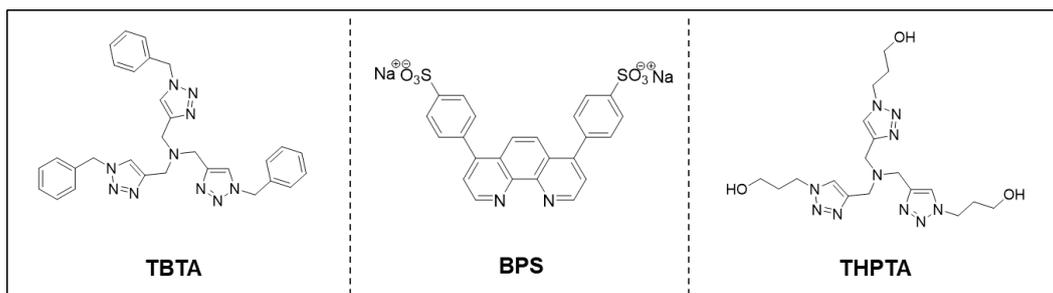


Figure 34 : Exemples de ligands utilisés pour la CuAAC

Ces ligands ont ainsi permis d'élargir le spectre d'application de la CuAAC à l'imagerie cellulaire⁹⁸. Il est à noter qu'une autre méthode catalytique permet de coupler un azoture avec un alcyne : la cycloaddition catalysée au ruthénium entre un alcyne et un azoture (RuAAC)⁹⁹. A l'inverse des triazoles 1,4-disubstitués obtenus par CuAAC, cette réaction conduit, elle, à la synthèse de composés triazoles 1,5-disubstitués. Cependant elle n'a pas été utilisée en biologie à cause des solvants organiques et des températures de

réaction élevées qu'elle nécessite, incompatibles avec tout système biologique. Outre ces ligands qui permettent de réduire la quantité de cuivre nécessaire, de nouvelles réactions de cycloaddition entre azoture et alcyne ont été développées afin d'éliminer toute utilisation de cuivre.

III-3.1.3. Cycloaddition assistée par contrainte stérique (SPAAC)

S'inspirant des travaux effectués par Wittig et Krebs¹⁰⁰ en 1961 sur une nouvelle génération d'alcyne activé, l'équipe de Bertozzi¹⁰¹ rapporte en 2004 la première étude de marquage cellulaire par couplage 1,3-dipolaire entre azotures et alcynes tendus (sans cuivre) où la triple liaison est cette fois-ci comprise dans un cycle à huit chaînons. Cette contrainte stérique affectée à la fonction alcyne permet à ces nouveaux composés cycliques de réagir sur les azotures sans apport de catalyseur. Cette variante de la cycloaddition de Huisgen est appelée cycloaddition assistée par contrainte stérique entre azoture et alcyne tendu (en anglais Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC)).

Les premières cinétiques de couplage entre alcynes tendus et azotures sont effectuées par Bertozzi avec le cyclooctyne (OCT) qui présente des cinétiques de couplage ($k = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) similaires à celles observées pour la réaction de Staudinger ($k = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)⁸². Par la suite, plusieurs cyclooctynes ont été développés afin d'améliorer leurs cinétiques de couplage avec les azotures (Figure 35).

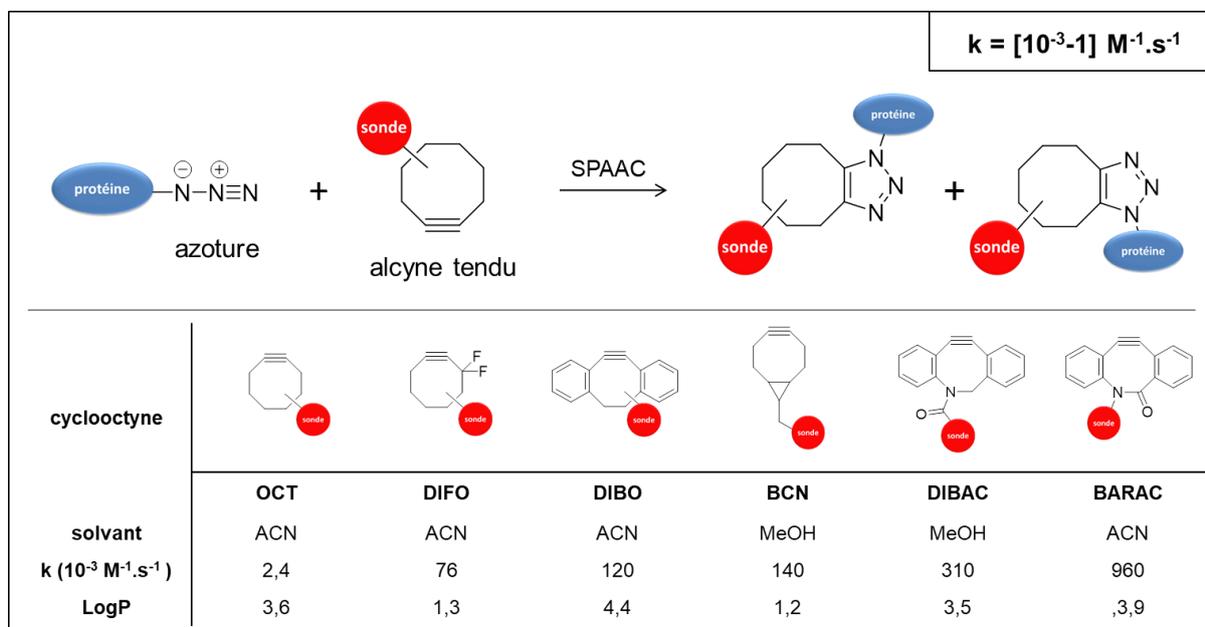


Figure 35 : Cycloaddition favorisée par contrainte stérique entre azoture et alcyne tendu : quelques exemples de cyclooctynes

Bertozzi¹⁰² montre en 2008 que la substitution d'hydrogènes sur le cycle par des atomes de fluor permet de multiplier par trente la vitesse de réaction de la triple liaison avec

un azoture (difluorocyclooctyne (DIFO), $k = 76 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Au même moment, l'équipe de Boons¹⁰³ développe un cyclooctyne approximativement deux fois plus réactif que le DIFO, le dibenzocyclooctynone (DIBO, $k = 120 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), issu de la fusion entre deux cycles benzéniques de part et d'autre du cyclooctyne. Sur le même principe, Van Delft¹⁰⁴ développe en 2010 un nouveau cyclooctyne, le dibenzoazacyclooctyne (DIBAC), présentant une réactivité presque trois fois supérieure au DIBO ($k = 310 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette augmentation de la réactivité s'explique par l'ajout dans le cycle cyclooctyne d'un hétéroatome (azote) qui augmente encore la contrainte appliquée sur la triple liaison. Cette accélération s'explique par la double contrainte appliquée sur le cyclooctyne par les carbones sp^2 des cycles benzéniques. Cependant, le greffage de ces cycles aromatiques augmente de façon importante le caractère lipophile de ces cyclooctynes, rendant leur utilisation limitée en milieu aqueux. Au cours de la même année, l'équipe de Bertozzi¹⁰⁵ développe un analogue au DIBAC, le biarylazacyclooctynone (BARAC, $k = 960 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Le développement de ce cyclooctyne a pour but de fusionner les caractères contraints du DIBAC (cycles aromatiques + hétéroatome) avec un carbone sp^2 (carbonyle) pour donner un cyclooctyne présentant l'une des constantes de vitesse les plus élevées observées à ce jour pour cette classe de cycloaddition.

Outre les problèmes de solubilité que l'on rencontre avec ces composés cycliques très lipophiles, l'un des facteurs limitants de la SPAAC est la faible disponibilité commerciale de ces cyclooctynes. En effet, les réactifs nécessaires sont pour la plupart difficiles à synthétiser et demandent des synthèses multi-étapes dont les rendements globaux dépassent difficilement les 25 %. De nombreux groupes de recherche se sont donc intéressés au développement de nouveaux procédés de synthèse plus accessibles. C'est ce qui a incité le groupe de Van Delft¹⁰⁶ à développer en 2010 la bicyclononyne BCN en s'inspirant des travaux de Meier¹⁰⁷ en 1981 qui montraient l'augmentation significative de la réactivité de la triple liaison lorsqu'un cycle cyclopropane était greffé sur le cycle cyclooctyne (OCT : $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ / BCN : $k = 140 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Contrairement à la CuAAC, la SPAAC ne présente pas de régiospécificité lors du couplage entre l'azoture et le cyclooctyne. Elle amène à la formation de deux isomères qui peuvent potentiellement rendre hétérogène le marquage de la cible biologique. Toutefois, cette hétérogénéité n'a pas été rapportée comme limitante lors de marquages cellulaires ou de protéines. Après leur développement, les réactions de cycloadditions SPAAC ont vu leurs utilisations exploser dans le domaine médical¹⁰⁸. On peut citer les travaux de Bertozzi¹⁰⁹ en 2007 sur l'imagerie in vivo de processus cellulaires par marquage de protéines

génétiqument encodées par des groupements azotures, ou encore plus récemment ceux de Yadagiri Kurra¹¹⁰ en 2014 sur le même sujet d'étude.

III-3.2. Réactions de Diels-Alder

Les cycloadditions de Diels-Alder sont des réactions chimiques appartenant, comme la réaction de Huisgen, à la famille des cycloadditions péricycliques concertées. Otto Diels et Kurt Alder¹¹¹ les décrivent pour la première fois en 1929 et obtiennent le prix Nobel de chimie en 1950 pour ces travaux. Dans ces réactions, un diénophile (alcène, alcyne) s'additionne à un diène conjugué pour former un cyclohexène.

Cette famille de cycloadditions se divise en deux cas : la réaction de Diels-Alder à demande normale d'électron (NEDDA), où un diène électroniquement enrichi réagit avec un diénophile électroniquement appauvri, et la réaction à demande inverse d'électron (IEDDA) où un diène électroniquement appauvri réagit avec un diénophile électroniquement enrichi (Figure 36). A partir de la théorie des orbitales moléculaires frontières (OMF), il est possible de prédire la cinétique de ces réactions en fonction de l'écart énergétique entre les orbitales HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) des réactifs mis en jeu¹¹². Dans le cas d'une réaction à demande normale, plus le diène est électroniquement enrichi et le diénophile électroniquement appauvri, et plus l'écart énergétique entre l'orbitale HOMO du diène et l'orbitale LUMO du diénophile est faible.

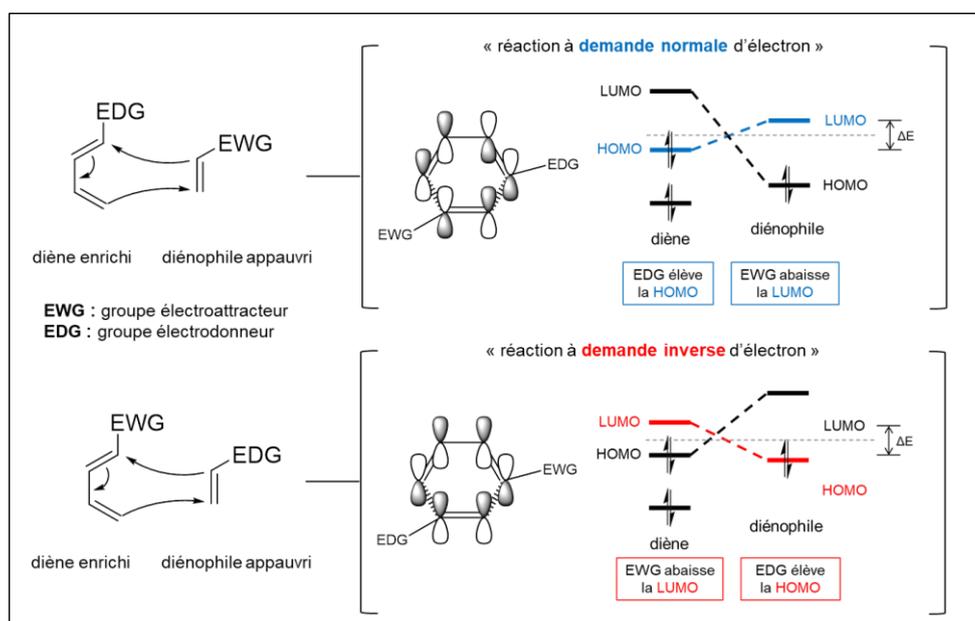


Figure 36 : Description des réactions de Diels-Alder à demande normale ou à demande inverse d'électron

A contrario, dans le cas d'une réaction à demande inverse, plus le diène est électroniquement appauvri et le diénophile électroniquement enrichi, et plus l'écart

énergétique entre l'orbitale LUMO du diène et l'orbitale HOMO du diénophile est faible. Considérant le grand nombre de réactions assimilables aux cycloadditions de Diels-Alder, ne seront étudiées ici que celles ayant été les plus utilisées dans le domaine de la radiochimie et de la médecine nucléaire, soit les réactions de Diels-Alder à demande inverse d'électron (IEDDA) faisant intervenir un diène conjugué type tétrazine et différents diénophiles de type alcènes ou alcynes contraints.

III-3.2.1. Alcènes et alcynes contraints

Les premières études de réactions de Diels Alder à demande inverse d'électron sont publiées en 1998 par Sauer¹¹³ qui liste les différentes cinétiques de couplage entre diènes de type tétrazine et diénophiles de type alcènes ou alcynes. Il décrit ces réactions comme étant hautement sélectives, et permettant la synthèse de molécules hétérocycliques complexes favorisées en milieu aqueux par l'effet hydrophobe des fonctions chimiques impliquées¹¹⁴.

En 2008, Fox et Hilderbrand rapportent les premières cycloadditions à partir d'un dérivé tétrazine et deux alcènes tendus : le *trans*-cyclooctène¹¹⁵ (TCO) et le norbornène¹¹⁶. Comme pour les cyclooctynes utilisés en SPAAC, ces deux alcènes cycliques présentent une contrainte stérique au niveau de leur double liaison qui leur permet de réagir plus rapidement par comparaison avec les alcènes ou alcynes non contraints (Figure 37).

Fox montre que le couple tétrazine-TCO présente des constantes de couplage spectaculaires pouvant s'élever jusqu'à $2000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en milieu aqueux, soit au moins deux ordres de grandeur plus rapides que toutes les autres réactions bioorthogonales citées précédemment. Par la suite, Fox¹¹⁷ en 2011 cherche à optimiser la réactivité du TCO en fusionnant un cyclopropane sur un cyclooctène (selon le même principe que le BCN) afin d'accroître la contrainte stérique affectée sur la fonction alcène (s-TCO). Ce nouvel alcène contraint montre des constantes de couplage impressionnantes jamais observées auparavant pouvant s'élever à $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en milieux aqueux, faisant de lui le diénophile le plus réactif étudié à ce jour.

Toutefois, la grande réactivité de ces *trans*-cyclooctènes a généré certaines limites dans leurs utilisations en milieu biologique. Robillard¹¹⁸ montre en 2013 que la forme *trans* du cyclooctène (TCO) a tendance à s'isomériser en forme *cis* en quelques heures en présence de fortes concentrations de thiols (sérum murin), et quelques jours en stockage prolongé. Pour résoudre ces problèmes de stabilité, Fox¹¹⁹ a conçu un an après un nouveau *trans*-cyclooctène en fusionnant un cycle dioxolane sur un cyclooctène (d-TCO). Cette association a permis d'augmenter significativement la stabilité du cycle contre l'isomérisation

en milieu sérique tout en maintenant une réactivité élevée vis-à-vis des tétrazines ($k = 3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Le BCN a également trouvé son utilité dans les réactions IEDDA avec des cinétiques de couplage ($k = 1,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) supérieures à tous les autres alcènes (hors *trans*-cyclooctènes). Mais seuls les cyclooctynes, sans cycles benzéniques greffés, sont capables de réagir avec une tétrazine, à cause de l'encombrement stérique au niveau de la triple liaison qui empêche l'approche de la tétrazine.

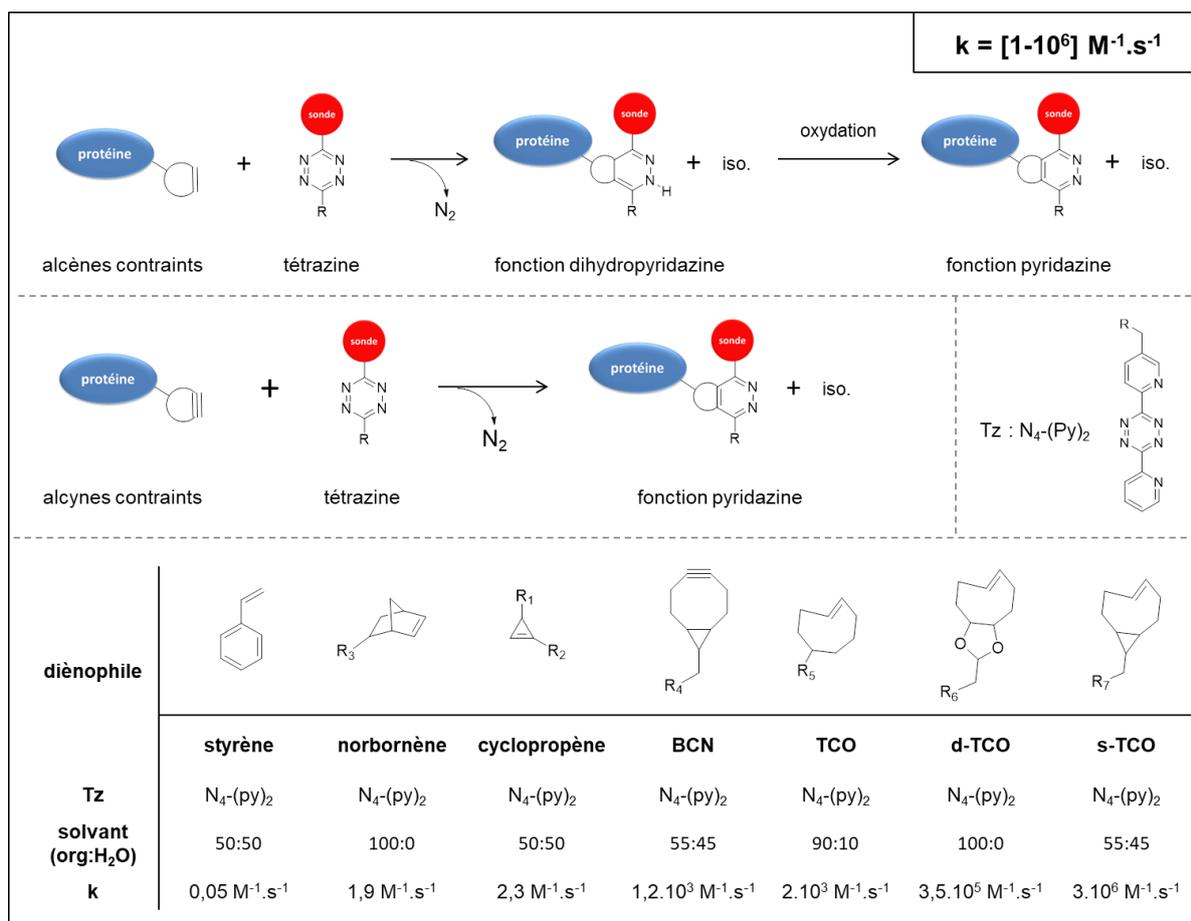


Figure 37 : Cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse d'électron entre une tétrazine et différents alcènes/alcyne (ref. 113)

Dans certains cas, la grande taille du *trans*-cyclooctène et du norbornène peut limiter l'application de l'IEDDA en milieu biologique, c'est pourquoi d'autres alcènes contraints de plus petite taille ont été étudiés.

Prescher et Devaraj^{120,121} publient en 2012 l'utilisation du plus petit alcène contraint, le cyclopropène, dans une réaction de couplage avec une tétrazine. Même si les constantes de vitesse entre cyclopropènes modifiés et tétrazine sont plutôt faibles ($k = 2,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ils montrent dans leur étude que la petite taille du couple cyclopropène-tétrazine peut avoir un intérêt lors du marquage de protéines très sensibles à la modification chimique (glycanes).

Cependant, dans certains milieux biologiques, les cyclopropènes présentent une forte instabilité, allant jusqu'à se polymériser au contact de certains groupes endogènes.

III-3.2.2. Tétrazines

La configuration électronique des tétrazines développées ces dernières années implique aussi des différences importantes de réactivité avec les alcènes contraints. Si l'on étudie les cinétiques de couplage entre le TCO et différentes tétrazines, on observe que celles-ci sont d'autant plus élevées que la tétrazine présente des groupements attracteurs^{122,123}. Dans cette étude, Hilderbrand¹²² montre que la tétrazine H-N₄-NH₂ présente la plus grande cinétique de couplage avec le TCO, suivie des tétrazines pyrazine (pz-N₄-NH₂), pyridine (py-N₄-NH₂) et méthylée (Me-N₄-NH₂). Cette différence de réactivité s'explique par l'effet électronique des substituants présents sur le cycle tétrazine. Les groupements pyridine et pyrazine agissent par effet mésomère attracteur (-M) sur la tétrazine alors que le groupement méthyle agit par effet inductif donneur (+I). Cet appauvrissement électronique dans le cas des tétrazines pyridine et pyrazine amène à une diminution du niveau énergétique de l'orbitale LUMO de la tétrazine, augmentant ainsi leur réactivité avec le TCO (Figure 38).

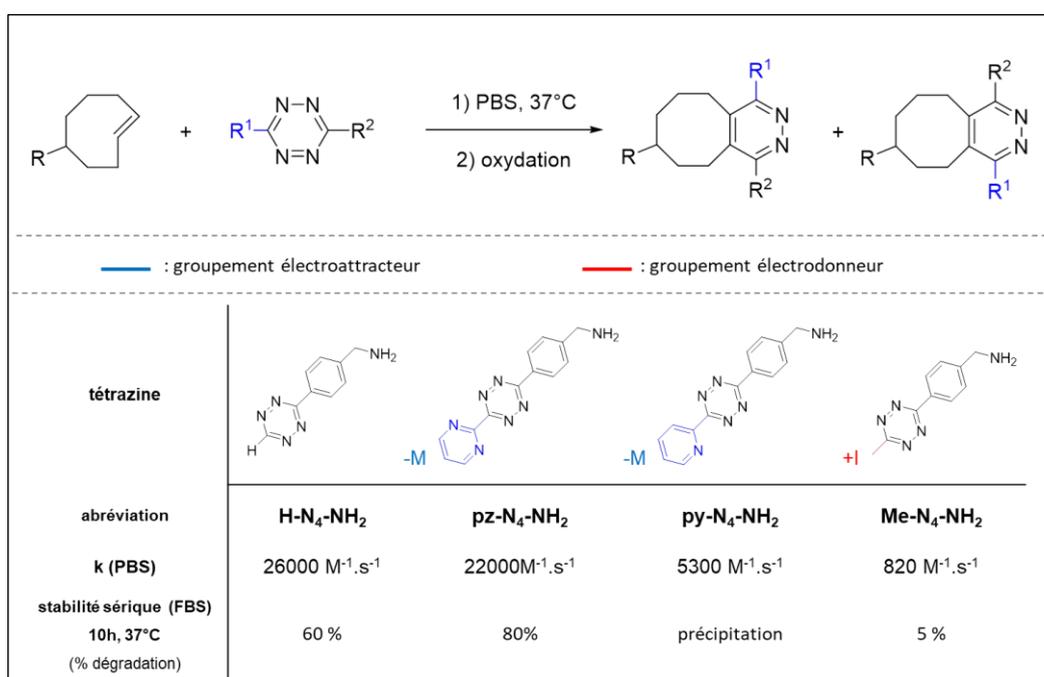


Figure 38 : Cinétiques de couplage entre le TCO et différentes tétrazines + stabilité sérique des tétrazines sélectionnées en FBS (ref. 123)

Cependant, cette augmentation de la réactivité s'accompagne d'une instabilité du cycle tétrazine en milieu sérique (sérum de veau foetal, FBS). Il est donc essentiel de choisir, selon l'application souhaitée, le bon compromis entre réactivité et stabilité de la tétrazine.

III-3.3. Autres réactions bio-orthogonales

Au cours de ces dix dernières années, un nombre important de réactions classifiées comme bio-orthogonales, ont été développées et décrites dans ces différentes revues^{97,124,125}. En revanche, seule une infime partie d'entre elles a été utilisée dans des applications biologiques. Sont en cause les limites qu'apportent certaines fonctions, comme l'accessibilité des réactifs nécessitant leurs synthèses et leur stabilité variable en milieu physiologique. Nous ne présenterons ici que quelques exemples ayant été utilisés en biologie ces dernières années.

Leeper¹²⁶ décrit en 2011 la première utilisation d'une cycloaddition [4+1] biocompatible entre une tétrazine et un isonitrile. Cette réaction passe par la formation d'un intermédiaire norbornadiénimine qui subit spontanément une cycloréversion [4+2] pour former un iminopyrazole après libération de diazote (Figure 39a). Dans le cas où le carbone lié à l'azote de la fonction isonitrile n'est pas quaternaire, l'imino-pyrazole se tautomérise puis s'hydrolyse pour former un aminopyrazole (Figure 39b).

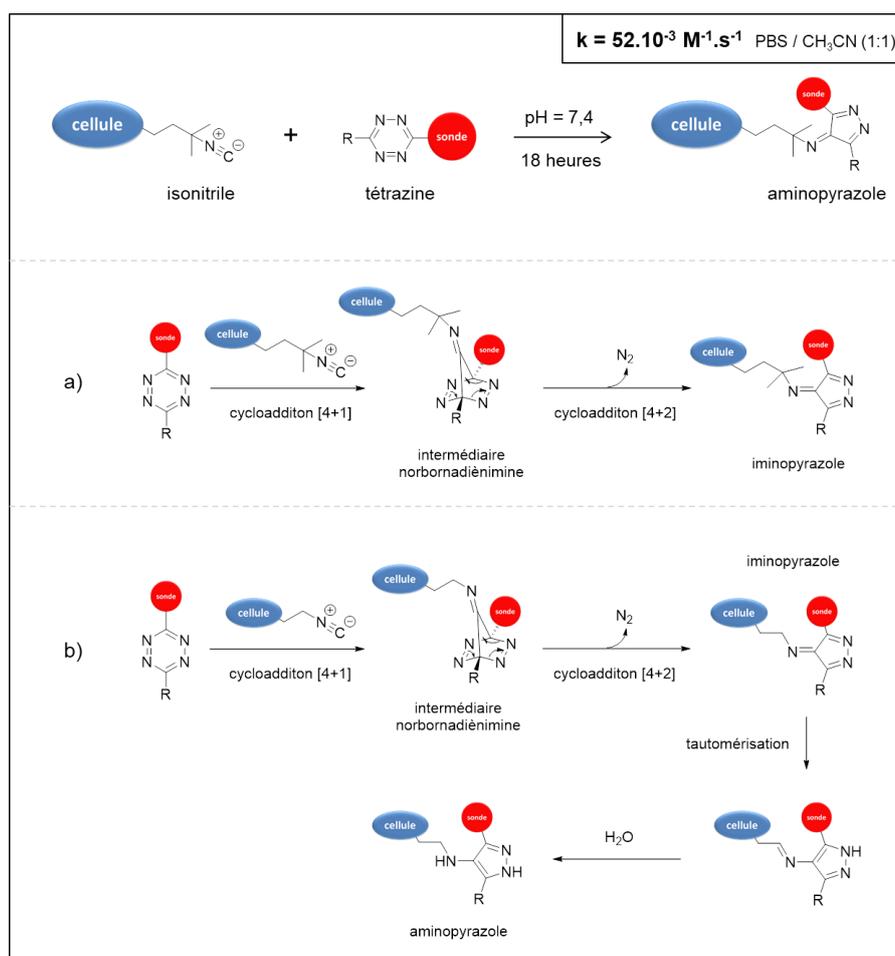


Figure 39 : Réaction de cycloaddition [4+1] entre une tétrazine et un isonitrile décrite par Leeper / a) formation d'un iminopyrazole / b) Formation d'un aminopyrazole

Les constantes de vitesse obtenues ($k = 52 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) sont comparables à celles observées avec le cyclooctyne DIFO et un azoture ($k = 76 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ce système est testé en 2013 pour le marquage de glycanes à la surface des cellules, par incorporation de sucres modifiés avec des groupements isonitriles¹²⁷. Dans cet étude, Leeper et son équipe décrivent le caractère orthogonal de cette réaction en montrant que l'incorporation cellulaire de sucres portant des fonctions azotures et isonitriles permet, avec cette nouvelle réaction, d'effectuer des imageries différentielles simultanées par combinaison avec la SPAAC.

En 2017, Taran¹²⁸ et son équipe développent une nouvelle réaction de cycloaddition impliquant des cyclooctynes et un iminosydnone (Figure 40). Elle s'effectue par cycloaddition [3+2] suivie spontanément d'une réaction de rétro-Diels-Alder pour donner un dérivé pyrazole et une urée. Les cinétiques obtenues montrent une augmentation significative des constantes de couplage par rapport au couple azoture-alcyne contraint allant de $3,15 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec le BCN à $29,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec la DIBAC.

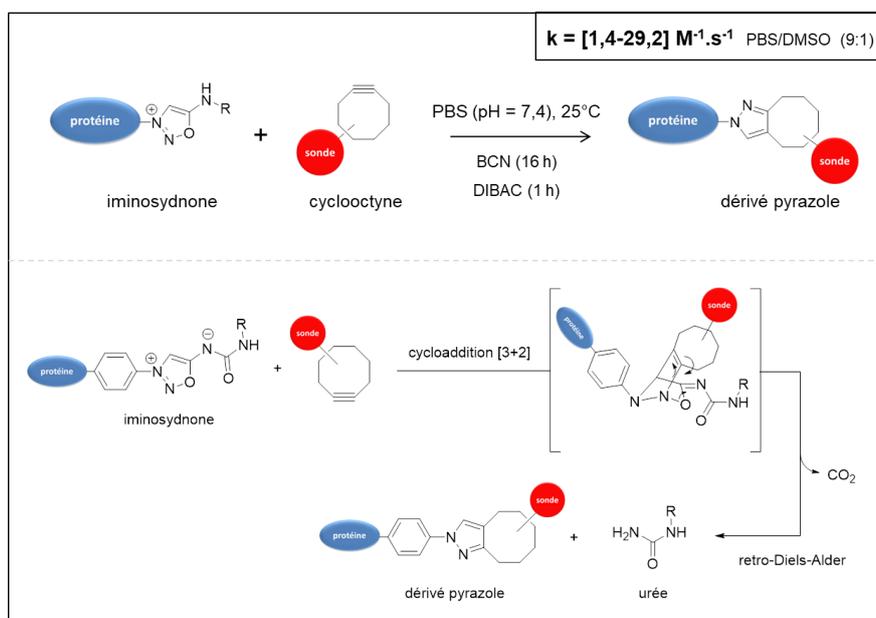


Figure 40 : Réaction de cycloaddition entre un iminosydnone et un cyclooctyne

Dans ses travaux, Taran montre le caractère orthogonal de cette réaction en l'associant à la CuAAC pour le marquage fluorescent de protéines en milieu sérique (anticorps, BSA). Il décrit ces précurseurs iminosydnones comme étant faciles d'accès, stables en milieu sérique, et orthogonaux à la réaction de CuAAC, permettant des marquages combinés sur diverses biomolécules d'intérêts.

Encore plus récemment, en 2018, Tang¹²⁹ et son équipe rapportent la découverte d'une nouvelle réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électron entre une tétrazine et le

β -caryophyllène, un sesquiterpène naturel bicyclique composé d'un macrocycle à 9 chaînons fusionné avec un cyclobutane (Figure 41).

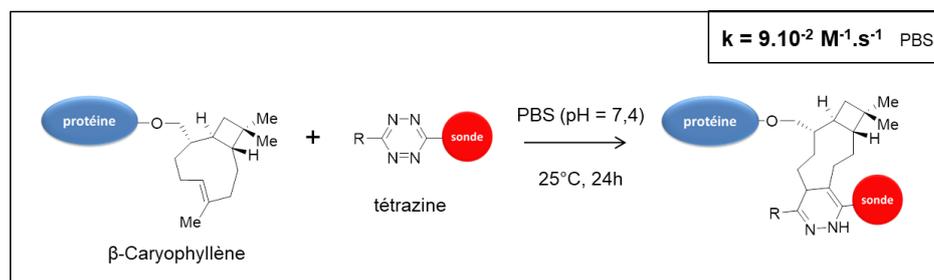


Figure 41 : Cycloaddition [4+2] entre un β -Caryophyllène et une tétrazine

Ce diénophile naturel, peu cher et facilement accessible, présente une structure semblable à celle du TCO qui lui permet de réagir selon le même mécanisme concerté que les alcènes contraints cités précédemment. Cette réaction présente des constantes de vitesse ($k = 9,10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) supérieures à celles de Staudinger mais très inférieures à celles des autres alcènes contraints (cyclopropène, norbornène, TCO, etc.). Cette différence s'explique par la plus faible contrainte stérique affectée à la double liaison par le cycle *trans*-cyclononène. Toujours en cours d'étude, cette réaction a été testée pour le marquage fluorescent de l'anticorps Trastuzumab et a permis d'obtenir des résultats prometteurs en termes d'imagerie et de biocompatibilité pour le marquage cellulaires¹²⁹.

III-4. Apport de la chimie bio-orthogonale dans le développement des radiopharmaceutiques

L'essor de la chimie bio-orthogonale a eu une grande influence sur de nombreux domaines scientifiques et notamment dans celui de la radiochimie pour la synthèse d'agents radiopharmaceutiques. Du fait de la désintégration des radioisotopes mis en jeu, cette discipline nécessite des réactions rapides et quantitatives pour réduire les pertes radioactives associées. Dans une première partie, nous nous concentrerons sur l'utilisation de la chimie bio-orthogonale lors du radiomarquage de vecteurs immunologiques à partir de groupements prothétiques (GP). Un accent particulier sera mis sur les trois réactions bio-orthogonales prédominantes : la CuAAC, la SPAAC et l'IEDDA. Enfin, une dernière partie décrira le développement du préciblage *in vivo* à l'aide de cette chimie particulière.

III-4.1. Radiomarquage à partir de groupements prothétiques

En médecine nucléaire, la chimie bio-orthogonale a permis le développement de nouvelles méthodes de marquage de biomolécules à partir de GP cliquables. Les peptides, les protéines ou encore les anticorps doivent être radiomarqués en conditions aqueuses à

température ambiante afin d'assurer la préservation de leur intégrité structurale. Cependant la plupart des réactions de marquage nécessitent l'utilisation de solvants organiques, des températures élevées et des conditions de pH incompatibles avec les milieux physiologiques.

Pour pouvoir coupler ces radioisotopes, les GP cliquables sont radiomarqués et ensuite couplés au vecteur selon des conditions de couplage adaptées aux biomolécules. Ces petites molécules intermédiaires (GP) possèdent deux fonctions : l'une permettant l'accroche du radioisotope, et l'autre permettant le couplage à la biomolécule. Jusqu'à récemment, la majorité des couplages reposait sur des réactions avec des acides aminés naturels, plus particulièrement entre les esters de *N*-hydroxysuccinimides (NHS) ou isothiocyanates (NCS) et les lysines, et les additions de Michael entre maléimides et cystéines. Pourtant, l'utilisation de ce genre de groupements prosthétiques présente un certain nombre de difficultés. En effet, lors du marquage d'un peptide ou d'une protéine contenant plus d'une lysine ou cystéine, il est impossible de contrôler précisément le site de couplage et le nombre de radionucléides fixés par vecteur, ce qui engendre la production de solutions hétérogènes de vecteurs radiomarqués. De plus les fonctions NHS et NCS, instables en conditions aqueuses, et les maléimides soumis à la trans-thiolation, entraînent une perte non négligeable de radioactivité. Conséquence de ces limites, de nouveaux groupements prosthétiques cliquables ont été développés.

III-4.1.1. CuAAC

La CuAAC est l'une des premières réactions bio-orthogonales à avoir été utilisée pour le développement de groupements prosthétiques cliquables, notamment pour le radiomarquage au fluor-18¹³⁰. Au cours de ces 5 dernières années, un grand nombre de GP cliquables munis de fonction azotures ou alcynes ont ainsi été développés pour le marquage d'une large variété de vecteurs tels que les peptides^{131,132}, les oligonucléotides¹³³ et les protéines^{134,135} (Figure 42).

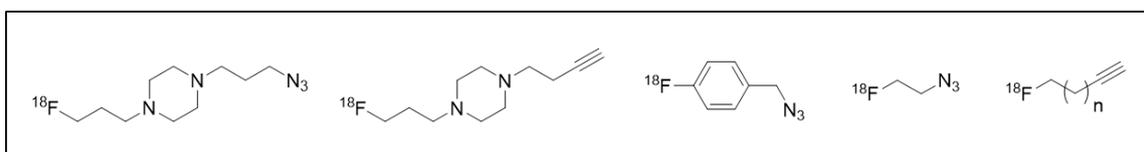


Figure 42 : Exemples de groupements prosthétiques cliquables développés en CuAAC pour le marquage de biomolécules au fluor-18

L'un des avantages de la CuAAC est la petite taille de l'adduit 1,2,3 triazole formé qui limite l'impact sur la structure et l'activité physiologique de la biomolécule. Cependant les conditions réactionnelles nécessaires à ce couplage apportent aussi leur lot de

complications. L'utilisation d'acide ascorbique comme réducteur peut endommager certaines régions fragiles des peptides et des protéines⁶⁴. Le cuivre peut se coordonner aux résidus histidines, sérines ou arginines amenant à l'altération fonctionnelle de la biomolécule¹³⁶. Certaines de ces contraintes peuvent être réduites grâce à l'utilisation de ligands stabilisants l'espèce Cu^+ , réduisant ainsi les quantités de cuivre nécessaires. Mais, ces réactifs peuvent aussi créer leur propre ensemble de complications^{137,138}.

III-4.1.2. SPAAC

Pour s'affranchir des limites liées à l'utilisation de cuivre, des réactions bio-orthogonales de seconde génération ne faisant pas intervenir de catalyseur ont été étudiées. Après la CuAAC, la plus évidente a été la SPAAC avec l'utilisation d'azotures et d'alcynes contraints. Campbell-Verduyn¹³⁹ a publié en 2011 l'une des premières approches de marquage au fluor-18 par SPAAC. Il a utilisé dans ses travaux un peptide modifié par un DIBAC radiomarqué par un GPC-¹⁸F muni d'une fonction azoture. Par la suite d'autres laboratoires ont testé cette approche (N_3 -GPC-¹⁸F ou DIBAC-GPC-¹⁸F) et ont montré que le comportement physiologique du peptide radiomarqué était similaire au peptide natif¹⁴⁰ (Figure 43).

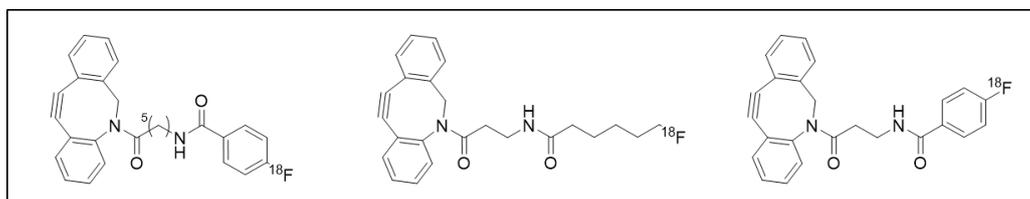


Figure 43 : Exemples de groupements prosthétiques cliquables (DIBAC) développés en SPAAC pour le marquage de biomolécules au fluor-18

Outre le fluor-18, la SPAAC a aussi été utilisée pour la radioiodation et la radioméallation. Pour la radioméallation on peut citer les travaux d'Evans¹⁴¹ en 2014 regroupant le marquage de différents peptides-DIBAC au gallium-68 à partir de N_3 -GPC-(PEG)₄-DOTA (Figure 44a) et ceux d'Anderson¹⁴² la même année, sur le marquage de l'anticorps Cetuximab modifié par des groupement azotures et marqué au cuivre-64 après couplage du DIBAC-GPC-TE1A1P (Figure 44b). Pour l'iode-125, on peut citer les travaux de Choi¹⁴³ en 2016 pour le marquage d'un peptide-DIBAC marqué à l'iode-125 à partir d'un ¹²⁵I-GPC-(PEG)₄-N₃ (Figure 44c).

Comme pour la CuAAC, il existe toutefois certaines limites à l'utilisation de la SPAAC. Les deux inconvénients principaux sont la lipophilie et la taille relativement grande des cyclooctynes utilisés pouvant modifier la biodistribution des biomolécules après

radiomarquage. Lors du marquage de peptides par SPAAC au fluor-18, Hausner¹⁴⁴ a montré que le comportement in vitro des peptides modifiés était bien conservé, mais que lors de tests in vivo, la biodistribution du peptide modifié était différente de celui non modifié à cause de la grande lipophilie des fonctions ajoutées.

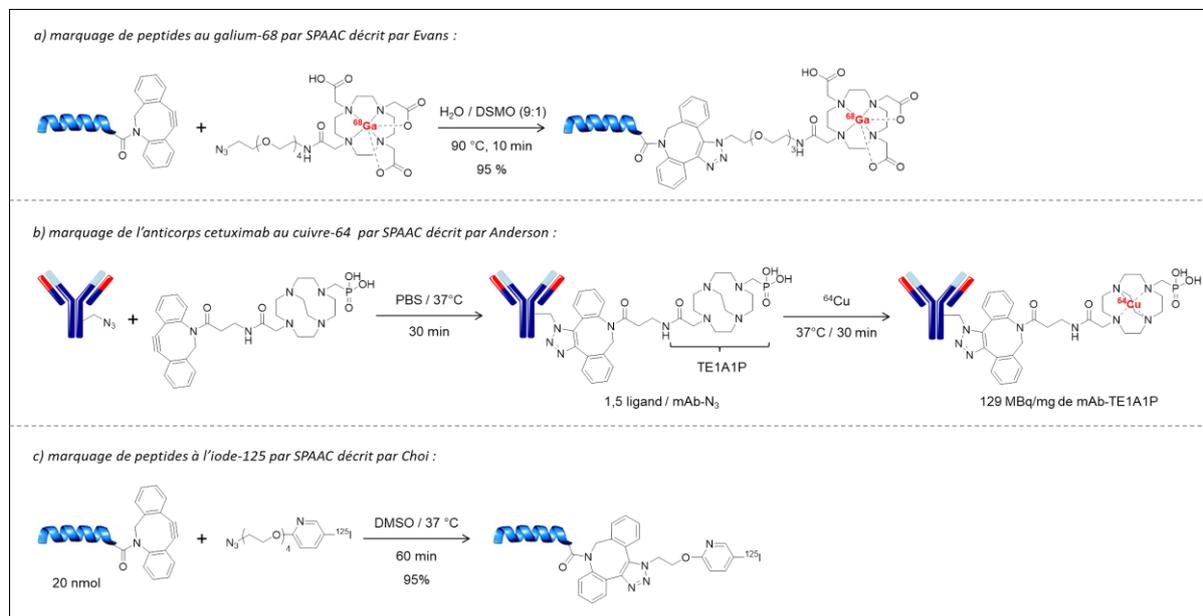


Figure 44 : Exemples de radiomarquages au gallium-68, au cuivre-64 et à l'iode-125 par SPAAC

III-4.1.3. IEDDA

L'IEDDA, comme la SPAAC, appartient aux réactions bio-orthogonales de seconde génération ne nécessitant pas d'ajout de catalyseur. L'atout principal de cette réaction est son extraordinaire rapidité, très adaptée pour l'utilisation de radioisotopes de courte période radioactive.

En 2010, les équipes de Fox et Conti¹⁴⁵ rapportent le premier marquage au fluor-18 d'un groupement TCO. Lors de ces travaux ils obtiennent un marquage quantitatif en 5 min, condition particulièrement adaptée pour le fluor-18. Deux ans plus tard, ces mêmes équipes utilisent ce TCO-GPC-¹⁸F pour le marquage de différents peptides modifiés par une tétrazine et montrent l'efficacité de ces peptides radiomarqués par IEDDA pour l'imagerie du cancer du pancréas chez la souris^{146,147} (Figure 45a). Comme pour la SPAAC, l'utilisation de l'IEDDA n'est pas réservée qu'au fluor-18. En 2015, Albu¹⁴⁸ développe la première tétrazine radiomarquée à l'iode-125 utilisée pour le marquage de l'anticorps anti-VEGFR2-TCO (Figure 45b). Outre l'efficacité du marquage, ces études effectuées chez la souris mirent en évidence une stabilité de l'anticorps à la déiodation 10 fois supérieure à celle observée par méthodes de radioiodation Iodogen[®] ou Bolton-Hunter.

Encore plus récemment, Choi¹⁴⁹, en utilisant cette même stratégie mais cette fois-ci appliquée à des peptides et à de l'albumine humaine, confirme cette observation en montrant une stabilité de l'albumine à la déiodation 50 fois supérieure à celle obtenue par radioiodations Iodogen[®]. Toutefois, ces études de stabilité n'ayant pas été comparées avec la méthode de référence (SIB), il est difficile de conclure quant à un éventuel gain de stabilité par rapport à la voie classique.

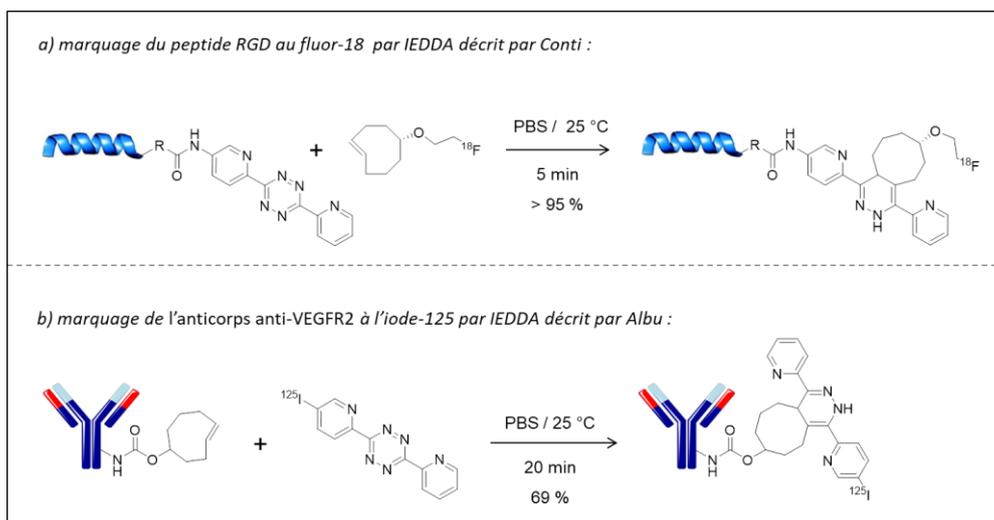


Figure 45 : Exemples de radiomarquages au fluor-18 et à l'iode-125 par IEDDA

En 2011, Zeglis¹⁵⁰ développe l'anticorps Trastuzumab couplé aux ligands déféroxamine (DFO) et DOTA utilisés pour le marquage au zirconium-89 et au cuivre-64. Dans ces travaux, l'anticorps est préalablement modifié avec des norbornènes pour ensuite être couplé avec ces deux chélatants munis d'une fonction tétrazine (Figure 46).

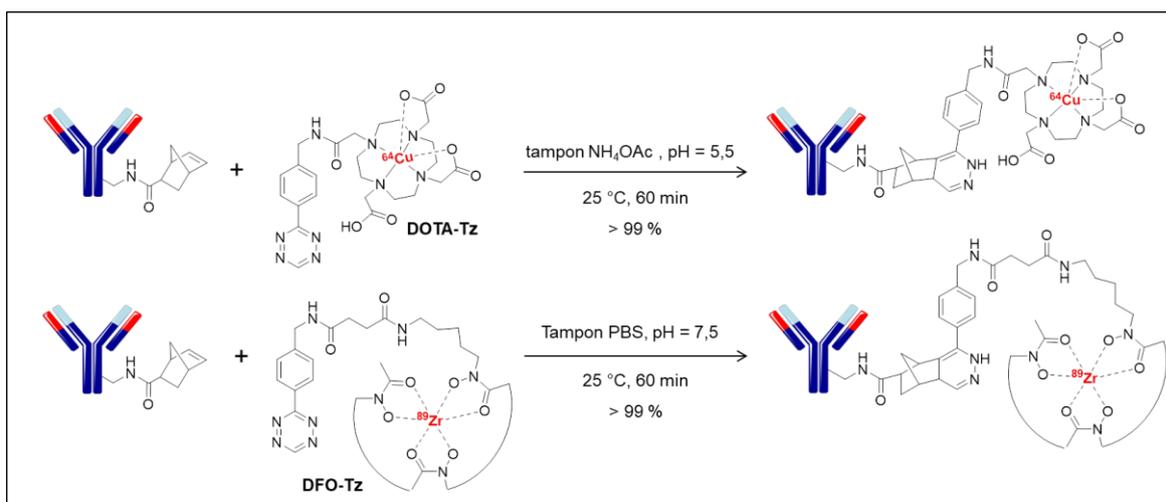


Figure 46 : Marquage de l'anticorps Trastuzumab au cuivre-64 et au zirconium-89 par IEDDA

Les études in vitro de ces deux anticorps ont mis en évidence une grande stabilité en milieu sérique et une immunoréactivité préservée de l'anticorps. En 2015, Kumar¹⁵¹ utilise le

même système IEDDA (NB-tétrazine) pour résoudre l'incompatibilité du marquage d'anticorps au cuivre-64 à hautes températures à partir du ligand TE2A. Dans cette étude, le ligand TE2A-NB est préalablement marqué au cuivre-64 pour ensuite être couplé à l'anticorps anti-PSMA modifié par des fonctions tétrazines. Ce radioimmunoconjugué marqué au ^{64}Cu est utilisé avec succès pour l'imagerie TEP de tumeurs exprimant le PSMA, dans un modèle murin de cancer de la prostate.

Bien que la rapidité des systèmes IEDDA permette une amélioration significative des vitesses de couplage entre vecteurs et groupements prosthétiques radiomarqués, ces systèmes ne résolvent pas l'inconvénient majeur aussi observé en SPAAC, à savoir le caractère lipophile et volumineux des fonctions mises en jeu. Cette observation est particulièrement vraie dans le cas de petites biomolécules modifiées par ces systèmes chimiques. Même si ces systèmes permettent des radiomarquages efficaces pour les anticorps, certains radioisotopes de courte période sont inadaptés à la biodistribution lente de ces vecteurs et exigent donc une vectorisation plus rapide afin de maximiser la dose reçue par la tumeur. Dans ce but, par le biais des systèmes cités précédemment, de nouvelles méthodes de ciblage en deux étapes ont été développées afin d'accélérer la vectorisation des radionucléides de courte période.

III-4.2. Radiomarquage en deux étapes – préciblage

En 2011, Vugts¹⁵² a développé l'approche bio-orthogonale basée sur le couplage de Staudinger entre un anticorps modifié par des groupements azotures et différentes phosphines marquées au gallium-68, au zirconium-89, au lutétium-177 et à l'iode-123. Cette étude a montré que la réaction de Staudinger n'était pas adaptée au préciblage in vivo, à cause des faibles cinétiques de couplage et de la faible stabilité des phosphines en milieu oxydant qui ne permettaient pas l'obtention d'images exploitables. En 2013, Bosch¹⁵³ a étudié la faisabilité du préciblage in vivo par SPAAC en couplant l'anticorps Rituximab radiomarqué à l'iode-125 et modifié par des groupements azotures avec différents cyclooctynes (DIFO, DIBO) associés au lutétium-177.

Les résultats obtenus ont montré une décevante concentration de lutétium fixé sur les tissus ciblés, supposant de faibles cinétiques de couplage entre l'anticorps- N_3 marqué à l'iode-125 et les cyclooctynes radiomarqués. De plus, la dilution importante des cyclooctynes dans l'organisme n'a pas facilité la réaction de couplage avec l'anticorps fixé à sa cible biologique. Toutefois des résultats prometteurs ont été obtenus en imagerie TEP par l'équipe de Kim la même année sur le préciblage in vivo chez la souris à partir de nanoparticules-DBCO couplées à un ^{18}F -GPC- N_3 ¹⁵⁴.

Durant ces sept dernières années, l'IEDDA est la réaction bio-orthogonale ayant été la plus publiée pour des applications de ciblage en deux étapes. Elle présente, par ses cinétiques de couplages rapides en milieu biologique ($k = [10^5-10^6] \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), un avantage certain pour le préciblage in vivo par rapport à celle de Staudinger ($k = [0,1-8].10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ou de la SPAAC ($k = [10^{-3}-1] \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). La majorité des méthodes de préciblage par IEDDA ont été effectuées entre un anticorps modifié par des groupements TCO et une tétrazine radiomarquable. En 2010, Rossin¹⁵⁵ et son équipe ont rapporté la première stratégie de préciblage par IEDDA en utilisant, pour l'imagerie TEMP de cancers colorectaux, l'anticorps Rituximab-TCO couplé à une dipyridyltétrazine marquée à l'indium-111. Cette équipe, pionnière dans ce domaine, a continué au cours des années suivantes à développer ces méthodes de préciblage en modulant les groupements TCOs¹⁵⁶, les tétrazines radiomarquées¹⁵⁷ et les vecteurs utilisés^{158,159}. Plus récemment, en 2016, Houghton et Meyer ont démontré la faisabilité de l'imagerie pré-ciblée de cancers du pancréas présentant des antigènes à la fois excrétés¹⁶⁰ et internalisés¹⁶¹, en utilisant l'anticorps 5B1-TCO marqué par ¹⁸F-GPC-Tz et ⁶⁴Cu-GPC-Tz.

Malgré ces résultats plus que prometteurs pour le préciblage par IEDDA, l'augmentation significative du volume sanguin entre la souris et l'homme a fait naître certaines interrogations sur l'efficacité de ces méthodes appliquées chez l'homme. Bien qu'aucun test n'ait été encore effectué, plusieurs groupes de recherche s'attachent à permettre le transfert de ces techniques de préciblage chez l'homme.

III-5. Bioconjugaison « site-spécifique » sur des protéines

Malgré les avancées apportées par la chimie bio-orthogonale concernant le préciblage in vivo, les marquages d'immunoglobulines présentent toujours un challenge qui est le contrôle du site de fixation du radionucléide. Pour résoudre ce problème, une large gamme de méthodes a ainsi été développée, basée sur la réduction sélective de ponts disulfures et l'oxydation des chaînes glycanes présentes sur le fragment Fc d'immunoglobulines G. Le principe a été de créer un site de couplage unique sur la biomolécule afin de maîtriser précisément le lieu, ainsi que le nombre de radionucléides fixés sur l'anticorps. Ces méthodes permettent la préparation de solutions homogènes d'anticorps au comportement in vivo préservé, par comparaison avec les méthodes de couplage classiques (couplage NHS-Lys / couplage Mal-Cys).

III-5.1. Réduction et repontage de ponts disulfures

La cystéine est un acide aminé relativement rare, souvent exploité comme site de fixation des protéines du fait de la bonne réactivité de son groupement thiol (SH) avec les maléimides sous pH contrôlé. Néanmoins, très peu de protéines natives contiennent des résidus de cystéine non appariés ou facilement accessibles. De plus, la stabilité des thioéthers issus du couplage maléimide-cystéine est généralement faible dans le plasma à cause des nombreuses réactions de trans-thiolations possibles et susceptibles de limiter leurs applications en milieu biologique.

C'est dans ce contexte que les ponts disulfures sont apparus comme candidats de choix pour la modification sélective de protéines. La plupart des protéines utilisées pour leur action thérapeutique présentent au moins un pont disulfure qui, dans la plupart des cas, régit la stabilité ainsi que l'action biologique de la protéine. Bien qu'il existe à ce jour un grand nombre de réactifs permettant la recombinaison de ponts disulfures, nous nous intéresserons ici particulièrement aux bisulfones et aux maléimides 1,2 disubstitués, deux réactifs les plus utilisés. La modification des ponts disulfures accessibles à la surface de protéines d'intérêts thérapeutiques par bis-alkylation a fait naître un intérêt grandissant ces dernières années dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques issus de protéines. Ces modifications site-spécifique ont l'avantage de préserver l'intégrité structurale de la protéine en permettant de limiter tout changement de biodistribution du vecteur après fixation du médicament (Antibody Drug Conjugate (ADC)) ou du radioisotope (radioimmunoconjugué).

III-5.1.1. Les bisulfones

En 2006, le groupe de Brocchini¹⁶², pionnier dans la modification des ponts disulfures, développe la bisulfone, un réactif de bis-alkylation, utilisée lors de la pégylation de protéines au niveau des ponts disulfures. Ce composé, synthétisé en trois étapes à partir de l'acide *p*-acétylbenzoïque (Figure 47), permet le ciblage sélectif des ponts disulfures accessibles situés sur les biomolécules (anticorps, peptides, protéines, etc.) par réactions séquentielles d'additions-éliminations, tout en préservant l'intégrité structurale et l'activité biologique de la biomolécule.

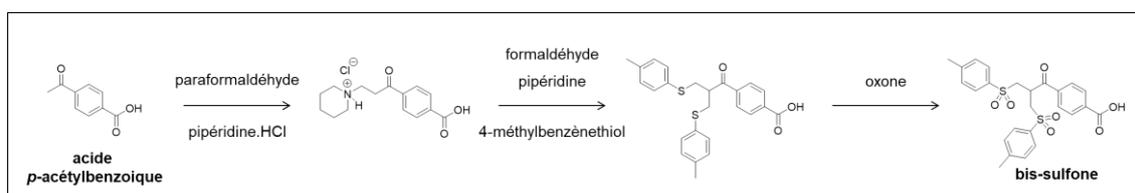


Figure 47 : Synthèse de la bisulfone développée par Brocchini en 2006

La bisulfone, mise en solution tampon légèrement basique (PBS, pH = 7,8), libère de l'acide paratoluènesulfonique pour former la monosulfone correspondante. Cette élimination crée un centre d'addition de Michael très réactif vis-à-vis de la fonction thiol des cystéines. Après ajout d'un réducteur dans le milieu de couplage (tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP), dithiothréitol (DTT)), le pont disulfure est réduit pour donner deux thiols réactifs, avec préservation de la structure tertiaire de la biomolécule. La première cystéine réagit alors par addition de Michael sur la monosulfone, entraînant l'élimination du second groupement acide toluène-4-sulfinique formant le second site d'addition de Michael. Le second thiol réagit par la suite avec ce second site pour donner, après protonation, le bisthioéther correspondant¹⁶³ (Figure 48).

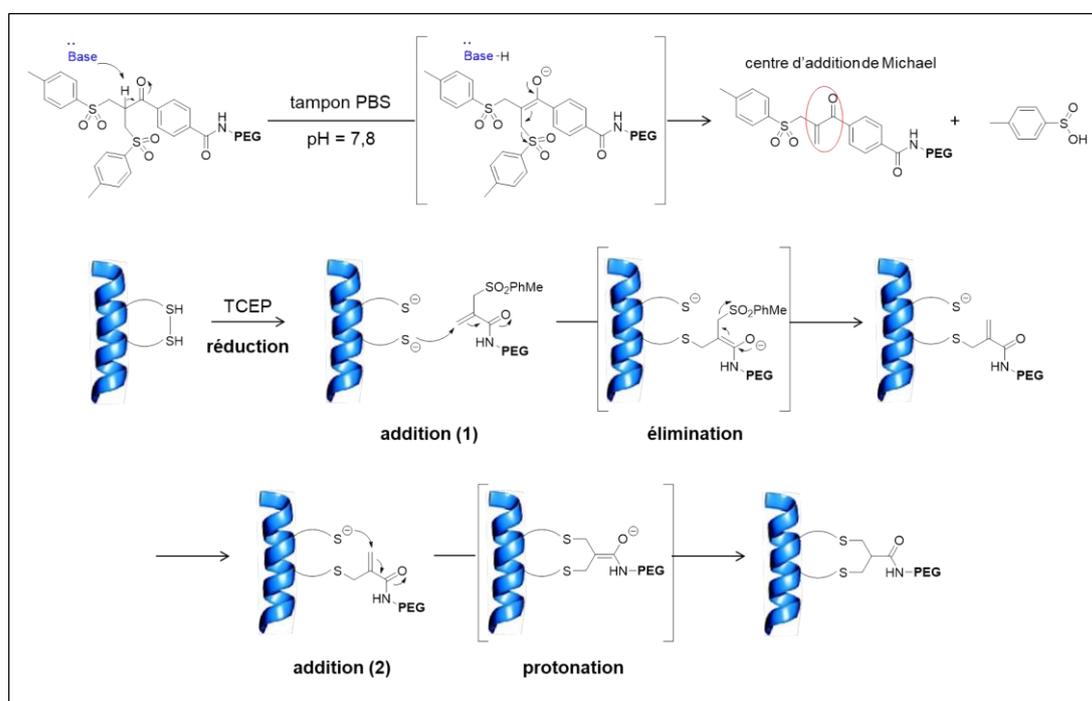


Figure 48 : Mécanisme d'insertion d'une bisulfone sur un pont disulfure d'une protéine

En 2011, l'équipe de Weil¹⁶⁴ découvrit par spectroscopie RMN le mécanisme du reponçage de ponts disulfures par les bisulfones en caractérisant la formation des différents diastéréoisomères formés. En l'absence de groupements thiols, les bisulfones peuvent produire, à pH basiques (pH > 8), certaines réactions secondaires avec l'eau, en raison de la réactivité de l'alcène de la monosulfone. Il est donc nécessaire de contrôler le pH du milieu de couplage afin d'éviter toute dégradation du composé¹⁶⁵. Pour les peptides et les protéines instables en solutions alcalines, il est possible d'effectuer la réaction en milieu acide, mais cela nécessite l'isolement préalable de la monosulfone.

Cette méthode de reponçage fut appliquée dans les années 2000 pour la pégylation de protéines thérapeutiques¹⁶⁶ comme l'exemple décrit par Shaunak¹⁶² sur l'interféron α -2b

(IFN). La conjugaison covalente de polyéthylène glycol (PEG) sur ce genre de protéines thérapeutiques les protège de la dégradation en masquant leurs sites immunogènes, réduisant ainsi leur clairance et augmentant leur stabilité in vivo¹⁶⁷. Ce pontage fut ensuite adapté aux fragments d'anticorps/anticorps entiers humanisés pour la synthèse d'ADC¹⁶⁸. En 2014, Goldwin¹⁶⁹ décrit la synthèse d'ADC par reponage de ponts disulfures à partir de l'anticorps humanisé Trastuzumab. Cette étude montre une conversion de l'anticorps natif en ADC de 78 % et un contrôle précis du ratio médicament-anticorps (DAR) de 4 par anticorps, permettant la production de solutions homogènes d'ADC (Figure 49).

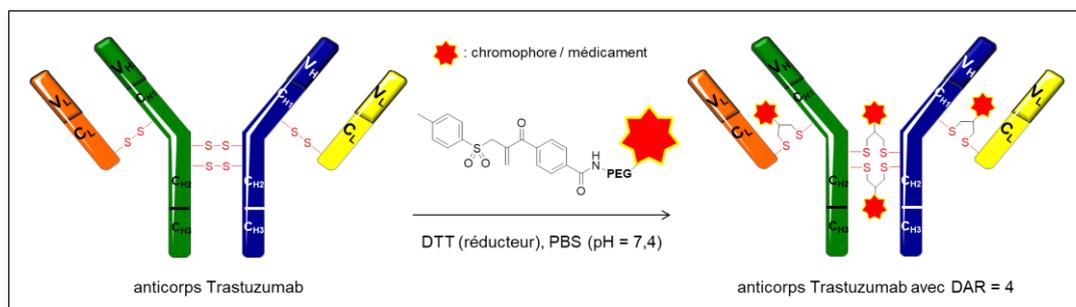


Figure 49 : Mécanisme d'insertion d'une bisulfone sur les ponts disulfures d'un anticorps

Chacune de ces études montre une conservation du comportement biologique de la protéine après modification, signe d'une préservation efficace de sa structure initiale. Toutefois, certaines d'entre elles amènent à une diminution drastique de la réactivité des mono-sulfones lorsqu'elles sont contraintes stériquement par les médicaments ou autres groupements volumineux. Il est donc nécessaire, lors de la fonctionnalisation d'une monosulfone, d'écarter le plus possible la molécule d'intérêt (chromophore, médicament, etc.) pour ne pas diminuer sa réactivité vis-à-vis les groupements thiols des cystéines.

A ce jour, aucune étude n'a été publiée rapportant le radiomarquage de vecteurs immunologiques à partir de bisulfones, mais leur utilisation reste une méthode très prometteuse pour le marquage site-spécifique de vecteurs immunologiques au vu des résultats très encourageants obtenus pour la synthèse d'ADC.

III-5.1.2. Les maléimides 1,2 disubstitués

Grâce aux réactions rapides et hautement sélectives observées avec les groupements thiols, les maléimides sont certainement les réactifs les plus utilisés pour la modification de cystéines présentes à la surface des anticorps. Toutefois, les maléimides traditionnels souffrent de certaines limites. Ils sont soumis aux réactions réversibles de trans-thiolation et présentent dans la plupart des cas une solubilité très faible en milieu aqueux, qui peut réduire leur utilisation en milieu biologique. A partir des années 2010, plusieurs

groupes, dont celui de Baker et Caddick^{170,171}, ont élaboré une nouvelle génération de maléimides pour le repontage de ponts disulfures. Les premiers exemples rapportés sont les maléimides 3,4-disubstitués (Figure 50), qui permettent le couplage de deux cystéines issues d'un pont disulfure préalablement clivé par un réducteur. Ces maléimides 3,4-disubstitués, compatibles à des pH plus ou moins neutres ($6 < \text{pH} < 8$), permettent, à l'inverse des bisulfones, d'effectuer sans précautions initiales, des réactions de bio-conjugaison sous pH légèrement acide.

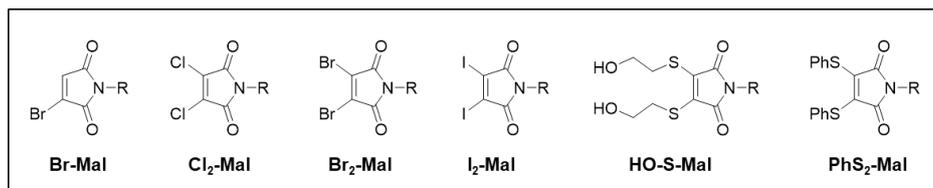


Figure 50 : Exemples de maléimides 3,4-disubstitués développés par Baker et Caddick

La plupart de ces maléimides, comme le dibromomaléimide, sont disponibles commercialement et peuvent être fonctionnalisés par réaction de Mitsunobu ou cyclisation à partir d'anhydride dibromomaléique¹⁷². Ils permettent le repontage rapide et efficace de ponts disulfures par formation d'une liaison rigide à deux carbones. En 2010, le dibromomaléimide ($\text{Br}_2\text{-Mal}$) est utilisé par l'équipe de Baker¹⁷³ pour la pégylation de calcitonine de saumon (sCT), un polypeptide à 32 acides aminés utilisé dans le traitement de l'ostéoporose et présentant un unique pont disulfure. En 2013, il est utilisé pour la production de solutions homogènes de fragments d'anticorps conjugués¹⁷⁴. Bien que le repontage de ponts disulfures à partir des dibromomaléimides soit très rapide (moins de cinq minutes), leur extrême réactivité amène à la formation d'une petite quantité de multimères lors de la modification de complexes polypeptides.

L'année suivante, pour réduire cette réactivité et ainsi éliminer la formation de multimères, l'équipe de Baker¹⁷⁰ et Haddleton¹⁷⁵ développe le dithiophénolmaléimide ($\text{PhS}_2\text{-Mal}$). Associé au benzèneséléinol (PhSeH) connu pour son efficacité à cliver les ponts disulfures, le dithiophénolmaléimide permet la conjugaison sélective de fragments d'anticorps sans détection de multimères, tout en conservant des cinétiques de repontage élevées. En 2015, l'équipe de Chudasama¹⁷⁶ associe cette méthode site-spécifique à la chimie bio-orthogonale pour la synthèse d'ADC, à partir de l'anticorps Trastuzumab utilisé lors du traitement des cancers du sein (Figure 51).

Les travaux approfondis réalisés sur les bisulfones et la seconde génération de maléimides soulignent clairement la viabilité des stratégies basées sur la modification sélective de biomolécules. Ces méthodes site-spécifique permettent la préservation de

l'activité biologique de la protéine et un contrôle précis du nombre de molécules sondes (chromophores, médicaments) fixées, selon la stœchiométrie du réducteur mis en jeu.

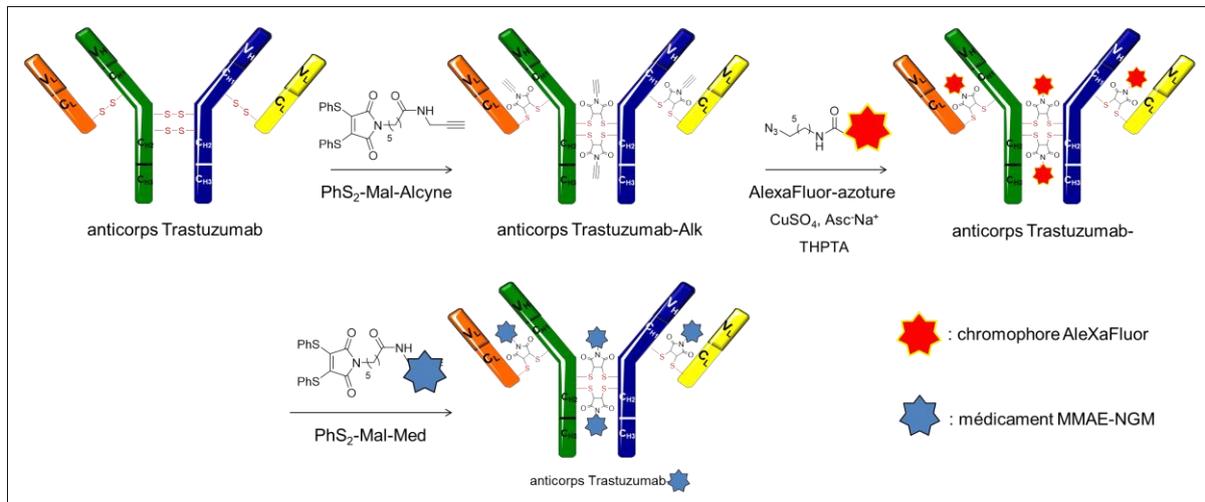


Figure 51 : Production d'ADC à partir d'un dithiophénolmaléimide

Néanmoins, ces réactifs de repontage présentent certaines limites. En effet, les bisulfones et les maléimides disubstitués ont la plupart du temps de faibles solubilités dans l'eau et aucune sélectivité entre les thiols des ponts disulfures et les cystéines naturellement libres. Il est donc difficile d'effectuer la modification sélective d'un pont disulfure en conditions réductrices, sans traitement préalable pour inhiber les résidus de cystéines libres. Par conséquent, des stratégies alternatives sont encore en cours d'élaboration pour faire progresser ces méthodes de modifications sélectives de protéines.

Ces stratégies ont principalement été utilisées pour la production de solutions homogènes d'ADC. A ce jour, aucune étude rapportant le radiomarquage de vecteurs immunologiques par cette méthode n'a été publiée. Elle reste pourtant prometteuse pour le développement de vecteurs immunologiques à site contrôlé de radiomarquage.

III-5.2. Insertion d'acides aminés non naturels

L'incorporation d'acides aminés non naturels et non canoniques (respectivement les uAAs et les ncAAs) sur des protéines afin d'étudier leur implication dans les processus biologiques cellulaires est l'une des techniques de bio-conjugaison site-spécifique la plus développée ces dix dernières années¹⁷⁷. Le *p*-azido-L-phénylalanine (pAzF) a été l'un des premiers uAAs utilisé lors du développement d'ADC ou d'anticorps modifiés par des fluorophores (SPAAC). Par la suite une large gamme d'acides aminés non naturels a été développée, portant des fonctions *trans*-cyclooctène, tétrazine, cyclooctynes et norbornène (Figure 52).

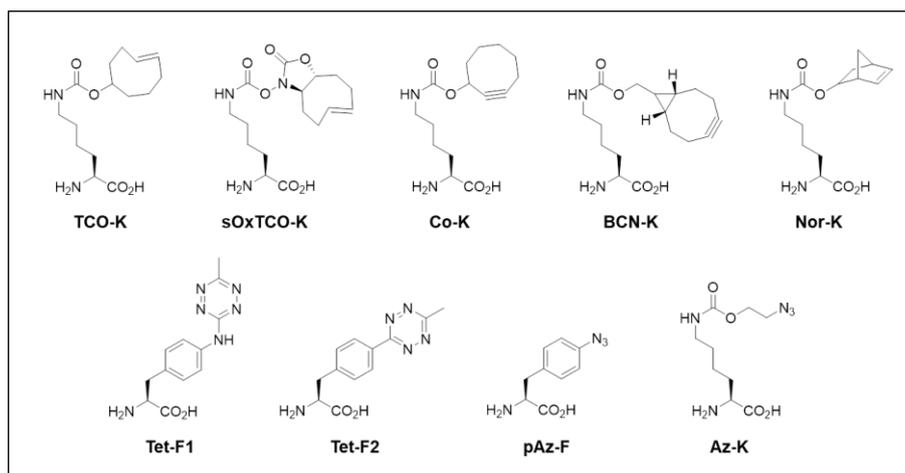


Figure 52 : Exemples d'acides aminés non naturels portant différentes fonctions bio-orthogonales

Ce n'est que très récemment qu'un exemple de radiomarquage utilisant cette technique d'incorporation fut rapporté. Dans ce travail, l'équipe de Wallberg¹⁷⁸ développe différents affibodies (petites protéines imitant la capacité de reconnaissance des anticorps monoclonaux) contenant la sélénocystéine, un ncAA naturel utilisé pour sa grande réactivité avec les maléimides. Ces premiers tests de radiomarquage ont été effectués au carbone-11 directement à partir d'iodométhane-¹¹C ou au gallium-68 par l'intermédiaire d'un précurseur DOTA-maléimide (Figure 53).

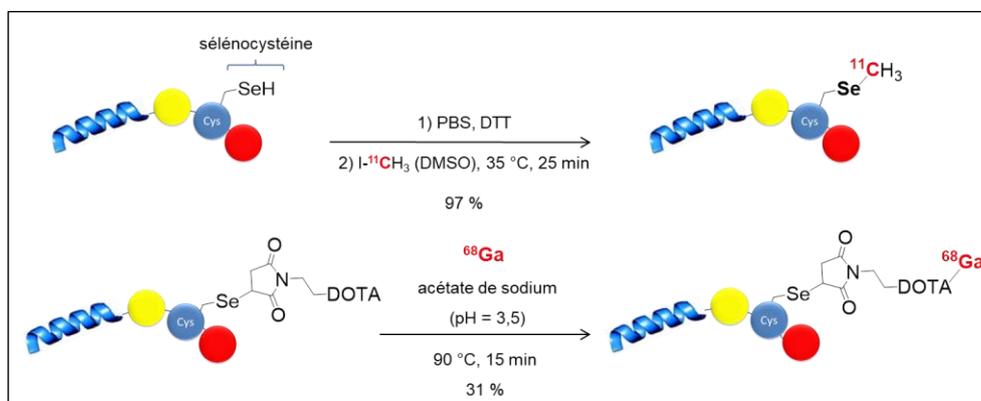


Figure 53 : Marquage de protéines au carbone-11 et au gallium-68 après incorporation de l'acide aminé sélénocystéine

En 2016, Wu¹⁷⁹ rapporte le premier exemple de marquage d'anticorps par incorporation d'uAAs modifiés par un groupement azote. Dans ces travaux, une lysine-N₃ est incorporée génétiquement sur chaque chaîne lourde de l'anticorps Rituximab anti-CD20 puis couplée par SPAAC à partir de DIBO-DOTA. L'anticorps résultant est par la suite radiomarké au cuivre-64 et au lutétium-177 et montre un comportement in vitro et in vivo comparable à l'anticorps Rituximab natif. Bien que ces acides aminés non naturels promettent de grandes avancées pour le développement de radiopharmaceutiques

(peptides, petites protéines), leurs méthodes d'incorporation, telles que la synthèse en phase solide, le couplage chimique natif¹⁸⁰ ou encore la traduction in vitro¹⁸¹, restent limitées par de faibles rendements et difficilement adaptables à la production de plus grandes protéines.

III-5.3. Réactions enzymatiques

L'une des stratégies de bio-conjugaison la plus prometteuse est la modification spécifique de chaînes glycanes par réactions enzymatiques. Cette stratégie, décrite en deux étapes, consiste à incorporer à l'aide d'une enzyme une fonction d'accroche sur un substrat (anticorps), pour ensuite y coupler une molécule d'intérêt portant la fonction complémentaire à celle ajoutée lors de la première étape. Dans ce contexte, la sélectivité ainsi que la rapidité des fonctions issues de la chimie bio-orthogonale sont particulièrement adaptées à ce type d'applications.

Une méthode récemment développée consiste à effectuer à l'aide de deux enzymes une modification enzymatique site-spécifique des chaînes lourdes glycanes présentes sur les domaines C_{H2} de la région Fc des anticorps. Inspirée des travaux de Qasba¹⁸² en 2002, cette technique consiste d'abord à éliminer les résidus terminaux de sucres des chaînes lourdes glycanes à partir de l'enzyme β -(1,4)-galactosidase. Puis on procède ensuite à l'incorporation de sucres galactose-N₃ à l'aide d'une seconde enzyme appelée galactosyltransférase (Figure 54).

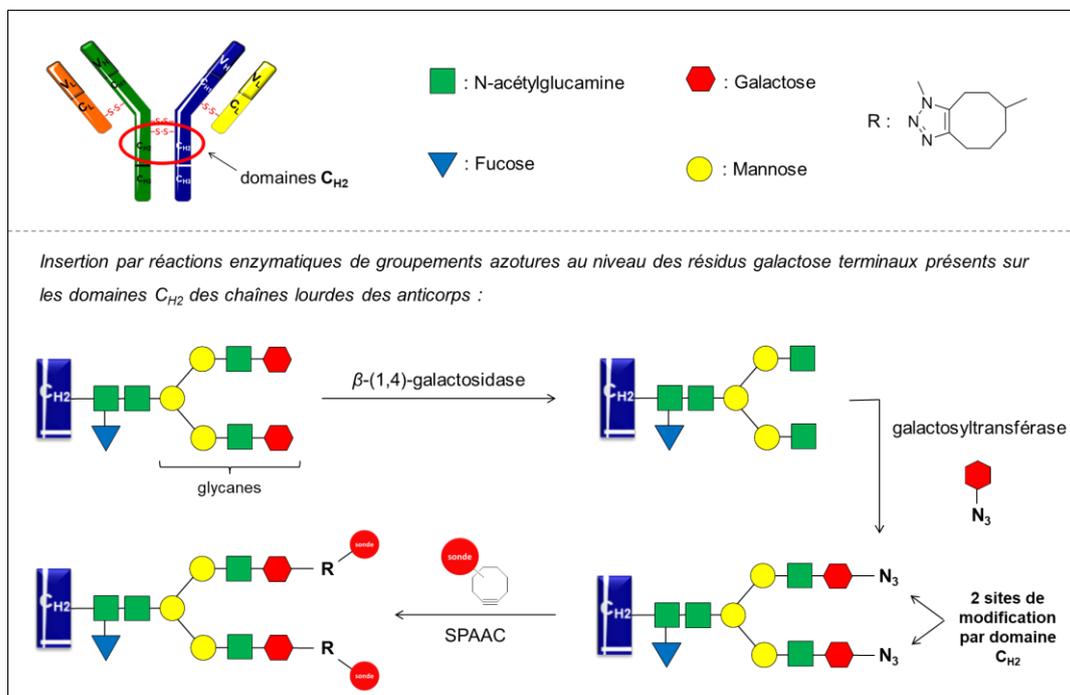


Figure 54 : Modification site-spécifique d'anticorps par réaction enzymatique avec la β -(1,4)-galactosidase

Par cette méthode, deux groupements azotures sont greffés sur chaque domaine C_{H2} faisant un total de 4 sites de couplage par anticorps. Cet anticorps peut alors subir un couplage site-spécifique à partir de cyclooctynes marqués. En 2014, Zeglis¹⁸³ utilise cette méthode site-spécifique pour le marquage de l'anticorps huA33 utilisé en imagerie TEP de cancers colorectaux. Dans cette étude, après insertion de galactoses-N₃ au niveau des domaines C_{H2} de l'anticorps, il combine une sonde radioactive (DIBO-DFO-⁸⁹Zr) à une sonde fluorescente (DIBO-Dye690) pour effectuer une imagerie multimodale TEP-IO (imagerie optique) de souris nues portant des xénogreffes de cancer colorectaux SW1222 exprimant l'antigène A33. Les résultats obtenus montrent une efficacité semblable aux méthodes conventionnelles (NHS-Lys/Mal-Cys).

Plus récemment cette même équipe¹⁸⁴ en 2016 combine cette stratégie avec le préciblage in vivo par IEDDA. L'anticorps huA33-N₃ issu des réactions enzymatiques est couplé avec des DIBO-(PEG)₁₂-TCO. L'anticorps huA33-TCO résultant de ce couplage est ensuite administré aux souris pour être radiomarqué dans un second temps à l'aide de tétrazines marquées au cuivre-64. L'association des stratégies site-spécifique et préciblage in vivo a permis une production rapide et homogène d'anticorps cliquables sans pour autant montrer une réelle amélioration au niveau des images obtenues par le même anticorps sans site spécifique de marquage.

En 2015, Geel¹⁸⁵ développe une variante à cette méthode basée sur l'utilisation de l'endo-glycosidase, une enzyme coupant lors de la première étape chaque glycane jusqu'à ses résidus les plus profonds, amenant cette fois-ci à seulement deux sites de modifications par anticorps au lieu de quatre obtenus avec l'enzyme β-(1,4)-galactosidase (Figure 55).

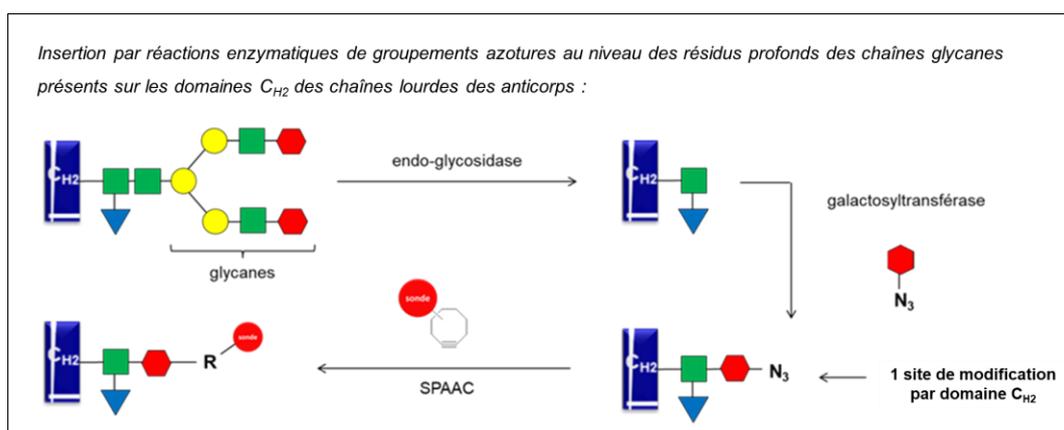


Figure 55 : Modification site-spécifique d'anticorps par réaction enzymatique avec l'endo-glycosidase

Actuellement, cette méthode a seulement été appliquée au développement d'ADC par système SPAAC mais pourrait facilement être adaptée à la synthèse de radiopharmaceutiques.

En parallèle à ces deux méthodes enzymatiques, une autre enzyme, la transglutaminase, a été reconnue comme réagissant spécifiquement avec les fonctions acyles des résidus glutamine. Bien que les anticorps contiennent de multiples résidus de glutamine, les transglutaminases réagissent exclusivement avec les glutamines Q295 exprimées dans le domaine C_{H2} des IgGs déglycosylées ou aglycosylées (Figure 56). Cette méthode a notamment été utilisée par Jeger¹⁸⁶ en 2010 pour la radioméallation site-spécifique de l'anticorps chCE7 déglycosylé à partir d'amines DFO-⁶⁷Ga et DFO-⁸⁷Zr.

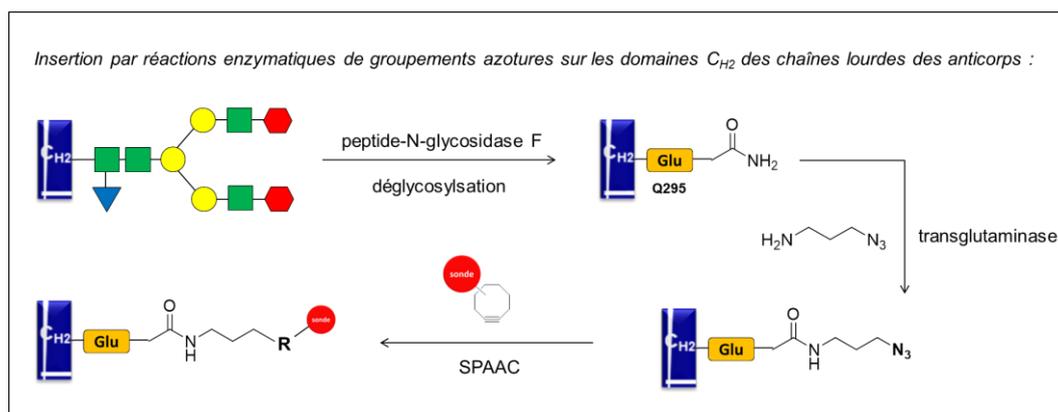


Figure 56 : Modification site-spécifique d'anticorps par réaction enzymatique à partir de la transglutaminase

Ces stratégies de bio-conjugaison site-spécifique couplées aux avantages de la chimie bio-orthogonale permettent de contrôler efficacement le nombre de radionucléides fixé par vecteur ainsi que la position à laquelle ils se fixent, tout en préservant la structure et l'activité biologique de l'anticorps.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

INTRODUCTION DU SUJET DE RECHERCHE

Ce projet de recherche a été divisé en deux parties

La première partie a voulu démontrer la faisabilité du radiomarquage d'anticorps aux halogènes lourds par voie bio-orthogonale afin de résoudre les problèmes de reproductivité et de pertes radioactives observées lors des méthodes classiques de radiomarquage à l'iode radioactif et à l'astate-211 (SIB, SAB).

La seconde partie de ce projet de recherche a porté sur le développement de nouveaux vecteurs immunologiques (anticorps, affinites) à site unique de radiomarquage à partir d'un linker trifonctionnel de type tétrazine. Ceci dans le but de permettre la production de solutions homogènes de vecteurs immunologiques radiomarqués.

1. Développement du radiomarquage d'anticorps à l'iode-125 et à l'astate-211 à partir de réactions bio-orthogonales

Les halogènes comme l'iode ou l'astate présentent différents radioisotopes d'intérêts. Dans le cas de l'iode, on peut citer les isotopes ^{123}I (γ , $t_{1/2} = 13,2$ h), ^{124}I (β^+ , $t_{1/2} = 4,18$ jrs), ^{125}I (γ , e^- Auger, $t_{1/2} = 59,4$ jrs) et ^{131}I (β^- et γ , $t_{1/2} = 8$ jours) qui sont utilisés, selon l'énergie de leur rayonnement, soit pour l'imagerie soit pour la thérapie. Dans le cas de l'astate, un seul isotope d'intérêt a été recensé : ^{211}At (α , $t_{1/2} = 7,2$ h). Cet isotope prometteur émet lors de sa décroissance, 100 % de désintégrations alpha, le caractérisant ainsi comme candidat idéal pour la thérapie « alpha ».

La méthode conventionnelle de couplage permettant de fixer ce type de radionucléide sur une molécule vectrice consiste à effectuer la radiohalogénéation d'un précurseur stannique (S_{EAr}) ou iodonium (S_{NAr}) portant dans sa structure une fonction *N*-hydroxysuccinimide (NHS) qui peut, par la suite réagir avec les lysines d'une biomolécule. Toutefois, pour déprotomer l'amine des lysines et la rendre réactive vis-à-vis du synthon radiomarqué, cette méthode nécessite l'utilisation de conditions basiques (pH \approx 8,5) amenant à la présence d'ions hydroxydes dans le milieu, qui vont, eux aussi, pouvoir réagir sur l'ester activé et ainsi rendre en partie inactif le synthon radiomarqué vis-à-vis de l'anticorps. Cette hydrolyse a pour conséquence des rendements de couplage qui, même dans des conditions de réactions optimisées, dépassent difficilement les 70 %, et amènent à une perte non négligeable de radioactivité.

Pour surmonter ces limites et simplifier le processus de radiomarquage, le but de ce projet a donc été de mettre au point, sur un modèle simple, une méthode alternative de radiomarquage d'anticorps aux halogènes lourds basée sur l'utilisation de fonctions bio-orthogonales. Ces fonctions, de plus en plus utilisées en médecine nucléaire, possèdent trois avantages notables : (i) elles permettent d'éviter, de par leur nature, un bon nombre de réactions secondaires en milieu biologique en ne réagissant qu'avec un type très précis d'autres fonctions (orthogonalité) ; (ii) elles disposent de cinétiques de réaction potentiellement très élevées, idéales pour l'utilisation de radionucléides de courte période radioactive comme l'astate-211 ; (iii) elles possèdent une forte réactivité dans l'eau, condition indispensable pour l'utilisation de biomolécules telles que les anticorps qui sont incompatibles avec les solvants organiques. C'est sur ces bases qu'a donc reposé cette première partie, à savoir transposer les avantages des fonctions bio-orthogonales au couplage de synthons radiomarqués à l'iode-125 et à l'astate-211 sur des anticorps.

Pour cela une série de précurseurs bifonctionnels et de peptides modèles munis de fonctions cliquables (Figure 57a + Figure 57b) ont été envisagés dans le but d'établir une étude comparative des différents systèmes de couplage bio-orthogonaux les plus utilisés à ce jour en radiochimie (Figure 57c).

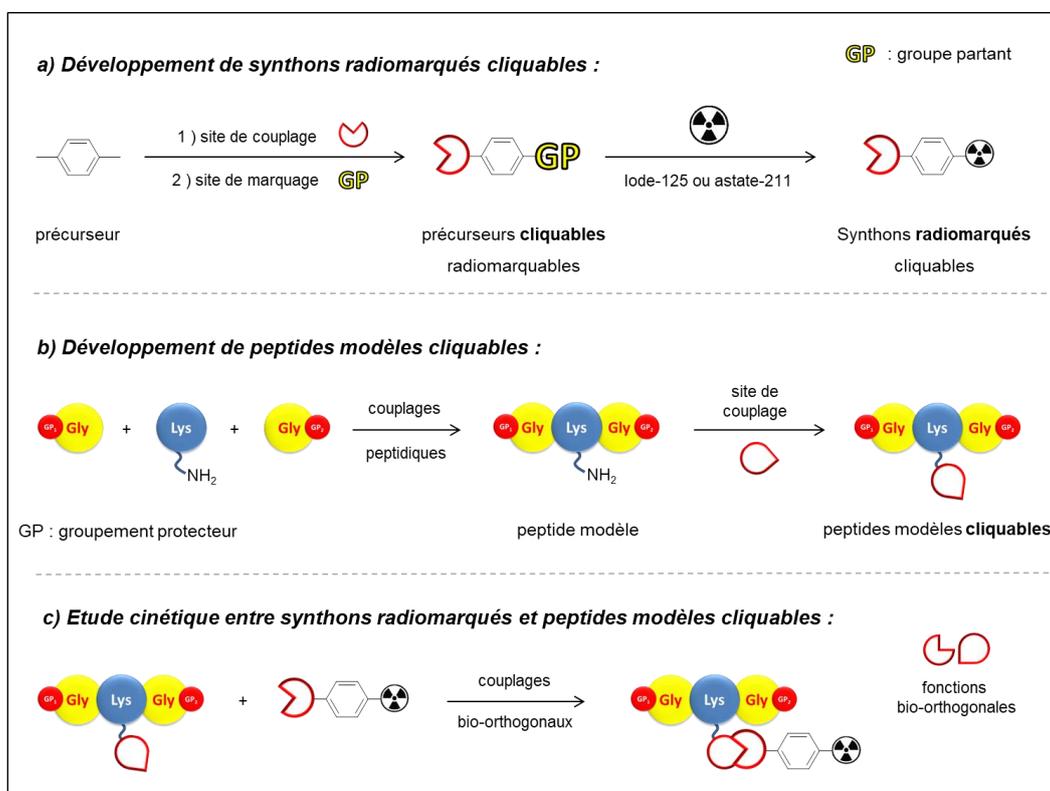


Figure 57 : Synthèses envisagées pour le développement d'une étude comparative de différents systèmes de couplage bio-orthogonaux

L'utilisation d'un peptide modèle avant tout transfert sur l'anticorps a été choisie pour réduire les limites d'utilisations associées à ce type de biovecteur (coûts de production, conditions réactionnelles, etc.). Cette étude, effectuée au départ sur un modèle simple (peptide modèle), vise à déterminer le ou les systèmes les plus adaptés afin d'effectuer leur transfert pour le radiomarquage d'anticorps à l'iode radioactif et à l'astate-211 (Figure 58).

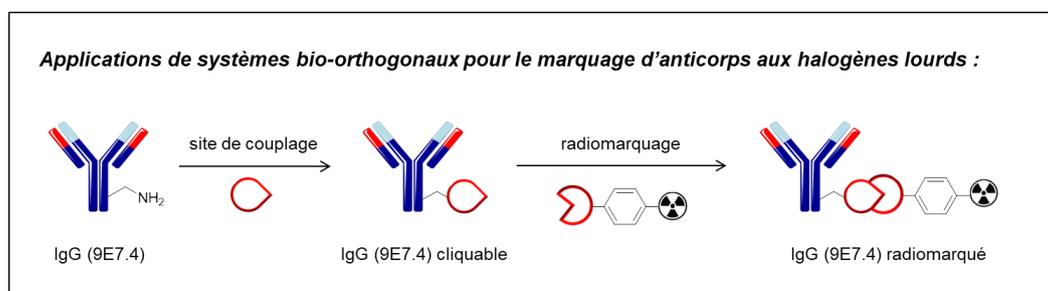


Figure 58 : Radiomarquage d'un vecteur immunologique d'intérêt à partir de fonctions de couplage bio-orthogonales

Les résultats associés à cette première partie sont présentés en deux sections. La première section présente les synthèses des synthons bifonctionnels radiomarqués et peptides modèles cliquables ayant permis l'étude comparative de différents systèmes bio-orthogonaux (CuAAC, SPAAC, IEDDA). La seconde section décrit le transfert des meilleurs systèmes bio-orthogonaux identifiés lors de l'étude comparative, pour le radiomarquage de l'anticorps monoclonal 9E7.4, développé par notre groupe et dirigé contre le CD138 murin pour cibler les cellules de myélome multiple¹⁸⁷.

2. Développement d'un linker trifonctionnel pour le radiomarquage site-spécifique et bio-orthogonal de vecteurs immunologiques

La seconde partie, en lien avec la première, s'intéresse au radiomarquage d'anticorps, avec toutefois une problématique qui se veut plus générale. De nos jours la plupart des méthodes visant à radiomarquer une biomolécule consistent à utiliser comme site de fixation des fonctions chimiques (lysines, thiols) présentes à la surface de celle-ci.

Ces méthodes, bien que très utilisées en médecine nucléaire, présentent deux inconvénients qui ne peuvent être négligés. Le premier est l'impossibilité de contrôler précisément le nombre de radionucléides que l'on fixe sur chaque traceur. En effet, lors du radiomarquage, une distribution aléatoire du synthon radiomarqué est effectuée sur chaque biomolécule, amenant à une solution hétérogène d'anticorps radiomarqués. Le second inconvénient est la possible modification chimique du site de reconnaissance de la

biomolécule, impliquant cette fois-ci une perte d'affinité envers l'antigène ciblé et donc l'inactivité de la molécule vectrice. Ces limites apportent une part non négligeable d'aléatoire lors du radiomarquage, rendant ces méthodes peu reproductibles et peu transférables à des applications cliniques. Cette seconde partie a donc visé à résoudre ces limites en développant une nouvelle méthodologie de couplage dite site spécifique adaptable à différents vecteurs et différents radionucléides.

Au cours de ces 5 dernières années, différents laboratoires de recherche ont développé d'intéressantes stratégies réversibles pour le pontage de ponts disulfures utilisant la dichloro-s-tétrazine¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. En plus de permettre le couplage de deux cystéines, ce motif tétrazine offre la possibilité de pouvoir être marqué après pontage, par réactions IEDDA à partir de molécules sondes portant des groupements TCO ou BCN.

L'idée a donc été d'utiliser les notions développées lors de la première partie (approches bio-orthogonales, cinétiques de couplages, rendements de marquage) afin de développer un linker trifonctionnel innovant basé sur cette dichloro-s-tétrazine. Ce type de structure permettrait la modification d'anticorps ou la recombinaison de protéines via leur cystéines (ponts disulfures), acides aminés présents en assez faible quantité et permettant une bonne homogénéité de la position du site de radiomarquage (Figure 59).

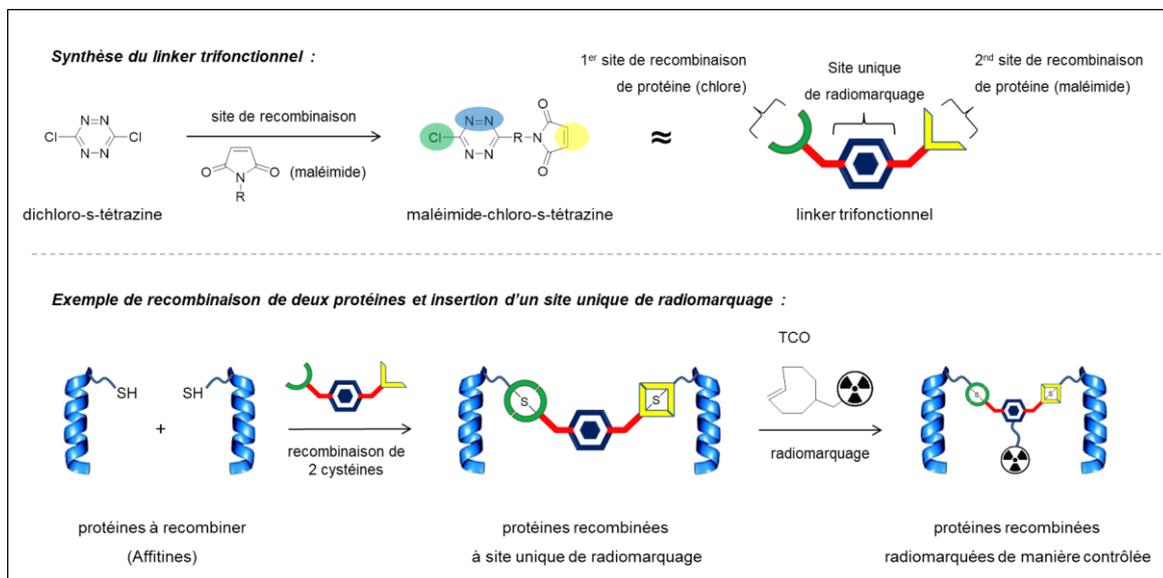


Figure 59 : Recombinaison de deux protéines avec insertion d'un site unique de radiomarquage

Une structure asymétrique de ce linker a été envisagée pour permettre aux bras recombinants de présenter des réactivités potentiellement différentes vis-à-vis des cystéines devant être recombinées. Le motif chlorotétrazine a été choisi afin de minimiser l'espacement entre les deux cystéines en comparaison d'un bismalimide.

Les résultats associés à cette seconde partie sont présentés en deux sections. La première présente les synthèses de la dichloro-s-tétrazine, du bras recombinant maléimide, du linker trifonctionnel et du précurseur radiomarquable TCO-SnBu₃. Ces synthèses sont suivies des tests de réactivité associés aux thiols et aux amines sur les deux bras recombinants. La dernière section décrit le test préliminaire de recombinaison d'une protéine (affitine) effectué avec ce linker trifonctionnel (Cl-Tétrazine-Maléimide).

IV. DEVELOPPEMENT DU RADIOMARQUAGE D'ANTICORPS A L'IODE-125 ET A L'ASTATE-211 A PARTIR DE REACTIONS BIO-ORTHOGRAPHONALES

IV-1. Mise au point du radiomarquage sur un modèle simple

IV-1.1. Synthèses des précurseurs bifonctionnels

Le choix des précurseurs bifonctionnels s'est initialement orienté vers quatre molécules munies d'une fonction de couplage bio-orthogonale (alcyne vrai, azotures, tétrazine) et d'une fonction tributylétain (SnBu_3) comme site de radiomarquage électrophile (schéma 1).

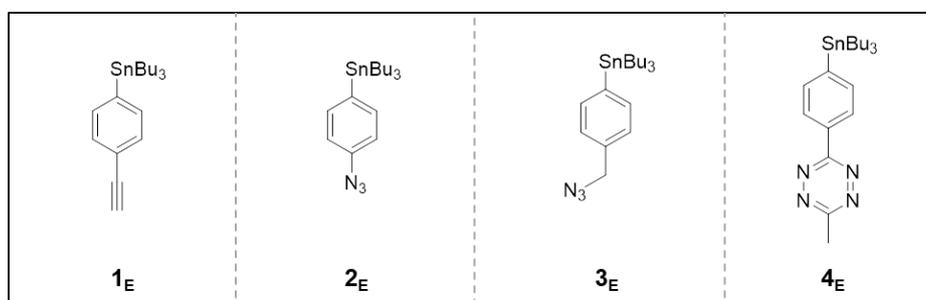


Schéma 1 : Précurseurs bifonctionnels envisagés pour un radiomarquage par voie électrophile (E)

Ces fonctions de couplage ont été choisies car elles permettent l'étude des trois systèmes bio-orthogonaux les plus utilisés à ce jour en radiochimie (CuAAC, SPAAC, IEDDA), mais aussi pour leur relative accessibilité qui permet une synthèse et une caractérisation chimique rapide en laboratoire. La fonction stannique a été choisie pour effectuer le marquage de ces molécules à l'iode et à l'astate, selon la méthode classique décrite lors des parties II-2.1.1. et II-2.2.1.

Pour générer ces précurseurs, quatre molécules bromées ont été sélectionnées (Schéma 2). L'intermédiaire alcyne **1a** est obtenu après déprotection de l'alcyne silylé (SiMe_3) par ajout d'une quantité catalytique de carbonate de potassium (K_2CO_3). L'intermédiaire azoture de phényle (Ph-N_3) **2a** est obtenu après formation d'un sel de diazonium, suivi de l'attaque nucléophile de l'anion azoture (méthode dérivée de la réaction de Sandmeyer). L'intermédiaire azoture de benzyle (Bn-N_3) **3a** est obtenu par substitution nucléophile de l'atome de brome (Br) par l'anion azoture. L'intermédiaire tétrazine de phényle (Ph-N_4) **4a** est obtenu par attaques nucléophiles successives des azotes de l'hydrazine monohydratée ($\text{NH}_2\text{NH}_2, \text{H}_2\text{O}$) sur le carbone des deux nitriles, à l'aide d'un

catalyseur à base de nickel ($\text{Ni}(\text{OTf})_2$), suivies d'une étape d'oxydation effectuée par du nitrite de sodium (NaNO_2) tel que décrit par Yang¹⁹¹.

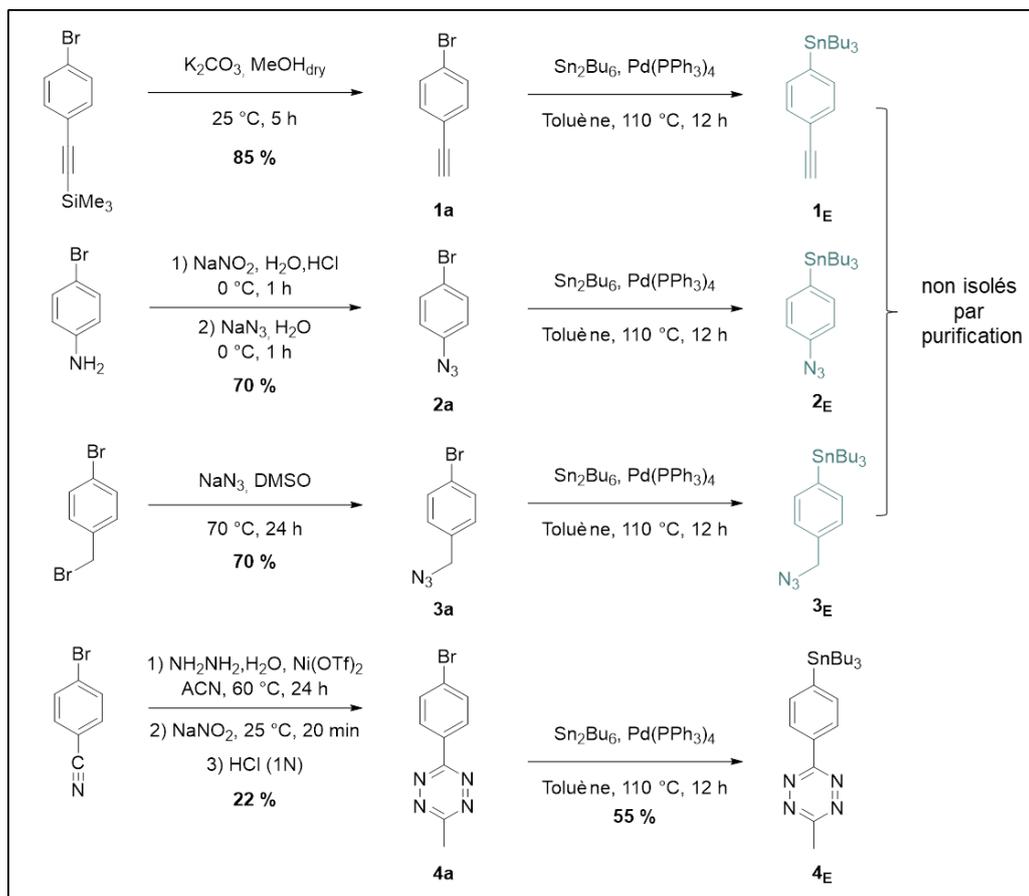


Schéma 2 : Synthèses des quatre précurseurs bifonctionnels développés pour un radiomarquage par substitution électrophile.

Le mécanisme de formation de ce cycle tétrazine du composé **4a** a été décrit pour la première fois par Pinner¹⁹² en 1871 (Schéma 3).

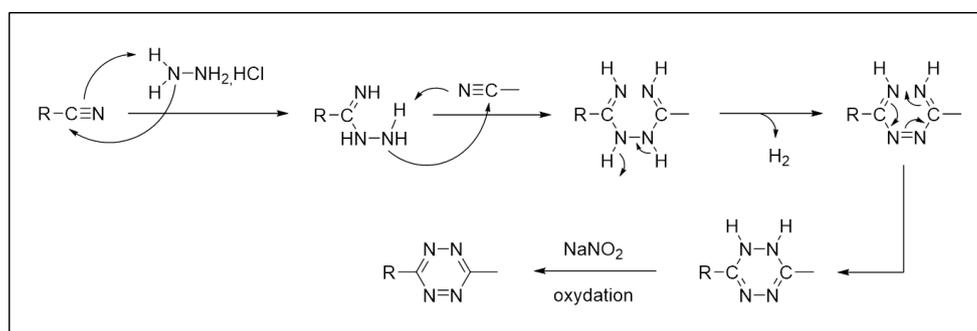


Schéma 3 : Mécanisme de formation d'une tétrazine 3,6 disubstituée selon Pinner

Au cours de ces vingt dernières années, cette réaction a été optimisée par de nombreux groupes de recherche comme celui de Yang¹⁹¹ en 2012, qui décrit un ensemble de catalyseurs organométalliques permettant d'augmenter significativement les rendements

de synthèse en fonction des composés nitriles utilisés. Dans cette étude, le catalyseur Ni(OTf)₂ était le plus recommandé pour la synthèse du composé **4a**.

L'insertion de la fonction tributylétain (SnBu₃) s'est effectuée selon le même protocole pour les composés **1a**, **2a**, **3a**, **4a**. La stannilation de ces quatre composés bromés est réalisée par une approche issue du couplage de Stille, faisant intervenir du bistrabutylétain (Sn₂Bu₆) et un catalyseur de palladium(0) tétrakis triphénylphosphine (Pd(PPh₃)₄).

Lors de cette étape, une seule synthèse permet d'isoler le précurseur souhaité : la tétrazine **4_E**. Le problème rencontré pour les trois autres composés s'est situé lors de l'étape de purification. En effet, à cause de la trop faible différence de polarité entre les produits de réaction et le réactif organostannique, les précurseurs **1_E**, **2_E** et **3_E** formés n'ont pu être séparés de l'excès de bistrabutylétain sur gel de silice de manière efficace, même en heptane pur, l'un des solvants les plus apolaires utilisés en chimie.

Pour contourner ce problème, une méthode alternative décrite dans les sections II-2.1.2. et II-2.2.1 utilisant la formation de sels d'iodonium a été choisie (Schéma 4). Actuellement, les sels d'iodonium sont notamment employés pour le marquage de molécules au fluor-18¹⁹³. De plus, cette chimie a été adaptée récemment au sein de notre laboratoire pour le marquage de précurseurs aux halogènes lourds (iode-125, astate-211)^{59,70}.

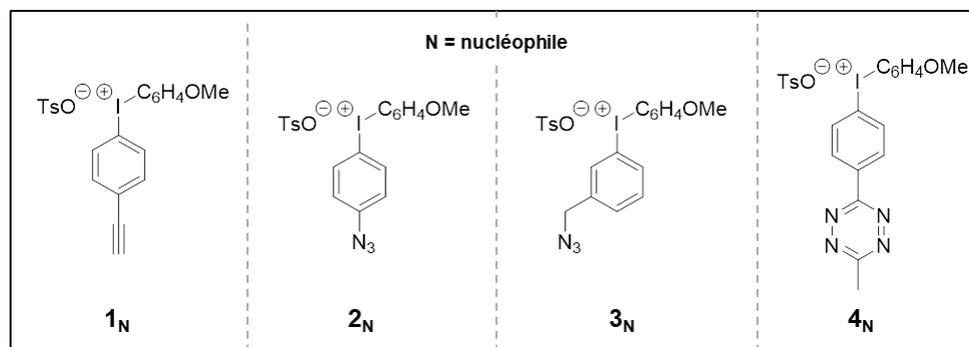


Schéma 4 : Précurseurs bifonctionnels envisagés pour un radiomarquage par voie nucléophile (N)

Pour permettre une bonne sélectivité lors du radiomarquage, il était nécessaire de réfléchir à l'introduction d'un second aryle riche en électron afin de maximiser l'attaque nucléophile de l'halogène radioactif sur le cycle aromatique du composé d'intérêt. L'anisole (PhOMe), composé aromatique enrichi par son groupement méthoxy donneur (OMe), est un bon candidat pour apporter cette bonne sélectivité.

Les premières étapes des synthèses précédemment utilisées ont été reconduites sur des précurseurs iodés avec des rendements sensiblement meilleurs que ceux obtenus à partir de précurseurs bromés (Schéma 5) sauf pour la tétrazine **4b** (libération d'iode).

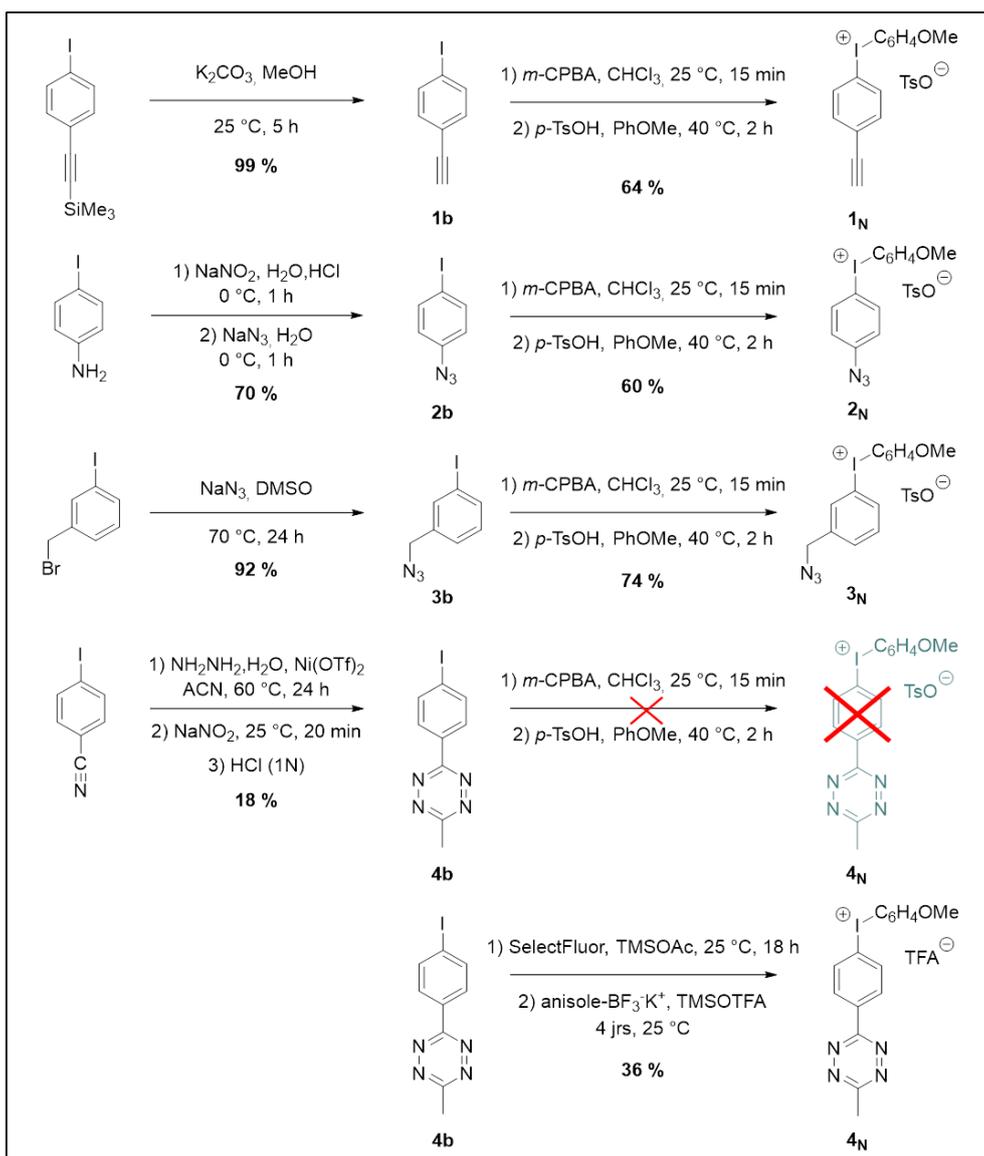


Schéma 5 : Synthèses des quatre précurseurs bifonctionnels développés pour un radiomarquage par substitution nucléophile.

L'étape de formation des sels d'iodonium **1_N**, **2_N**, **3_N** et **4_N** est basée sur la méthode décrite par Chun¹⁹⁴ pour la synthèse de précurseurs marqués au fluor-18. Cette synthèse est initiée par l'oxydation de l'iodoaryle à partir d'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) pour former l'intermédiaire aryliodane qui, après ajout d'acide *para*-toluènesulfonique (*p*-TsOH) et d'anisole, donne le sel d'iodonium correspondant. Cette stratégie a permis l'obtention des trois sels d'iodoniums **1_N**, **2_N**, **3_N** mais a été inefficace pour la synthèse du composé **4_N**. En effet, plusieurs heures après l'ajout de *m*-CPBA, aucune trace de formation de l'intermédiaire tétrazine d'aryliodane n'a été observée. Ceci peut s'expliquer par l'effet électronique désactivant de la fonction tétrazine sur le cycle aromatique portant l'iode qui modifie potentiellement la réactivité du *m*-CPBA avec l'atome d'iode.

Pour permettre la synthèse du composé **4_N**, une autre voie, décrite par Qin¹⁹⁵ en 2015 a été choisie. Elle permet la synthèse de sels d'iodonium aux fonctions chimiques plus sensibles (esters activés, alcools, amines, etc.). Dans cette voie, la formation de la fonction iodonium s'effectue par ajout de Selectfluor[®] et d'acétate de triméthylsilyle (TMSOAc) pour former l'intermédiaire aryliodane qui, après ajout d'un sel d'anisole (anisoleBF₃K⁺) et de trifluoromethanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTFA) donne le sel d'iodonium **4_N** correspondant (Schéma 6).

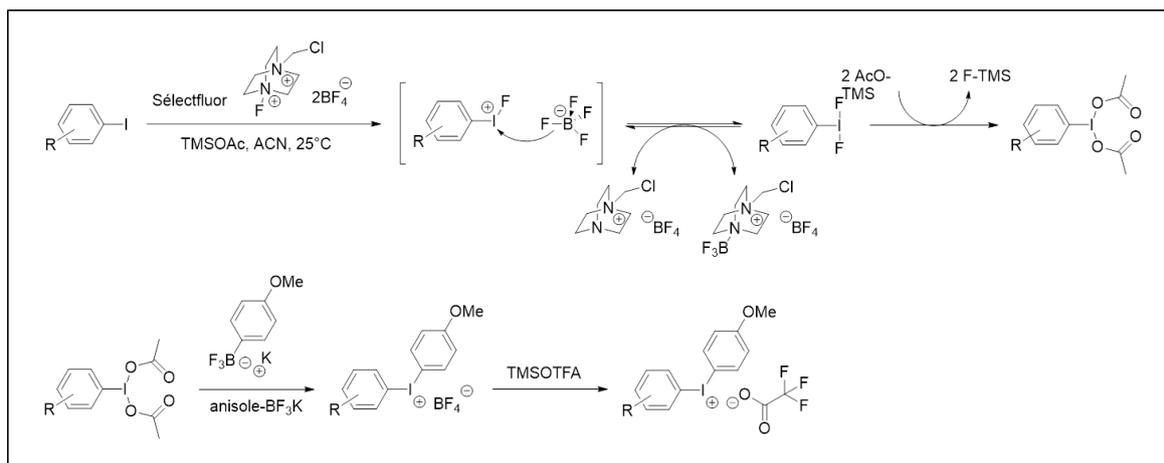


Schéma 6 : Mécanisme de formation d'un sel d'iodonium par la méthode de Qin décrite en 2005.

Les précurseurs bifonctionnels cliquables **4_E**, **1_N**, **2_N**, **3_N** et **4_N** ont été retenus lors de ce projet pour être radiomarqués à l'iode-125 et à l'astate-211 (Schéma 7).

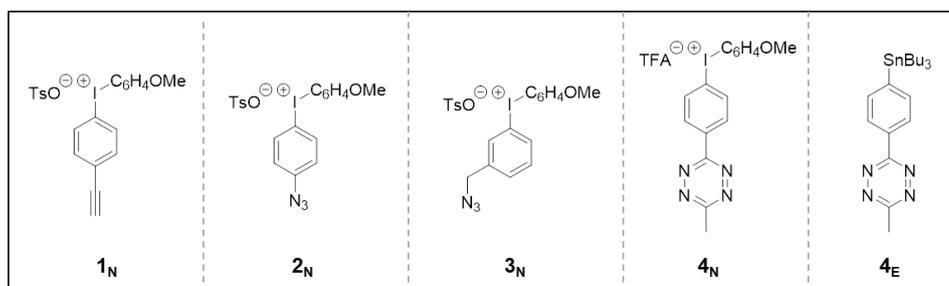


Schéma 7 : cinq précurseurs bifonctionnels cliquables et radiomarquables

IV-1.2. Mise au point du radiomarquage des précurseurs bifonctionnels cliquables

Les radiomarquages des précurseurs bifonctionnels **4_E**, **1_N**, **2_N**, **3_N** et **4_N** ont été effectués à l'iode-125 disponible commercialement sous forme d'iodure de sodium (Na¹²⁵I). L'astate-211 est produit par le cyclotron Arronax en utilisant la réaction ²⁰⁹Bi(α, 2n)²¹¹At et récupéré de la cible irradiée dans du chloroforme ((²¹¹At)_{CHCl₃}). Selon les précurseurs synthétisés, deux voies de marquage ont été envisagées. Pour le composé stannique **4_E**, le

radiohalogène doit être à l'état d'oxydation +I (I^+ / At^+) pour procéder à une démétallation électrophile aromatique. A l'inverse, pour les composés idonium 1_N , 2_N , 3_N et 4_N , le radiohalogène doit être à l'état d'oxydation -I (I^- / At^-) pour procéder à une substitution nucléophile aromatique.

IV-1.2.1. Radiomarquage par démétallation électrophile aromatique

Les marquages à l'iode-125 et à l'astate-211 du composé stannique 4_E ont été réalisés selon les conditions réactionnelles établies dans notre laboratoire pour le marquage des précurseurs SIB et SAB. Le marquage à l'iode-125 du composé 4_E (2,5 mmol/L) a été effectué dans un mélange méthanol / acide acétique (95 / 5) en utilisant de la *N*-chlorosuccinimide (NCS, 2,5 mmol/L) comme oxydant et une solution aqueuse de $[^{125}I]NaI$ (770 kBq). La réaction a été réalisée à 30 min et 60 min selon trois températures : 25 °C, 60 °C et 80 °C. Le marquage à l'astate-211 du composé 4_E (2,5 mmol/L) a été réalisé dans un mélange méthanol / acide acétique (95 / 5) en utilisant de la *N*-chlorosuccinimide (NCS, 2,5 mmol/L) comme oxydant et une solution d'astate-211 en méthanol (2 MBq). La réaction a été réalisée sur 30 min et 60 min à deux températures : 25 °C et 60 °C (Figure 60). Les solutions de marquage ont été analysées par CLHP afin de déterminer les rendements radiochimiques de chaque marquage.

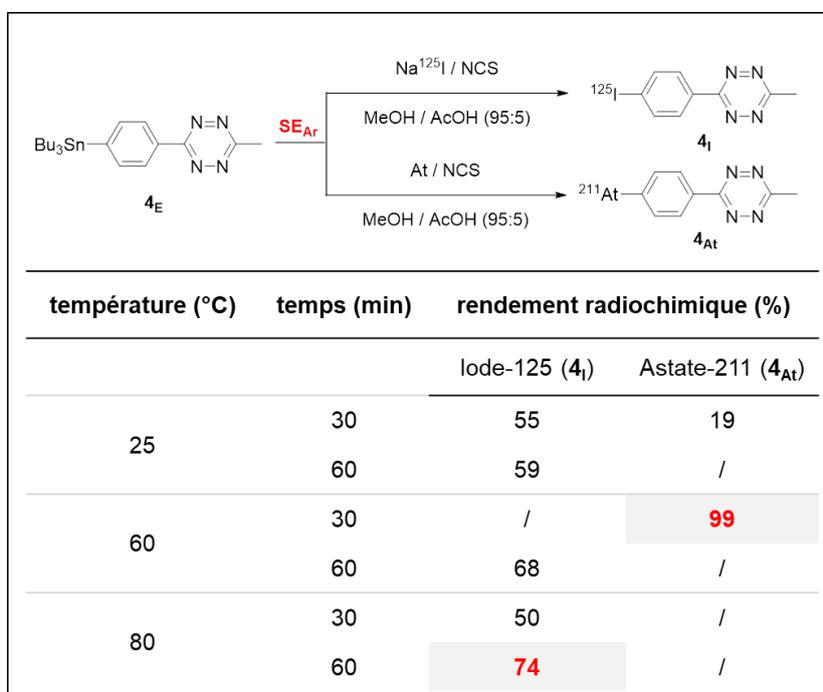


Figure 60 : Radiomarquage du composé 4_E + tableau récapitulatif des résultats obtenus

Les résultats obtenus pour le composé 4_E montrent une différence significative de réactivité entre l'iode-125 et l'astate-211. Après optimisation, les meilleures conditions

obtenues ont été de 60 min à 80 °C (74 %) pour l'iode-125, alors que pour l'astate-211, un marquage quantitatif a été observé à 60 °C en seulement 30 min (Figure 61). Malgré un rendement non quantitatif, la température de marquage à l'iode-125 n'a pas été élevée au-dessus de 80 °C pour limiter tout risque de dégradation du précurseur, déjà observé en faible proportion à 80 °C.

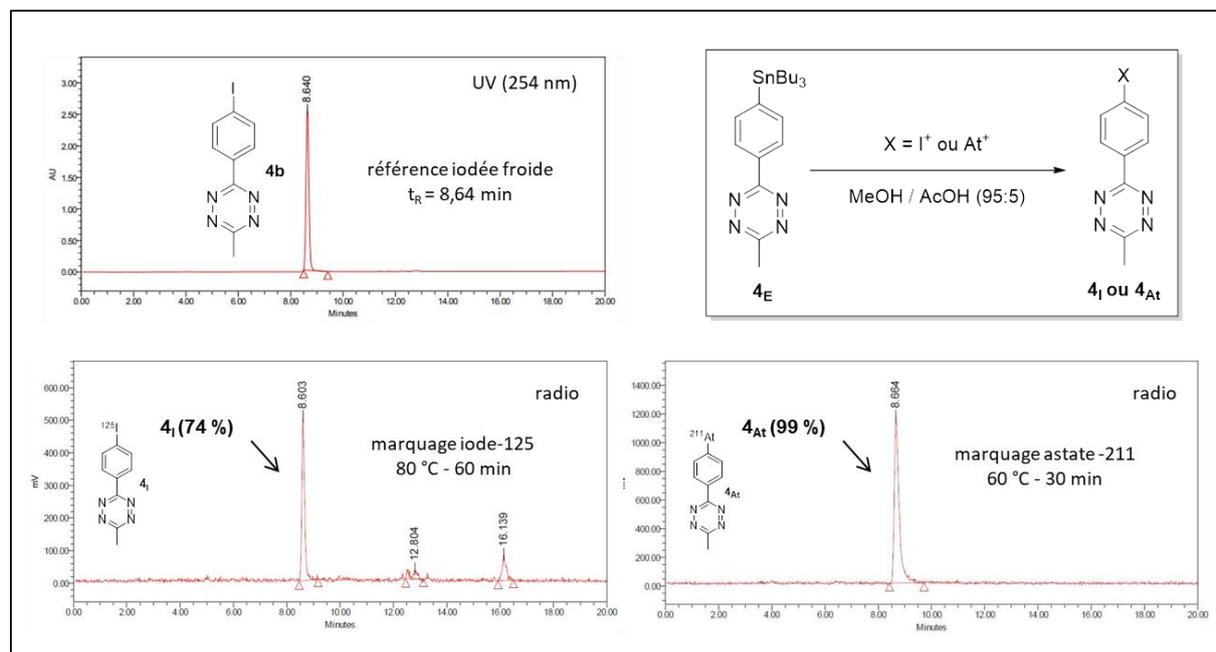


Figure 61 : Analyses chromatographiques des conditions de marquage optimisées du précurseur 4_E à l'iode-125 et à l'astate-211

Après marquage, les synthons radiomarqués 4_I et 4_{At} ont été purifiés par CLHP en phase normale afin d'éliminer l'excès du précurseur stannique 4_E . Cette méthode a pour inconvénient des pertes radioactives associées, d'une part à la fixation du synthon sur les tubulures de la CLHP (40 ± 5 % de perte), et d'autre part aux multiples étapes d'évaporation (20 ± 3 % de perte). Après purification, les produits 4_I et 4_{At} ont été obtenus avec des rendements globaux de 42 % et 35 %.

IV-1.2.2. Radiomarquage par substitution nucléophile aromatique

Le marquage à l'iode-125 des quatre précurseurs iodonium 1_N , 2_N , 3_N et 4_N (5 mmol/L) a été réalisé en acétonitrile (ACN) en utilisant une solution aqueuse de $[^{125}I]NaI$ (770 kBq). Les réactions ont été réalisées en 30 min selon une plage de températures allant de 40 °C à 120 °C. Le marquage à l'astate-211 des quatre précurseurs iodonium 1_N , 2_N , 3_N et 4_N (5 mmol/L) a été réalisé en acétonitrile (ACN) ou en méthanol (MeOH) en utilisant une solution aqueuse de $[^{211}At]NaAt$ (2 MBq) préalablement préparée à partir de sulfite de sodium

(Na₂SO₃). Les réactions ont été réalisées en 30 min selon une plage de températures allant de 40 °C à 120 °C (Figure 62).

précurseur	Température (°C)	Rendement radiochimique (%)			
		Iode-125		Astate-211	
		1 _I / 2 _I / 3 _I / 4 _I	0 _I	1 _{At} / 2 _{At} / 3 _{At} / 4 _{At}	0 _{At}
 1_N	80	/	/	33 / 44 ^a	6 / 11 ^a
	100	1	2	65 ^a	13 ^a
	120	39	5	78^a	11^a
 2_N	60	/	/	44	17
	80	10	2	31 / 71^a	12 / 28^a
	100	22	6	/	/
	120	23	10	/	/
 3_N	60	/	/	58	9
	80	20	2	73 / 86^a	14 / 13^a
	100	63	4	/	/
	120	81	7	/	/
 4_N	40	/	/	82	10
	60	20	1	85	11
	80	60	2	/	/
	100	96	3	/	/

a : méthanol

Figure 62 : Radiomarquages des composé 1_N, 2_N, 3_N et 4_N + tableau récapitulatif des résultats obtenus

Les résultats obtenus pour les composés 1_N, 2_N, 3_N et 4_N montrent, comme pour la voie électrophile, une différence significative de réactivité entre l'iode-125 et l'astate-211. Cette différence a été observée dans de précédents travaux de notre laboratoire⁷⁰.

L'hypothèse qui a été émise, appuyée sur des calculs DFT, serait que l'étape de substitution de l'astate se produirait par l'intermédiaire d'un complexe d'iodonium monomérique ($E_A = 17,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$) alors que la radioiodation s'effectuerait par

l'intermédiaire d'un complexe iodonium dimérique, plus stable ($E_A = 23,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$), ce qui expliquerait pourquoi les radiomarquages à l'iode-125 nécessitent des températures plus élevées.

Cette observation s'accompagne d'une moindre sélectivité de l'astate envers le groupement aryle d'intérêt. Dans l'exemple du précurseur **4_N**, un marquage total de l'iode-125 est obtenu avec un rapport 96 / 3 des synthons **4_I** et **0_I** alors qu'à l'astate-211, le rapport diminue à 85 / 11. De plus, en méthanol, une amélioration du rendement de marquage à l'astate-211 a été observée, en particulier pour les composés **1_N**, **2_N**, **3_N**. Le méthanol a été rapporté comme favorisant le marquage à l'astate-211 et inhibant les rendements de radioiodation⁷⁰, c'est pourquoi ce solvant n'a pas été utilisé lors de la radioiodation. De même, il n'a pas été utilisé non plus pour le précurseur **4_N** vu son instabilité en milieu réducteur en présence de méthanol. Les températures de radioiodation n'ont pas dépassé les 120 °C pour limiter la dégradation du précurseur et du synthon formé.

Les rendements de radiomarquage du composé **1_N** montrent une grande différence de réactivité entre l'iode-125 et l'astate-211. Après optimisation, pour l'iode-125, les meilleures conditions obtenues ont été 30 min à 120 °C en ACN (39 %), et 30 min à 120 °C (78 %) en méthanol pour l'astate-211 (Figure 63).

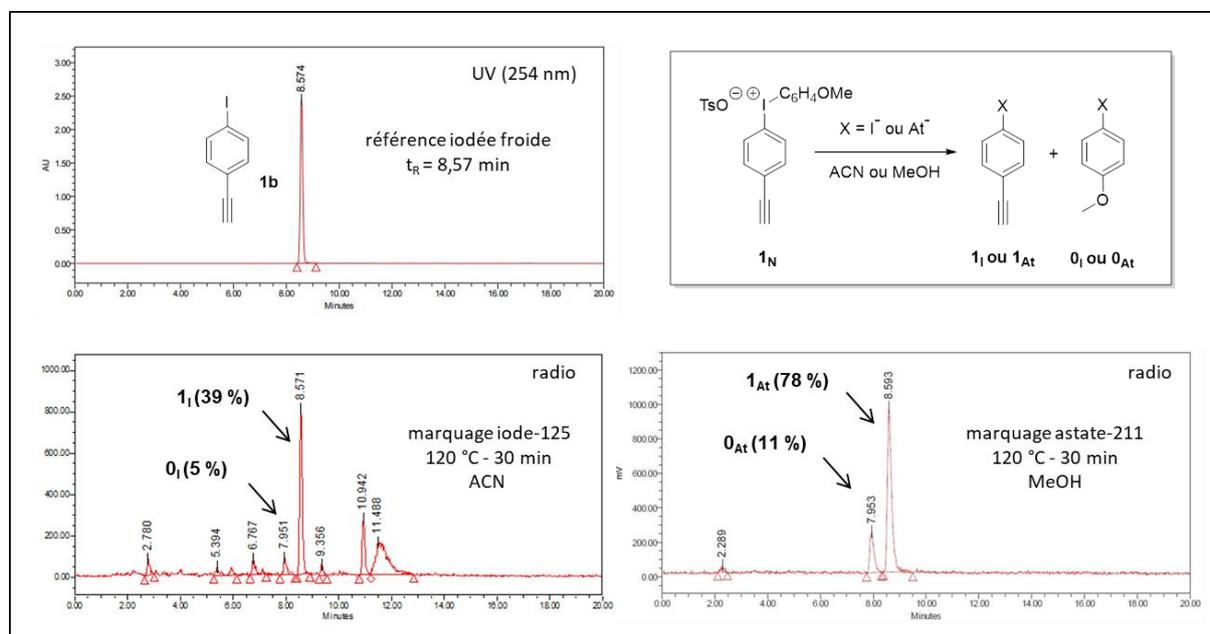


Figure 63 : Analyses chromatographiques des conditions de marquage optimisées du précurseur **1_N à l'iode-125 et à l'astate-211**

Après marquage, les solutions de synthons alcyriques **1_I** et **1_{At}** ont été évaporées à sec, suivies d'une extraction à l'éther diéthylique (Et_2O). Cette méthode de purification, beaucoup plus rapide que la méthode par CLHP, permet en principe de réduire

considérablement les pertes radioactives tout en facilitant le processus de purification. Le précurseur **1_N**, étant insoluble dans ce solvant à cause de sa grande polarité, seuls les synthons **1_I / 1_{At}** et **0_I / 0_{At}** ont été extraits. Après évaporation de l'éther, le sous-produit **0_I / 0_{At}**, très volatil, est éliminé pour ne donner le synthon alcynique **1_I / 1_{At}**. Toutefois, malgré un bon rendement de marquage, le chauffage à 120 °C amène une forte dégradation du précurseur iodonium **1_N** entraînant la libération d'une quantité importante de produit froid **1b** non séparable du synthon radiomarqué **1_I** ou **1_{At}** lors de l'étape de purification (Figure 64a). De plus, à cause de leur grande volatilité, une quantité importante ([60-80] %) des synthons **1_I / 1_{At}** s'élimine lors des étapes d'évaporation, rendant difficile leur récupération (Figure 64b). C'est pourquoi, les synthons **1_I** et **1_{At}** n'ont pas été retenus pour l'étude cinétique comparative.

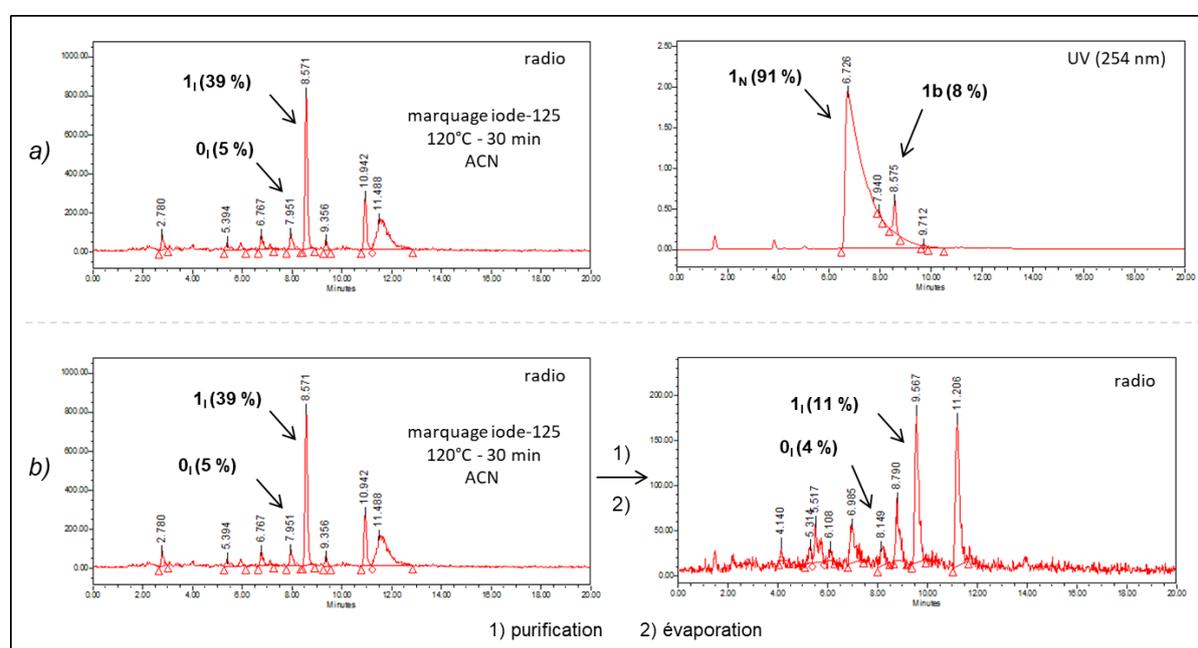


Figure 64 : a) Analyses chromatographiques montrant la dégradation du précurseur **1_N** lors du marquage à l'iode-125 (120 °C - 30 min) / b) Analyses chromatographiques montrant l'évaporation du synthon **1_I**

Les meilleures conditions obtenues pour le composé **2_N** ont été 30 min à 120 °C en ACN pour l'iode-125 (23 %), et 30 min à 80 °C en MeOH (71 %) pour l'astate-211 (Figure 65). Les solutions de radiomarquage des synthons azotures **2_I** et **2_{At}** ont été évaporées à sec, puis extraites à l'éther diéthylique.

Comme pour le composé **1_N**, à l'iode-125, le chauffage à 120 °C amène une forte dégradation du précurseur iodonium **2_N** entraînant la libération d'une quantité importante de produit froid **2b** non séparable du synthon radiomarqué **2_I** lors de la purification (Figure 66a). Néanmoins, les synthons **2_I** et **2_{At}**, comme ceux précédemment cités, présentent une grande

volatilité, rendant difficile leur récupération en quantité suffisante (Figure 66b). C'est pourquoi les synthons **2_i** et **2_{At}** n'ont pas été retenus pour l'étude cinétique comparative.

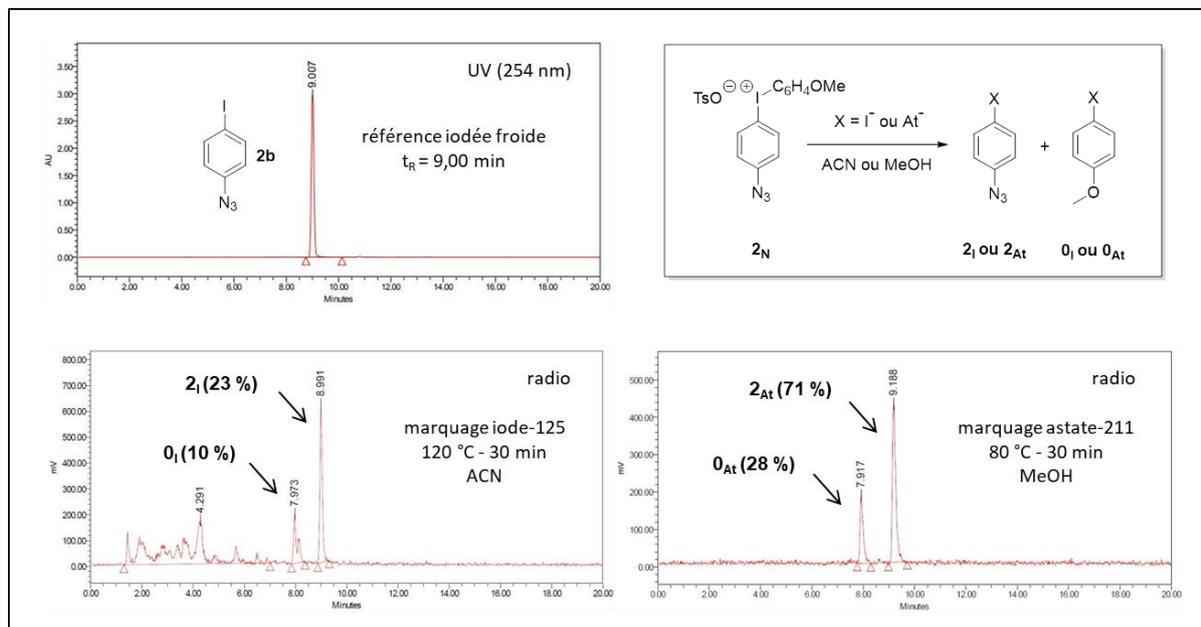


Figure 65 : Analyses chromatographiques des conditions de marquage optimisées du précurseur **2_N** à l'iode-125 et à l'astate-211

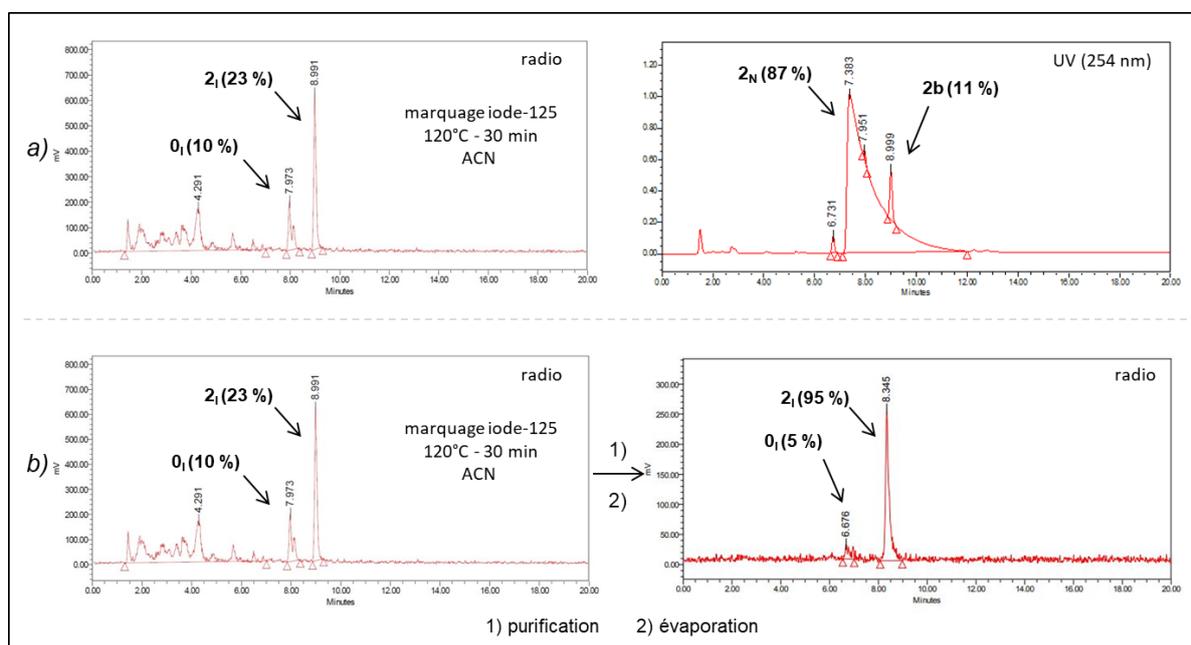


Figure 66 : a) Analyses chromatographiques montrant la dégradation du précurseur **2_N** lors du marquage à l'iode-125 (120 °C - 30 min) / b) Analyses chromatographiques montrant l'évaporation du synthon **2_i**

Après optimisation, les meilleures conditions obtenues pour le composé **3_N** ont été 30 min à 120 °C en ACN pour l'iode-125 (81 %), et 30 min à 80 °C en méthanol pour l'astate-

211 (86 %). La plus faible valeur de marquage observée à l'iode s'explique par la formation à 120 °C de sous-produits à hauteur de 12 % (Figure 67).

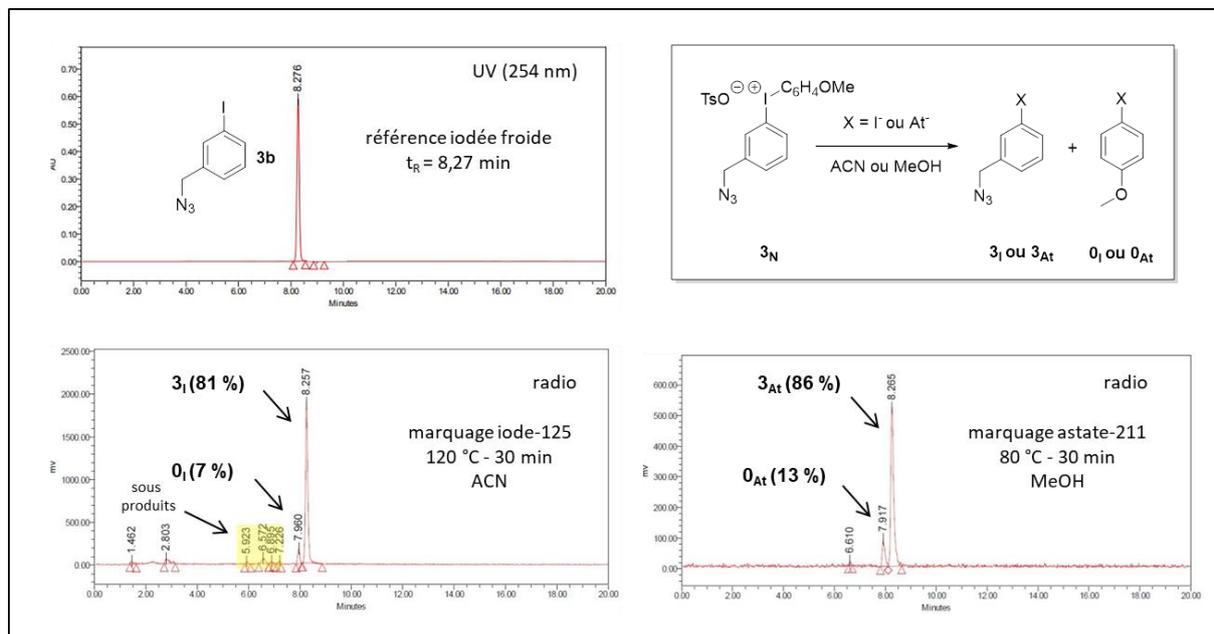


Figure 67 : Analyses chromatographiques des conditions de marquage optimisées du précurseur 3_N à l'iode-125 et à l'astate-211

A l'inverse des précurseurs 1_N et 2_N , le précurseur 3_N présente une bonne stabilité chimique à 120 °C, sans formation du produit froid 3_b dans le milieu. Les solutions de radiomarquage des synthons azotures 3_I et 3_{At} ont été évaporées à sec, puis extraites à l'éther diéthylique (Et_2O). Le précurseur 3_N , étant insoluble dans ce solvant, seuls les synthons $3_I / 3_{At}$ et $0_I / 0_{At}$ ont été extraits.

Après une nouvelle évaporation à sec, l'éther emporte le sous-produit $0_I / 0_{At}$ très volatil pour ne donner que le synthon azoture $3_I / 3_{At}$. Lors de l'évaporation du mélange réactionnel ou de l'éther diéthylique après extraction, seule une faible proportion (2 à 7%) du synthon 3_I ou 3_{At} a été éliminée, montrant ainsi une volatilité plus faible que son homologue azoture 2_I ou 2_{At} . Les rendements très satisfaisants obtenus à l'iode-125 et à l'astate-211 pour ce précurseur après purification ($RRC(3_I) = 65 \pm 5 \%$ et $RRC(3_{At}) = 64 \pm 6 \%$) ont permis de retenir les synthons 3_I et 3_{At} pour l'étude cinétique comparative.

Après optimisation, les meilleures conditions obtenues pour le composé 4_N ont été 30 min à 100 °C (96 %) en ACN pour l'iode-125, et 30 min à 60 °C en ACN (85 %) pour l'astate-211 (Figure 68a). Pour descendre en dessous des 60 °C lors du marquage à l'astate-211, des tests ont été réalisés en méthanol, mais l'instabilité chimique du précurseur 4_N dans ce solvant n'a pas permis la synthèse du synthon 4_{At} sans formation du produit froid 4_b .

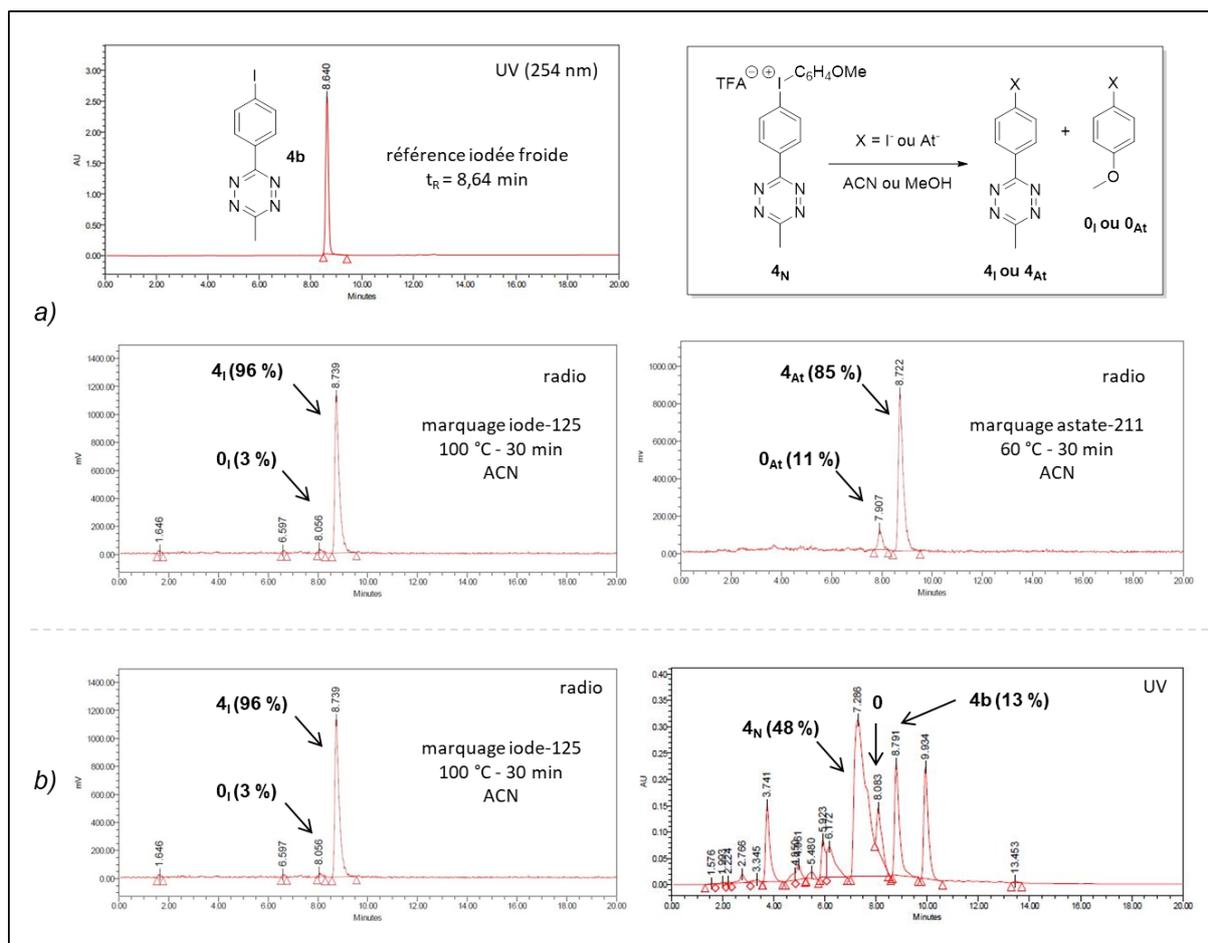


Figure 68 : a) Analyses chromatographiques des conditions de marquage optimisées du précurseur **4_N** à l'iode-125 et à l'astate-211 / b) Analyses chromatographiques montrant la dégradation du précurseur **4_N** lors du marquage à l'iode-125 (100 °C - 30 min)

Pour l'iode-125, le précurseur **4_N** présente une grande instabilité lors du marquage à 100 °C. On observe sa dégradation avec libération de composé **4_b** en grande quantité (Figure 68b). Cependant, dès 60 °C, aucune dégradation n'est observée. Des tests de purification par extraction à l'éther diéthylique ont été effectués. Cependant, il s'est avéré qu'une petite quantité de sels d'iodonium **4_N** était partiellement soluble dans l'éther, contaminant ainsi la solution de synthon **4_I** ou **4_{At}**.

Pour résoudre ce problème de solubilité partielle du précurseur dans l'éther diéthylique, une autre méthode de purification a été développée basée sur l'utilisation de cartouches de silice (Sep-Pak) et permettant la rétention du précurseur **4_N**. Après avoir évaporé l'acétonitrile de la solution de marquage, le mélange réactionnel a été repris dans de l'acétate d'éthyle et déposé sur une Sep-Pak. Le précurseur **4_N**, très polaire, est retenu intégralement sur la silice, et les synthons **4_I** / **4_{At}** et **0_I** / **0_{At}**, très apolaires, eux, migrent très rapidement et sont élués dès les premières gouttes d'acétate d'éthyle. Les composés **0_I** / **0_{At}**

sont éliminés, comme dans l'étape d'extraction à l'éther, après évaporation de l'acétate d'éthyle pour donner seulement les synthons 4_I ou 4_{At} . Lors de l'évaporation du mélange réactionnel ou de l'acétate d'éthyle, seule une faible proportion (2 à 4 %) du synthon 4_I ou 4_{At} a été éliminée, montrant une volatilité quasi-nulle.

Les rendements très satisfaisants obtenus à l'iode-125 et à l'astate-211 pour ce précurseur après purification ($RRC(4_I) = 71 \pm 5\%$ et $RRC(4_{At}) = 76 \pm 4\%$) ont permis de retenir les synthons 4_I et 4_{At} pour l'étude cinétique comparative.

Au final, sur les cinq précurseurs développés, seuls trois ont donné des résultats très intéressants pour le radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211. Bien que les précurseurs 1_N et 2_N aient donné des résultats satisfaisants à l'astate-211, les problèmes associés à leur l'instabilité thermique ainsi qu'à leur volatilité ne leur ont pas permis d'être sélectionnés pour la suite de ce projet. De plus, la purification obligatoire par CLHP et les pertes radioactives du précurseur 4_E , associées à cette étape, limitent son adaptation malgré les très bons rendements obtenus. Son homologue 4_N présente certes des rendements de marquage légèrement plus faibles, mais qui sont compensés par la méthode de purification simple et plus rapide, caractéristique particulièrement intéressante pour des radionucléides de courte période comme l'astate-211. Les précurseurs retenus pour l'étude cinétique effectuée sur les différents peptides cliquables sont donc le précurseur azoture 3_N et le précurseur tétrazine 4_N (Schéma 8).

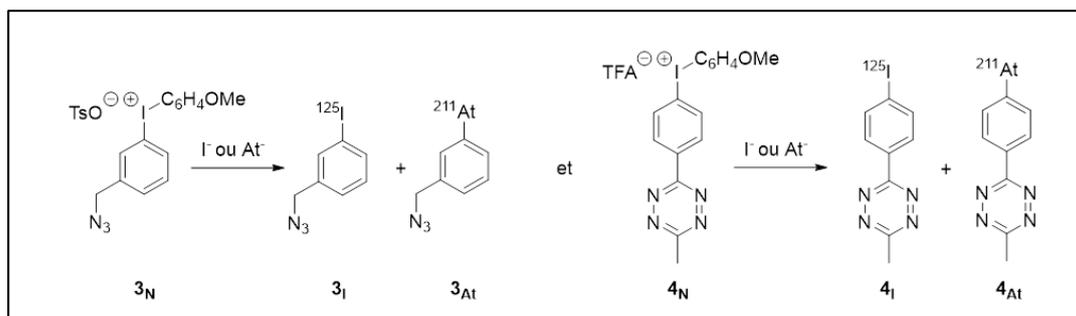


Schéma 8 : Précurseurs 3_N et 4_N retenus pour l'étude cinétique comparative

IV-1.3. Synthèses des peptides modèles cliquables

Lors de ce projet, le choix de développer un peptide modèle s'est basé sur la volonté de pouvoir effectuer, sur un modèle simple, une étude comparative de différents systèmes bio-orthogonaux, tout en réduisant les contraintes liées à l'utilisation de vecteurs immunologiques type anticorps (coûts de production, conditions réactionnelles, solvants, etc.). De plus, l'utilisation de peptides modèles permet la caractérisation des produits formés par couplages bio-orthogonaux, chose impossible à réaliser à partir d'anticorps. Pour cela,

nous avons choisi de synthétiser un peptide possédant dans sa structure une fonction identique à celle utilisée sur l'anticorps, à savoir une amine primaire issue d'une lysine, permettant de simuler la réactivité d'un anticorps.

IV-1.3.1. Synthèse du peptide modèle

L'objectif a été de synthétiser le plus petit peptide possible composé d'une lysine entourée de deux glycines, protégées en positions N et C-terminales (Schéma 9).

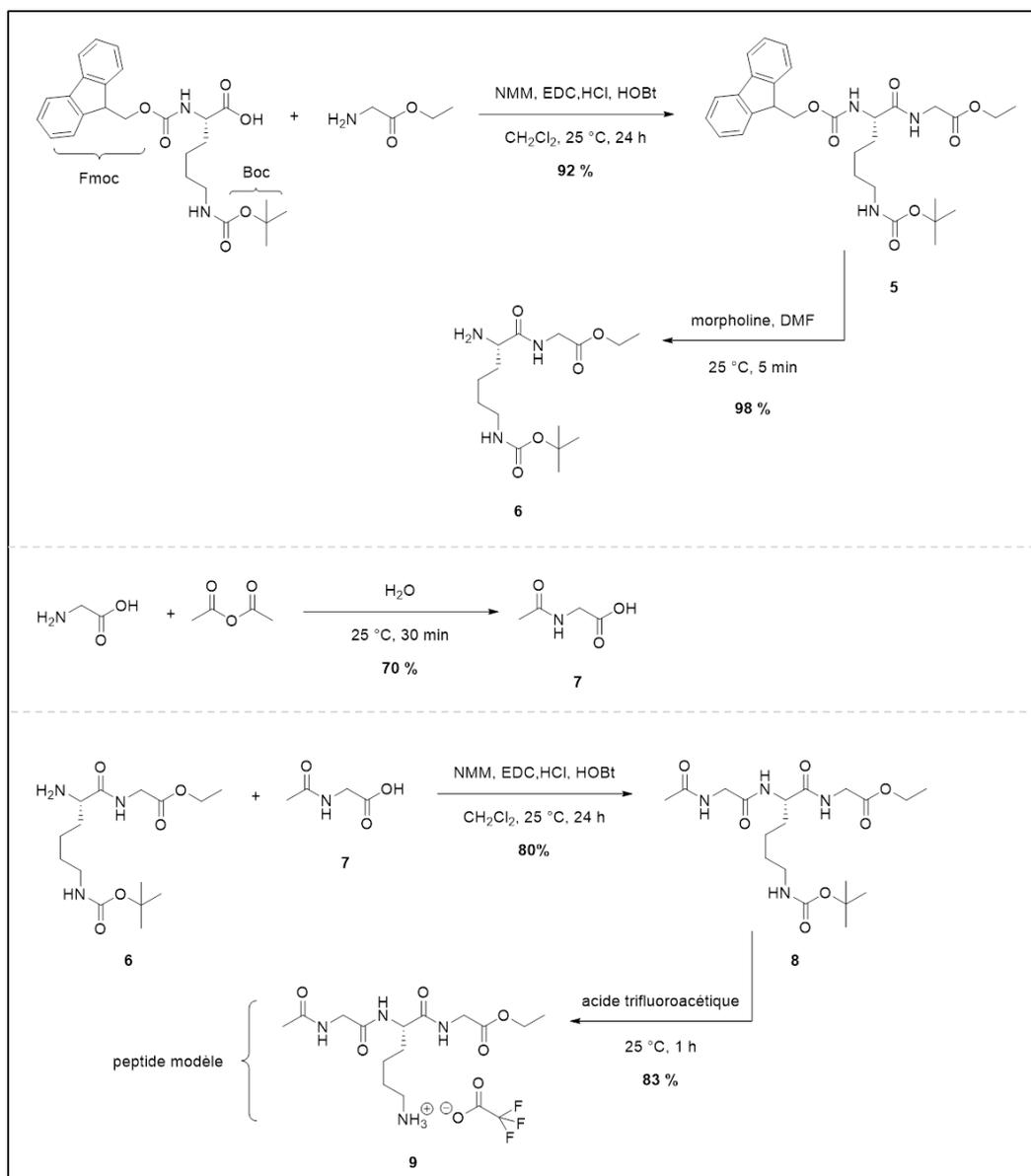


Schéma 9 : synthèse du peptide modèle en cinq étapes (Rdt_{global} : 42 %)

La synthèse de ce peptide s'est déroulée en cinq étapes avec trois réactions classiques de couplages peptidiques (présence d'EDC, HCl et d'HOBT comme activateurs du carboxyle), et deux étapes de déprotection de groupements orthogonaux (fluorényl-

méthoxycarbonyle (Fmoc) et tert-butoxycarbonyle (Boc)). Après optimisation de chacune de ces étapes, le peptide souhaité **9** a été obtenu avec un rendement global de 42%.

A noter que l'étape de déprotection du groupement Fmoc effectuée lors de la synthèse du composé **6** a posé un certain problème. En effet, il est important de ne pas dépasser les 5 min de déprotection sous risque de produire une réaction secondaire amenant à la formation d'un composé cyclique. Ce composé n'a pas pu être exactement caractérisé par résonance magnétique nucléaire (RMN), toutefois il semble être issu de l'attaque nucléophile de l'amine formée sur l'un des groupements carbonyles présents sur la molécule.

IV-1.3.2. Synthèses des linkers cliquables

Afin de développer différents peptides cliquables complémentaires des quatre synthons sélectionnés précédemment (**3_I** / **3_{At}** / **4_I** / **4_{At}**), plusieurs linkers cliquables ont été synthétisés ou obtenus commercialement. Au regard des fonctions présentes sur ces précurseurs, le choix s'est tourné sur quatre linkers cliquables (alcyne vrai **10**, *trans*-cyclooctène **11**, cyclooctynes **12** et **13** (DIBAC, BCN)) munis d'une fonction (ester activé (NHS), carbonate) réactive avec les lysines du peptide modèle **9** (Schéma 10).

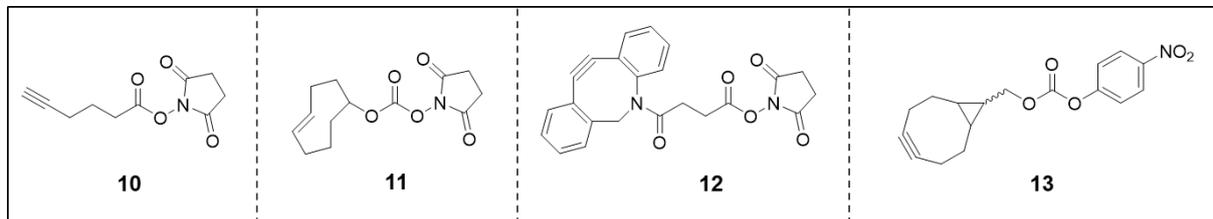


Schéma 10 : Quatre linkers cliquables sélectionnés

Les composés **11** et **12** ont été obtenus commercialement en raison de la relative difficulté à les synthétiser. En effet, les fonctions DIBAC¹⁹⁶ (**13**) et TCO¹⁹⁷ (**12**) nécessitent des synthèses multi-étapes complexes, et dans le cas du TCO, des appareillages (réacteurs photochimiques) non disponibles au sein de notre laboratoire. Le composé **10** est obtenu par réaction de couplage entre la fonction acide du précurseur alcyne et la *N*-hydroxysuccinimide avec comme activateur de la fonction acide le couple EDCI / HOBt.

La synthèse du composé **13**, décrite par Dommerholt¹⁰⁶, a quant à elle, nécessité plusieurs étapes. La première étape consiste à effectuer la cyclopropanation du cyclooctadiène par ajout de diazoacétate d'éthyle et d'un catalyseur au rhodium ($\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$). Le mélange d'isomères *endo* et *exo* **13a** résultant n'a pas été séparé en raison de leur faible différence de cinétique rapporté en SPAAC ($k_{\text{endo}} = 0,14 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $k_{\text{exo}} = 0,11 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans un

mélange ACN:H₂O (1:2))¹⁰⁶. Le mélange d'isomères *endo* et *exo* **13a** est ensuite réduit par le tétrahydruroaluminat de lithium (LiAlH₄) pour donner, après élimination de l'excès d'hydrure, l'alcool **13b** correspondant. Puis, l'alcool obtenu est traité par du dibrome (dihalogénéation) pour donner le dibromure **13c**, qui, mis au contact d'une solution de *tert*-butylate de potassium (*t*-BuOK, 1 mol/L), forme le cyclooctyne **13d**. Enfin, la dernière étape consiste à créer la fonction carbonate par attaque nucléophile de l'alcool du cyclooctyne **13d** sur le carbonochloridate de 4-nitrophényle pour donner le composé **13** avec un rendement global de 10 % (Schéma 11).

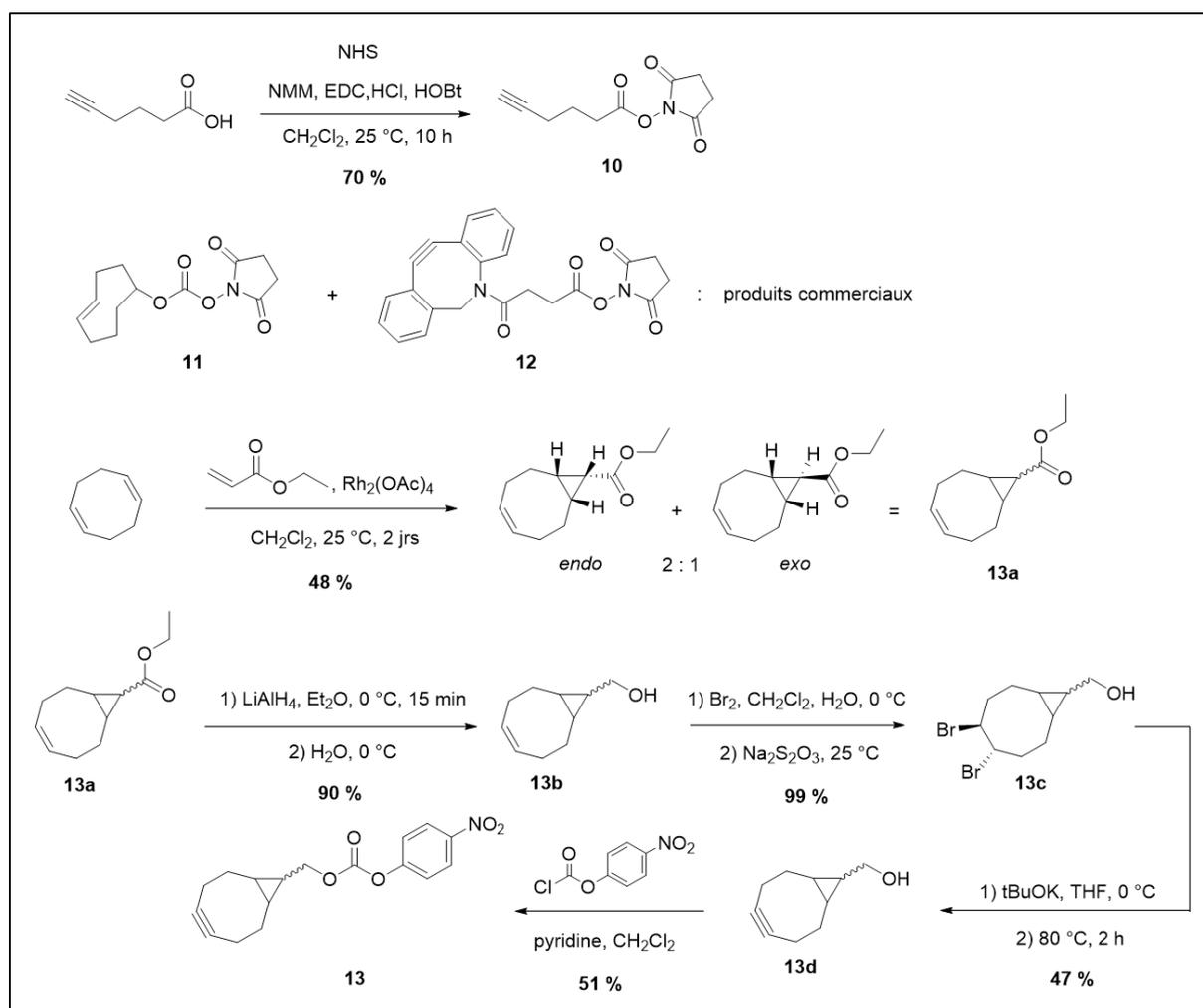


Schéma 11 : Structures et synthèses des cinq linkers cliquables

IV-1.3.3. Couplages des linkers cliquables sur le peptide modèle

Après avoir synthétisé ces différents linkers cliquables, l'étape suivante a été de les coupler sur le peptide modèle. Ces couplages ont été effectués à partir de conditions réactionnelles classiques, c'est-à-dire par substitution nucléophile de l'amine du peptide modèle sur les fonctions *N*-hydroxysuccinimide (**10**, **11**, **12**) ou carbonate (**13**) présentes sur les différents linkers cliquables (Schéma 12).

Après purification des solutions de couplage par chromatographie en phase normale, chacun de ces peptides cliquables a été obtenu avec de bons rendements allant de 74 à 83 %. Chaque peptide a été injecté en CLHP afin d'avoir une référence UV de chaque composé.

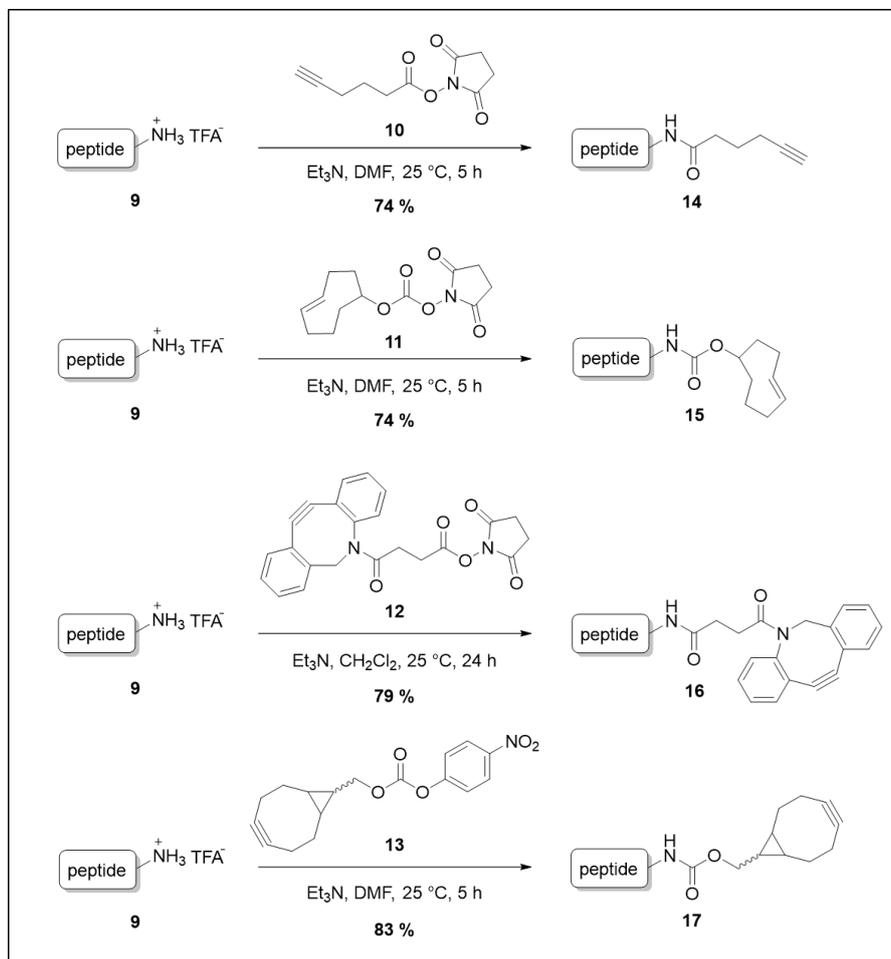


Schéma 12 : Synthèses des différents peptides cliquables

IV-1.4. Génération des peptides modèles cliquables - références iodées froides

Afin d'acquérir une référence UV (CLHP) des différents peptides devant être radiomarqués par couplages bio-orthogonaux, les peptides alcyne **13**, TCO **14**, DIBAC **15** et BCN **17** ont été couplés aux références froides (**3b** et **4b**) des synthons sélectionnés (Schéma 13). Ces références UV permettent d'identifier les peptides radiomarqués qui ne peuvent être observés en détection UV du fait de la très faible proportion formée, de l'ordre de la picomole (10^{-12} mol), lors des couplages bio-orthogonaux envisagés. Les peptides radioiodés auront des temps de rétention identiques à leur homologues froids (**18**, **19**, **20**, **21**, **22**). Pour les peptides astatés, on s'attend à des temps de rétention quasi identiques.

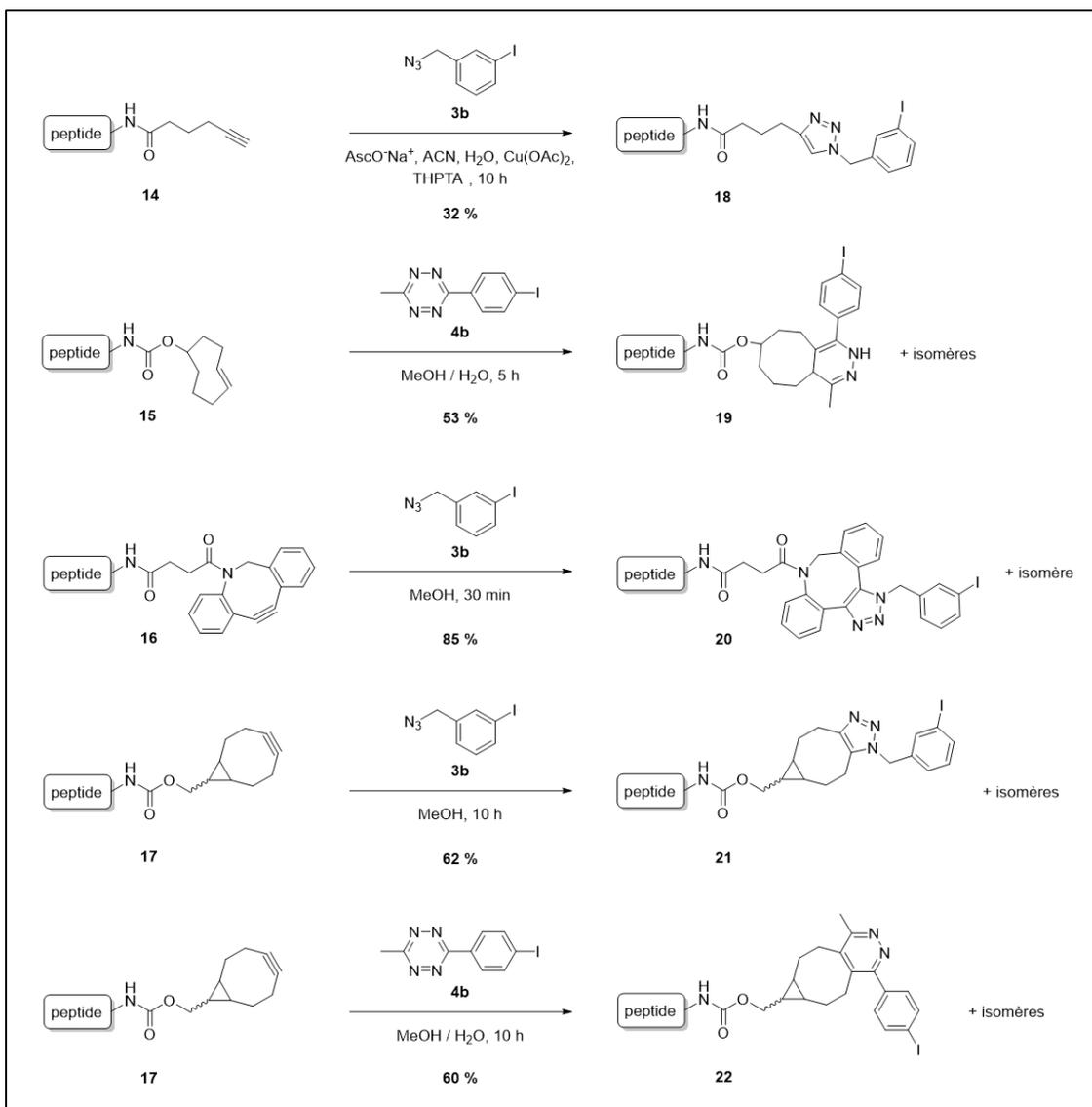


Schéma 13 : Couplages bio-orthogonaux entre peptides cliquables et références iodées froides

IV-1.5. Etude comparative des différents systèmes bio-orthogonaux

Les couplages entre les quatre peptides cliquables **14**, **15**, **16**, **17** et les quatre synthons radioiodés ou astatés **3_I** / **3_{At}** et **4_I** / **4_{At}** ont donné lieu à cinq combinaisons bioorthogonales dont les cinétiques de réaction et les rendements de couplage ont été comparés et suivis par CLHP (schéma 14).

Pour obtenir une estimation des rendements et des cinétiques de couplage qui seraient obtenus lors du marquage de biomolécules d'intérêts (anticorps monoclonal (mAb)), nous avons choisi de fixer la concentration en peptide cliquable à 200 μ M dans une solution saline de tampon phosphate (PBS, pH = 7,2) avec 10 % de méthanol pour permettre la

bonne solubilisation des synthons radiomarqués. Une telle concentration équivaldrait à 6 fonctions bio-orthogonales couplées par mAb à 5 mg/mL, ce qui situe ces couplages dans la plage des concentrations habituellement requises pour effectuer la bio-conjugaison de composés radiomarqués sur des résidus de lysine présents sur un mAb^{198,199}. 1 à 2 MBq de synthons radioiodés et astatés **3_I** / **3_{At}** et **4_I** / **4_{At}** ont été mis en jeu pour chaque point des cinétiques suivantes.

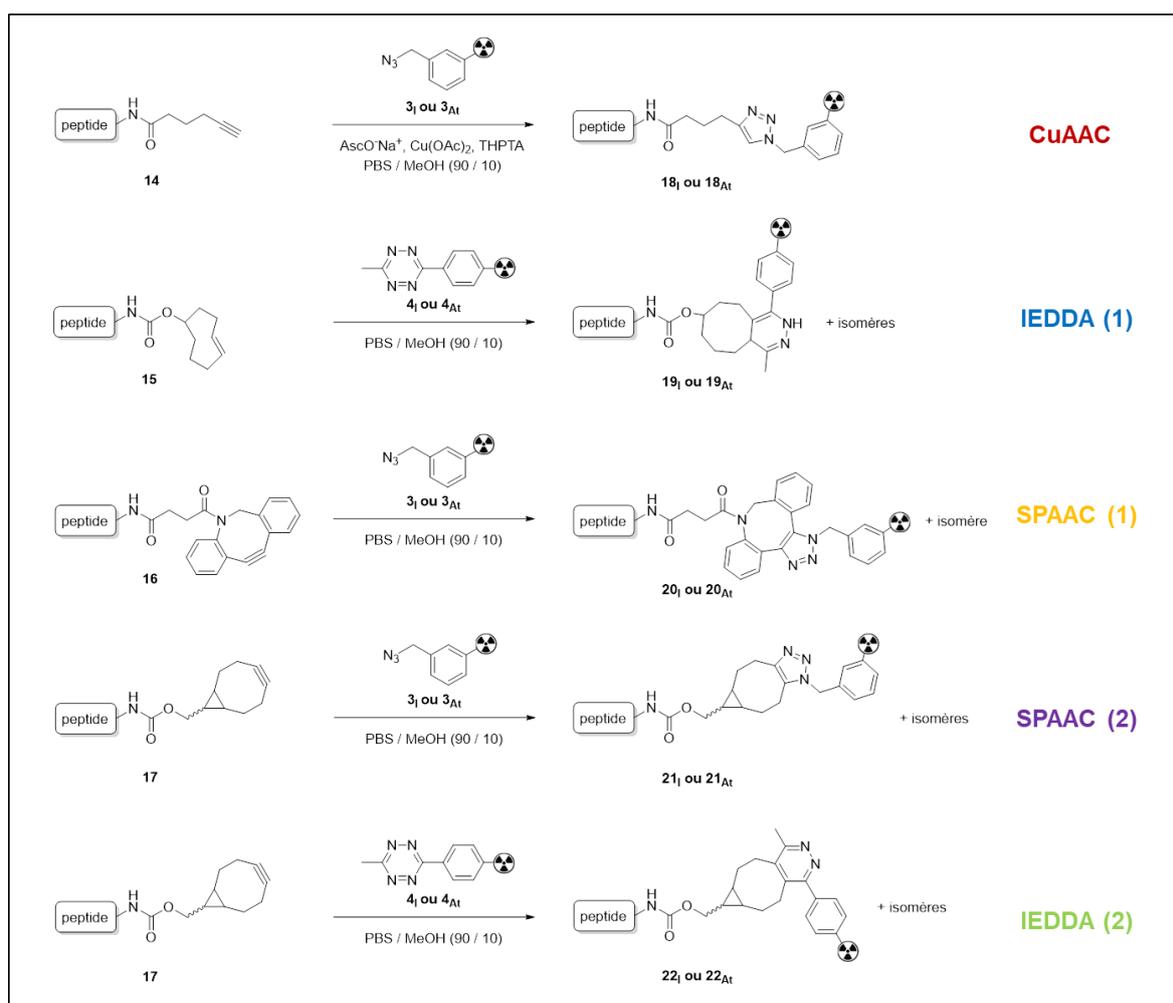


Schéma 14 : Réactions de couplages bio-orthogonaux effectués entre les peptides cliquables **14**, **15**, **16**, **17** et les quatre synthons radioiodés ou astatés **3_I** / **3_{At}** et **4_I** / **4_{At}**

Les 5 systèmes bio-orthogonaux étudiés ont tous conduit à des rendements radiochimiques quantitatifs (> 99 %). Comme attendu d'après la littérature, le système IEDDA entre le peptide TCO (**15**) et les tétrazines (Tz) radiomarquées (**4_I** ou **4_{At}**) a été le plus rapide, fournissant des rendements quantitatifs en moins d'une minute. Après optimisation des conditions de couplage (concentrations de cuivre, concentration en ligand THPTA), la CuAAC entre le peptide alcyne vrai (**14**) et les azotures radiomarqués (**3_I** ou **3_{At}**) a été le deuxième système le plus rapide avec des rendements quantitatifs en 5 à 10 minutes, suivi

de la réaction IEDDA entre le peptide BCN (**17**) et les tétrazines radiomarquées (**4_I** ou **4_{At}**) (RCY > 99 % après 10-15 min). Les réactions SPAAC entre les synthons azotures (**3_I** ou **3_{At}**) et les peptides DIBAC (**16**) ou BCN (**17**) ont fourni les cinétiques les plus lentes avec des rendements quantitatifs atteints après respectivement 45 à 60 minutes et plusieurs heures (Figure 69).

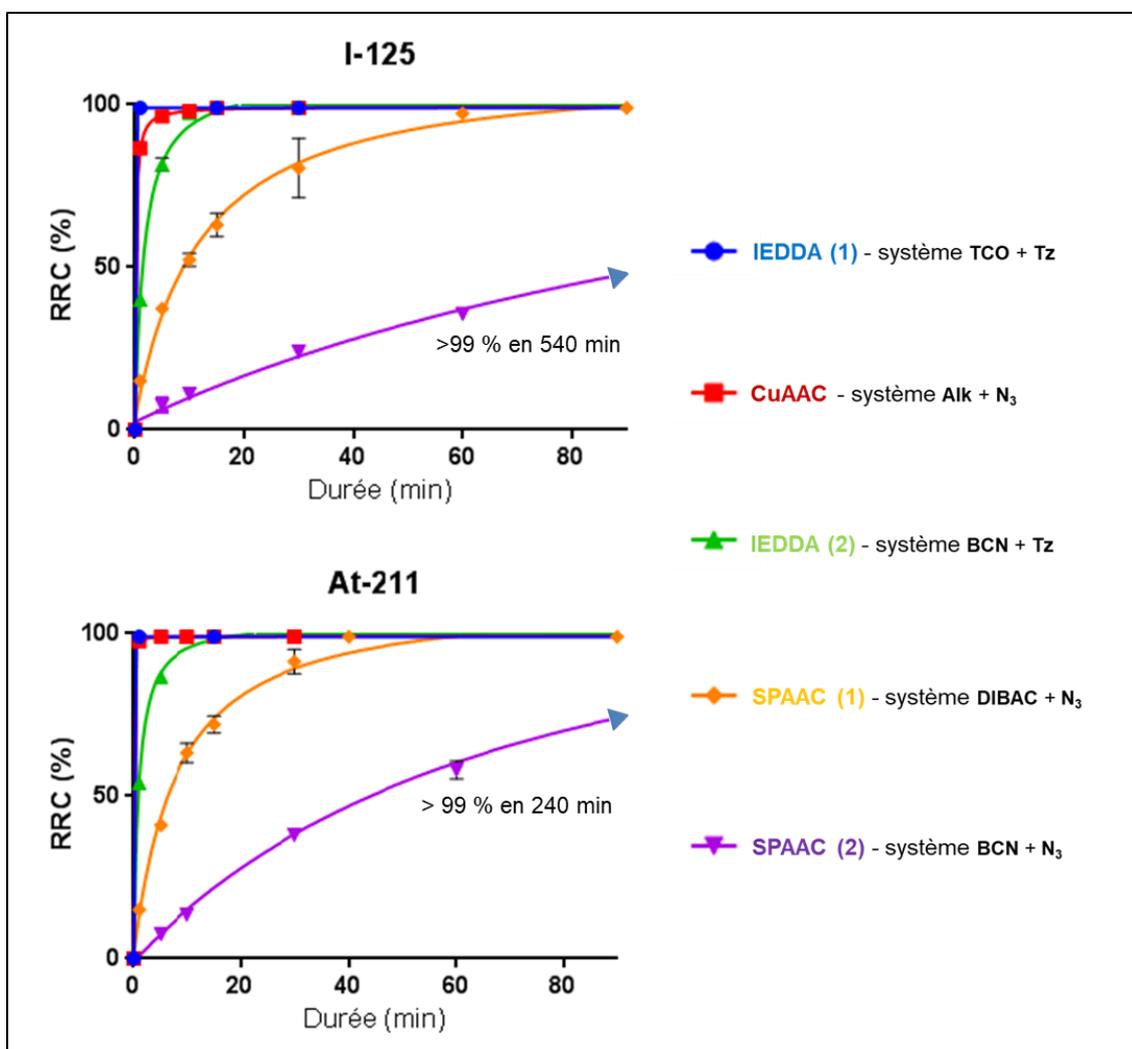


Figure 69 : Cinétiques des couplages bio-orthogonaux entre peptides cliquables et synthons radiomarqués (n = 3). Rendements radiochimiques (RRC) basés sur une analyse HPLC du produit brut

De manière surprenante, les réactions de cycloaddition ont été plus rapides avec les synthons astatés (**3_{At}** et **4_{At}**) qu'avec les synthons radioiodés (**3_I** et **4_I**). Bien que cela ne soit pas clairement visible pour les systèmes les plus rapides (IEDDA, CuAAC), cette observation est particulièrement marquée pour le système SPAAC le plus lent (peptide **17** + **3_I** et **3_{At}**) où le temps de demi-réaction ($t_{1/2}$) est de 110 min avec l'iode-125 alors qu'avec l'astate-211, il est seulement de 45 min. Cette différence nous a suggéré la possible influence de la lipophilie amenée par le radionucléide (¹²⁵I, ²¹¹At) fixé sur le synthon. En effet, il a été

rapporté dans de nombreuses études (dont celle de Otto²⁰⁰ en 2003) que la lipophilie des réactifs impliqués dans des réactions de cycloadditions pouvait avoir une incidence sur les vitesses de réactions en milieu aqueux, avec des cinétiques plus élevées pour les réactifs les plus lipophiles du fait des interactions hydrophobes produites par le milieu et qui forcent ces fonctions chimiques à se regrouper, accélérant ainsi leur rencontre.

Les coefficients de partage eau / octanol ont ainsi été déterminés pour les synthons **3_I** et **3_{At}** afin de comparer leur caractère lipophile. Comme attendu, la lipophilie mesurée du synthon astaté **3_{At}** ($\log P = 2,47 \pm 0,03$) est plus élevée que celle du synthon radioiodé **3_I** ($\log P = 2,38 \pm 0,05$). Cependant, cette différence n'est pas assez significative pour conforter notre hypothèse. Étant donné la concentration extrêmement faible des espèces astatées utilisées dans cette étude cinétique ($1 \text{ MBq} = 6.10^{-14} \text{ mol}$), la catalyse par des traces potentielles d'impuretés associées à la source d'astate-211 pourrait avoir contribué à l'accélération de la cinétique avec le composé **3_{At}**.

Globalement, quatre de ces systèmes bio-orthogonaux présentent des cinétiques de réaction et des rendements de couplage compatibles avec l'utilisation d'isotopes radioactifs de l'iode et en particulier avec la période relativement courte de l'astate-211. Cependant, le critère de la vitesse ne peut être seul pris en compte. En effet, alors que le couple TCO-tétrazine fournit un rendement de cycloaddition quantitatif en quelques secondes, il en résulte deux tautomères de dihydropyrazine qui se convertissent spontanément, après plusieurs heures, en pyrazine aromatique correspondante, phénomène décrit auparavant sur des composés similaires^{148,201} (Figure 70). Cela peut susciter des préoccupations concernant le manque d'homogénéité du produit radiopharmaceutique obtenu, les conséquences appliquées à la pharmacocinétique du vecteur, la dégradation in vivo des liaisons de conjugaison et enfin la stabilité de la liaison carbone-radiohalogène.

D'autre part, le deuxième système le plus rapide, la CuAAC, offre l'avantage de nécessiter moins d'atomes que les autres systèmes testés (2 atomes de carbone et 3 atomes d'azote), ce qui limite le risque de modification du comportement in vivo du radioimmunoconjugué obtenu. Il faut toutefois garder à l'esprit que la présence d'espèces de cuivre, en particulier de Cu^I , dans le milieu réactionnel, génère potentiellement des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO : radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes) capables de modifier les peptides et les protéines par des réactions secondaires oxydatives, même lorsqu'un ligand stabilisant est utilisé pour diminuer les concentrations de cuivre (Cu^I) requises¹³⁶. Dans certains cas, une optimisation poussée peut donc être nécessaire pour atteindre des rendements radiochimiques élevés tout en préservant l'activité de la biomolécule.

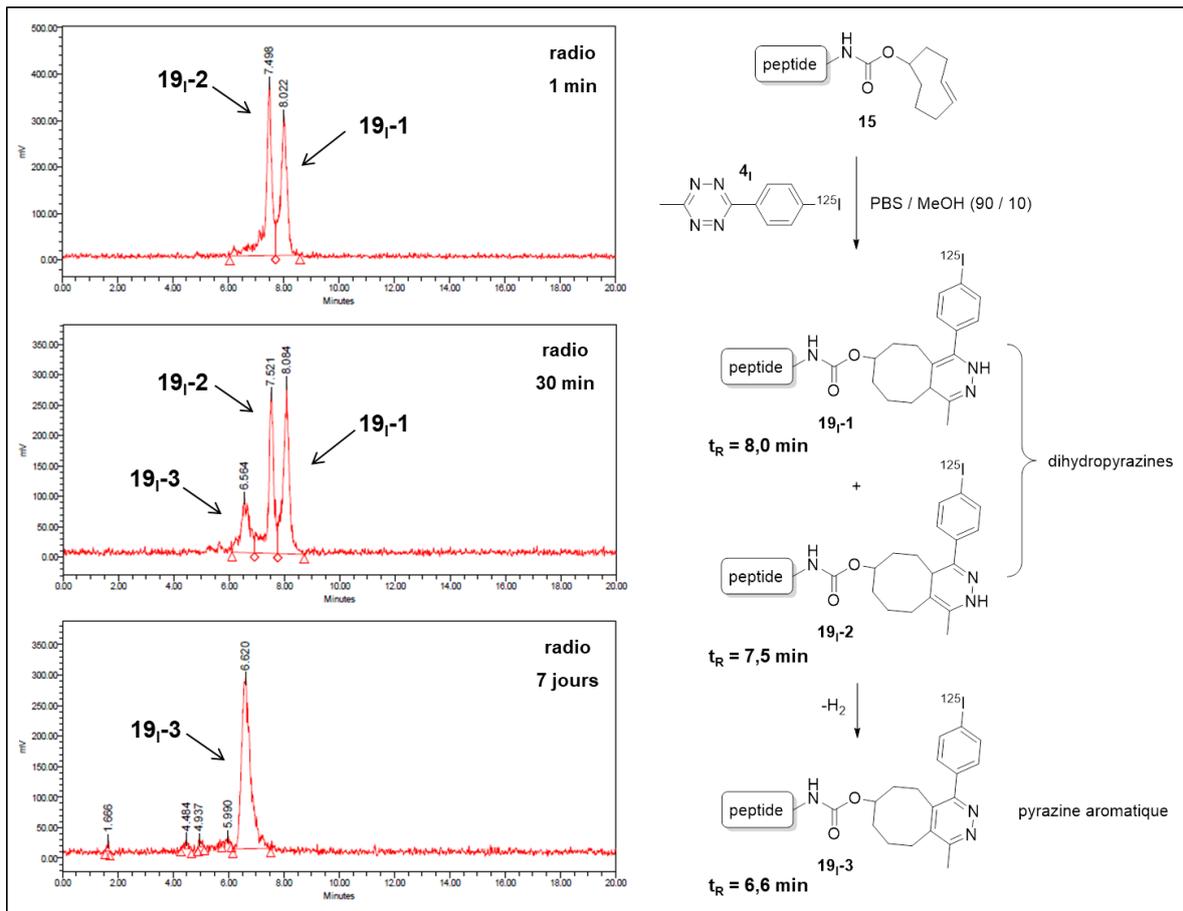


Figure 70 : Evolution au cours du temps des formes tautomères formées lors d'une IEDDA entre TCO et tétrazine

Comme pour le couple TCO-tétrazine, le couple DIBAC-azoture forme deux isomères aromatiques stables (**20-1**, **20-2**) pouvant eux aussi susciter des préoccupations concernant le manque d'homogénéité du vecteur radiomarqué mais dans une moindre mesure. Ce phénomène est aussi présent pour les couples BCN-azoture et BCN-tétrazine. Cependant, aucune différence des temps de rétention UV de ces isomères n'a pu être observée, résultant d'une plus grande similitude entre les différents peptides formés (Figure 71).

Pour conclure sur cette étude préliminaire, nous avons pu mettre en évidence, sur un modèle simple, l'efficacité de ces types d'approches bio-orthogonales pour le radiomarquage aux halogènes lourds. Entre ces cinq approches, deux ont été retenues pour la finalisation de cette étude : la réaction de Diels-Alder IEDDA entre une tétrazine (**4_I**, **4_{At}**) et un *trans*-cyclooctène (peptide **15**), et la réaction de cycloaddition SPAAC entre un azoture (**3_I**, **3_{At}**) et un cyclooctyne (peptide **16**). Ces deux systèmes, un très rapide (TCO-tétrazine) et un autre plus lent mais toujours adapté à la période radioactive de l'astate (DIBAC-azoture), ont été choisis pour déterminer leur possible transposition lors du marquage d'un vecteur d'intérêt. La cinétique relativement lente du système DIBAC-azoture (45 min) comparée à celle du

système TCO-tétrazine (quelques secondes) nous permettra d'évaluer l'influence de cette transposition sur sa cinétique de couplage.

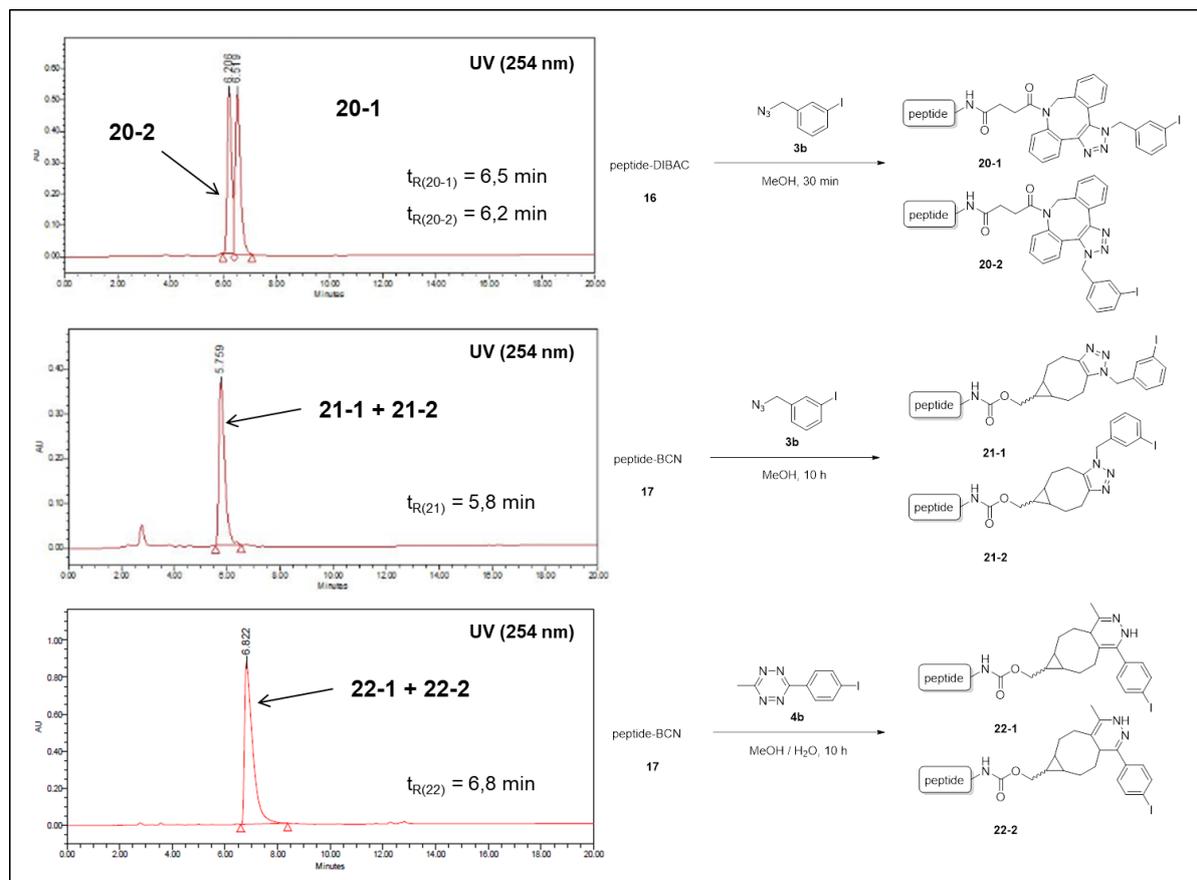


Figure 71 : Chromatogrammes UV des différents isomères formés lors des systèmes DIBAC-azoture, BCN-azoture et BCN-tétrazine.

IV-2. Radiomarquage d'un vecteur immunologique d'intérêt par réactions bio-orthogonales

Après avoir validé ces différentes approches bio-orthogonales de radiomarquage sur différents peptides cliquables, nous nous sommes intéressés au transfert des deux approches sélectionnées (IEDDA, SPAAC) pour le radiomarquage de macromolécules d'intérêt (anticorps). Nous avons choisi d'utiliser l'anticorps monoclonal 9E7.4, un anticorps développé par notre équipe de recherche et dirigé contre le CD138 murin pour cibler les cellules de myélome multiple¹⁸⁷.

Le myélome multiple, appelé également maladie de Kahler, est un cancer hématologique survenant après multiplication non contrôlée d'un plasmocyte anormal dans la moelle osseuse. Les plasmocytes sont des cellules plasmiques dont le rôle est de produire différentes immunoglobulines permettant à l'organisme de se défendre contre les infections

et maladies. Lorsque ce plasmocyte muté se multiplie de manière anarchique dans la moelle osseuse, il en résulte des conséquences néfastes pour l'organisme allant de l'affaiblissement du système immunitaire à la formation de métastases osseuses détruisant progressivement les os (cancers disséminés). Cette maladie est la plupart du temps diagnostiquée chez des personnes relativement âgées (70 à 74 ans), mais ne présente toutefois pas de cause connue à son développement.

Notre équipe travaille depuis plusieurs années sur les traitements de cancers disséminés ou résiduels par radio-immunothérapie alpha (RIT α). C'est pourquoi le myélome multiple représente un modèle de choix afin d'étudier l'efficacité de l'astate-211 dans ce type de traitement (particule α). Dans notre équipe, la RIT α a été réalisée dans un modèle murin de myélome multiple syngénique et immunocompétent par le bismuth-213 et a donné des résultats encourageants^{202,203}.

IV-2.1. Modifications chimiques de l'anticorps monoclonal (mAb) 9E7.4 anti CD138 murin

L'étude de ces approches bio-orthogonales sur l'anticorps 9E7.4 a nécessité, comme pour le peptide modèle, l'introduction de fonctions TCO et DIBAC sur les résidus lysines de l'anticorps. Pour faciliter l'accessibilité de ces fonctions aux synthons radiomarqués (**3**, **3_{At}**, **4**, **4_{At}**), le linker cliquable **11** a été remplacé par son homologue pégylé **11-PEG** (TCO-(PEG)₄-NHS) permettant d'espacer la fonction TCO de la surface peptidique de l'anticorps²⁰⁴ (Schéma 15). Dans le cas du linker DIBAC, nous avons choisi d'utiliser le linker DIBAC-NHS **12** utilisé lors de l'étude préliminaire et disponible au laboratoire. Toutefois il restera, comme pour le TCO, à tester son homologue pégylé dans les perspectives de cette étude.

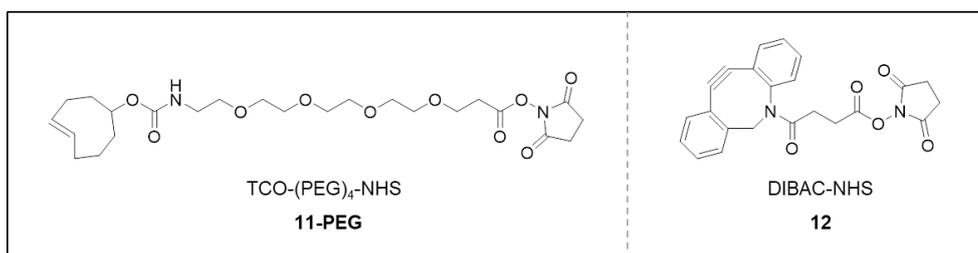


Schéma 15 : Linkers cliquables utilisés pour la modification de l'anticorps 9E7.4

IV-2.1.1. Modifications chimiques par des groupements TCO

Les premiers tests de modifications de l'anticorps 9E7.4 ont été effectués à partir du linker cliquable TCO-(PEG)₄-NHS en utilisant différents nombres d'équivalents (10 eq, 20 eq, 50 eq) afin de déterminer la quantité minimum de TCO nécessaire pour un couplage

quantitatif. Afin d'activer les résidus lysines situés à la surface de l'anticorps, le tampon de stockage de l'anticorps (PBS, pH = 7,2) a été échangé par un tampon borate (pH = 8,6) par ultracentrifugation. La solution obtenue a ensuite été concentrée à 5 mg/mL, concentration habituellement utilisée pour le couplage de composés sur les lysines d'un anticorps. Le linker cliquable TCO-(PEG)₄-NHS a été solubilisé en DMSO et ajouté ensuite à la solution d'anticorps. Afin d'éviter toute dégradation du vecteur, chaque manipulation ([10 - 20 - 50] eq) a présenté un rapport tampon borate / DMSO toujours supérieur à 95 / 5 (Schéma 16).

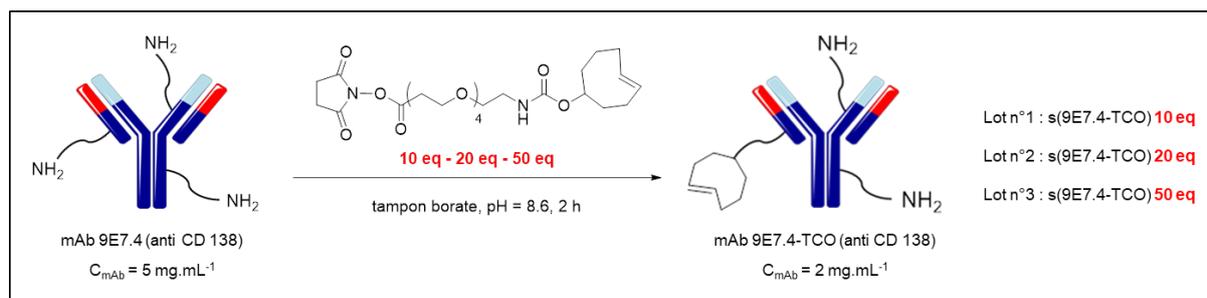


Schéma 16 : Modification de l'anticorps 9E7.4 par selon 10, 20 et 50 eq de linker TCO-(PEG)₄-NHS

Après 2 h de couplage, les solutions d'anticorps ont été purifiées par ultrafiltration sur membrane (Amicon[®]) afin d'éliminer l'excès de linkers TCO hydrolysés, puis reconditionnées en tampon phosphate (PBS) à 2 mg/mL.

La quantification du nombre de TCO greffés pour chaque lot d'anticorps a été mesurée par fluorescence à l'aide d'une tétrazine-Cy5 obtenue commercialement. Cependant, la rapide dégradation de cette tétrazine n'a malheureusement pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles. L'utilisation d'une autre plus stable (Cy5-Tétrazine méthylée) permettra de déterminer le nombre précis de fonctions TCO greffées par lot d'anticorps.

IV-2.1.2. Modifications chimiques par des groupements DIBAC

La modification de l'anticorps 9E7.4 à partir du linker cliquable DIBAC-NHS s'est déroulée selon des conditions analogues à celles décrites précédemment, en utilisant cette fois-ci 15 équivalents de linker DIBAC-NHS. Après couplage, la solution d'anticorps a été purifiée par filtration sur membrane (Amicon[®]) afin d'éliminer l'excès de linkers DIBAC hydrolysés, puis reconditionnée en tampon phosphate (PBS) à 2 mg/mL.

La quantification du nombre de DIBAC greffés pour ce lot d'anticorps (15eq) a été mesurée par fluorescence à l'aide d'un azoture-Cy5 obtenu commercialement. Une solution d'azoture-Cy5 (0,1 à 2 eq) en méthanol a été ajoutée sur la solution d'anticorps 9E7.4-

DIBAC-15eq (16,4 pmol) en PBS. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation à 23 °C pendant une nuit et une portion de cette solution a ensuite été déposée sur une bande ITLC-SG (Instant Thin Layer Chromatography Medium Silica Gel) pour être éluée avec du méthanol. Le contact de l'anticorps avec le méthanol permet à celui-ci de précipiter et ainsi de ne pas migrer lors de l'éluion. A l'inverse, l'azoture-Cy5 lui ne précipite pas et migre directement sur l'ITLC-SG dans le front de solvant. Par conséquent, le ratio entre la fraction d'azoture-Cy5 lié à l'anticorps (bas de l'ITLC-SG) et celle non liée (haut de l'ITLC-SG) permet de déterminer le nombre de DIBAC greffés par vecteur en fonction du nombre d'équivalents d'azoture-Cy5 ajouté à la solution d'anticorps. Ces mesures de fluorescence ont été effectuées en utilisant un scanner à détection de fluorescence et ont permis de déterminer un rapport de $0,21 \pm 0,05$ DIBAC / IgG 9E7.4 (Figure 72).

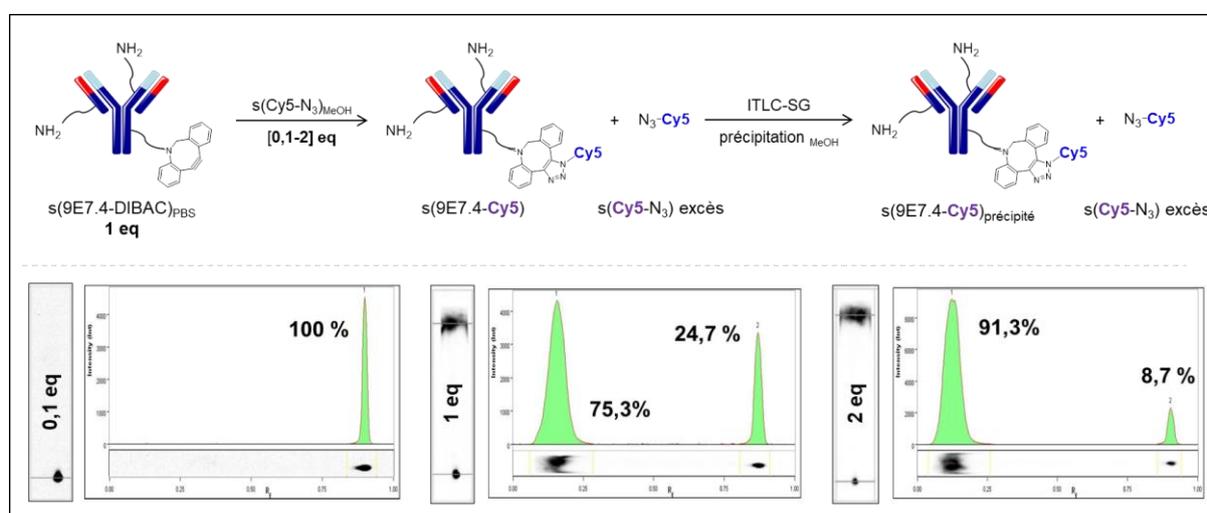


Figure 72 : Mesures ITLC-SG du nombre de DIBAC greffés sur l'anticorps 9E7.4 à partir d'un azoture fluorescent (azoture-Cy5)

IV-2.2. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 - système IEDDA

IV-2.2.1. Mise au point du radiomarquage de l'anticorps 9E7.4-TCO

Chaque lot d'anticorps 9E7.4-TCO (10 eq, 20 eq, 50 eq) a ensuite été couplé aux synthons tétrazine radioiodé et astaté (4_I / 4_{At}). Les rendements de marquage ont été évalués par ITLC-SG à l'aide d'un scanner Cyclone phosphorimager. Les activités d'iode-125 et d'astate-211 utilisées pour le radiomarquage des deux précurseurs 4_E et 4_N ont été fortement augmentées pour permettre des couplages de l'ordre de 5 MBq sur chaque lot d'anticorps (Figure 73). Pour l'astate-211, ceci implique des volumes de chloroforme prélevés importants et donc potentiellement des concentrations en impuretés résiduelles (issue de la production d'astate-211) élevées. La tétrazine radioiodée 4_I a été synthétisée par voie stannique (précurseur 4_E , 35 MBq) pour éviter toute formation de tétrazine iodée froide

(4b) observée lors du marquage du précurseur 4_N à l'iode-125 (Figure 67). Celle-ci pourrait réagir avec l'anticorps TCO en même temps que le synthon 4_I et réduire les rendements de couplage. Pour la tétrazine astatée 4_{At} , la voie iodonium a été choisie en raison des conditions de marquage plus douces (30 min, 60 °C) éliminant en théorie la dégradation du précurseur iodonium 4_N (40 MBq).

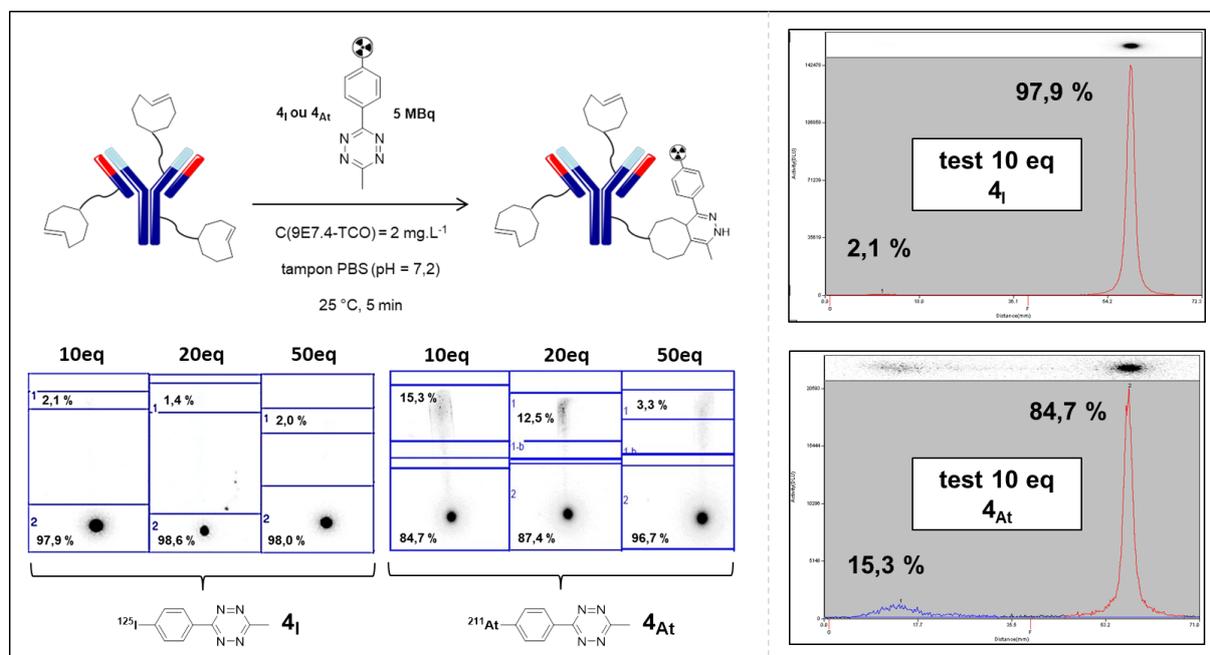


Figure 73 : ITLC-SG obtenues après radiomarquage des lots d'anticorps 9E7.4-TCO (10 eq, 20 eq, 50 eq) avec les tétrazines 4_I et 4_{At}

Comme attendu, le système TCO-tétrazine sur le modèle anticorps a fait preuve de son efficacité en donnant des rendements quantitatifs dès 5 min de couplage. Cependant on remarque qu'avec l'astate-211, il est nécessaire d'utiliser le lot 9E7.4-TCO-50eq pour obtenir un rendement quantitatif. Ceci s'explique par la présence inattendue de tétrazine froide 4_b , produite par voie iodonium, qui réagit en parallèle avec l'anticorps diminuant ainsi les rendements de couplage. Cette formation de tétrazine froide, non observée lors de la mise au point du radiomarquage du précurseur 4_N à 60 °C, nous a fait réfléchir sur la possible influence qu'ont le réducteur et les impuretés résiduelles de la source d'astate-211 sur le précurseur 4_N . Cette notion sera décrite plus en détails dans la suite de ces résultats.

Outre ces problèmes de tétrazine froide résiduelle, ces résultats ont montré que les concentrations d'anticorps modifiés nécessaires (9E7.4-TCO) pouvaient être fortement réduites (2 mg/mL) par rapport à la méthode conventionnelle ([4 - 5] mg/mL), ce qui permet d'envisager une augmentation significative de l'activité spécifique lors de marquages sous plus hautes activités.

IV-2.2.2. Optimisation des conditions de radiomarquage à l'astate-211 du précurseur 4_N à « haute activité / haut volume de solution mère d'astate »

Afin de résoudre les limites associées à la formation de tétrazine froide **4b** survenant lors du marquage du précurseur 4_N à l'astate-211 (60 °C / 30 min) sous haute activité et sous haut volume de chloroforme prélevé, nous nous sommes intéressés aux influences respectives du réducteur, du solvant et de l'activité employée sur la dégradation du précurseur 4_N .

Pour cela, nous avons testé différents réducteurs (organiques et inorganiques), différents solvants (ACN, MeOH), et des activités allant de 1 MBq (faible activité) à 50 MBq (haute activité). Avec comme référence le profil CLHP de la source d'astate-211 effectué à son arrivée, nous avons pu comparer les différents profils CLHP d'astate réduit obtenus après ajout du réducteur (Tableau 8). Cette étude comparative met en évidence les différences de comportement de l'astate-211 en fonction du réducteur et des concentrations employés. Nous nous focaliserons sur les réducteurs ayant donné les meilleurs résultats : le sulfite de sodium (Na_2SO_3) et le dithiothréitol (DTT).

A faible activité, que ce soit en acétonitrile ou en méthanol, le sulfite de sodium montre de bons profils de réduction dès 5mg/mL. Cependant, lorsque l'on passe à des activités plus élevées, de l'ordre de 30 à 50 MBq, on observe dans la plupart des cas de mauvais profils de réduction de l'astate. Ces problèmes de réduction peuvent être contournés par l'augmentation de la concentration en sulfite mais s'accompagnent d'une dégradation non négligeable du précurseur 4_N .

Le DTT, à faible activité et à une concentration d'1 mg/mL, présente de bons profils de réduction sans dégradation du précurseur iodonium que ce soit en acétonitrile ou en méthanol. Cependant, à haute activité, cette concentration s'est montrée inefficace pour permettre une bonne réduction de l'astate. A l'inverse du sulfite de sodium, l'augmentation de la concentration à 10 mg/mL a permis d'obtenir de bons profils de réduction sans dégradation du précurseur iodonium 4_N quel que soit le solvant utilisé.

L'hypothèse émise suite à ces résultats était que, lors de marquages à haute activité, le prélèvement important de chloroforme impliquait, dans le milieu de réduction, des concentrations élevées d'impuretés résiduelles qui ne permettaient pas aux deux réducteurs d'effectuer une réduction efficace de l'astate-211. L'augmentation de la concentration de ces

deux réducteurs (10 mg/mL) permettait dans les deux cas une bonne réduction de l'astate mais dans le cas du sulfite, cela impliquait une dégradation partielle du précurseur **4_N**.

Tableau 8 : Tableau comparatif de différents réducteurs/solvants pour le radiomarquage du précurseur **4_N à l'astate-211 selon différentes activités**

Réducteur	Solvant (1:1)	t (red)	[Réducteur]	Réduction (1 à 5 MBq)	Réduction (30 à 50 MBq)	Dégradation 4_N
<p style="text-align: center;"> </p>						
Na ₂ S ₂ O ₅ Métabisulfite de sodium	H ₂ O / ACN	1 min	1 mg/mL	-	/	Pas de dégradation
	H ₂ O / MeOH	1 min	1 mg/mL	+	/	Pas de dégradation
Na ₂ SO ₃ Sulfite de sodium	H ₂ O / ACN	1 min	1 mg/mL	-	/	Pas de dégradation
			5 mg/mL	+	-	Dégradation (2-3 %)
			10 mg/mL	+	+	Dégradation (7-15 %)
	H ₂ O / MeOH	1 min	1 mg/mL	+	-	Dégradation (2-5 %)
			5 mg/mL	+	/	Dégradation (2-5 %)
			10 mg/mL	+	+	Dégradation (3-10 %)
Cystéine	H ₂ O / ACN	1 min	1 mg/mL	+	+	Dégradation (10 %)
			10 mg/mL	/	+	Dégradation (10 %)
	H ₂ O / MeOH	1 min	1 mg/mL	+	/	Pas de dégradation
			10 mg/mL	/	+	Dégradation (10 %)
DTT	H ₂ O / ACN	1 min	1 mg/mL	+	-	Pas de dégradation
			10 mg/mL	/	+	Pas de dégradation
	H ₂ O / MeOH	1 min	1 mg/mL	+	/	Pas de dégradation
			10 mg/mL	/	+	Pas de dégradation
Acide ascorbique	H ₂ O / ACN	1 min	1 mg/mL	-	/	Pas de dégradation
	H ₂ O / MeOH	1 min	1 mg/mL	-	/	Pas de dégradation

+ : bonne réduction - : mauvaise réduction / : non effectué

Pour montrer cette différence de réactivité, deux marquages en parallèle d'une même source d'astate ont été effectués sur 50 MBq d'astate-211 avec pour réducteur le sulfite de sodium et le DTT à une concentration de 10 mg/mL (Figure 74). Sachant que le MeOH dégrade partiellement le précurseur **4_N**, ces deux tests ont été réalisés dans un mélange ACN / H₂O.

A 10 mg/mL, le sulfite de sodium et le DTT donnent de bons profils de réduction avec un pic unique d'astate réduit observé à 1,5 min pour le sulfite (Figure 74B) et à 2,9 min pour

le DTT (Figure 74C). Le précurseur iodonium 4_N a ensuite été ajouté, et ces deux solutions ont été chauffées à 60 °C pendant 30 min.

La solution réduite par le sulfite de sodium a donné un rendement de 70 % (Figure 74D) et une dégradation du précurseur iodonium à hauteur de 6 % (Figure 74F). Pour la solution réduite par le DTT, les chromatogrammes obtenus ont montré un rendement de 79 % (Figure 74E) et une absence détectable de dégradation du précurseur iodonium (Figure 74G).

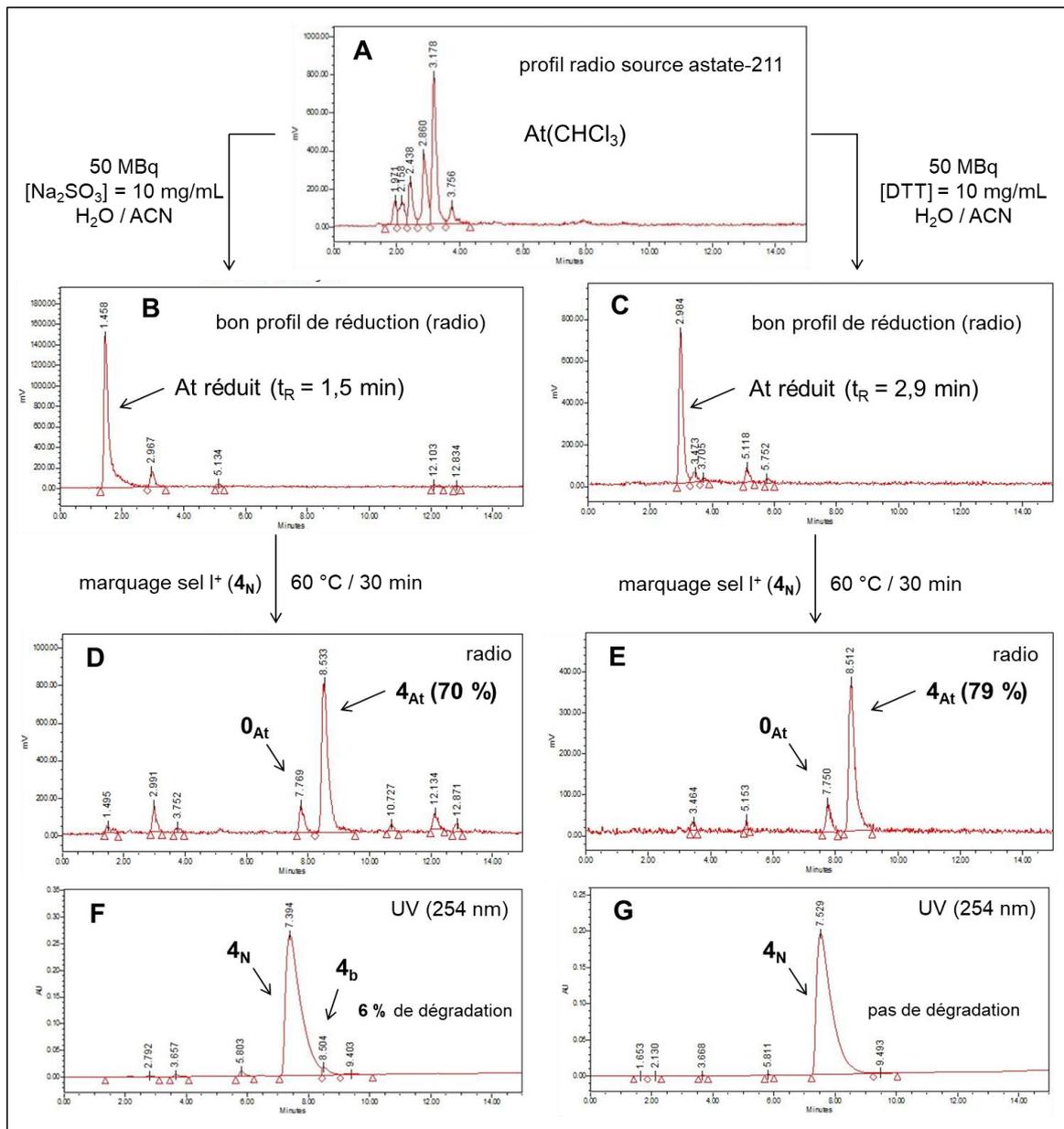


Figure 74 : Comparaison de l'influence du réducteur sur le radiomarquage et la stabilité du précurseur iodonium 4_N

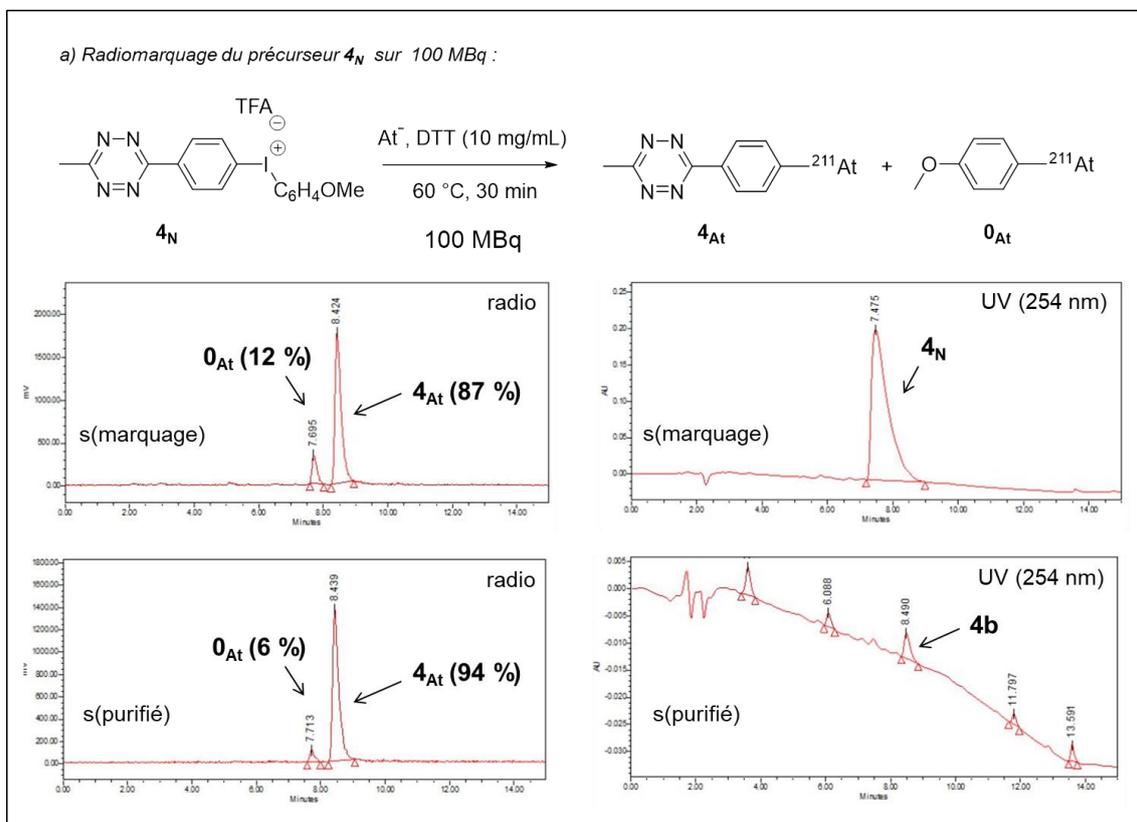
Ces tests de marquage mettent en évidence l'efficacité du DTT pour la réduction de l'astate-211 et la préservation du précurseur iodonium 4_N que ce soit sous hautes ou faibles

activités. Par la suite, l'ensemble des marquages de haute activité (50 à 100 MBq) effectués sur le précurseur tétrazine 4_N ont été réalisés en acétonitrile (ACN) avec une concentration de 10 mg/mL en DTT.

IV-2.2.3. Radiomarquage à haute activité de l'anticorps 9E7.4-TCO

Pour tester ce nouveau procédé de marquage au DTT sur de plus grandes activités d'astate-211 (100 MBq), une nouvelle solution d'anticorps 9E7.4-TCO a été produite à partir de 15 équivalents de TCO-(PEG)₄-NHS. Malgré l'absence de quantification du nombre de TCO greffés par anticorps sur les lots 10, 20 et 50 équivalents décrits précédemment, nous sommes basés sur les résultats obtenus pour l'anticorps-DIBAC ($0,21 \pm 0,05$ DIBAC / IgG 9E7.4) dans l'attente d'une quantification plus précise à l'aide de la Cy5-Tétrazine méthylée. Sachant que la quantité de tétrazine astatée 4_N mise à coupler sur l'anticorps est de plusieurs centaines de fois inférieure à la quantité d'anticorps mis en jeu, cette valeur hypothétique de 0,2 fonction bio-orthogonale par anticorps est convenable pour permettre une quantité suffisante de TCO, tout en limitant l'impact potentiel sur la biodistribution de l'anticorps 9E7.4.

Une série de trois marquages du précurseur 4_N ont été effectués à partir de 100 MBq d'astate-211. Ils ont été réalisés en acétonitrile avec une concentration en DTT de 10 mg/mL (Figure 75a).



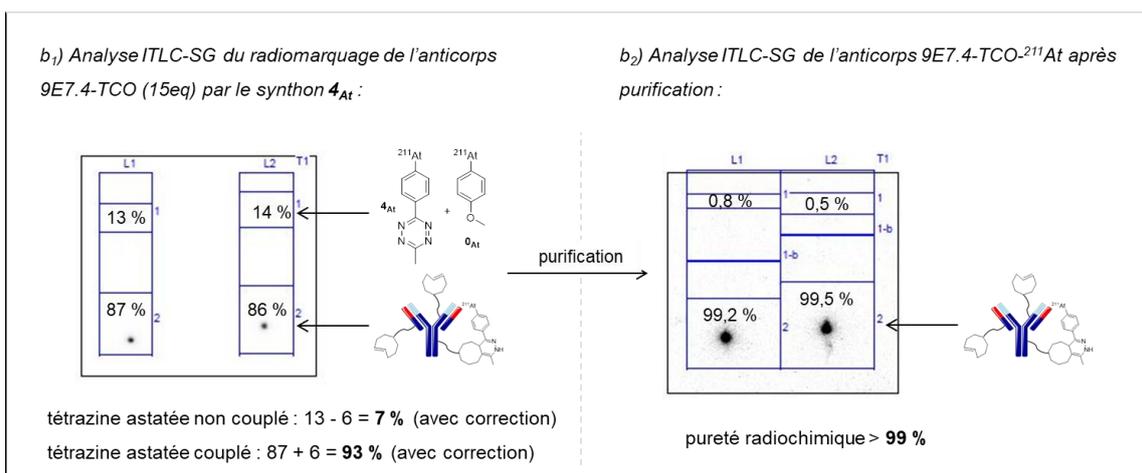


Figure 75 : Exemple de radiomarquage de l'anticorps 9E7.4-TCO (65 MBq) à partir du synthon astaté 4_{At}

Ces solutions radiomarquées ont ensuite été purifiées par Sep-Pak pour donner après évaporation des rendements radiochimiques de $70 \pm 4\%$ avec correction de décroissance (≈ 65 MBq). Chaque lot de tétrazine astatée 4_{At} a ensuite été solubilisé en MeOH et introduit dans une solution d'anticorps 9E7.4-TCO (15 eq). Les rendements de couplage de ces trois marquages ont été évalués à $92 \pm 4\%$ par ITLC-SG en additionnant le pourcentage d'astatoanisole 0_{At} restant (6 %) aux valeurs obtenues par ITLC-SG (Figure 75b₁). Les purifications de ces solutions d'anticorps radiomarqués ont été effectuées à l'aide de colonnes d'exclusion stérique en utilisant le PBS comme éluant. Enfin, la pureté radiochimique de ces solutions d'anticorps a été évaluée à 99 % par ITLC-SG (Figure 75b₂).

Cette voie de marquage par le DTT a fait preuve de son efficacité en donnant des rendements de marquage élevés ($> 80\%$) sous hautes activités (100 MBq). L'absence de dégradation du précurseur 4_N permet de bons rendements de couplage ($> 90\%$) sur l'anticorps 9E7.4-TCO (15eq).

IV-2.2.4. Test d'immunoréactivité et de stabilité sérique

Afin de vérifier que ces modifications chimiques n'avaient pas entravé l'affinité de l'anticorps envers son antigène, des tests d'immunoréactivité ont été effectués à partir de billes magnétiques marquées par un peptide reconnu par l'anticorps 9E7.4. Les tests d'immunoréactivité effectués sur l'anticorps 9E7.4 marqué à l'astate-211 par système TCO-tétrazine ($82 \pm 3\%$) ont donné des résultats similaires à ceux obtenus lors du marquage de cet anticorps par méthode classique SAB ($86 \pm 2\%$)⁵⁹.

De plus, afin de valider la stabilité chimique de ces radiomarquages, des tests de stabilité sérique à $37\text{ }^\circ\text{C}$ ont été effectués et ont montré une bonne stabilité du marquage par

approche bio-orthogonale pendant 8 h avec absence totale de dissociation de l'activité du vecteur (Figure 76).

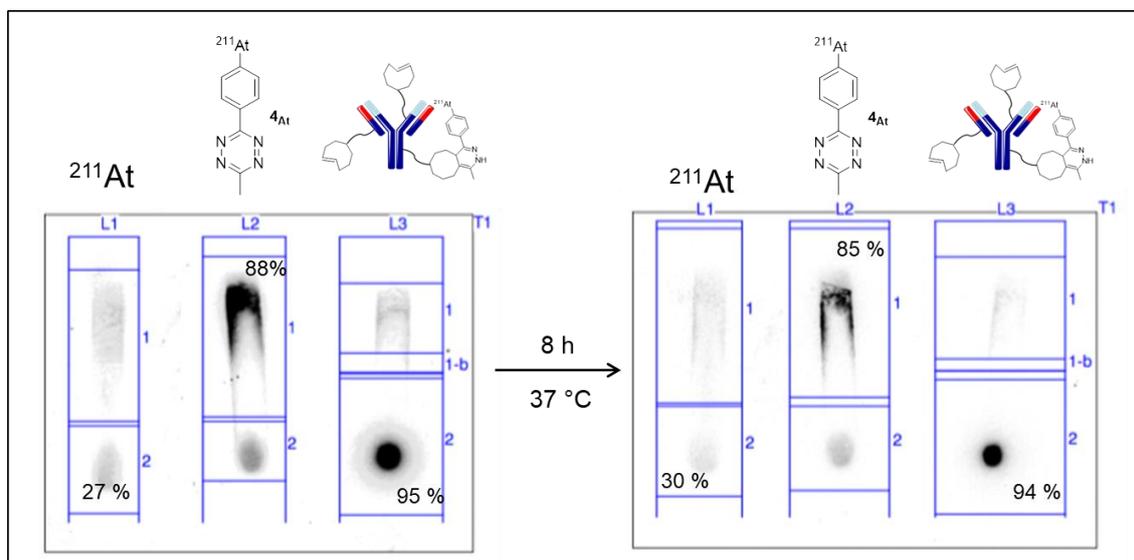
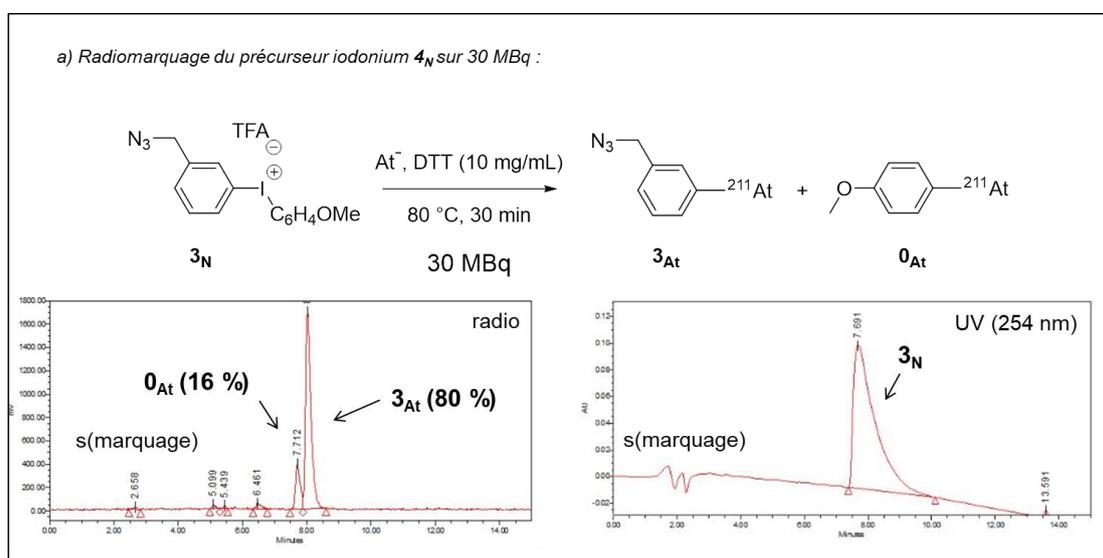


Figure 76 : Test de stabilité sérique de l'anticorps 9E7.4-15eq marqué à l'astate-211 par IEDDA

IV-2.3. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 - système SPAAC

IV-2.3.1. Mise au point du radiomarquage de l'anticorps 9E7.4-TCO

Le transfert du second système bio-orthogonal SPAAC s'est effectué selon le même protocole que l'anticorps-TCO. Le précurseur azoture **3_N** a été radiomarqué (30 MBq) à partir des mêmes conditions déterminées pour le marquage du peptide modèle DIBAC, en remplaçant toutefois le sulfite de sodium par le DTT afin de prévenir les éventuels problèmes de réduction observés avec le sulfite (Figure 77a). Le synthon **3_{At}** obtenu (≈ 18 MBq) a ensuite été couplé à l'anticorps 9E7.4-DIBAC.



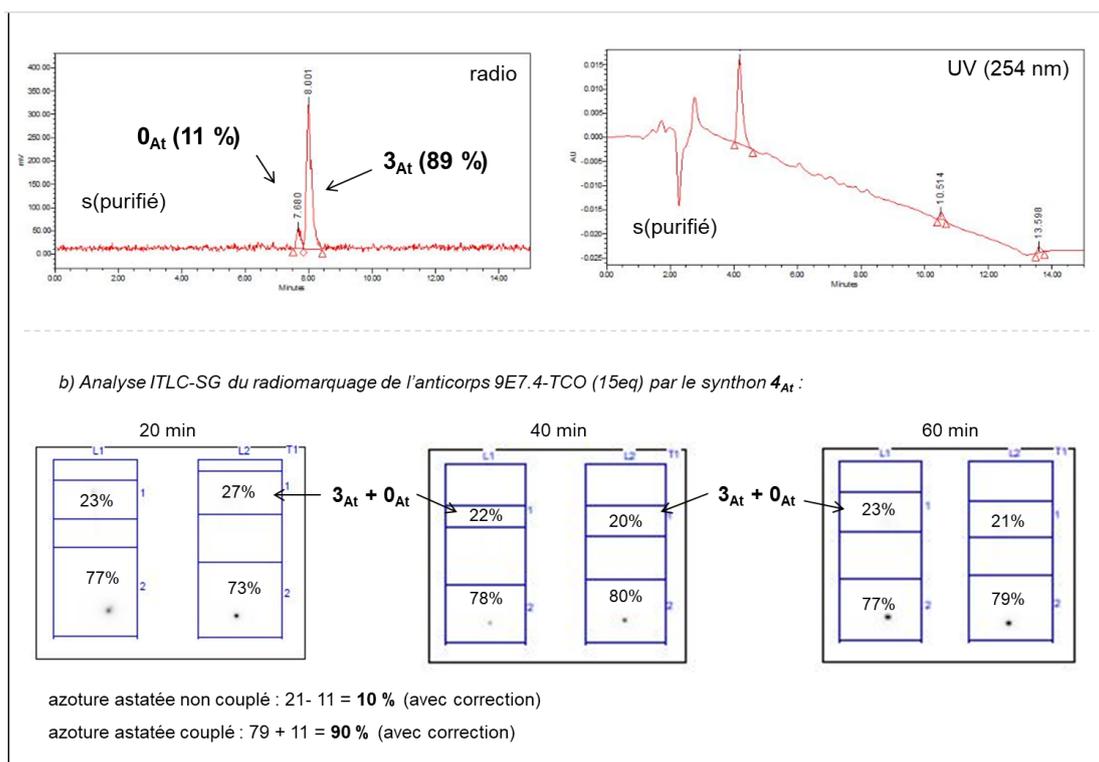


Figure 77 : Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4-DIBAC (18 MBq) à partir du synthon astaté 3_{At}

Malgré la concentration plus faible de DIBAC en solution ($3\ \mu\text{M}$ avec IgG contre $200\ \mu\text{M}$ avec le peptide modèle), la réaction s'est déroulée de la même façon que notre modèle, avec un rendement radiochimique de 90 % en 40 min à température ambiante (Figure 77b). Comme précédemment, ce rendement est déterminé en additionnant le pourcentage d'astatoanisole 0_{At} restant (11 %) aux valeurs obtenues par ITLC-SG.

IV-2.3.2. Test d'immunoréactivité

Comme pour l'anticorps marqué par système TCO-tétrazine, des tests d'immunoréactivité ont été effectués afin de vérifier que ces modifications chimiques n'avaient pas entravé l'affinité de l'anticorps envers son antigène. Les résultats de ces tests ($82 \pm 5\%$) ont été similaires à ceux obtenus lors du marquage de cet anticorps par méthode classique SAB ($86 \pm 2\%$)⁵⁹.

IV-3. Conclusion

L'utilisation des systèmes bio-orthogonaux IEDDA et SPAAC, sélectionnés lors de notre étude préliminaire, a permis de mettre en évidence l'efficacité de ces approches bio-orthogonales appliquées au radiomarquage d'anticorps à l'iode-125 et à l'astate-211. Les marquages effectués sur le mAb 9E7.4 ont donné de très bons résultats avec des

rendements quasi-quantitatifs (> 90 %) en seulement 5 (IEDDA) et 40 minutes (SPAAC). Les tests de stabilité sérique et d'immunoréactivité réalisés sur ces anticorps radiomarqués ont montré une bonne stabilité chimique et une préservation de l'affinité du vecteur vers sa cible biologique.

Comparé au système Lysine-NHS utilisé lors de la méthode classique SIB / SAB ([60-75]%, 30 min), ces nouvelles fonctions de couplage permettent d'imaginer de nouveaux procédés de radiomarquage d'anticorps aux halogènes lourds, mais aussi modulables à d'autres radionucléides de courte période. Il restera cependant à déterminer pour le système SPAAC la stabilité chimique du marquage en milieu sérique, et si le caractère lipophile des groupements TCO et DIBAC fixés sur cet anticorps influence ou non son comportement in vivo. La prochaine étape sera donc d'effectuer des tests de biodistribution afin d'évaluer l'influence de ces nouvelles fonctions de couplage sur la pharmacocinétique de l'anticorps, la dégradation in vivo des liaisons de conjugaison et enfin la stabilité de la liaison carbone-radiohalogène.

V. DEVELOPPEMENT D'UN LINKER TRIFONCTIONNEL POUR LE RADIOMARQUAGE SITE SPECIFIQUE ET BIO-ORTHOGONAL DE VECTEURS IMMUNOLOGIQUES

La seconde partie de ce projet de recherche a consisté à développer d'une nouvelle approche de marquage site-spécifique à partir d'un linker trifonctionnel tétrazine. La structure dissymétrique de ce linker a été choisie pour permettre aux bras recombinants de présenter des réactivités différentes vis-à-vis des groupements thiols (Figure 78a). Ces bras pourront permettre la recombinaison à la fois de deux cystéines issues d'un même vecteur (anticorps) mais aussi de deux cystéines issues de vecteurs différents (protéines). Dans le cas d'un anticorps, afin de minimiser au maximum l'espacement créé entre les deux thiols recombinés, nous avons fait le choix de ne pas utiliser un linker trifonctionnel de type bis-maléimide qui aurait apporté un espacement plus important entre les deux thiols, entraînant un possible changement structural de l'anticorps (Figure 78b).

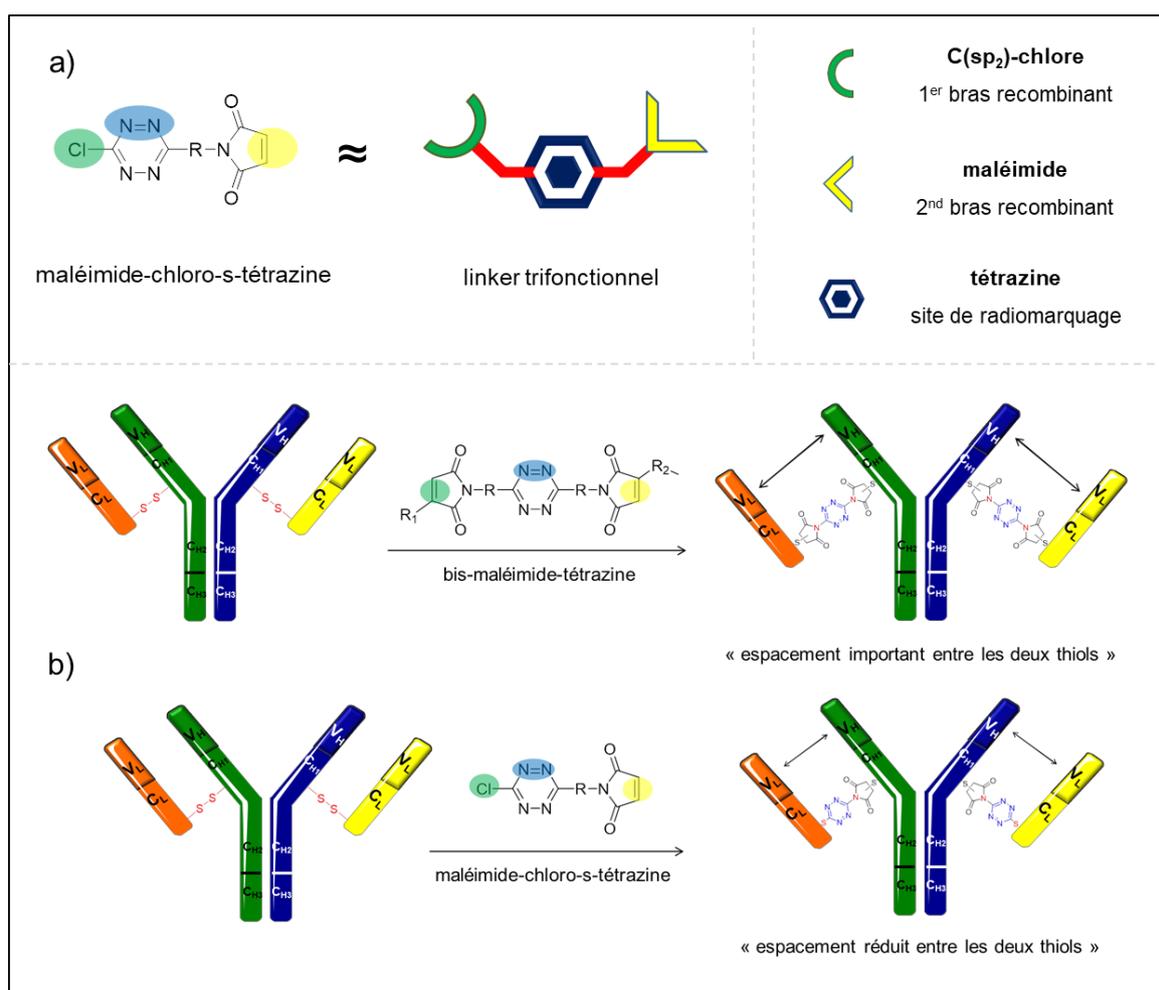


Figure 78 : a) Structure du linker trifonctionnel envisagée / b) influence du linker sur l'espacement des deux thiols recombinés

V-1. Synthèse du linker trifonctionnel

V-1.1. Synthèse de la 1,4-dichlorotétrazine

La synthèse du linker trifonctionnel a consisté premièrement à former la dichloro-s-tétrazine. Ce motif, facilement fonctionnalisable de manière symétrique ou dissymétrique par le biais des carbones portant les atomes de chlore, correspond à la structure centrale du linker. Cette synthèse décrite en 2013 par Tolshchina²⁰⁵ a été réalisé en cinq étapes (Schéma 17).

La première étape a consisté en une triple addition nucléophile de l'hydrazine sur la guanidine avec élimination d'ammoniac pour obtenir la triamino-guanidine correspondante **23**. Une réaction de condensation et de cyclisation a ensuite été effectuée entre la triamino-guanidine **23** et l'acétylacétone dans l'eau pour former la dihydrotétrazine **24** (mécanisme schéma 18).

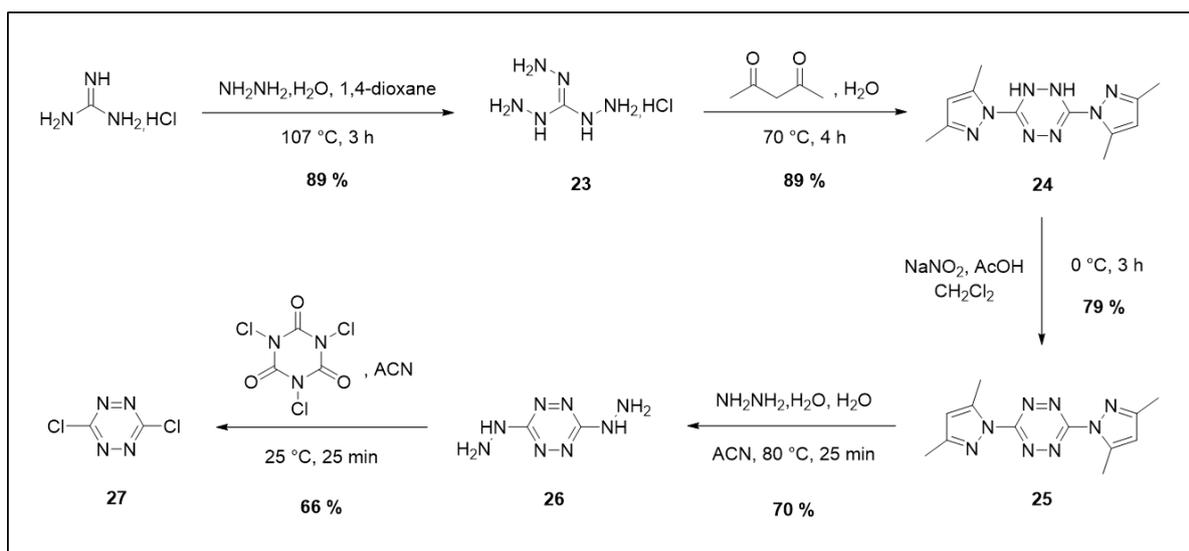


Schéma 17 : Synthèse de la 1,4-dichlorotétrazine (**27**)

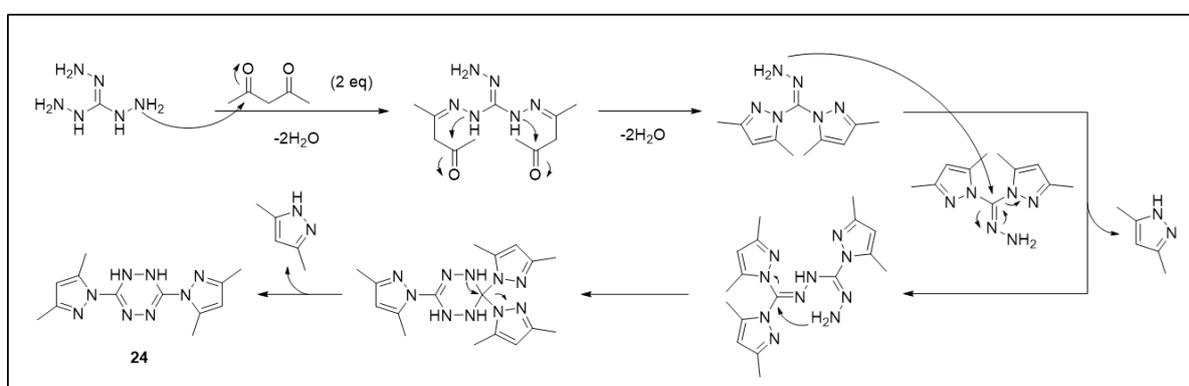


Schéma 18 : Mécanisme de formation de la dihydrotétrazine (**24**)

La tétrazine **25** est obtenue par oxydation en présence de nitrite de sodium (NaNO_2). La dihydrazine-tétrazine **26** est formée par substitution nucléophile de l'hydrazine. Enfin, la 1,4-dichlorotétrazine **27** (dichloro-s-tétrazine) est obtenue par substitution de l'hydrazine par des chlores issus de l'acide trichloroisocyanurique (agent de chloration). La tétrazine dichloro-s-tétrazine **27** a été obtenue avec un rendement global de 28 %.

V-1.2. Synthèse du 2-aminoéthylmaléimide

Le 2-aminoéthylmaléimide **30**, utilisé comme second bras recombinant du linker trifonctionnel, a été obtenu en quatre étapes avec un rendement global de 42 % (Schéma 19). Le groupement maléimide permettra la conjugaison d'une première fonction thiol par addition de Michael. Bien que le couplage via des maléimides présente certains risques (réactions de trans-thiolation), nous avons quand même souhaité étudier cette approche comme modèle de base simple. D'autres fonctions ne présentant pas ces inconvénients (arylpriponitrite²⁰⁶, oxadiazole-méthylsulfone²⁰⁷, etc.) pourront être synthétisées par la suite afin d'optimiser notre approche.

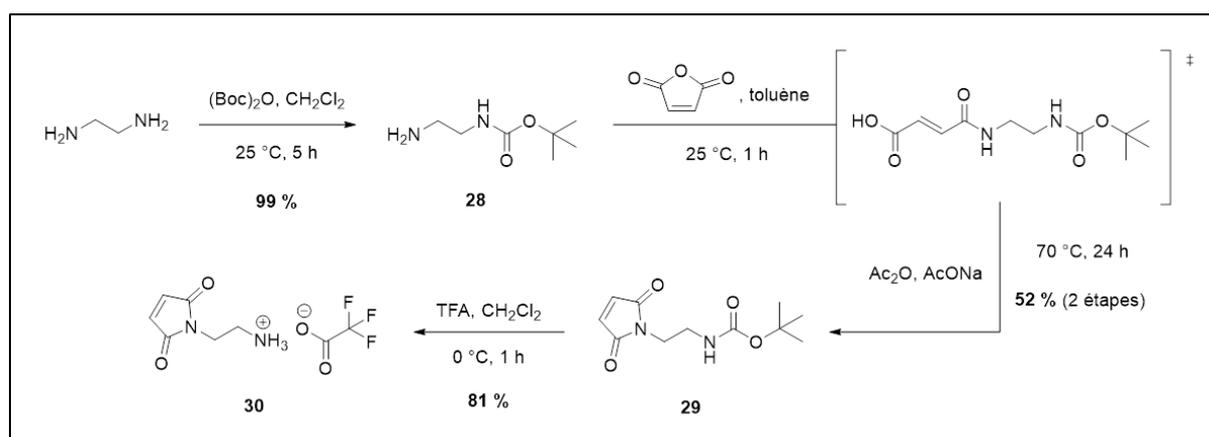


Schéma 19 : Synthèse du 2-aminoéthylmaléimide (**30**)

La synthèse de cette molécule commence par la protection de l'une des deux fonctions amines de l'éthylènediamine par un groupement Boc, à partir du dicarbonate de di-*tert*-butyle ($(\text{Boc})_2\text{O}$), pour donner le composé **28**. Le composé **29** est ensuite formé en deux étapes. La première comprend la substitution nucléophile de l'amine non protégée sur l'un des carbonyles de l'anhydride maléique, et la seconde, en une cyclisation par attaque nucléophile de l'azote du groupement amide sur le second carbonyle pour former le maléimide **29** correspondant. Enfin, le composé **30** est obtenu sous forme de sel de trifluoroacétate en utilisant des conditions classiques de déprotection du groupement Boc (traitement avec de l'acide trifluoroacétique, TFA).

V-1.3. Couplage entre la 1,4-dichlorotétrazine et le 2-aminoéthylmaléimide

Le linker trifonctionnel **31** a été obtenu par substitution nucléophile d'un des chlores de la dichloro-s-tétrazine **27** par le 2-aminoéthylmaléimide **30** en présence de base (DIPEA) avec un rendement de 68 % (Schéma 20). Etant donné la grande réactivité de la dichloro-s-tétrazine et afin de favoriser la mono-substitution, le composé **30** a été ajouté goutte à goutte à la tétrazine dichlorée préalablement refroidie dans la glace et protégée de la lumière. Le motif tétrazine est connu comme étant photosensible.

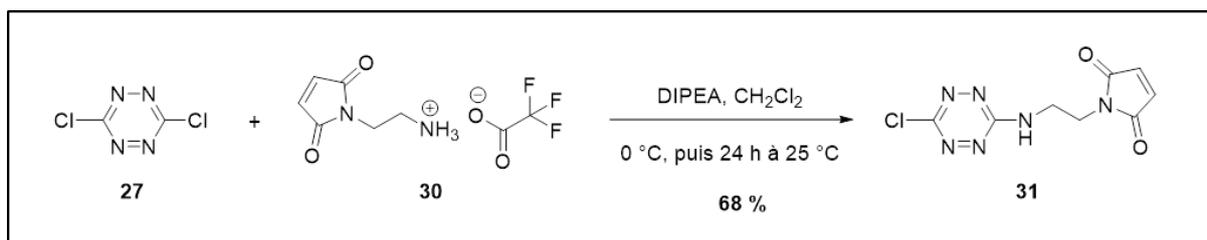


Schéma 20 : Synthèse du linker trifonctionnel maléimide-chloro-s-tétrazine **31**

V-2. Synthèse du précurseur radiomarquable TCO

V-2.1. Synthèses du précurseur stannique-TCO et sa référence iodée froide

Afin de pouvoir radiomarquer à l'iode-125 les vecteurs qui seront couplés à ce linker trifonctionnel, un précurseur stannique **36** muni d'une fonction TCO a été synthétisé ainsi que son analogue iodé **35** utilisé ici comme référence chromatographique pour le suivi de la réaction de radiomarquage du précurseur **35**. L'ester activé iodé **32** a été formé par réaction de l'acide iodobenzoïque avec le *N*-hydroxysuccinimide dans le THF anhydre en présence de DCC (Dicyclohexylcarbodiimide) avec un rendement de 98% (Schéma 21).

L'analogue stannique **33** était quant à lui disponible au laboratoire. Les composés **35** et **36** ont ensuite été synthétisés, en une étape, par attaque nucléophile de l'amine du composé TCO **33** (obtenu commercialement) sur les carbonyles des composés **32** et **34** en présence de base (DIPEA) avec des rendements respectifs de 44 et 62 % (Schéma 21). Le produit **36** pourra ainsi être radiomarqué à l'iode-125 puis couplé à la fonction tétrazine du linker trifonctionnel après recombinaison de deux thiols (mise au point du marquage en cours de réalisation).

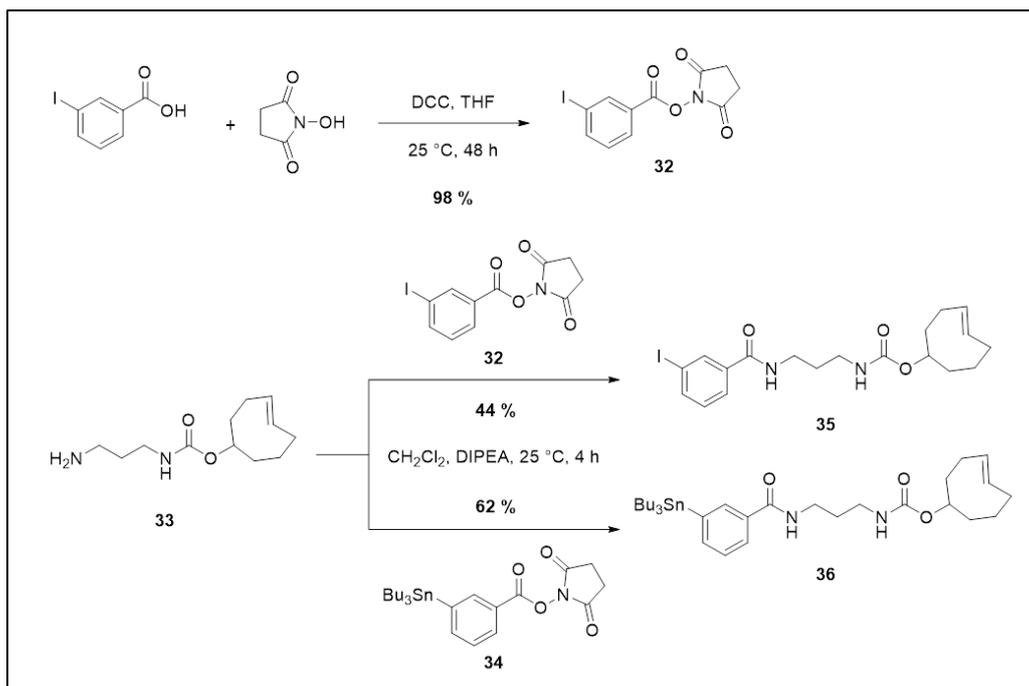


Schéma 21 : Synthèses du précurseur stannique-TCO 36 et de son analogue iodé 35

V-3. Evaluation et optimisation du couplage de thiols sur le linker trifonctionnel tétrazine

Afin de déterminer la faisabilité du couplage entre le linker trifonctionnel **31** et les thiols présents sur les protéines, des tests de réactivité avec des molécules modèles simples ont été effectués pour évaluer les conditions optimales de couplage. De plus, sachant que les protéines possèdent différentes fonctions nucléophiles pouvant réagir avec le maléimide et le carbone portant le chlore (en particulier les chaînes latérales des lysines et cystéines), des tests de compétition en présence de thiols et d'amines ont également été effectués pour évaluer la spécificité du couplage des thiols sur des composés de type protéine.

V-3.1. Tests de couplage de thiols sur le linker trifonctionnel

Pour tester la possibilité de coupler deux thiols sur le linker **31** (addition sur le maléimide et substitution du chlore), nous avons dans un premier temps envisagé comme molécule modèle la cystéine. Ce premier test a été effectué avec 1 équivalent de linker trifonctionnel **31** et 2 équivalents de cystéine à différents pH (PBS : pH = 7,4 / borate : pH = 8,2) et différentes températures (25 °C et 37 °C). Quelles que soient les conditions, on observe d'après le suivi par spectrométrie de masse, uniquement l'addition d'un thiol au niveau du maléimide, et aucune substitution sur le carbone portant le chlore n'a été observée (Figure 79). Ce test met en évidence la plus faible réactivité du site chloré.

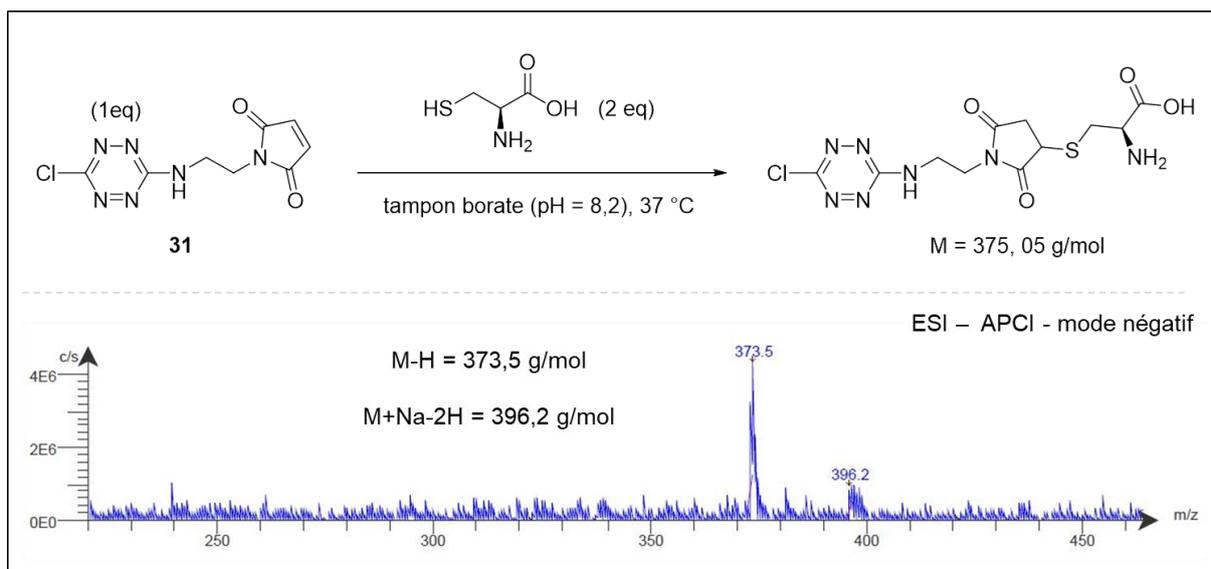


Figure 79 : Mono-addition (A_D) de la cystéine sur le maléimide du linker trifonctionnel 31 déterminé par spectrométrie de masse

Pour expliquer cette mono-substitution, l'hypothèse a été émise que la présence des fonctions acide carboxylique et amine dans l'environnement proche de la cystéine pourraient altérer la nucléophilie de la fonction thiol. Nous avons donc choisi de repartir sur un dérivé thiolé encore plus simple, le 3-chloro-1-propanethiol (Figure 80).

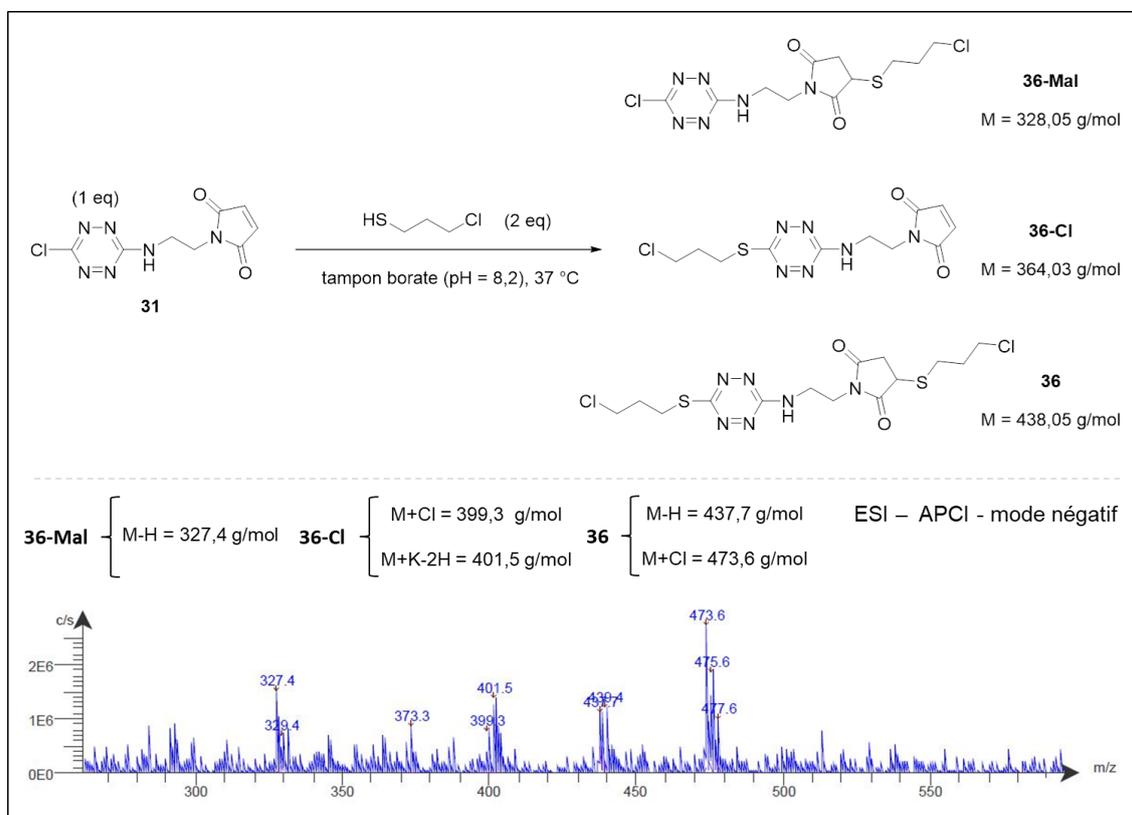


Figure 80 : Double addition ($A_D + S_N$) du 3-chloro-1-propanethiol sur le linker trifonctionnel 31 déterminé par spectrométrie de masse

Le test a été réalisé pendant 30 minutes à 25 °C en tampon borate (pH = 8,2), et a conduit à un mélange de mono et de double addition des thiols sur le linker trifonctionnel **31** (Figure 79). Les résultats des couplages ont été présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Evaluation du couplage du linker trifonctionnel 31 avec la cystéine et le 3-chloro-1-propanethiol

Réactifs	Nbre éq.	pH	T°C	Base	Résultats	
					Addition Maléimide	Substitution Chlore
	2	PBS (pH = 7,4)	25 °C	Et ₃ N		
Cystéine	2	PBS (pH = 8,2)	25 °C	/	oui	non
	2	PBS (pH = 8,2)	37 °C	/		
3-chloro-1-propanethiol	2	PBS (pH = 8,2)	25 °C	/	oui	oui

V-3.2. Tests de compétition en présence d'amines

Afin de simuler la présence d'amines sur les protéines qui peuvent entrer en compétition avec les thiols, nous avons étudié le couplage du 3-chloro-1-propanethiol sur le linker trifonctionnel **31** en présence d'une amine modèle, la propylamine, ajoutée en excès. Dans un premier temps, nous avons réalisé ce couplage en PBS (pH = 7,4) en présence de 2 équivalents de propylamine et 2 équivalents de 3-chloro-1-propanethiol. La double addition des thiols sur le linker trifonctionnel **31** a été observée.

Pour simuler le grand nombre de lysines présentes sur les protéines par rapport aux cystéines, nous avons ensuite augmenté la quantité d'amines à 20 équivalents et nous avons observé, par spectrométrie de masse, le couplage de la propylamine et du 3-chloro-1-propanethiol soit sur le maléimide ou soit sur le carbone portant le chlore (Figure 81).

Une analyse RMN du produit obtenu permettra de déterminer le site de couplage de la propylamine. Toutefois, au vu de l'excès d'amine et de la différence de réactivité des deux sites d'accroche, nous pouvons supposer que l'amine, moins nucléophile que le thiol, s'additionnera préférentiellement sur le maléimide suivi du thiol sur le carbone portant le chlore.

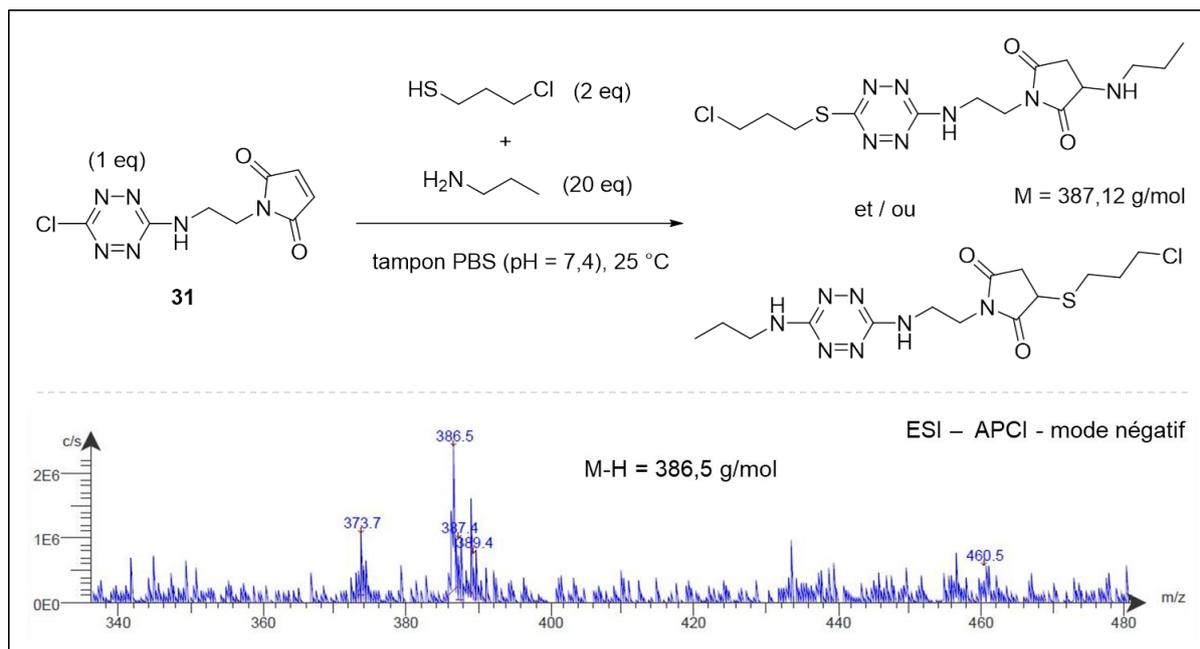


Figure 81 : Double addition ($A_D + S_N$) d'un mélange de propylamine (20 eq) et de 3-chloro-1-propanethiol (2 eq) à pH = 7,4 sur le linker trifonctionnel 31 déterminé par spectrométrie de masse

Finalement, en diminuant le pH pour atténuer la nucléophilie de l'amine nous avons obtenu une sélectivité complète pour la substitution par deux thiols. Les résultats de ces trois couplages sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Evaluation du couplage du linker trifonctionnel 31 avec le 3-chloro-1-propanethiol et la propylamine selon différents pHs et différents nombre d'équivalents

Réactifs	Nbre eq.	pH	Résultats			
			Addition sur Mal		Substitution sur Chlore	
			SH	NH ₂	SH	NH ₂
thiol	2	PBS	oui	non	oui	non
amine	2	pH = 7,4				
thiol	2	PBS	Oui (SH ou NH ₂)		Oui (SH ou NH ₂)	
amine	20	pH = 7,4				
thiol	2	PBS	oui	non	oui	non
amine	20	pH = 6,5				

thiol : 3-chloro-1-propanethiol et **amine** : propylamine

V-4. Couplage entre le linker trifonctionnel et l'affitine C5

Pour valider ces résultats de couplage sur une protéine d'intérêt, nous avons réalisé un test préliminaire de recombinaison de deux cystéines présentes sur l'acide aminé terminal de l'affitine C5 utilisée contre le staphylocoque doré. L'affitine C5 native, ne présentant pas de cystéine dans sa structure, a été modifiée par notre laboratoire pour y insérer une cystéine en C-terminal (C5-C_{TER}). Cette insertion a permis la création d'un site d'accroche spécifique sur l'affitine sans altérer son affinité. Cette cystéine permet à cette affitine de se combiner naturellement sous forme dimérique par formation de pont disulfure.

L'affitine C5-C_{TER} a premièrement été réduite sous forme monomérique par action du réducteur tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP). L'affitine monomérique résultante a ensuite été purifiée par ultrafiltration et mise en tampon PBS/EDTA (pH = 7,4), l'EDTA permettant de capter les métaux pouvant catalyser la reformation de l'affitine sous forme dimérique. Enfin, le linker trifonctionnel **31** a été ajouté en large défaut (0,25eq) à cette solution pour éviter toute saturation des thiols de l'affitine (Figure 82).

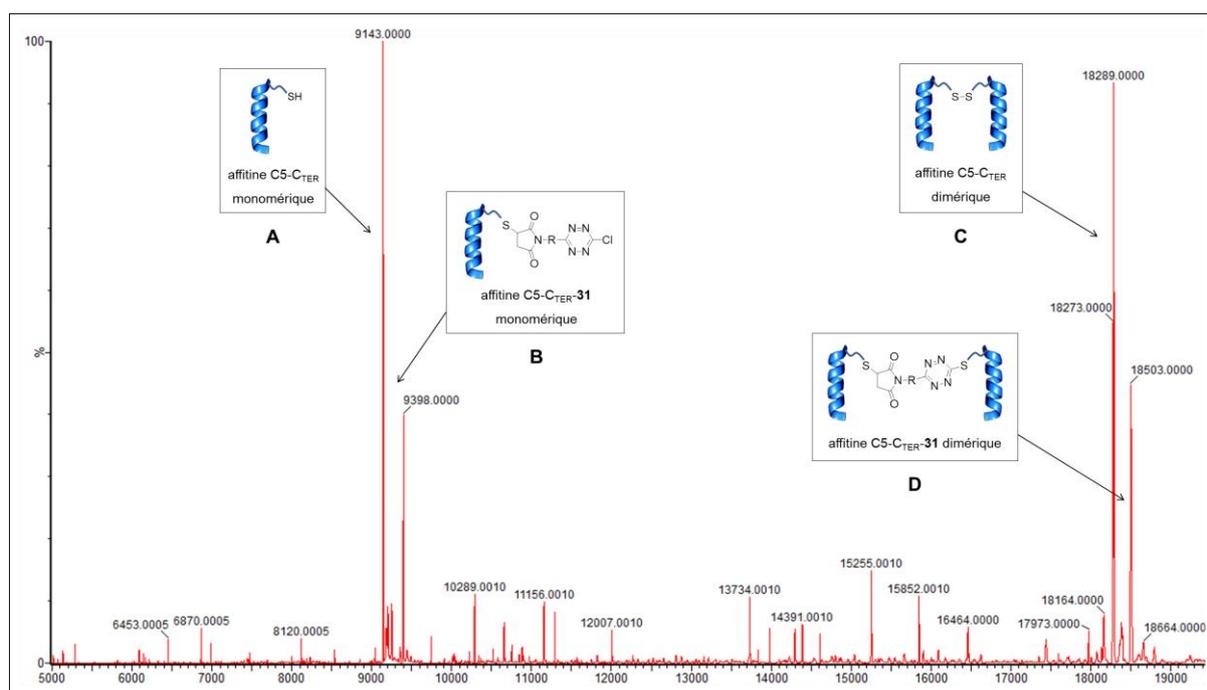


Figure 82 : Spectre de masse du couplage entre le linker trifonctionnel **31** et l'affitine C5-C_{TER} sous forme monomérique

Le spectre de masse de cette réaction a montré, dans des proportions modestes mais toutefois prometteuses, la recombinaison de l'affitine sur le linker trifonctionnel (**D**) à hauteur de [20-30] % par rapport à la quantité de linker mise en jeu. Comme observé lors du couplage de la cystéine (Figure 78), le maléimide est le premier groupement à subir

l'addition d'un thiol (**B**). Cependant, la grande proportion d'affitine monomérique et dimérique restante après une nuit de couplage (**A+C**) nous suggère que ces conditions restent encore à optimiser. Malgré cela, ce test préliminaire a permis de faire la preuve de ce concept quant à l'utilisation de ce linker pour la recombinaison de ponts disulfures.

V-5. Conclusion

Bien qu'étant à son stade préliminaire, cette étude a permis de mettre en évidence la possible recombinaison de ponts disulfures à partir du linker trifonctionnel tétrazine **31**. Les tests réalisés à pH acide ont montré une bonne sélectivité pour l'addition de groupements thiols, même en présence d'un large excès d'amines compétitrices. Nous avons réalisé un test de recombinaison de deux cystéines présentes sur une protéine d'intérêt (affitine C5) et, bien que les conditions réactionnelles de ce test restent à optimiser, nous avons obtenu des résultats encourageants sur le repontage de ponts disulfures. Nous avons ainsi, par cette approche, créé un nouveau vecteur, une double affitine bivalente, dont l'originalité est de posséder un site unique de radiomarquage. Cette preuve de concept répond donc à l'un des principaux objectifs de ce travail de thèse.

En parallèle, nous avons réalisé la synthèse d'un synthon radiomarquable **36** à l'iode radioactif comportant une fonction bio-orthogonale qui pourra se coupler à la tétrazine de notre linker. Ce précurseur sera prochainement radiomarqué afin de valider le concept du radiomarquage site-spécifique par couplage bio-orthogonal IEDDA. Notre approche devrait permettre le développement de nouveaux vecteurs possédant des sites de radiomarquage bien définis en nombre et en localisation, ce qui serait une réelle amélioration par rapport aux approches classiques basées sur le couplage aux lysines des protéines.

CONCLUSION GENERALE

Depuis les années 2000, la chimie bio-orthogonale a été appliquée à un nombre croissant d'applications biomédicales dans le but d'apporter de nouvelles solutions aux problèmes anciens observés lors de la bio-conjugaison de molécules actives (synthons radioactifs, médicaments) sur des vecteurs immunologiques d'intérêt (ADC, radiopharmaceutiques). Plus particulièrement en médecine nucléaire, de nouvelles approches alternatives de bio-conjugaison ont été étudiées pour résoudre les problèmes de reproductibilité observés sur les méthodes classiques utilisées pour le marquage de protéines et de peptides à l'iode radioactif et à l'astate-211. Les méthodes conventionnelles permettant la fixation de ces radionucléides sur une molécule vectrice consistent à effectuer la radiohalogénéation d'un précurseur stannique ou iodonium doté d'une fonction *N*-hydroxysuccinimide réagissant avec les lysines de la biomolécule. Cependant, les problèmes d'hydrolyses partielles survenant lors du couplage de ces synthons radioactifs, conduisent à des rendements de couplages non optimaux (70 %), amenant à des pertes importantes de radioactivité.

Pour pallier ces limites et simplifier ces approches de radiomarquage, **la première partie** de ce projet a donc été de mettre au point une méthode alternative de radiomarquage d'anticorps aux halogènes lourds basée sur l'utilisation de fonctions bio-orthogonales. Etant donné l'abondance de systèmes bio-orthogonaux développés au cours de la dernière décennie, une sélection et une comparaison de ces systèmes nous ont paru nécessaires avant de développer des traceurs spécifiques radiomarqués selon cette stratégie de bio-conjugaison. Pour cela, une série de précurseurs bifonctionnels et de peptides modèles cliquables ont d'abord été conçus dans le but d'établir une étude comparative des différents systèmes de couplage bio-orthogonaux les plus utilisées à ce jour. Au départ, le choix des précurseurs bifonctionnels s'est orienté vers quatre molécules munies de fonctions bio-orthogonales alcyne vrai, azotures, tétrazine, et d'une fonction tributylétain comme site de radiomarquage électrophile. Un problème a toutefois été rencontré pour trois de ces précurseurs. En effet, après insertion de la fonction tributylétain sur ces composés, la trop faible différence de polarité entre eux et le réactif organostannique ne nous a pas permis de réaliser une purification efficace de ces précurseurs stanniques.

Pour contourner ce problème, nous avons choisi d'utiliser une méthode alternative de radiomarquage basée sur la chimie des sels d'iodonium. Les quatre précurseurs cliquables envisagés au départ ont donc été synthétisés avec cette nouvelle fonction et ont été obtenus avec succès. Au final, nous avons développé cinq précurseurs cliquables, dont un muni d'un site de radiomarquage électrophile (stannique), et quatre munis d'un site de radiomarquage nucléophile (iodonium).

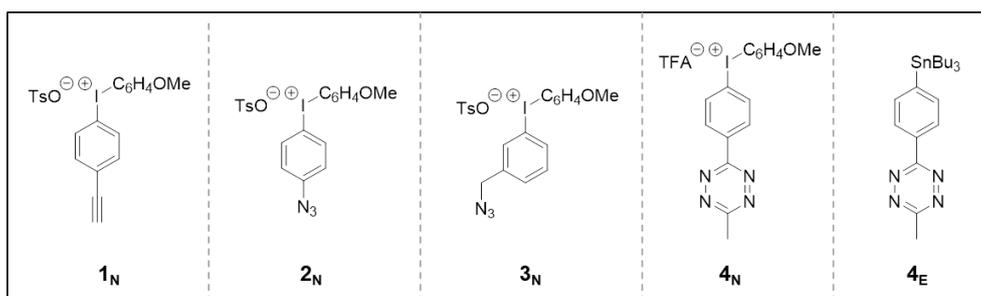


Figure 83 : Précurseurs bifonctionnels synthésés

Les radiomarquages de ces précurseurs ont été réalisés à l'iode-125 et à l'astate-211 selon deux voies de marquage. Le précurseur stannique **4_E** par démétallation électrophile aromatique, et les précurseurs idonium **1_N**, **2_N**, **3_N** et **4_N** par substitution nucléophile aromatique. Comme décrits récemment dans la littérature⁷⁰, les résultats obtenus nous ont révélé une différence significative de réactivité entre l'iode-125 et l'astate-211. Malgré de bons rendements de marquage pour chaque précurseur à l'astate-211, seuls deux ont été retenus pour la suite de notre projet : les précurseurs **3_N** et **4_N**. Les raisons en sont les pertes radioactives importantes associées à la purification du précurseur **4_E** et la grande volatilité et instabilité thermique des précurseurs **2_N** et **3_N** ne permettant pas une purification efficace sans produit froid issu de la dégradation du précurseur.

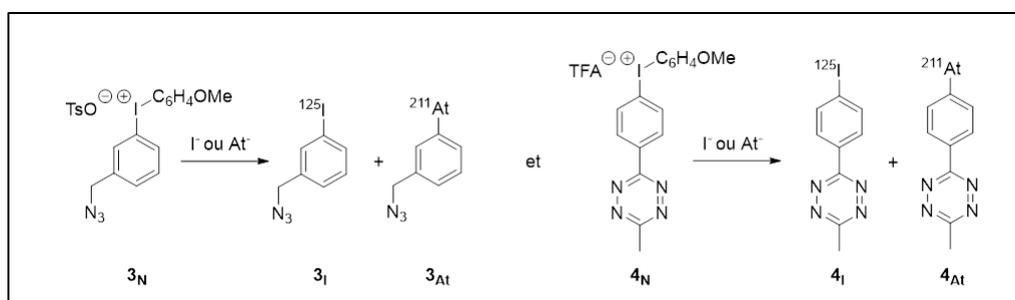


Figure 84 : Précurseurs **3_N** et **4_N** retenus pour l'étude cinétique comparative

Ensuite, afin de réaliser une étude comparative de différents systèmes bio-orthogonaux, nous avons développé quatre peptides modèles cliquables munis de fonctions bio-orthogonales complémentaires de celles présentes sur les deux précurseurs bifonctionnels sélectionnés.

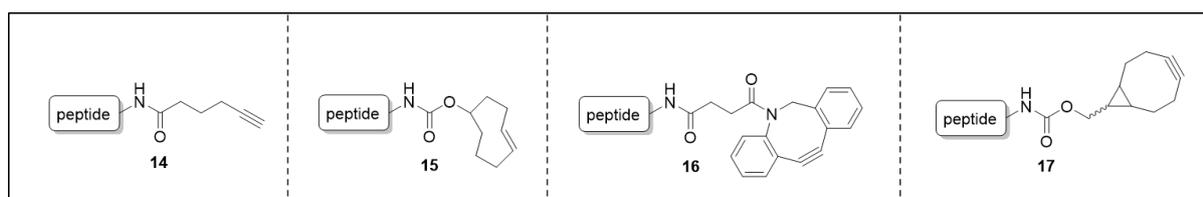


Figure 85 : Peptides cliquables développés

Les 5 systèmes bio-orthogonaux étudiés par ces quatre peptides cliquables **14**, **15**, **16**, **17** et ces quatre synthons radiomarqués **3_I** / **3_{At}** et **4_I** / **4_{At}** ont tous conduit à des rendements radiochimiques quantitatifs. Comme espéré, le système IEDDA (TCO-Tz) a été le plus rapide avec des rendements quantitatifs en moins d'une minute. Après optimisation, la CuAAC (Alk-N₃) a été le deuxième système le plus rapide ([5-10] min), suivis du système IEDDA (BCN-Tz, 15 min) et des deux systèmes SPAAC (DIBAC-N₃ / BCN-N₃) aux cinétiques bien plus lentes ([45-60] min et plusieurs heures).

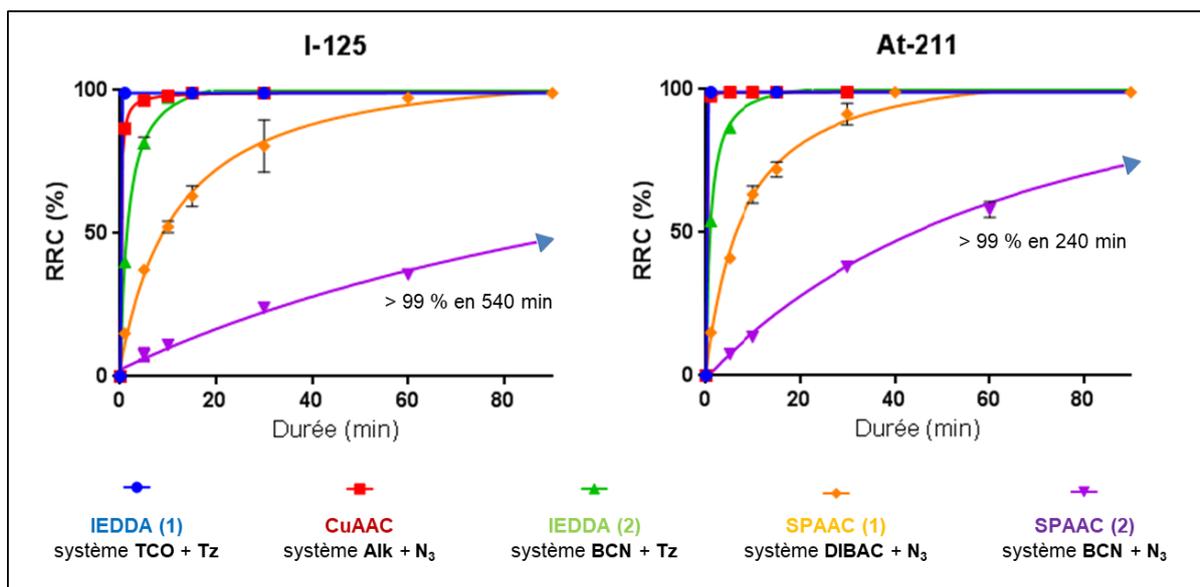


Figure 86 : étude comparative de 5 systèmes bio-orthogonaux

Etonnamment, les réactions de cycloaddition ont été plus rapides avec les synthons astatés qu'avec les synthons radioiodés. Bien qu'elle ne soit pas évidente pour les systèmes les plus rapides (IEDDA, CuAAC), cette observation est particulièrement marquée pour le système SPAAC le plus lent (BCN-N₃) où le temps de demi-réaction ($t_{1/2}$) était presque divisé par deux avec le synthon astaté par rapport au synthon iodé. Cette différence laisse sous-entendre l'influence éventuelle de la lipophilie amenée par le radionucléide (¹²⁵I, ²¹¹At) fixé sur le synthon. Pour tenter d'apporter une réponse à ce phénomène, nous avons mesuré les coefficients de partage eau / octanol des synthons azotures **3_I** / **3_{At}** et avons observé une légère différence de lipophilie entre ces deux synthons, sans néanmoins qu'elle soit assez significative pour conforter notre hypothèse.

Cette étude réalisée sur des peptides modèles a démontré, sur un modèle simple, l'efficacité des approches bio-orthogonales pour le radiomarquage aux halogènes lourds. Deux d'entre elles ont été retenues pour le transfert vers le radiomarquage d'anticorps : la réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électron entre une tétrazine et un trans-cyclooctène, et la réaction de cycloaddition assistée par contrainte stérique entre un azoture

et un cyclooctyne (DIBAC). Le choix de prendre deux systèmes aux cinétiques particulièrement différentes visait à évaluer l'influence de cette transposition sur leur cinétique de couplage.

Le transfert de ces deux approches bio-orthogonales a été réalisé sur l'anticorps monoclonal 9E7.4 dirigé contre le CD138, antigène surexprimé sur les cellules de myélome multiple¹⁸⁷. Comme pour le peptide modèle, cette transposition a nécessité l'introduction de fonctions TCO et DIBAC sur les résidus lysines de l'anticorps. Après modification, ces lots d'anticorps ont été radiomarqués avec les synthons **3_I** / **3_{At}** et **4_I** / **4_{At}** et ont donné, après optimisation des conditions de réduction, de très bons résultats avec des rendements quasi-quantitatifs (> 90 %) en seulement 5 (IEDDA) et 40 minutes (SPAAC). De plus, les tests de stabilité sérique et d'immunoréactivité réalisés sur ces anticorps radiomarqués ont souligné une bonne stabilité chimique et une préservation de l'affinité du vecteur envers sa cible biologique. Par comparaison avec le système Lysine-NHS utilisée lors de la méthode classique SIB / SAB ([60-75]%, 30 min), ces nouvelles fonctions de couplage ont permis d'entrevoir de nouvelles approches de radiomarquage d'anticorps à l'astate-211 plus efficaces, mais aussi adaptables à tout autre radionucléide de courte période utilisé au sein de notre laboratoire (bismuth-213, cuivre-64, etc.).

Toutefois, la vitesse et les rendements de couplage ne doivent pas être présentés comme les seuls paramètres à prendre en compte. Bien que le couple TCO-tétrazine donne de bons rendements en quelques minutes, il entraîne la formation de formes tautomères pouvant amener à une stabilité variable de la liaison carbone-radiohalogène et à un manque d'homogénéité du produit radiopharmaceutique obtenu. De plus, le couple DIBAC-azoture, malgré une cinétique de couplage toujours adaptée à l'astate-211, apporte un nombre important de carbone à la surface du vecteur, créant potentiellement des zones hydrophobes pouvant aussi modifier la distribution naturelle du vecteur dans l'organisme. Par conséquent, les perspectives de ce projet consisteront à effectuer des tests de biodistribution sur ces lots d'anticorps radiomarqués afin d'évaluer l'influence des fonctions de couplage TCO et DIBAC sur la pharmacocinétique de l'anticorps et sur la stabilité chimique du marquage in vivo.

La seconde partie de ce projet, en lien avec la première, s'est intéressée au radiomarquage de vecteurs immunologiques avec toutefois une problématique qui se veut plus générale. La majorité des techniques visant à radiomarquer une biomolécule utilisent, comme site d'accroche, des fonctions chimiques naturellement présentes à leur surface (amines, thiols). Pourtant, l'utilisation de ces fonctions amène plusieurs complications qui

vont de l'impossibilité de contrôler précisément le nombre de radionucléides que l'on fixe, à la perte éventuelle d'affinité de la molécule vectrice après modification, rendant certaines méthodes peu reproductibles et peu transférables pour des applications cliniques. Afin de résoudre ces limites, nous avons développé dans cette partie une nouvelle méthode de radiomarquage site spécifique adaptable à différents vecteurs (anticorps, affinites) et différents radionucléides. Le principe a donc été de synthétiser un linker trifonctionnel innovant capable, d'une part, de s'insérer régiosélectivement sur un anticorps, et d'autre part, de permettre la recombinaison de protéines, tout ceci via les cystéines (ponts disulfures) de ces vecteurs. Ce linker permet potentiellement l'introduction contrôlée d'un site unique de radiomarquage avec l'assurance de ne pas avoir modifié l'affinité du vecteur envers sa cible biologique. Dans l'optique de pouvoir être adaptable aux anticorps et aux protéines, une structure asymétrique de ce linker a été envisagée. Cette asymétrie aurait pour rôle de permettre aux bras recombinants de présenter des réactivités potentiellement différentes vis-à-vis des cystéines devant être recombinées.

Dans ce but, un motif chlorotétrazine a été choisi afin de minimiser l'espacement entre les deux cystéines (cas des anticorps) par comparaison avec un bismaléimide. Ce linker trifonctionnel **31** a été synthétisé par couplage entre le motif dichloro-s-tétrazine et le 2-aminoéthylmaléimide. Afin de pouvoir radiomarquer à l'iode-125 les vecteurs qui seront couplés à ce linker, un précurseur stannique **36** muni d'une fonction TCO a été synthétisé.

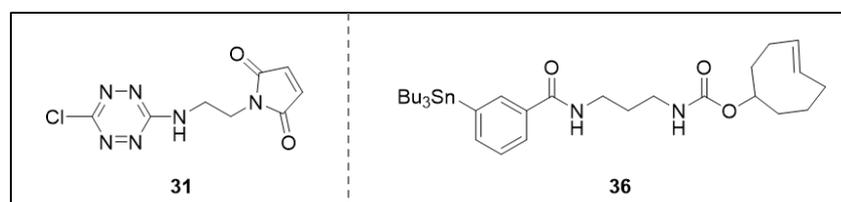


Figure 87 : Linker trifonctionnel **31** et précurseur stannique **36** synthétisés

Nous avons dans un premier temps évalué la faisabilité du couplage de deux thiols sur ce linker à partir d'une molécule thiolée simple : le 3-chloro-1-propanethiol. Ensuite, nous avons effectué des tests de compétition en présence d'amines pour simuler le grand nombre de lysines présentes sur les protéines par rapport aux cystéines. Différents équivalents d'amines et différents pH ont été évalués et finalement, en diminuant le pH pour atténuer la nucléophilie de l'amine, nous avons obtenu une sélectivité complète pour la substitution par deux thiols. Enfin, nous avons réalisé un test préliminaire de recombinaison de deux cystéines présentes sur une protéine d'intérêt (affitine C5) et, bien que les conditions réactionnelles de ce test restent à optimiser, nous avons obtenu des résultats encourageants sur le repontage de pont disulfure.

Le précurseur stannique **36** sera prochainement radiomarcué afin de valider le concept du radiomarquage site-spécifique par couplage bio-orthogonal IEDDA sur la tétrazine de notre affitine C5 recombinaison. Si les résultats s'avéraient positifs, la synthèse d'un analogue idonium-TCO pourrait être envisagée afin de simplifier la purification du synthon TCO radiomarcué. De plus, au vu du faible caractère électrophile du carbone portant le chlore, une structure différente de notre linker pourrait être envisagée. Les possibilités seraient de modifier l'hétéroatome permettant la fixation du groupement maléimide (dans notre cas un azote) par un atome plus électronégatif comme l'oxygène qui appauvrirait le cycle tétrazine rendant ce carbone plus sujet à la substitution nucléophile.

Cette étude préliminaire nous a permis de démontrer la recombinaison sélective de ponts disulfures sur notre linker trifonctionnel tétrazine **31** en présence d'autres fonctions nucléophiles. Le test effectué sur l'affitine-C5 nous a permis d'entrevoir la possibilité de développer de nouveaux vecteurs immunologiques bivalents à site unique de radiomarquage. Après cette preuve positive de concept sur des protéines, il restera à réaliser des tests de recombinaison de ponts disulfures présents entre les chaînes lourdes et légères d'un anticorps afin d'évaluer l'efficacité de notre approche sur ce type de vecteur, et dans un second temps, de voir si l'espacement apporté par notre linker influence de manière importante l'intégrité structurale de l'anticorps par comparaison avec les linkers actuels de type bismaléimide.

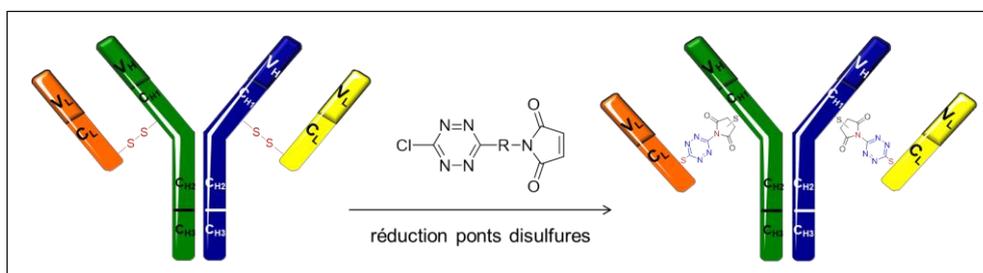


Figure 88 : Perspectives de recombinaison de ponts disulfures sur un anticorps

En conclusion, le travail accompli dans cette thèse a permis le développement de nouveaux procédés de radiomarquage aux halogènes lourds d'intérêt pour la médecine nucléaire. Mais ces procédés sont potentiellement applicables à d'autres domaines de la médecine. Ils pourraient optimiser certaines méthodes actuelles utilisées lors du développement d'ADC, des techniques d'imagerie utilisant la résonance magnétique, ou encore la fluorescence. Et ainsi, comme tant d'autres, ces travaux peuvent apporter leur pierre à l'édifice de la médecine.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie 1 : Développement du radiomarquage d'anticorps à l'iode et à l'astate-211 à partir de réactions bio-orthogonales

I. Synthèses organiques

Produits commerciaux :

Les réactifs commerciaux ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Merk), FluoroChem et Tokyo Chemical Industry (TCI), à l'exception des composés **11**, **11-PEG** et **12** fournis par Click Chemistry Tools.

Solvants :

Les solvants ont été obtenus chez Biosolve et ThermoFischer. Lorsqu'ils sont précisés anhydres dans les protocoles, les solvants ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Merk).

Spectroscopie RMN :

Les spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{19}F ont été enregistrés avec des spectromètres Bruker AC à 400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C) et 376 MHz (^{19}F). Les déplacements chimiques des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été rapportés en partie par million (ppm) relatifs au signal des protons ou des carbones résiduels des solvants CDCl_3 ($\delta = 7.25, 77.16$), $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta = 2.50, 39.52$), CD_3CN ($\delta = 1.94, 1.32$), CD_3OD ($\delta = 3.31, 49.00$). Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz) et se réfèrent aux multiplicités apparentes indiquées par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dt (doublet de triplet), m (multiplet).

Spectrométrie de masse :

Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées sur un appareil Expression CMS (Advion) à ionisation par électrospray (ESI) en mode positif et / ou négatif et équipé d'un analyseur quadripolaire. Les analyses par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ont été effectuées sur un spectromètre de masse Synapt G2 HRMS Q-TOF équipé d'une interface d'ionisation par électrospray (ESI) fonctionnant en mode positif (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Analyse chromatographique :

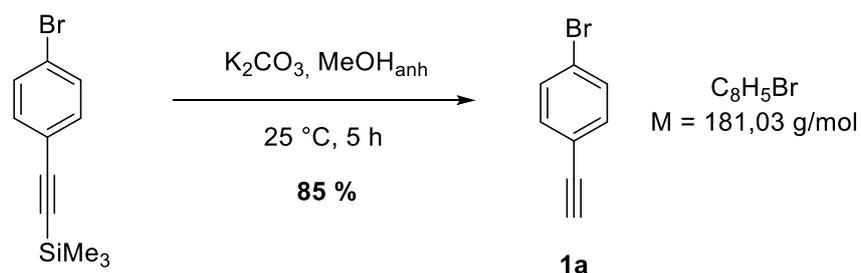
Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60 F₂₅₄ sur support plastique (Merck) et ont été révélées par lampe UV (254 nm) pour les composés aromatiques, par de la ninhydrine (10 mg/mL d'EtOH) pour les composés comportant des amines, et par de la vanilline (10 mg/ml de H₂SO₄ : EtOH (4:1)) pour les composés comportant des fonctions alcools et peptidiques. La valeur des rapports frontaux (Rf) est donnée à titre indicatif avec entre parenthèses les éluants utilisés.

Les purifications sur colonne ont été effectuées en utilisant un appareil Puriflash 600 (Interchim) avec des colonnes de silice de 30 µm.

Les chromatographies liquides haute performance (CLHP) ont été effectuées sur un appareil CLHP Waters Alliance e2695 équipé d'une colonne C-18 (Spherisorb ODS2 5µ 4,6 mm x 25 cm, Waters) avec un débit réglé à 1,50 mL/min et le gradient suivant : t = 0 : 60 % (A), 40 % (B) ; t = 15 min: 100 % (B) ; avec A = H₂O avec 0,05 % de TFA et B = ACN avec 0,05 % de TFA.

L'utilisation de molécules munies de fonctions azotures a nécessité certaines précautions. Les azotures organiques présentent un risque d'explosion et doivent être synthétisés en petites quantités en évitant les températures élevées, les chocs et les frictions. Si le rapport C/N est inférieur à 1, ils ne doivent jamais être isolés ou concentrés.

1-éthynyl-4-bromobenzène (1a)



A une solution de ((4-bromophényl)éthynyl)triméthylsilane (2 g, 7,76 mmol, 1 eq) dans du méthanol anhydre (20 mL) est ajouté du carbonate de potassium (0,14 g, 0,95 mmol, 0,12 eq). La solution est agitée sous argon pendant 5 heures à 25 °C. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous vide. Le résidu obtenu est solubilisé dans 15 mL d'éther diéthylique, lavé avec 10 mL d'eau distillée et 10 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl), séché sur sulfate de magnésium (MgSO_4), filtré et concentré sous vide. Le produit obtenu se présente sous forme d'un solide légèrement jauni (1,19 g, 85 %).

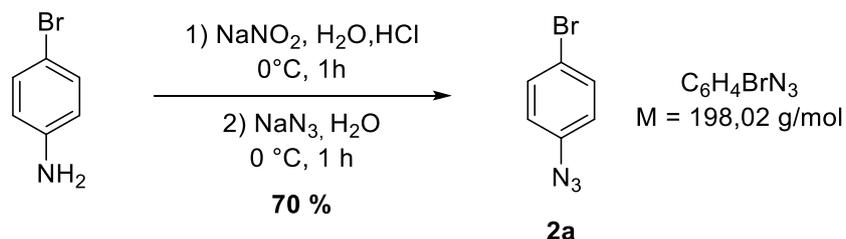
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.45 (d, 2H, ortho, 8,4 Hz) ; 7,34 (d, 2H, méta, 8,4 Hz) ; 3,12 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 133,7 ; 131,7 ; 123,3 ; 121,2 ; 82,71 ; 78,5

MS (ESI+) : non détecté

Rf : (*n*-heptane / dichlorométhane : 3 / 2) : 0,64

1-azido-4-bromobenzène (2a)



A une solution de 4-bromoaniline (1 g, 5,8 mmol, 1 eq) dans un mélange 50:50 $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ 37% (20 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C sous vive agitation une solution de nitrite de sodium (0,56 g, 8,1 mmol, 1,4 eq) dans de l'eau distillée (20 mL). Après addition, le mélange est maintenu à 0°C et une solution d'azoture de sodium (0,87 g, 13,4 mmol, 2,3 eq) dans de l'eau distillée (20 mL) est ajoutée goutte à goutte sous agitation. Après addition, la solution est laissée sous agitation à 0°C pendant 1 heure. Le mélange réactionnel est ensuite extrait au dichlorométhane (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de l'eau (3 x 10 mL), séchées sur MgSO_4 , et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane) pour donner une huile incolore (0,80 g, 70 %).

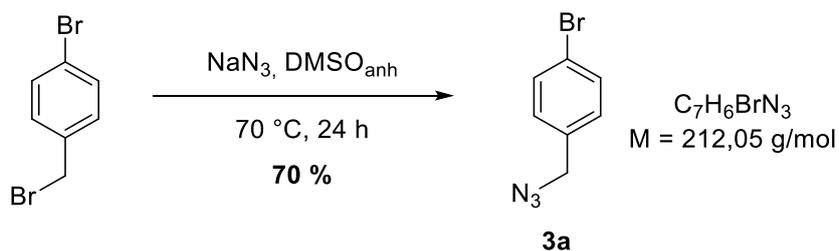
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7,52 (d, 2H, ortho, 8,8 Hz) ; 6,86 (d, 2H, méta, 8,8 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 143,0 ; 131,6 ; 131,0 ; 123,1.

MS (ESI+) : non détecté

Rf : (*n*-heptane) : 0,54

1-(azidométhyl)-4-bromobenzène (3a)



A une solution de 1-bromo-4-bromométhylbenzène (0,25 g, 1,0 mmol, 1 eq) dans du diméthylsulfoxyde anhydre (5 mL) est ajouté de l'azoture de sodium (0,25 g, 3,9 mmol, 2,3 eq). La solution est agitée sous argon à $70\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. Le mélange réactionnel est ensuite versé dans 15 mL d'eau distillée et extrait avec du dichlorométhane (2 x 10 mL). Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane) pour donner une huile incolore (0,14 g, 70 %).

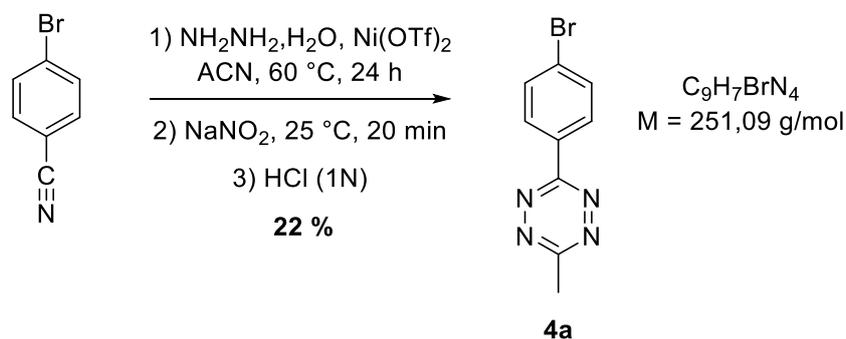
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7,51 (d, 2H, ortho, 8,4 Hz) ; 7,19 (d, 2H, méta, 8,4 Hz) ; 4,30 (s, 2H, CH_2)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 134,5 ; 132,1 ; 129,9 ; 122,5 ; 54,2.

MS (ESI+) : non détecté

Rf : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 9 / 1) : 0,52

3-(4-bromophényl)-6-méthyl-1,2,4,5-tétrazine (4a)



A une solution de 4-bromobenzonitrile (0,239 g, 1,3 mmol, 0,1 eq) en acétonitrile (660 μl , 12,9 mmol, 1 eq) dans un tube scellable sont ajoutés de l'hydrazine monohydratée (3,2 mL, 64,2 mmol, 5 eq) et le catalyseur $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ (240 mg, 0,65 mmol, 0,05 eq). Le tube est muni d'un barreau aimanté, scellé, et le mélange est chauffé à 60 °C pendant 24 heures sous vive agitation. La solution est mise à température ambiante et du nitrite de sodium (1,83 g, 25,8 mmol, 2 eq) dans de l'eau distillée (15 ml) est ajouté goutte à goutte. Une solution d'HCl 1M est ensuite ajoutée lentement jusqu'à pH égale à 3 (dégagement gazeux toxiques). Le mélange réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle (2 x 30 mL), séché sur MgSO_4 et concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane / acétate d'éthyle) pour obtenir le composé souhaité sous la forme d'un solide violet (73 mg, 22 %).

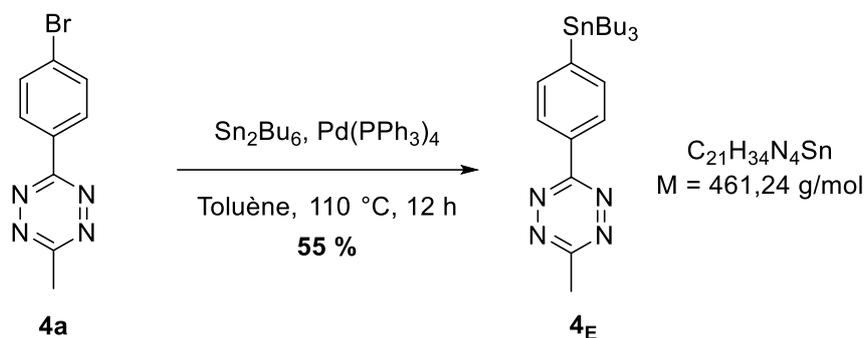
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ : 8,47 (d, 2H, méta, 8,4 Hz) ; 7,73 (d, 2H, ortho, 8,4 Hz) ; 3,10 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 167,5 ; 163,5 ; 132,4 ; 129,8 ; 129,5 ; 127,6 ; 29,5.

MS (ESI+) : non détecté

Rf : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 3 / 2) : 0,68

3-méthyl-6-(4-(tributylstannyl)phényl)-1,2,4,5-tétrazine (**4_E**)



A une solution du composé **4_a** (71,8 mg, 0,28 mmol, 1 eq) dans du toluène dégazé sous argon pendant 10 minutes (10 mL) sont ajoutés du bistributylétain (380 µl, 0,71 mmol, 2,5 eq) et le catalyseur palladium(0) tétrakis triphénylphosphine (16,5 mg, 0,014 mmol, 0,05 eq). La solution est mise sous agitation à 115 °C pendant 1 nuit sous gaz inerte. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous pression réduite. Le mélange est filtré sur lit de célite (élimination Pd) avec du dichlorométhane et le filtrat obtenu est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane / acétate d'éthyle) pour obtenir le composé souhaité sous la forme d'une huile violette (72 mg, 55 %).

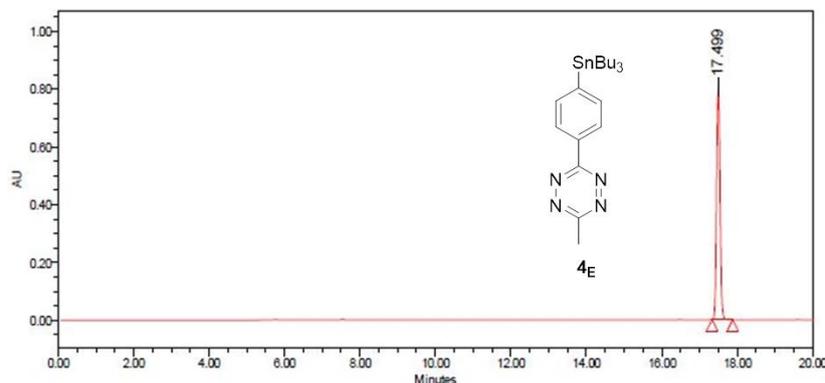
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ : 8,48 (d, 2H, méta, 8,4 Hz) ; 7,68 (d, 2H, ortho, 8,4 Hz) ; 3,09 (s, 3H, CH₃) ; 1,56 (m, 6H, CH₂) ; 1,34 (m, 6H, CH₂) ; 1,12 (m, 6H, CH₂) ; 0,89 (m, 9H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 167,2 ; 164,5 ; 149,3 ; 137,3 ; 131,2 ; 126,8 ; 29,0 ; 27,3 ; 21,1 ; 13,7, 9,8.

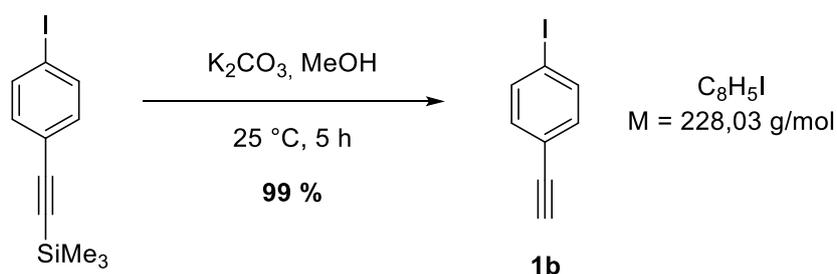
MS (ESI+) : non détecté

R_f : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 8 / 2) : 0,63

t_R : 17,5 min



1-éthynyl-4-iodobenzène (**1b**)



A une solution de ((4-iodophényl)éthynyl)triméthylsilane (1 g, 3,26 mmol, 1 eq) dans du méthanol anhydre (20 mL) est ajouté du carbonate de potassium (68 mg, 0,49 mmol, 0,15 eq). La solution est agitée sous argon pendant 5 heures à 25 °C. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous vide. Le résidu obtenu est solubilisé dans 20 mL d'acétate d'éthyle, lavé avec 10 mL d'eau distillée et 10 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl), séché sur MgSO_4 , filtré et concentré sous vide. Le produit obtenu se présente sous forme d'un solide blanc (0,74 g, 99 %).

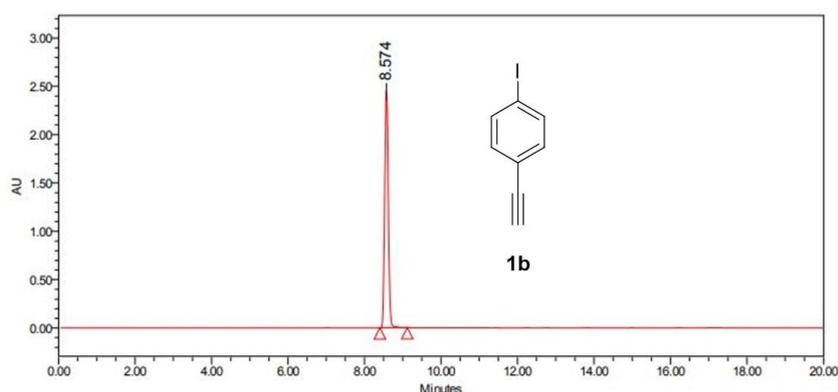
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7,66 (d, 2H, ortho, 7,9Hz) ; 7,20 (d, 2H, méta, 7,9Hz) ; 3,12 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 137,2 ; 133,9 ; 121,6 ; 94,1 ; 82,3 ; 81,4.

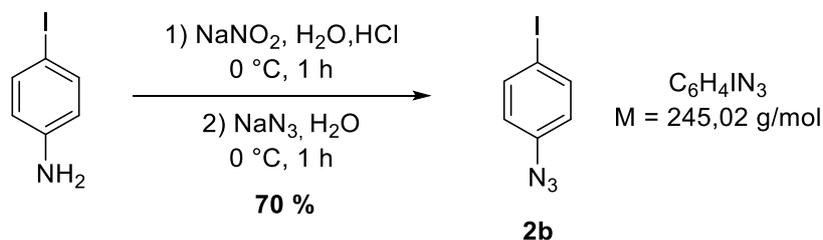
MS (ESI+) : non détecté

Rf : (*n*-heptane) : 0,52

t_R : 8,6 min



1-azido-4-iodobenzène (2b)



A une solution de 4-iodoaniline (0,25 g, 1,1 mmol, 1 eq) dans un mélange 50:50 $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ 37% (5 mL) est ajoutée goutte à goutte à $0\text{ }^\circ\text{C}$ sous vive agitation une solution de nitrite de sodium (0,11 g, 1,61 mmol, 1,4 eq) dans de l'eau (5 mL). Après addition, le mélange est maintenu à $0\text{ }^\circ\text{C}$ et une solution d'azoture de sodium (0,17 g, 2,6 mmol, 2,3 eq) dans de l'eau (5 mL) est ajoutée goutte à goutte sous agitation. Après addition, la solution est maintenue sous agitation à $0\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 1 heure. Le mélange réactionnel est ensuite extrait au dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de l'eau distillée (3 x 10 mL), séchées sur MgSO_4 , et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane) pour donner une huile légèrement jauni (0,19 g, 70 %).

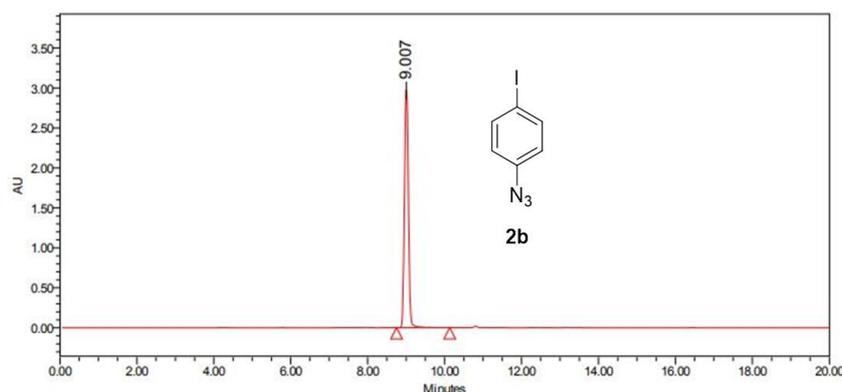
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7,63 (d, 2H, ortho, 8,8 Hz) ; 6,78 (d, 2H, méta, 8,8 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 142,9 ; 137,6 ; 130,4 ; 97,2.

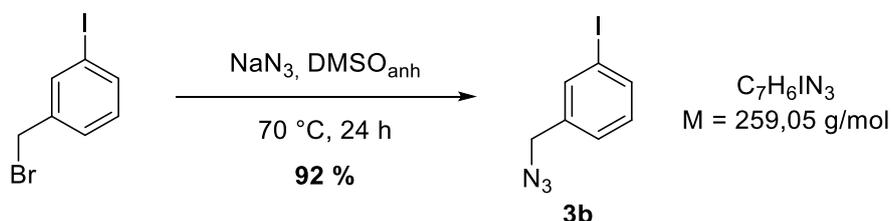
MS (ESI+) : non détecté

Rf : (*n*-heptane) : 0,57

t_R : 9,0 min



1-(azidométhyl)-3-iodobenzène (3b)



A une solution de 1-iodo-3-bromométhylbenzène (0,50 g, 1,62 mmol, 1 eq) dans du diméthylsulfoxyde anhydre (5 mL) est ajouté de l'azoture de sodium (0,43 g, 6,5 mmol, 4 eq). La solution est agitée sous argon à 70 °C pendant 24 heures. Le mélange réactionnel est ensuite versé dans 15 mL d'eau distillée et extrait avec du dichlorométhane (2 x 10 mL). Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane / acétate d'éthyle) pour donner une huile incolore (0,38 g, 92 %).

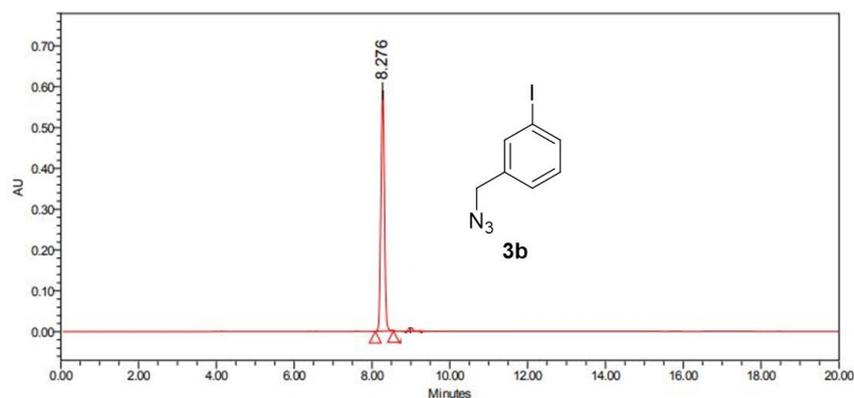
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7,68 (s, 1H, ortho) ; 7,66 (s, 1H, ortho) ; 7,28 (d, 1H, para, 7,6 Hz) ; 7,12 (t, 1H, méta, 8 Hz) ; 4,30 (s, 2H, CH_2)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 137,7 ; 137,3 ; 137,0 ; 130,5 ; 127,2 ; 94,6 ; 53,9.

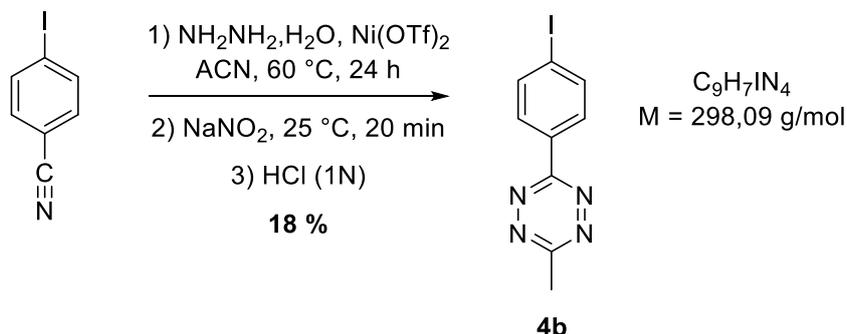
MS (ESI+) : non détecté

Rf : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 9 / 1) : 0,60

t_R : 8,3 min



3-(4-iodophényl)-6-méthyl-1,2,4,5-tétrazine (4b)



A une solution de 4-iodobenzonitrile (0,50 g, 2,12 mmol, 1 eq) en acétonitrile (550 μl , 10,6 mmol, 5 eq) dans un tube scellable sont ajoutés de l'hydrazine monohydratée (2,6 mL, 53 mmol, 25 eq) et le catalyseur $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ (394 mg, 1.1 mmol, 0,5 eq). Le tube est muni d'un barreau aimanté, scellé, et le mélange est chauffé à 60 °C pendant 24 heures sous vive agitation. La solution est mise à température ambiante et du nitrite de sodium (1,51 g, 21,2 mmol, 10 eq) dans de l'eau distillée (15 ml) est ajouté goutte à goutte. Une solution d'HCl 1M est ensuite ajoutée lentement jusqu'à pH égale à 3 (dégagement gazeux toxiques). Le mélange réactionnel est extrait avec du dichlorométhane (3 x 50 mL), séché sur MgSO_4 et concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane / chloroforme) pour obtenir le composé souhaité sous la forme d'un solide violet (113 mg, 18 %).

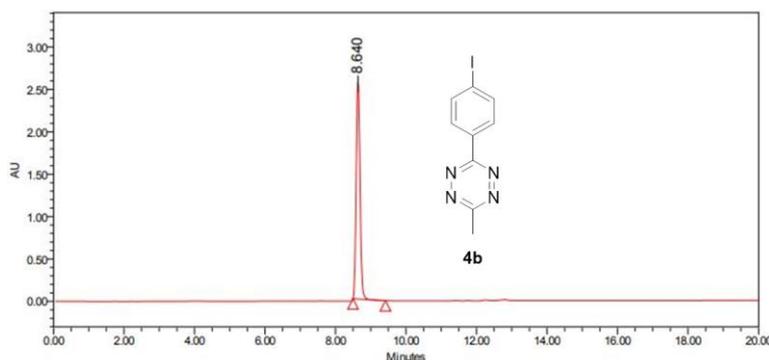
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ : 8,46 (d, 2H, méta, 8,4 Hz) ; 7,72 (d, 2H, ortho, 8,4 Hz) ; 3,09 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 167,6 ; 163,7 ; 132,4 ; 130,8 ; 129,5 ; 127,8 ; 29,8.

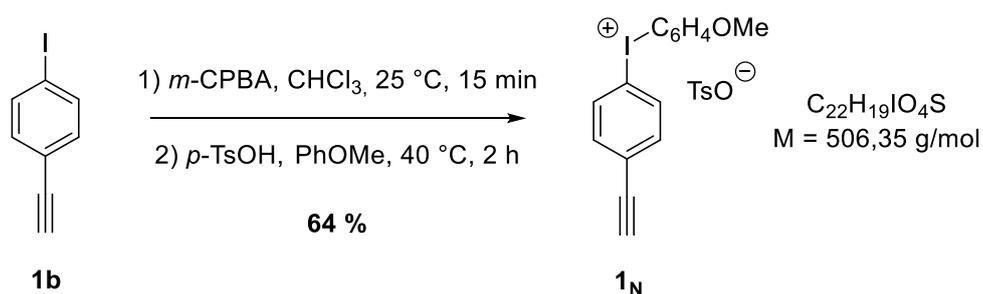
MS (ESI+) : non détecté

R_f : (*n*-heptane / chloroforme : 1 / 1) : 0,28

t_R : 8,6 min



(4-(éthynyl)phényl)(4-méthoxyphényl)iodonium tosylate (**1_N**)



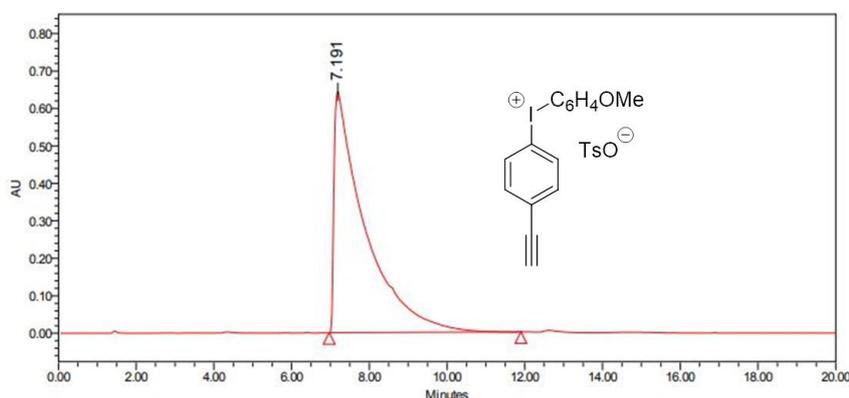
À une solution du composé **1b** (200 mg, 0,88 mmol, 1,1 eq) dans du chloroforme (10 mL) est ajouté de l'acide métachloroperbenzoïque (177 mg, 0,79 mmol, 1 eq). La solution est agitée à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, de l'acide *para*-toluènesulfonique monohydraté (153 mg, 0,79 mmol, 1 eq) et de l'anisole (432 mg, 3,95 mmol, 5 eq) sont ajoutés et la solution a été agitée pendant 2 heures à 40 °C. Le mélange réactionnel est concentré sous vide et le résidu obtenu est trituré dans de l'éther diéthylique froid (20 mL) jusqu'à obtention d'un solide blanc (253 mg, 64%)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) : δ 7,97-7,95 (m, 4H) ; 7,52-7,48 (m, 4H) ; 7,11 (d, 2H, 7,6 Hz) ; 7,05 (d, 2H, 8,8 Hz) ; 3,82 (s, 3H) ; 3,61 (s, 1H) ; 2,32 (s, 3H).

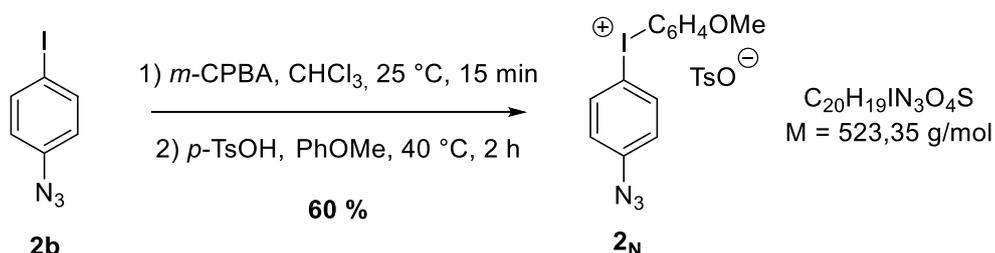
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃CN) : δ 160,6 ; 142,0 ; 139,4 ; 136,2 ; 134,8 ; 132,3 ; 130,0 ; 128,2 ; 122,7 ; 120,3 ; 114,3 ; 111,9 ; 81,5 ; 80,7 ; 56,3 ; 19,9.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₁₅H₁₂OI et 2M+TsO⁻(+) C₃₇H₃₁O₅SI₂ : 334,9933 et 840,9979 ; valeurs mesurées : 344,9946 et 840,9984.

t_R : 7,2 min



(4-(azido)phényl)(4-methoxyphényl)iodonium tosylate (**2_N**)



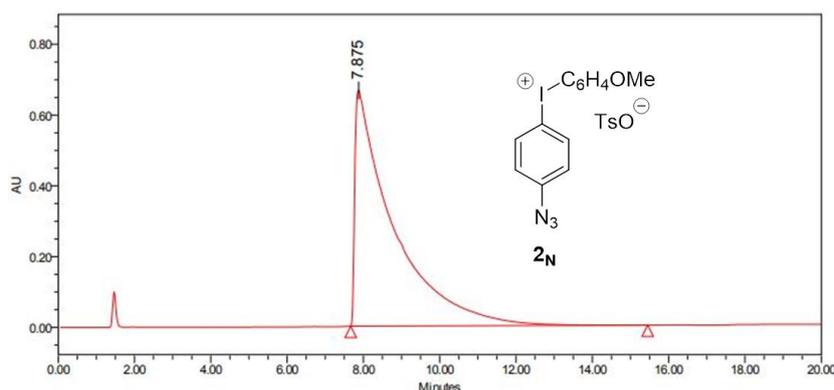
À une solution du composé **2b** (103 mg, 0,42 mmol, 1 eq) dans du chloroforme (10 mL) est ajouté de l'acide métachloroperbenzoïque (113 mg, 0,51 mmol, 1,2 eq). La solution est agitée à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, de l'acide *para*-toluènesulfonique monohydraté (97 mg, 0,51 mmol, 1,2 eq) et de l'anisole (234 mg, 2,14 mmol, 5 eq) sont ajoutés et la solution a été agitée pendant 2 heures à 40 °C. Le mélange réactionnel est concentré sous vide et le résidu obtenu est trituré dans de l'éther diéthylique froid (20 mL) jusqu'à obtention d'un solide blanc (132 mg, 60%)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) : δ 7,99-7,94 (m, 4H) ; 7,42 (d, 2H, 8 Hz) ; 7,09 (d, 2H, 8 Hz) ; 6,99 (d, 2H, 9,2 Hz) ; 6,95 (d, 2H, 9,2 Hz) ; 3,79 (s, 3H) ; 2,32 (s, 3H).

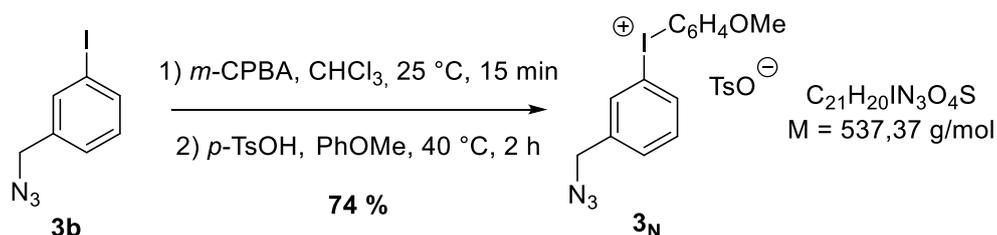
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃CN) : δ 163,8 ; 145,4 ; 141,1 ; 140,1 ; 138,5 ; 135,3 ; 135,2 ; 132,9 ; 132,6 ; 129,4 ; 126,6 ; 118,5 ; 116,8 ; 104,7 ; 56,6 ; 54,0 ; 21,3.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₁₃H₁₁N₃OI et 2M+TsO⁻(+) C₃₃H₂₉N₆O₅SI₂ : 351,9947 et 874,9992 ; valeurs mesurées : 351,9951 et 875,0000.

t_R : 7,9 min



(3-(azidométhyl)phényl)(4-méthoxyphényl)iodonium tosylate (**3_N**)



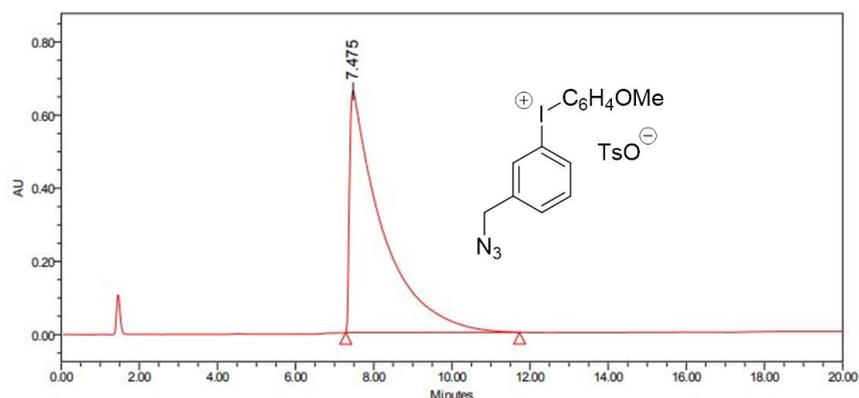
À une solution du composé **3b** (200 mg, 0,77 mmol, 1 eq) dans du chloroforme (10 mL) est ajouté de l'acide métachloroperbenzoïque (193 mg, 0,86 mmol, 1,1 eq). La solution est agitée à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, de l'acide *para*-toluènesulfonique monohydraté (170 mg, 0,87 mmol, 1,1 eq) et de l'anisole (424 mg, 3,88 mmol, 5 eq) sont ajoutés et la solution a été agitée pendant 2 heures à 40 °C. Le mélange réactionnel est concentré sous vide et le résidu obtenu est trituré dans de l'éther diéthylique froid (20 mL) jusqu'à obtention d'un solide blanc (306 mg, 74%)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) : δ 7,40-7,34 (m, 4H) ; 6,93 (d, 1H, 7,6 Hz) ; 6,82-6,78 (m, 3H) ; 6,47 (d, 2H, 8 Hz) ; 6,32 (d, 2H, 8,8 Hz) ; 3,77 (s, 2H) ; 3,17 (s, 3H) ; 1,69 (s, 3H).

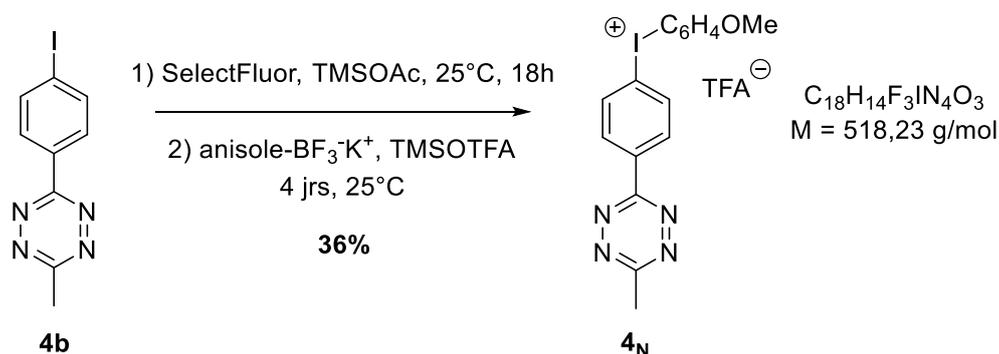
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃CN) : δ 163,8 ; 145,4 ; 141,1 ; 140,1 ; 138,5 ; 135,3 ; 135,2 ; 132,9 ; 132,6 ; 129,4 ; 126,6 ; 118,5 ; 116,8 ; 104,7 ; 56,6 ; 54,0 ; 21,3.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₁₄H₁₃N₃OI et 2M+TsO⁻(+) C₃₅H₃₃N₆O₅SI₂ : 366,0103 et 903,0315 ; valeurs mesurées : 366,0115 et 903,032.

t_R : 7,5 min



(4-méthoxyphényl)(4-(6-méthyl-1,2,4,5-tétrazin-3-yl)phényl)iodonium tosylate (**4_N**)



À une solution dégazée du composé **4b** (0,167 g, 0,53 mmol, 1 eq) dans de l'acétonitrile anhydre (15 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution d'acétate de triméthylsilyle (216 mg, 1,59 mmol, 3 eq) et de SelectFluor™ (277 mg, 0,745 mmol, 1,4 eq) dans de l'acétonitrile anhydre (10 mL). La solution est agitée pendant 24 heures à température ambiante sous argon. Du trifluoroborate de potassium (130 mg, 0,583 mmol, 1,1 eq) et du trifluoroacétate de triméthylsilyle (105 µL, 0,583 mmol, 1,1 eq) sont ensuite ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation pendant 96 heures à la température ambiante sous argon. Le mélange réactionnel est concentré sous vide et le résidu obtenu est trituré dans de l'éther diéthylique froid (20 ml) jusqu'à obtention d'un solide violet (99,3 mg, 36%).

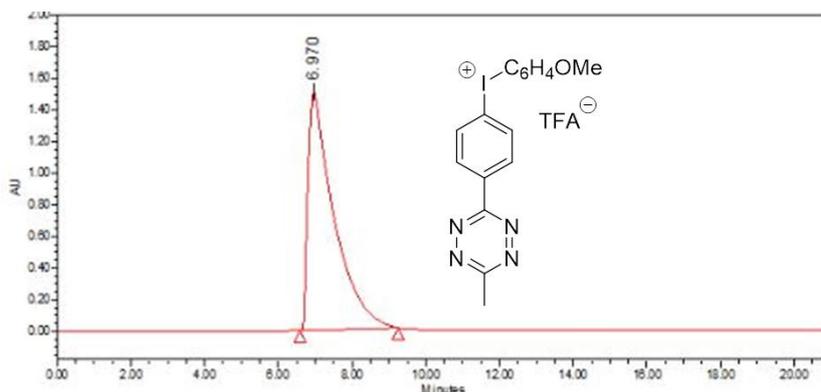
RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) : δ 8,59 (d, 2H, *mé*ta, 8,8 Hz) ; 8,23 (d, 2H, *ortho*, 8,8 Hz) ; 8,06 (d, 2H, *ortho*, 9,2 Hz) ; 7,08 (d, 2H, *mé*ta, 9,2 Hz) ; 3,84 (s, 3H, CH₃) , 3,05 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃CN) : δ 169,2 ; 164,5 ; 163,9 ; 138,9 ; 137,9 ; 137,5 ; 136,5 ; 119,3 ; 118,3 ; 66,3 ; 66,3 ; 56,8 ; 21,5 ; 15,6.

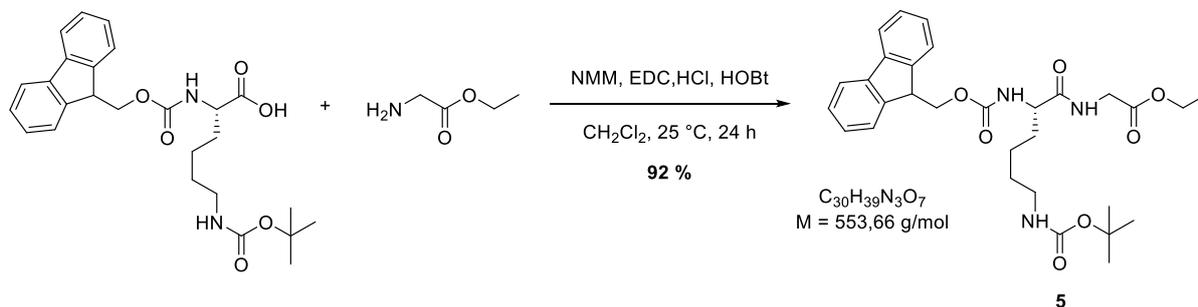
RMN ¹⁹F (376 MHz, CD₃OD) : -80,0 (CF₃COO⁻, 80%) ; -154,7 (BF₄⁻, 20%)

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₁₄H₁₃N₃OI : 405,0212 ; valeurs mesurées : 405,0219.

t_R : 7,0 min



Ethyl-*N*²-(((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)-*N*⁶-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-lysylglycinate (5)



À une solution de *N*²-(((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)-*N*⁶-(*tert*-butoxycarbonyl)-lysine (9.99 g, 20.9 mmol, 1 eq) dans du dichlorométhane anhydre (150 mL) sont ajoutés dans l'ordre la *N*-méthylmorpholine (5.80 mL, 52.3 mmol, 2.5 eq), l'EDC,HCl (6.13 g, 31.4 mmol, 1.5 eq), l'hydroxybenzotriazole (4.37 g, 31,4 mmol, 1.5 eq) et l'éthylglycinate hydrochloride (3.54 g, 25.1 mmol, 1.2 eq). La solution est laissée sous agitation pendant 24 heures sous gaz inerte (argon). Le mélange réactionnel est ensuite lavé avec une solution d'HCl 0.2 M (75 mL), une solution de carbonate de sodium 1M (50 mL) et de l'H₂O distillée (2 x 75 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (CHCl₃/MeOH) pour obtenir le composé souhaité sous la forme d'un solide blanc (10.6 g, 92 %).

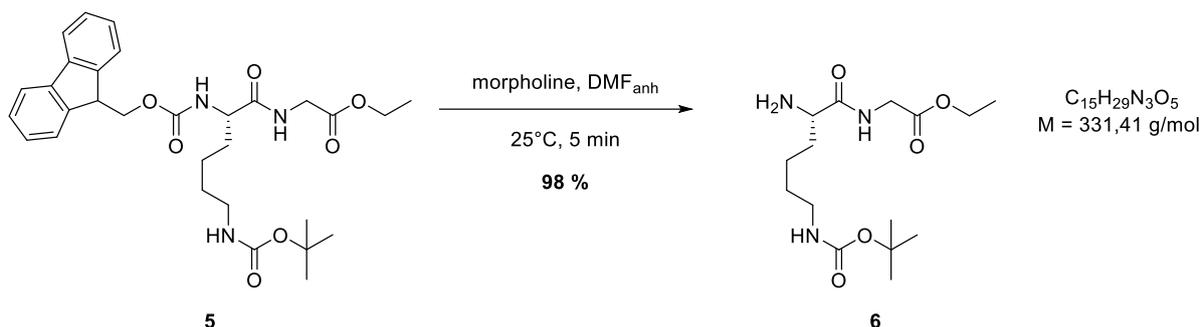
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,32 (s, 1H, NH) ; 7,89 (d, 2H, 7,6 Hz) ; 7,75-7,72 (m, 2H) ; 7,51 (s, 1H, NH) ; 7,42 (t, 2H, 7,2 Hz) ; 7,33 (t, 2H, 7,2 Hz) ; 6,78 (s, 1H, NH) ; 4,31-4,19 (m, 3H) ; 4,07 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 4,02-3,98 (m, 1H, CH), 3,90-3,74 (m, 2H, CH₂) ; 2,89 (m, 2H) ; 1,68-1,51 (m, 2H, CH₂) ; 1,46-1,22 (m, 13H) ; 1,18 (t, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 172,6 ; 169,7 ; 156,0 ; 155,6 ; 143,8 ; 140,8 ; 139,5 ; 137,4 ; 128,9 ; 127,6 ; 127,1 ; 125,4 ; 121,4 ; 120,1 ; 77,4 ; 65,7 ; 60,4 ; 54,4 ; 46,7 ; 40,6 ; 31,7 ; 29,4 ; 28,3 ; 22,8 ; 14,0.

MS (ESI+) : M+H : 554,4 ; M+Na : 576,4 ; 2M+Na : 1129,8.

Rf : (chloroforme / méthanol : 95 / 5) : 0,33

Ethyl-*N*⁶-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysylglycinate (**6**)



A une solution du composé **5** (3 g, 5.4 mmol, 1 eq) dans du *N,N*-diméthylformamide anhydre (15 ml) est ajoutée de la morpholine (15 mL). La solution est agitée pendant 5 min à température ambiante et directement concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (CHCl₃/MeOH) pour obtenir le composé souhaité sous la forme d'une huile incolore (1.75 g, 98 %).

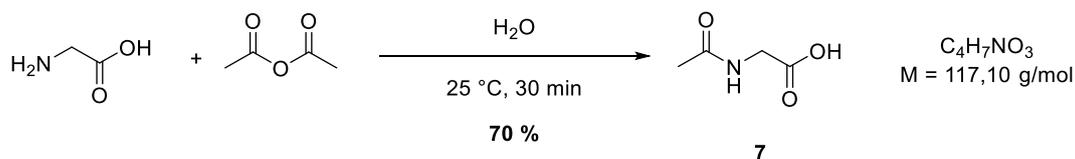
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,24 (s, 1H, NH) ; 6,75 (s, 1H, NH) ; 4,08 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 3,83-3,81 (m, 2H, CH₂) ; 3,15-3,12 (m, 1H, CH) ; 2,90-2,85 (m, 2H, CH₂) ; 1,90-1,68 (m, 1H) ; 1,59-1,51 (m, 1H) ; 1,42-1,24 (m, 13H) ; 1,18 (m, 3H, CH₃, 6,8 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 175,8 ; 169,9 ; 155,5 ; 77,3 ; 60,3 ; 54,9 ; 54,5 ; 40,5 ; 34,8 ; 29,4 ; 28,2 ; 22,4 ; 14,0.

MS (ESI⁺) : M+H : 332,3 ; M+Na : 354,3 ; 2M+H : 663,6 ; 2M+Na : 685,5.

R_f : (chloroforme / méthanol : 9 / 1) : 0,36

Acétylglycine (7)



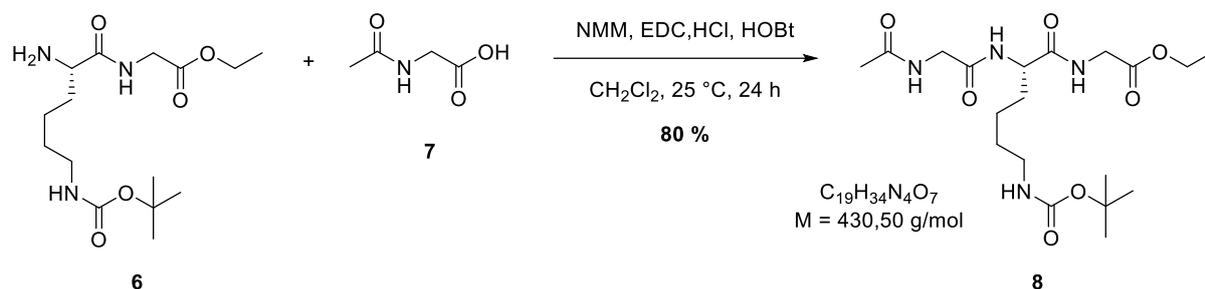
À une solution de glycine (5 g, 66 mmol, 1 eq) dans de l'eau distillée (20 mL) est ajouté sous agitation de l'anhydride acétique (16.6 mL, 132 mmol, 2 eq) en une seule fois (réaction exothermique). La solution est laissée sous agitation pendant 30 minutes. Après être revenu à température ambiante (apparition des premiers cristaux), le mélange réactionnel est mis au réfrigérateur pendant une nuit pour favoriser la cristallisation. Les cristaux sont recueillis par filtration, lavés à l'eau glacée et séchés à l'étuve à 100°C pendant une nuit (5.31 g, 70 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 12,50 (s, 1H, OH) ; 8,17 (s, 1H, NH) ; 3,71 (d, 2H, CH₂, 5,6 Hz) ; 1,84 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 171,3 ; 169,5 ; 40,5 ; 22.2.

MS (ESI-) : M-H : 116,1.

Ethyl *N*²-(acétylglycyl)-*N*⁶-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysylglycinate (8**)**



À une solution de composé **7** (0,528 g, 4,5 mmol, 1 eq) dans le dichlorométhane (75 mL) sont ajoutés dans l'ordre le composé **6** (1,79 g, 5,4 mmol, 1,2 eq), la NMM (1,30 mL, 11,7 mmol, 2,5 eq), l'EDC,HCl (1,33 g, 6,8 mmol, 1,5 eq) et la HOBT (0,943 g, 6,8 mmol, 1,5 eq). Le mélange est laissé sous agitation pendant 24 heures sous gaz inerte durant lesquels le produit précipite. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec du dichlorométhane froid et séché sous vide (1,52 g, 80 %).

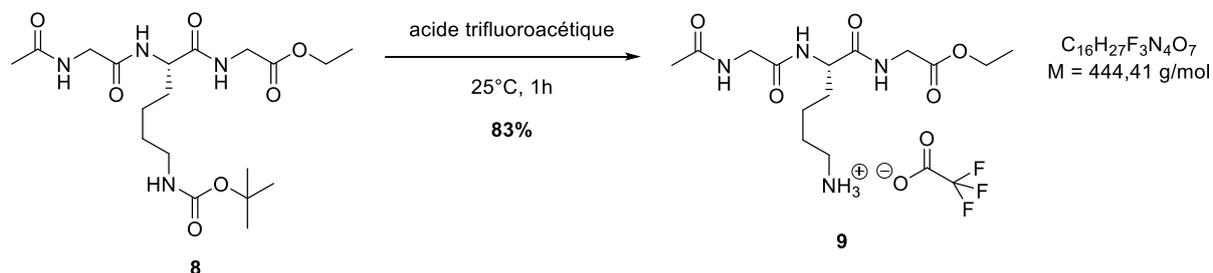
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,36 (s, 1H, NH) ; 8,07 (s, 1H, NH) ; 7,99 (d, 1H, NH) ; 6,76 (s, 1H, NH) ; 4,27-4,22 (m, 1H) ; 4,07 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 3,81-3,78 (m, 2H, CH₂) ; 3,71 (d, 2H, 5,6 Hz) ; 2,89-2,84 (m, 2H, CH₂) ; 1,84 (s, 3H, CH₃) ; 1,69-1,60 (m, 1H) ; 1,54-1,45 (m, 1H) ; 1,43-1,23 (m, 13H) ; 1,18 (t, 3H, CH₃, 6,8 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 172,1 ; 169,6 ; 169,5 ; 168,8 ; 155,5 ; 77,4 ; 60,4 ; 52,2 ; 42,0 ; 40,7 ; 31,8 ; 29,3 ; 28,3 ; 22,6 ; 22,5 ; 14,0.

MS (ESI+) : M+H : 431,4 ; M+Na : 459,4 ; 2M+H : 861,9.

Rf : (chloroforme / méthanol : 9 / 1) : 0,48

(S)-5-(2-acetamidoacetamido)-6-((2-éthoxy-2-oxoéthyl)amino)-6-oxohexan-1-aminium 2,2,2-trifluoroacetate (9)



Une solution de composé **9** (1,47 g, 3,42 mmol) dans de l'acide trifluoroacétique pur (30 mL) est agitée pendant 1 heure. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous pression réduite (obtention huile opaque) et trituré dans de l'éther froid (formation précipité blanc), L'éther est éliminé et le solide blanc obtenu est séché sous cloche à vide pendant 1 nuit (1,26 g, 83 %).

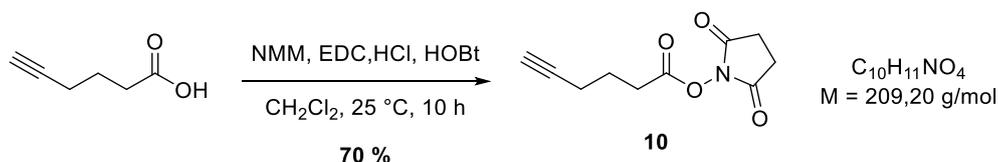
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 8,38 (s, 1H, NH) ; 8,11 (s, 1H, NH) ; 8,03 (s, 1H, NH) ; 7,67 (s, 3H, NH₃) ; 4,31-4,25 (m, 1H) ; 4,08 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 3,82-3,80 (m, 2H, CH₂) ; 3,72-3,69 (m, 2H, CH₂) ; 2,80-2,71 (m, 2H, CH₂) ; 1,85 (s, 3H, CH₃) ; 1,75-1,63 (m, 1H, CH₂) ; 1,57-1,46 (m, 3H) ; 1,38-1,26 (m, 2H, CH₂) ; 1,18 (t, 3H, CH₃, 6,8 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) : δ 172,0 ; 169,7 ; 169,6 ; 167,0 ; 60,5 ; 52,0 ; 42,3 ; 42,0 ; 40,7 ; 31,3 ; 26,5 ; 22,4 ; 22,0 ; 14,1.

MS (ESI+) : M+H : 331,2.

Rf : (chloroforme / méthanol : 8 / 2) : 0,19

N-succinimidyl-5-hexynoate (10)



À une solution d'acide hex-5-ynoïque (500 μ L, 4,4 mmol, 1 eq) dans du dichlorométhane anhydre (15 mL) sont ajoutés dans l'ordre la NMM (720 μ L, 6,5 mmol, 1,5 eq), l'EDC,HCl (1,27 g, 6,5 mmol, 1,5 eq) et la *N*-hydroxysuccinimide (0,77 g, 6,5 mmol, 1,5 eq). La solution est agitée pendant 1 nuit à température ambiante sous argon. Le mélange réactionnel est ensuite lavé avec une solution d'HCl 0,2N (10 ml), de l'eau distillée (10 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (10 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice ($CHCl_3/AcOEt$) pour obtenir le composé souhaité sous la forme d'un solide blanc (640 mg, 70 %),

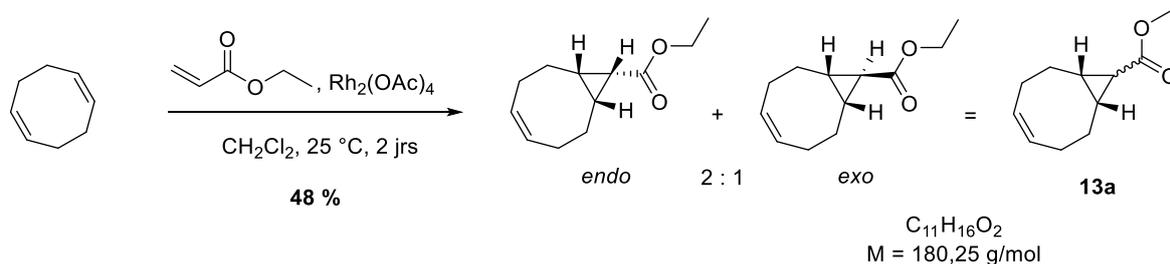
RMN 1H (400 MHz, $CHCl_3$) : δ 2,84 (s, 4H, 2 CH_2) ; 2,78 (t, 2H, CH_2 , 7,6 Hz) ; 2,35 (dt, 2H, CH_2 , 6,8 Hz) ; 2,01 (t, 1H, CH, 2,8 Hz) ; 1,97 (q, 2H, CH_2 , 7,2 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CHCl_3$) : δ 169,2 ; 168,1 ; 82,7 ; 70,0 ; 29,8 ; 25,7 ; 23,5 ; 17,7.

MS (ESI+) : non détecté

Rf : (chloroforme / acétate d'éthyle : 7 / 3) : 0,58

Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylméthyl (4-nitrobenzyl) carbonate (13a)



A une solution de 1,5-cyclooctadiène (45 mL, 0,362 mol, 8 eq) et de catalyseur $Rh_2(OAc)_4$ (1 g, 2,26 mmol, 0,05 eq) dans le dichlorométhane anhydre (50 mL) est ajoutée goutte à goutte sous argon pendant 3 heures une solution de 2-diazoacétate d'éthyle (5,5 mL, 45 mmol, 1 eq) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL). La solution est laissée sous agitation pendant 2 jours. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous vide et l'excès de cyclooctadiène est éliminé à l'aide d'un fritté rempli de gel de silice avec un mélange 200 : 1 (*n*-heptane / acétate d'éthyle). Les deux composés (*endo* : *exo* = 2 : 1) ont été obtenus sous forme d'huiles incolores (4,13 g, 48 %).

RMN 1H (400 MHz, $CHCl_3$) : δ 5,64-5,59 (m, 2H, =CH_{endo+exo}) ; 4,10 (q, 2H, 7,2 Hz, CH_{2endo+exo}) ; 2,55-2,45 (m, 1,31H, 2xCH_{endo}) ; 2,34-2,26 (m, 0,69H, 2xCH_{exo}) ; 2,24-2,15 (m, 2H, m, 2xCH_{endo+exo}) ; 2,12-2,01 (m, 2H, m, 2xCH_{endo+exo}) ; 1,87-1,78 (m, 1,30H, 2xCH_{endo}) ; 1,70 (t, 0,65H, 8,8 Hz, CH_{endo}) ; 1,59-1,54 (m, 0,71H, 2xCH_{exo}) ; 1,52-1,43 (m, 0,74H, 2xCH_{exo}) ; 1,42-1,36 (m, 1,33H, 2xCH_{endo}) ; 1,26 (t, 2H, 7,2 Hz, CH_{3endo}) ; 1,25 (t, 1,05H, 7,2 Hz, CH_{3exo}) ; 1,18 (t, 4,4 Hz, 0,36H, CH_{exo}).

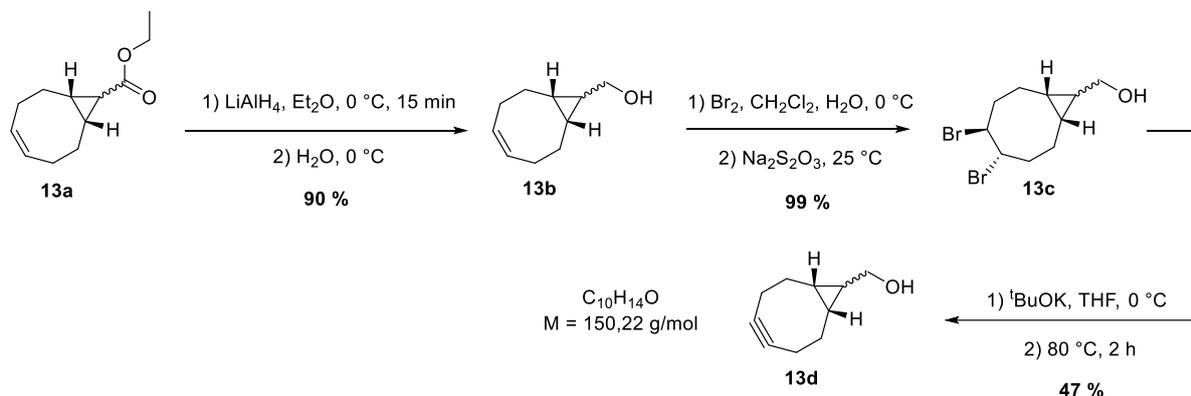
RMN ^{13}C (100 MHz, $CHCl_3$) : δ (*exo*), 172,4 (*endo*) ; 130,1 (*exo*) ; 129,6 (*endo*) ; 60,4 (*exo*) ; 59,9 (*endo*) ; 28,4 (*exo*) ; 28,0 (*exo*) ; 27,9 (*exo*) ; 27,2 (*endo*) ; 26,8 (*exo*) ; 24,3 (*endo*) ; 22,8 (*endo*) ; 21,4 (*endo*) ; 14,5 (*endo*) ; 14,4 (*exo*).

MS (ESI+) : non détecté

Rf (*endo*) : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 95 / 5) : 0,31

Rf (*exo*) : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 95 / 5) : 0,22

Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methanolcarbonate (13d)



A une suspension de LiAlH_4 (277 mg, 6,95 mmol, 0,9 eq) dans de l'éther diéthylique anhydre (25 mL) est ajoutée goutte à goutte à $0\text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation une solution d'esters **13a** (1,5 g, 7,72 mmol, 1 eq) dans de l'éther diéthylique anhydre (10 mL). Après addition, la solution est agitée pendant 15 minutes à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à $0\text{ }^\circ\text{C}$ et ajoutée dans de l'eau distillée avec précaution jusqu'à ce que le solide gris devienne blanc (libération de dihydrogène, élimination du LiAlH_4 en excès). Du MgSO_4 (5 g) est ajouté et le solide est filtré et lavé avec de l'éther diéthylique froid (2 x 50 mL). Le filtrat est concentré sous pression réduite. Les alcools **13b** (*endo* / *exo*) obtenus se présentent sous forme d'une huile incolore (1,05 g, 90 %).

A une solution d'alcools **13b** (1,05 g, 6,9 mmol, 1 eq) dans du dichlorométhane anhydre (30 mL) est ajouté goutte à goutte à $0\text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation du dibrome (393 μL , 7,6 mmol, 1,1 eq) dans du dichlorométhane anhydre (5 mL) jusqu'à ce que la couleur jaune persiste (point d'équivalence). La solution est ensuite amenée à température ambiante et la réaction est désactivée avec quelques gouttes d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 10% massique (élimination de l'excès de dibrome). Le mélange réactionnel est extrait avec du dichlorométhane (2 x 30 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous vide. Les composés dibromés **13c** (*endo* / *exo*) sont obtenus sous forme de solide blanc (2,13 g, 99 %).

A une solution de composés dibromés **13c** (2,05 g, 6,57 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (30 mL) est ajoutée goutte à goutte à $0\text{ }^\circ\text{C}$ sous argon et vive agitation une solution de $t\text{-BuOK}$ 1M dans du THF anhydre (21,7 mL, 21,7 mmol, 3,3 eq). La solution est ensuite chauffée au reflux pendant 2 heures. Après refroidissement à température ambiante, le mélange réactionnel est désactivé avec une solution saturée de NH_4Cl (2 x 30 mL) et extrait avec du dichlorométhane (3 x 20 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur

MgSO₄ et concentrées sous vide. Le produit brut est purifié sur gel de silice (*n*-heptane / acétate d'éthyle) pour donner les deux isomères **13d** sous la forme d'un solide blanc (462 mg, 47 %).

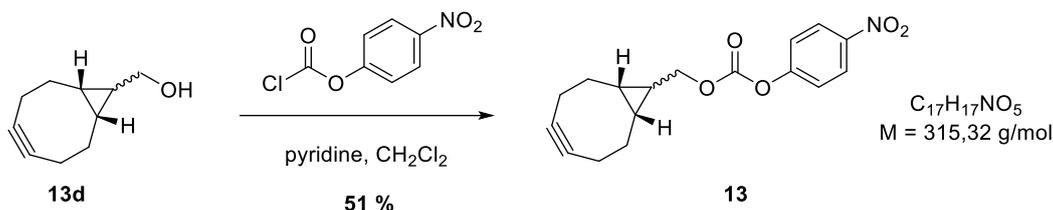
RMN ¹H (400 MHz, CHCl₃) : δ 3,73 (d, 1,32H, 8 Hz, CH_{2endo}) ; 3,54 (d, 0,67H, 6 Hz, CH_{2exo}) ; 2,43-2,14 (m, 6H, 3CH_{2endo}+ 3CH_{2exo}) ; 1,65-1,59 (m, 1,72H, 2H_{endo}+ 1H_{exo}) ; 1,55-1,34 (m, 2,03H, 2H_{endo} + 2H_{exo}) ; 0,96-0,91 (m, 1,32H, 2xH_{endo}) ; 0,69-0,66 (m, 1,05H, 3H_{exo}).

RMN ¹³C (100 MHz, CHCl₃) : δ 98,22 (exo) ; 98,0 (endo) ; 66,3 (exo) ; 59,2 (endo) ; 32,6 (exo) ; 28,2 (endo) ; 26,5 (exo) ; 21,8 (exo) ; 20,7 (endo) ; 20,6 (exo) ; 20,6 (endo) ; 19,2 (endo).

Rf (endo) : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 1 / 1) : 0,25

Rf (exo) : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 1 / 1) : 0,22

Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)méthyl (4-nitrophényl) carbonate (13)



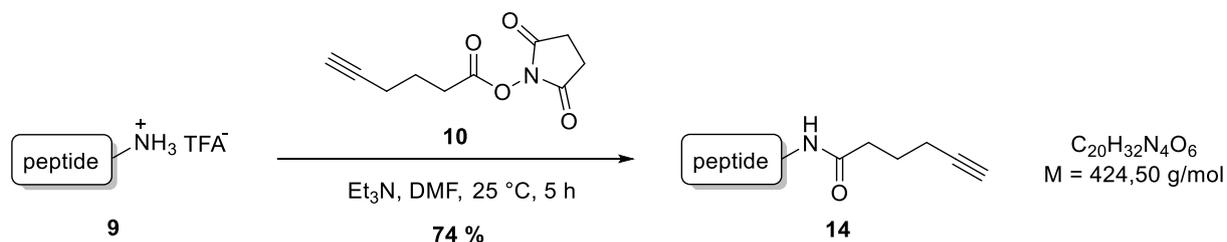
A une solution de composés **13d** (80 mg, 0,53 mmol, 1 eq) sous gaz inerte dans du dichlorométhane anhydre (10 mL), est ajoutée de la pyridine (108 μ L, 1,33 mmol, 2,5 eq). Après agitation pendant 5 minutes, du chloroformiate de 4-nitrophényle (0,145 g, 0,692 mmol, 1,3 eq) est ajouté en une fois dans la solution. Le mélange est agité pendant 15 minutes à température ambiante. La solution est traitée avec une solution saturée de NH_4Cl (15 mL) et extraite avec du dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous vide. Le produit brut est purifié sur gel de silice (n-heptane / acétate d'éthyle) pour donner le composé **13** sous la forme d'un solide blanc (85 mg, 51 %).

RMN 1H (400 MHz, $CHCl_3$) : δ 8,26 (d, 2H, $2CH_{endo-exo}$, 7,2 Hz) ; 7,39 (d, 2H, $2CH_{aro_{endo-exo}}$, 9,2 Hz) ; 4,40 (d, 1,32H, CH_{2endo} , 8,4 Hz) ; 4,22 (d, 0,65H, CH_{2exo} , 6,8 Hz) ; 2,47-2,13 (m, 6H, $3CH_{2endo}+3CH_{2exo}$) ; 1,67-1,56 (m, 1,68H, $2H_{endo}+1H_{exo}$) ; 1,55-1,34 (m, 21,97H, $2H_{endo} + 2H_{exo}$) ; 1,09-1,04 (m, 1,32H, $2xH_{endo}$) ; 0,90-0,79 (m, 1,07H, $3H_{exo}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CHCl_3$) : δ 155,8 (endo) ; 152,8 (endo) ; 152,7 (exo) ; 145,6 (endo) ; 125,4 (endo) ; 121,9 (endo) ; 121,9 (exo) ; 98,9 (endo) ; 98,8 (exo) ; 68,1 (endo) ; 33,3 (exo) ; 29,2 (endo) ; 23,5 (exo) ; 23,1 (exo) ; 21,5 (endo) ; 21,4 (exo) ; 20,7 (endo) ; 17,4 (endo).

Rf : (n-heptane / acétate d'éthyle : 8 / 2) : 0,65

Ethyl *N*²-(acétylglycyl)-*N*⁶-(hex-5-ynoyl)-L-lysylglycinate (**14**)



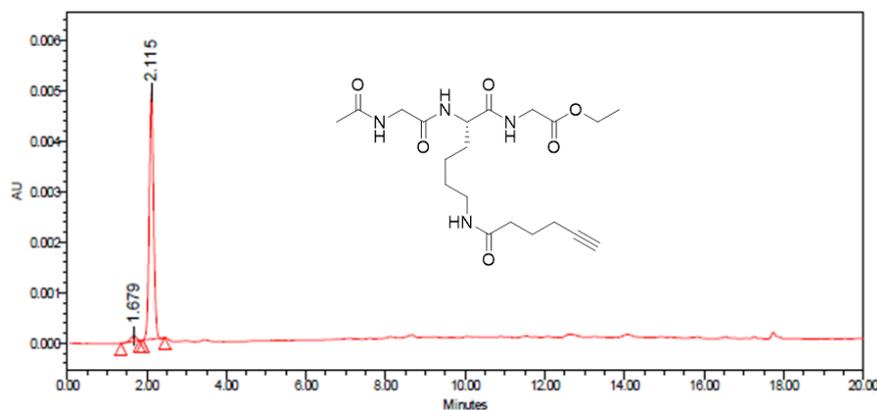
À une solution du peptide **9** (100 mg, 0,23 mmol, 1 eq) dans du DMF anhydre (10 mL) sont ajoutés la triéthylamine (99 μL , 0,68 mmol, 3 eq) et le composé **10** (70,6 mg, 0,34 mmol, 1,5 eq). La solution est agitée pendant 5 heures sous gaz inerte. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **14** sous la forme d'un solide blanc (71 mg, 74 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,32 (s, NH) ; 8,05 (s, NH) ; 7,94 (s, NH) ; 7,73 (s, NH) ; 4,28-4,23 (m, 1H) ; 4,08 (q, 2H, 4 Hz) ; 3,81 (t, 2H, 8 Hz) ; 3,71 (d, 2H, CH₂, 4 Hz) ; 3,01 (q, 2H, 8 Hz) ; 2,74 (s, 1H), 2,16-2,12 (m, 4H) ; 1,85 (s, 3H, CH₃) ; 1,69-1,63 (m, 3H) ; 1,56-1,46 (m, 1H) ; 1,41-1,31 (m, 2H) ; 1,31-1,23 (m, 2H) ; 1,18 (t, 3H, CH₃, 7,2 Hz).

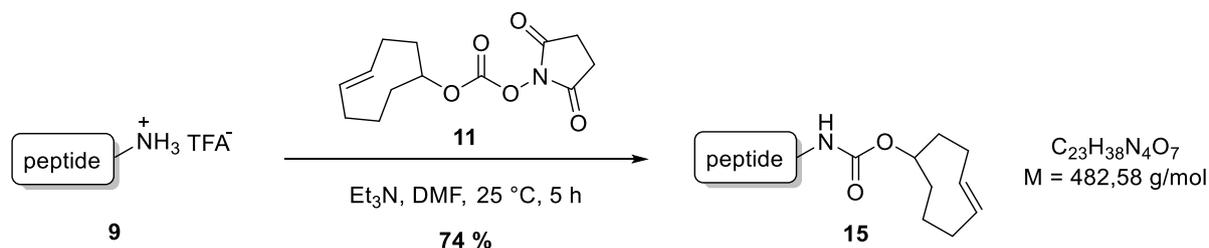
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 172,0 ; 171,2 ; 171,1 ; 169,5 ; 168,8 ; 84,1 ; 71,4 ; 60,3 ; 52,1 ; 41,9 ; 40,6 ; 38,3 ; 34,1 ; 31,7 ; 28,8 ; 24,2 ; 22,5 ; 22,4 ; 17,4 ; 14,0.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$: 447,2220 ; valeurs mesurées : 447,2202.

t_R : 2,1 min



Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-((((*E*)-cyclooct-4-en-1-yl)oxy)carbonyl)-L-lysylglycinate (**15**)



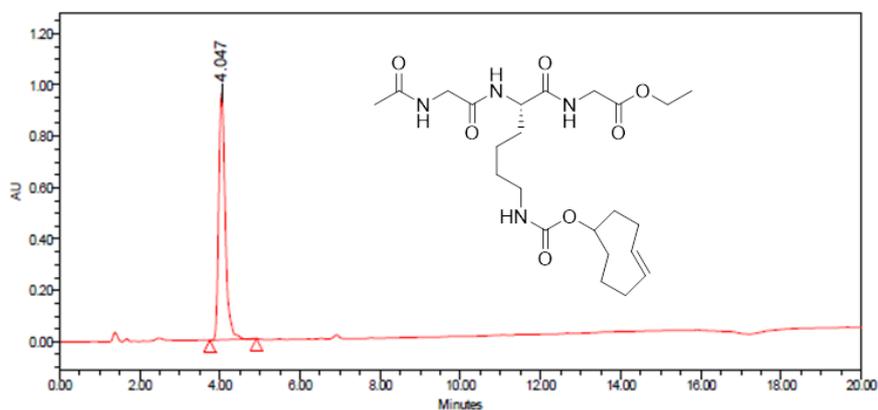
À une solution du peptide **9** (83 mg, 0,18 mmol, 2 eq) dans du DMF anhydre (10 mL) sont ajoutés la triéthylamine (78 μL , 0,56 mmol, 6 eq) et le composé **11** (25 mg, 0,09 mmol, 1 eq). La solution est agitée pendant 5 heures sous gaz inerte. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **15** sous la forme d'un solide blanc (33 mg, 74 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,32 (s, NH) ; 8,04 (s, NH) ; 7,94 (s, NH) ; 6,89 (s, NH) ; 5,69-5,53 (m, 1,41H, =CH) ; 5,47-5,39 (m, 0,66H, =CH) ; 4,61-4,52 (m, 0,41H) , 4,27-4,19 (m, 1,64H) ; 4,08 (q, 2H, 8 Hz) ; 3,80 (t, 2H, 4 Hz) ; 3,71 (d, 2H, 8 Hz) ; 2,93-2,89 (m, 2H) ; 2,34-1,97 (m, 4H) ; 1,92-1,71 (m, 6H) ; 1,69-1,43 (m, 5H) ; 1,40-1,31 (m, 2H) ; 1,28-1,22 (m, 2H) ; 1,18 (t, 3H, 8 Hz).

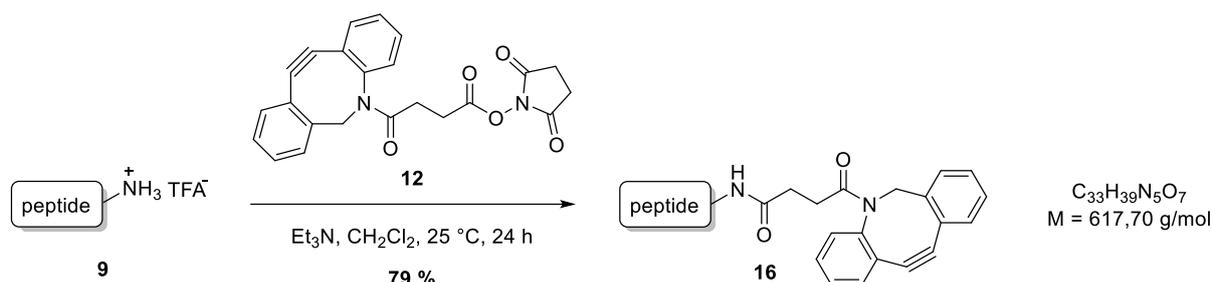
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 172,0 ; 169,6 ; 169,5 ; 168,8 ; 155,7 ; 134,9 ; 132,5 ; 74,9 ; 74,2 ; 60,3 ; 52,2 ; 42,0 ; 40,6 ; 38,2 ; 33,7 ; 32,1 ; 31,7 ; 30,6 ; 29,1 ; 25,1 ; 24,5 ; 22,4 ; 21,9 ; 14,0.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: 505,2638 ; valeurs mesurées : 505,2656.

t_R : 4,0 min



Ethyl *N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-("dibenzocyclooctyne (DIBAC)")-L-lysylglycinate (**16**)



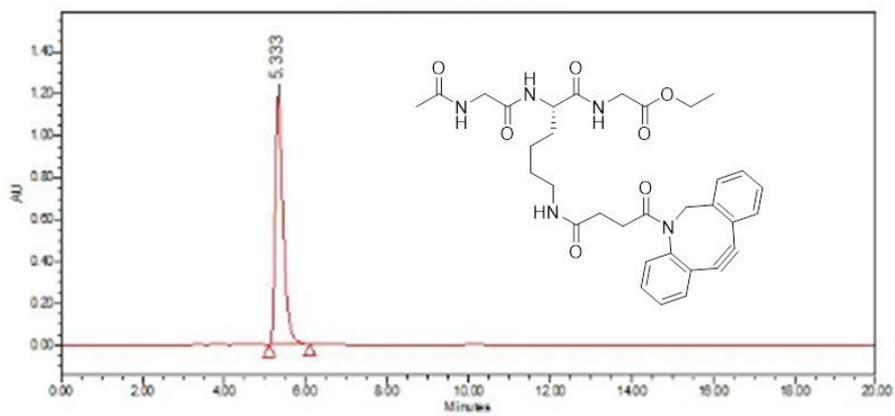
À une solution du peptide **9** (38 mg, 0,084 mmol, 1,2 eq) dans du dichlorométhane anhydre (10 mL) sont ajoutés la triéthylamine (35 μL , 0,25 mmol, 3,6 eq) et le composé **12** (28 mg, 0,069 mmol, 1 eq). La solution est agitée pendant 24 heures sous argon à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec de l'eau distillée (10 mL), séché sur MgSO_4 et concentré sous pression réduite. Le produit brut est purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **16** sous la forme d'un solide blanc (34 mg, 79 %).

RMN ¹H (400 MHz, CHCl_3) : δ 7,70-7,57 (m, 2H) ; 7,55-7,52 (m, NH) ; 7,48-7,46 (m, 1H) ; 7,40-7,35 (m, 3H) ; 7,24-7,17 (m, 2H) ; 7,11-7,07 (m, NH) ; 6,68-6,62 (NH) ; 6,52-6,48 (NH) ; 5,15-5,07 (m, 1H, CH) ; 4,56-4,43 (m, 1H) ; 4,13 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 4,02-3,90 (m, 2H) ; 3,87-3,81 (m, 1H, CH) ; 3,76-3,59 (m, 2H) ; 3,35-3,21 (m, 0,5H) ; 3,10-2,98 (m, 1H) ; 2,96-2,81 (m, 1H) ; 2,78-2,66 (m, 0,5H) ; 2,37-2,26 (m, 1H) ; 2,19-2,05 (m, 1H) ; 1,94 (s, 3H, CH_3) ; 1,91-1,71 (m, 2H) ; 1,69-1,56 (m, 1H) ; 1,50-1,27 (m, 4H) ; 1,22 (t, 3H, 7,2 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CHCl_3) : δ 172,8 ; 172,7 ; 172,5 ; 172,5 ; 172,4 ; 172,3 ; 171,5 ; 171,3 ; 170,0 ; 169,9 ; 169,7 ; 151,3 ; 151,3 ; 148,3 ; 148,2 ; 132,4 ; 132,3 ; 129,6 ; 128,9 ; 128,8 ; 128,4 ; 128,4 ; 128,3 ; 128,0 ; 127,8 ; 127,3 ; 127,1 ; 125,6 ; 125,6 ; 123,3 ; 123,2 ; 122,6 ; 122,5 ; 114,8 ; 114,7 ; 108,0 ; 114,7 ; 108,0 ; 107,9 ; 77,3 ; 61,5 ; 61,5 ; 53,1 ; 53,0 ; 43,4 ; 43,2 ; 41,2 ; 38,8 ; 38,8 ; 31,6 ; 31,3 ; 30,9 ; 30,5 ; 30,2 ; 28,6 ; 28,4 ; 22,9 ; 22,8 ; 22,2 ; 14,2 ; 14,2.

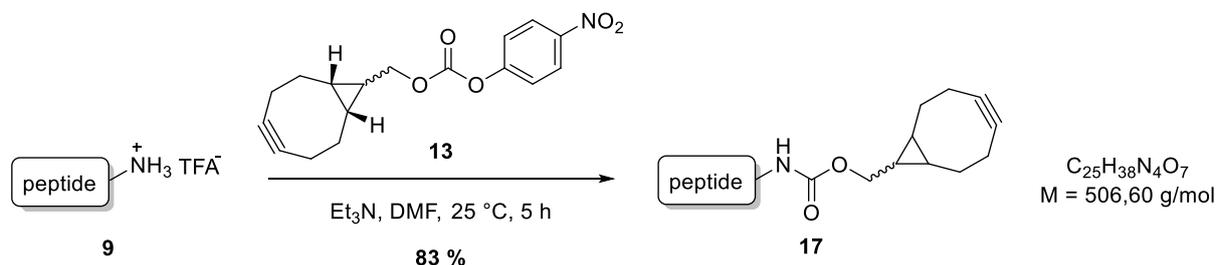
MS (HRMS) : valeurs calculées pour $\text{M}(+)$ $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_7$: 618,2928 ; valeurs mesurées : 618,2755.

t_R : 5,3 min



Ethyl-*N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-((bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl)-L-lysyl-glycinate

(17)



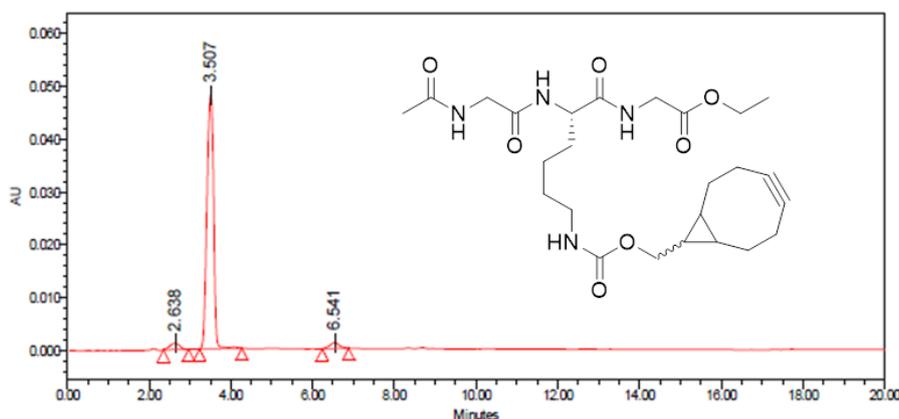
À une solution du peptide **9** (117 mg, 0,27 mmol, 1,2 eq) dans du DMF anhydre (10 mL) sont ajoutés la triéthylamine (92 μL , 0,66 mmol, 3 eq) et le composé **13** (69 mg, 0,22 mmol, 1 eq). La solution est agitée pendant 5 heures sous argon à température ambiante. Le mélange réactionnel est concentré sous vide et le produit brut obtenu est purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **16** sous la forme d'un solide blanc (92 mg, 83 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,33 (s, NH) ; 8,05 (s, NH) ; 7,96 (s, NH) ; 7,05 (s, NH) ; 4,28-4,22 (m, 1H) ; 4,11-4,07 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 4,05-4,01 (m, 1,31H) ; 3,86-3,82 (m, 0,62H) ; 3,81-3,79 (t, 2H, 5,6 Hz) ; 3,71 (d, 2H, 6 Hz) ; 2,95-2,91 (m, 2H) ; 2,36-1,89 (m, 6H) ; 1,84 (s, 3H, CH₃) ; 1,70-1,61 (m, 1H) ; 1,55-1,46 (m, 2H) ; 1,38-1,24 (m, 5H) ; 1,18 (t, 3H, 7,2 Hz) ; 1,04 (d, 0,65H, 6,4 Hz) ; 0,90-0,71 (m, 1,32H) ; 0,71-0,59 (m, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 172,0 ; 169,6 ; 169,5 ; 168,9 ; 156,3 ; 99,0 ; 98,9 ; 67,6 ; 61,2 ; 60,3 ; 54,9 ; 52,2 ; 42,0 ; 40,7 ; 32,9 ; 31,8 ; 29,1 ; 28,6 ; 25,5 ; 23,4 ; 22,4 ; 22,2 ; 20,8 ; 19,5 ; 17,6 ; 14,0.

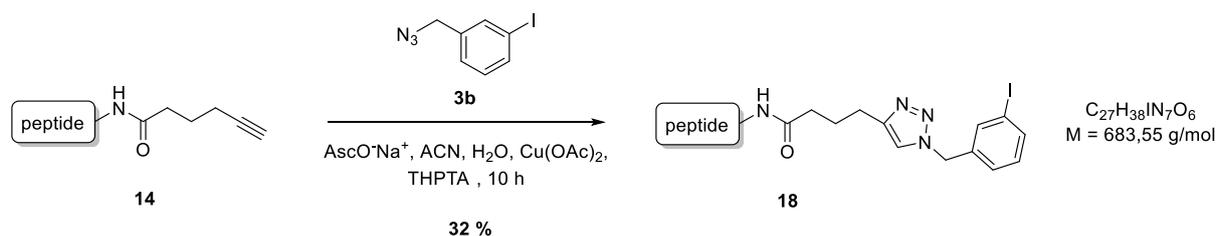
MS (HRMS) : valeurs calculées pour $\text{M}^+(\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na})$: 529,2638 ; valeurs mesurées : 529,2644.

t_R : 3,5 min



Ethyl-*N*²-(acetyl)glycyl)-*N*⁶-((bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl)-L-lysyl-glycinate

(18)



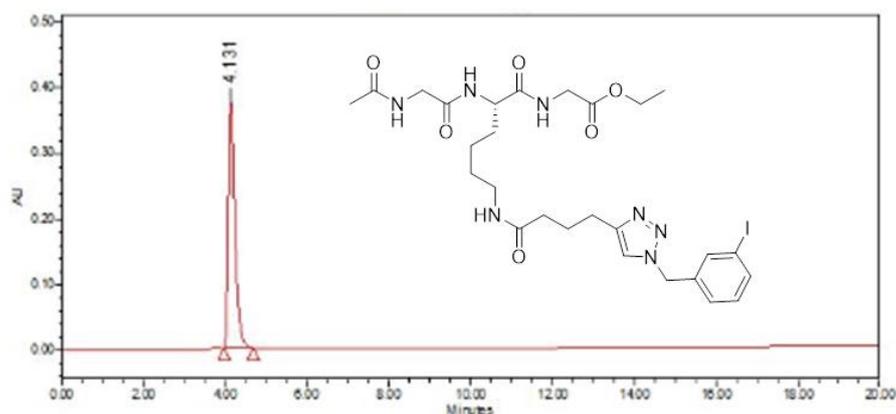
À une solution de peptide **14** (32 mg, 0,076 mmol, 1 eq) et de composé **3b** (18 mg, 0,069 mmol, 0,9 eq) dans du méthanol (2,5 mL) sont ajoutées une solution d'ascorbate de sodium (1,5 mg, 7,6 µmol, 0,1 eq) dans de l'eau distillée (0,5 mL), une solution de sulfate de cuivre (0,19 mg, 758 nmol, 0,01 eq) dans de l'eau distillée (0,5 mL) et une solution de ligand THPTA (0,33 mg, 758 nmol, 0,01 eq) dans du méthanol (0,5 mL). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 10 heures. Le mélange réactionnel est concentré sous vide et purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **16** sous la forme d'une huile incolore (15 mg, 32 %).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : δ 7,79 (s, 1H) ; 7,71 (s, 1H) ; 7,69 (s, 1H) ; 7,31 (d, 1H, 8 Hz) ; 7,14 (t, 1H, 8 Hz) ; 5,52 (s, 2H, CH₂) ; 4,42-4,35 (m, 1H) ; 4,16 (q, 2H, CH₂, 7,2 Hz) ; 3,91 (d, 2H, 6 Hz) ; 3,86 (s, 2H) ; 3,16 (t, 2H, CH₂, 6,4 Hz) ; 2,71 (t, 2H, CH₂, 7,6 Hz) ; 2,23 (t, 2H, CH₂, 7,6 Hz) ; 2,00 (s, 3H, CH₃) ; 1,95 (t, 2H, CH₂, 7,6 Hz) ; 1,91-1,83 (m, 1H) ; 1,74-1,64 (m, 1H) ; 1,57-1,48 (m, 2H) ; 1,46-1,36 (m, 2H) ; 1,25 (t, 3H, CH₃, 7,2 Hz).

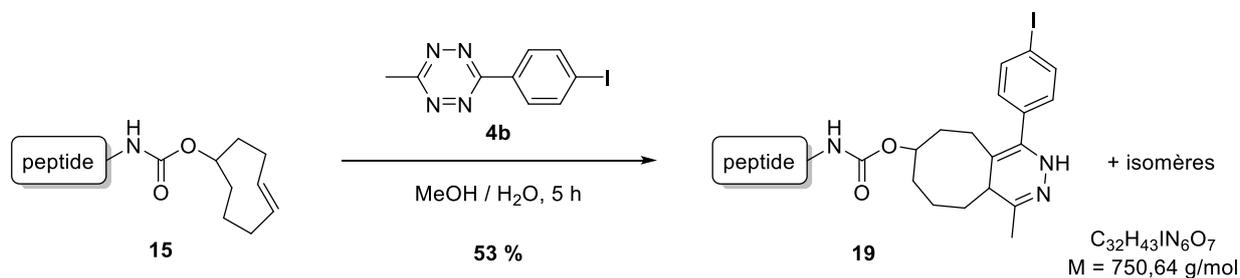
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : δ 175,5 ; 174,7 ; 174,0 ; 171,7 ; 171,2 ; 149,0 ; 139,4 ; 138,7 ; 138,1 ; 131,8 ; 128,4 ; 123,6 ; 95,2 ; 62,3 ; 54,5 ; 53,9 ; 43,7 ; 42,1 ; 40,1 ; 36,4 ; 32,6 ; 29,9 ; 26,7 ; 25,8 ; 24,0 ; 22,5 ; 14,5.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₂₇H₃₉IN₇O₆ : 684,2007 ; valeurs mesurées : 684,2005.

t_R : 4,1 min



Ethyl-*N*²-(acétylglycyl)-*N*⁶-(((1-(4-iodophenyl)-4-méthyl-5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazin-7-yl)oxy)carbonyl)-L-lysylglycinate (**19**)



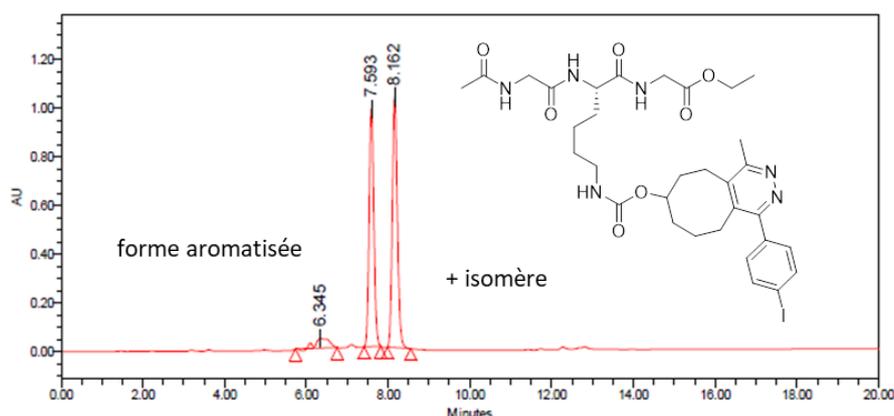
À une solution de peptide **15** (9,8 mg, 0,020 mmol, 1 eq) dans un mélange eau / méthanol 1 / 1 (1 mL) est ajouté le composé **4b** (6,7 mg, 22,6 μ mol, 1,1 eq). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 5 heures. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **16** sous la forme d'un solide blanc (8 mg, 53 %).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) : δ 7,84 (d, 2H, 6,4 Hz) ; 7,22 (t, 2H, 6,4 Hz) ; 7,19-7,10 (m, NH) ; 7,01-6,90 (m, NH) ; 6,90-6,74 (m, NH) ; 5,50-5,35 (m, NH) ; 4,48-4,38 (m, 1H, CH) ; 4,29-4,19 (m, 1H) ; 4,12-4,06 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 3,86-3,76 (m, 2H) ; 3,76-3,60 (m, 2H) ; 3,06-2,92 (m, 2H) ; 2,92-2,78 (m, 2H) ; 2,67 (s, 3H, CH₃) ; 2,63-2,50 (m, 2H) ; 1,92-1,77 (m + s, 6H, CH₃ + 3H) ; 1,77-1,70 (m, 1H) ; 1,65-1,50 (m, 4H) ; 1,45-1,32 (m, 2H) ; 1,32-1,22 (m, 2H) ; 1,19 (t, 3H, CH₃, 7,2 Hz).

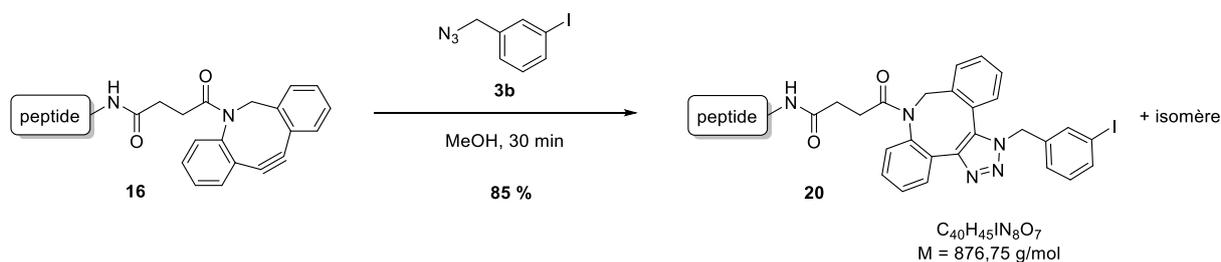
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃CN) : δ 173,1 ; 171,9 ; 171,8 ; 170,7 ; 170,4 ; 170,3 ; 129,2 ; 139,1 ; 138,4 ; 132,1 ; 132,0 ; 130,5 ; 61,8 ; 54,0 ; 53,9 ; 44,0 ; 41,8 ; 41,1 ; 41,0 ; 36,2 ; 36,1 ; 34,5 ; 34,4 ; 32,1 ; 32,0 ; 30,1 ; 31,0 ; 24,8 ; 24,3 ; 24,2 ; 23,3 ; 22,9 ; 21,9 ; 20,5 ; 14,5.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₃₂H₄₄IN₆O₇ : 751,2316 ; valeurs mesurées : 751,2319.

t_R : 6,3 – 7,6 – 8,2 min



Ethyl-*N*²-(acétylglycyl)-*N*⁶-(1-(4-iodophényl)-(DIBAC)^{tr})-L-lysylglycinate (**20**)



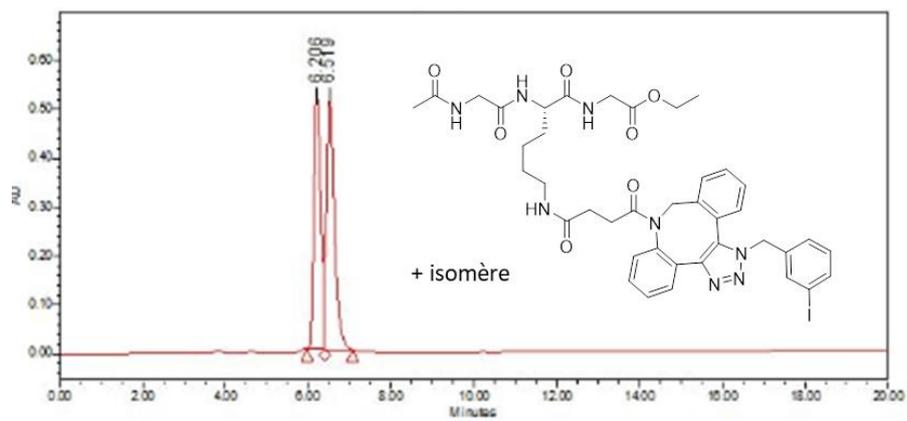
À une solution de peptide **16** (33 mg, 0,053 mmol, 1 eq) dans du méthanol (4 mL) est ajouté le composé **3b** (17 mg, 64 μmol , 1,2 eq). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **16** sous la forme d'une huile incolore (39 mg, 85 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7,71-7,54 (m, 4H) ; 7,52-7,49 (m, 1H) ; 7,47-7,32 (m, 3H) ; 7,24-7,19 (m, 2H) ; 7,16-7,06 (m, 2H) ; 7,05-6,98 (m, NH) ; 6,93-6,91 (m, NH) ; 6,72-6,63 (m, NH) ; 6,51-6,40 (m, NH) ; 5,95 (t, 0,8H, 18,8 Hz) ; 5,79 (t, 0,4H, 15,2 Hz) ; 5,63-5,44 (m, 1,2H) ; 5,30-5,24 (m, 0,4H) ; 5,11-5,03 (m, 0,1H) ; 4,96-4,88 (m, 0,1H) ; 4,57-4,26 (m, 2H) ; 4,49-4,06 (m, 2H) ; 4,00-3,70 (m, 4H) ; 3,24-2,87 (m, 2H) ; 2,37-2,25 (m, 1H) ; 2,22-2,01 (m, 2H) ; 1,97 (s, 3H) ; 1,90-1,71 (m, 2H) ; 1,71-1,52 (m, 1H) ; 1,45-1,34 (m, 2H) ; 1,34-1,27 (m, 2H) ; 1,23 (t, 3H, 6,8 Hz).

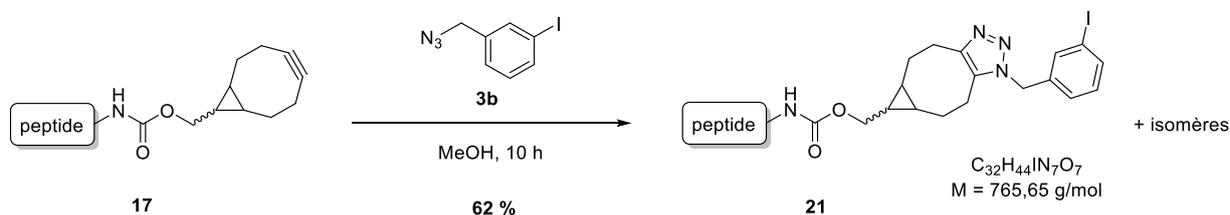
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 172,5 ; 172,4 ; 172,3 ; 172,2 ; 172,1 ; 172,0 ; 171,4 ; 171,4 ; 171,2 ; 170,1 ; 170,0 ; 170,0 ; 169,8 ; 145,4 ; 145,3 ; 143,3 ; 141,5 ; 140,2 ; 140,2 ; 138,0 ; 137,8 ; 137,8 ; 137,4 ; 137,3 ; 137,2 ; 136,6 ; 136,5 ; 136,3 ; 136,0 ; 135,3 ; 135,2 ; 133,6 ; 132,7 ; 132,3 ; 132,2 ; 131,6 ; 131,5 ; 131,4 ; 131,3 ; 131,0 ; 130,9 ; 130,3 ; 130,0 ; 129,9 ; 129,7 ; 129,5 ; 129,2 ; 128,8 ; 128,7 ; 128,4 ; 128,2 ; 128,1 ; 127,3 ; 127,2 ; 127,1 ; 127,0 ; 126,9 ; 126,6 ; 124,2 ; 124,1 ; 94,9 ; 94,6 ; 77,36 ; 61,5 ; 53,4 ; 53,3 ; 53,2 ; 53,0 ; 52,0 ; 51,7 ; 51,6 ; 51,3 ; 51,2 ; 50,7 ; 43,3 ; 41,4 ; 39,0 ; 38,7 ; 38,5 ; 31,5 ; 31,4 ; 31,2 ; 31,2 ; 30,9 ; 30,8 ; 30,1 ; 29,9 ; 29,7 ; 29,6 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,6 ; 28,3 ; 23,0 ; 22,9 ; 22,4.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{IN}_8\text{O}_7$: 877,2534 ; valeurs mesurées : 877,2554.

t_R : 6,2 – 6,5 min



Ethyl-*N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(((6*R*)-1-(3-iodobenzyl)-1,4,5,5a,6,6a,7,8-octahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-6-yl)méthoxy)carbonyl)-L-lysylglycinate (**21**)



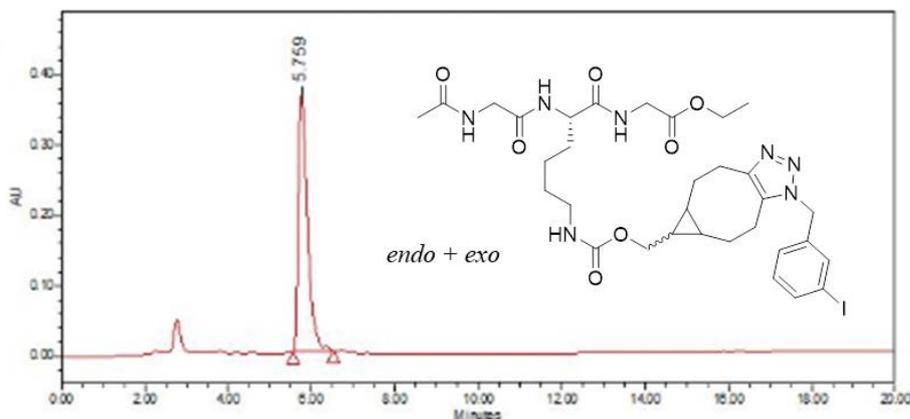
À une solution de peptide **17** (33 mg, 0,065 mmol, 1 eq) dans du méthanol (4 mL) est ajouté le composé **3b** (16 mg, 62 μmol , 0,95 eq). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 10 heures. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **16** sous la forme d'une huile incolore (29 mg, 62 %).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : 7,67 (d, 1H, 6,8 Hz) ; 7,47 (s, 1H) ; 7,17-7,11 (m, 2H) ; 5,59-5,50 (m, 2H, CH₂) ; 4,40-4,37 (m, 1H) ; 4,20-4,09 (m, 3,32H) ; 3,92 (d, 2,65H, 5,6 Hz) ; 3,87 (s, 2H) ; 3,16-3,03 (m, 3H) ; 2,96-2,80 (m, 2H) ; 2,72-2,58 (m, 1H) ; 2,42-2,28 (m, 0,64H) ; 2,26-2,12 (m, 1,34H) ; 2,01 (s, 3H, CH₃) ; 1,94-1,83 (m, 1H) ; 1,73-1,61 (m, 2H) ; 1,55-1,37 (m, 5H) ; 1,25 (t, 3H, CH₃, 7,2 Hz) ; 1,10-0,95 (m, 0,8H) ; 0,91-0,81 (m, 1,4H) ; 0,78-0,67 (m, 0,8H).

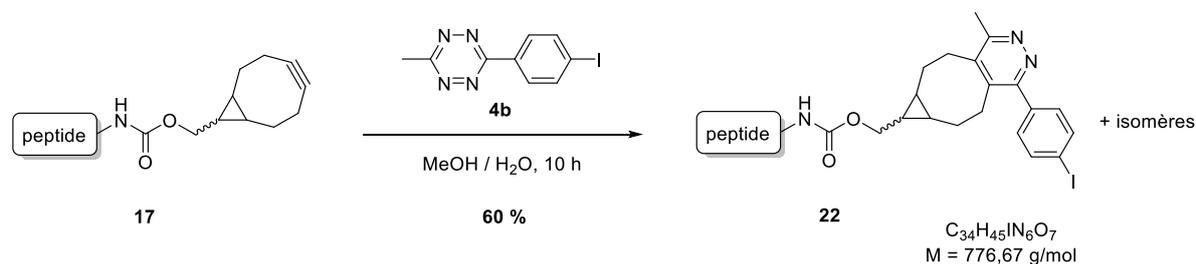
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : δ 174,7 ; 174,0 ; 171,7 ; 171,1 ; 159,2 ; 146,4 ; 139,5 ; 138,4 ; 137,1 ; 135,7 ; 135,6 ; 131,8 ; 127,5 ; 127,4 ; 95,2 ; 69,3 ; 63,4 ; 62,3 ; 54,5 ; 51,7 ; 49,8 ; 43,8 ; 43,7 ; 42,2 ; 42,0 ; 41,4 ; 32,6 ; 30,8 ; 30,5 ; 28,0 ; 27,1 ; 26,4 ; 26,1 ; 25,6 ; 23,9 ; 23,6 ; 23,5 ; 23,4 ; 23,3 ; 23,3 ; 22,5 ; 22,4 ; 20,5 ; 20,2 ; 18,8 ; 14,5.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₃₂H₄₅IN₇O₇ : 766,2425 ; valeurs mesurées : 766,2421.

t_R : 5,7 min



Ethyl-*N*²-(acetylglycyl)-*N*⁶-(((1-(4-iodophenyl)-4-methyl-6,6a,7,7a,8,9-hexahydro-5H-cyclopropa [5,6]cycloocta[1,2-d]pyridazin-7-yl)methoxy)carbonyl)-L-lysylglycinate (**22**)



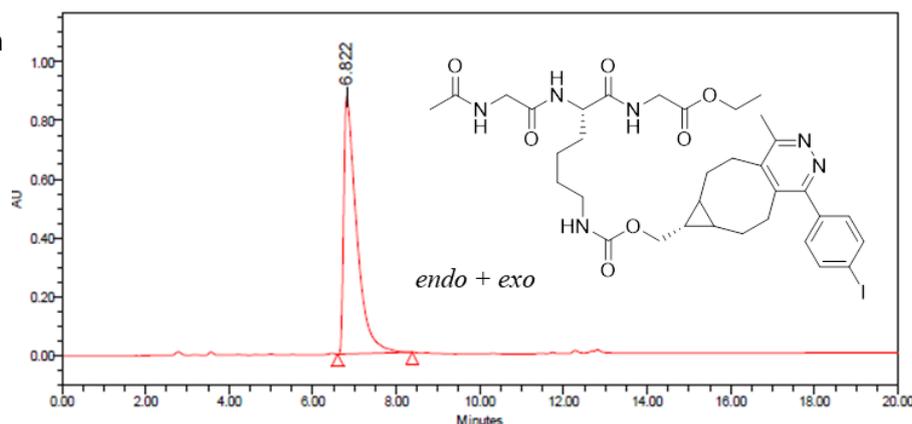
À une solution de peptide **17** (10 mg, 0,02 mmol, 1 eq) dans un mélange eau / méthanol 1 / 1 (1 mL) est ajouté le composé **4b** (6,5 mg, 22 μmol , 1,1 eq). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 10 heures. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et purifié sur du gel de silice (chloroforme / méthanol) pour donner le peptide **16** sous la forme d'une huile incolore (9,2 mg, 60 %).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) : 7,84 (d, 2H, 8,4 Hz) ; 7,2 (d, 2H, 8,4 Hz) ; 7,13-7,08 (m, NH) ; 6,89-6,85 (m, NH) ; 6,85-6,76 (m, NH) ; 5,59-5,48 (m, NH) ; 4,28-4,22 (m, 1H, CH) ; 4,12-4,06 (q, 2H, 7,2 Hz) ; 4,06-3,99 (m, 1,3H) ; 3,81 (d, 2H, 6 Hz) ; 3,71 (d, 2,56H, 5,6 Hz) ; 3,05-2,95 (m, 2H) ; 2,86-2,74 (m, 2H) ; 2,67 (s, 3H, CH₃) ; 2,58-2,45 (m, 0,62H, CH₂_{exo}) ; 2,34-2,18 (m, 2,34H, CH₂_{endo}) ; 1,92-1,85 (m + s, 5H, CH₃ + 2CH) ; 1,81-1,73 (m, 1H) ; 1,63-1,52 (m, 2H) ; 1,45-1,26 (m, 5H) ; 1,18 (t, 3H, CH₃, 6,8 Hz) ; 1,10-0,99 (m, 0,68H, CH₂_{exo}) ; 0,90-0,79 (m, 1,35H, CH₂_{endo}) ; 0,75-0,66 (M, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃CN) : δ 173,0 ; 171,5 ; 170,7 ; 170,4 ; 158,9 ; 141,8 ; 139,5 ; 138,3 ; 94,6 ; 92,5 ; 62,48 ; 61,8 ; 53,9 ; 44,0 ; 41,9 ; 41,1 ; 32,1 ; 30,4 ; 30,1 ; 28,5 ; 28,4 ; 28,3 ; 23,3 ; 23,0 ; 20,9 ; 20,8 ; 14,5.

MS (HRMS) : valeurs calculées pour M(+) C₃₄H₄₅IN₆O₇ : 777,2473 ; valeurs mesurées : 777,2479.

t_R : 6,8 min



II. Radiochimie

II-1. Radiomarquages précurseurs bifonctionnels

Isotopes radioactifs :

L'iode-125 a été obtenu commercialement auprès de Perkin Elmer dans une solution d'hydroxyde de sodium à 10^{-5} M (Na^{125}I) avec une activité volumique de 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (1,85 MBq/ μL).

L'astate-211 a été produit par le cyclotron Arronax en utilisant la réaction $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$, et récupéré de la cible irradiée dans du chloroforme en utilisant un protocole de distillation sèche adapté de la procédure décrite précédemment par Lindegren²⁰⁸. Avant utilisation, la solution d'astate-211 a été réduite à sec sous un léger courant d'azote.

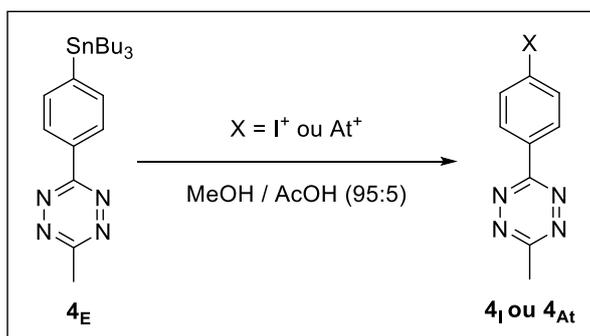
Analyse chromatographique :

Les chromatographies liquides haute performance (CLHP) radioactives ont été réalisées sur le même système que les références analytiques non radioactives. En sortie de cellule de détection UV, l'éluant est redirigé vers un détecteur de radioactivité Flow Star LB 513 (BERTHOLD Technologies).

La purification des synthons radioactifs 4_{I} et 4_{At} issus du radiomarquage du précurseur stannique 4_{E} a été réalisée sur un appareil CLHP Waters Alliance e2695 équipé d'une colonne silica (Spherisorb 5 μm Silica 4,6 mm x 250 cm, Waters) avec un débit réglé à 2 mL/min et le gradient suivant : t = 0 : 95 % (A), 5 % (B) ; t = 5 min : 95 % (A), 5 % (B) ; t = 15 min : 100 % (B) ; avec A = *n*-heptane et B = acétate d'éthyle.

La purification des synthons radioactifs 4_{I} et 4_{At} issus du radiomarquage du précurseur iodonium 4_{N} a été réalisée à partir de cartouche de silice (Sep-Pak[®] Vac silica 3cc, Waters) avec l'acétate d'éthyle comme éluant.

Radiomarquage du précurseur stannique **4_E** à l'iode-125 et à l'astate-211 :

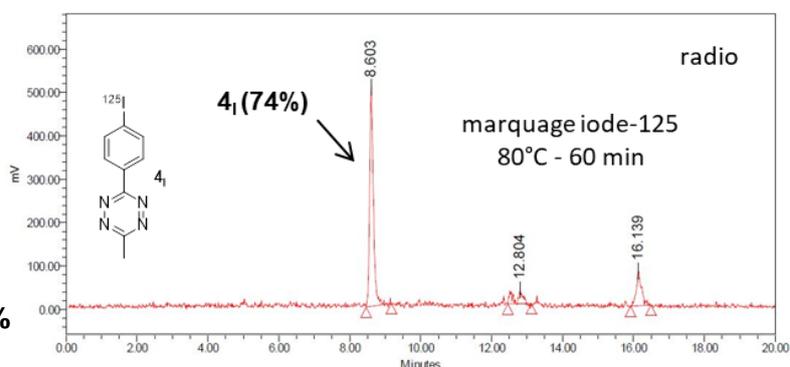


Iode-125 :

À une solution de précurseur stannique **4_E** (50 μ L, 2.5 mmol/L) dans un mélange MeOH / AcOH (95 : 5) sont ajoutés 45 μ L d'une solution de *N*-chlorosuccinimide (2.5 mmol/L) dans un mélange MeOH / AcOH (95 : 5) et 5 μ L d'une solution d'iodure de sodium $Na[^{125}I]$ (770 kBq). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H₂O / ACN 60:40 (100 μ L, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon **4_I** a été identifié par comparaison avec le temps de rétention du composé iodé non radioactif, et purifié par CLHP en phase normale.

Conditions optimisées :

- température : **80 °C**
- temps : **60 min**
- solvant : **MeOH / AcOH**
- RRC : **74 %**
- RRC après purification : **42%**



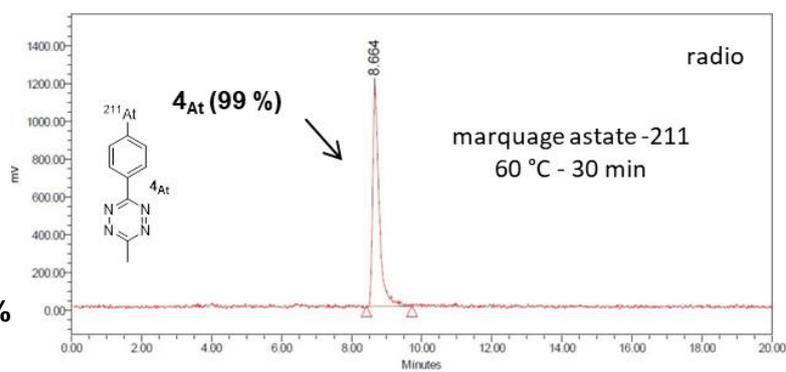
Astate-211 :

À une solution de précurseur stannique **4_E** (6 μ L, 2.5 mmol/L) dans un mélange MeOH / AcOH (95 : 5) sont ajoutés 4 μ L d'une solution de *N*-chlorosuccinimide (2.5 mmol/L) dans un mélange MeOH / AcOH (95 : 5) et 50 μ L d'une solution d'astate-211 (2 MBq) dans du MeOH. La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H₂O / ACN 60:40 (100 μ L, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon **4_{At}** a été identifié par comparaison

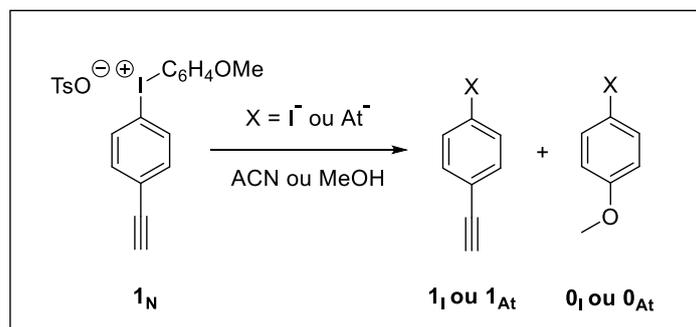
avec le temps de rétention du composé iodé non radioactif, et purifié par CLHP en phase normale.

Conditions optimisées :

- température : **60 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **MeOH / AcOH**
- RCC : **99 %**
- RRC après purification : **35 %**



Radiomarquage du précurseur iodonium 1_N à l'iode-125 et à l'astate-211 :

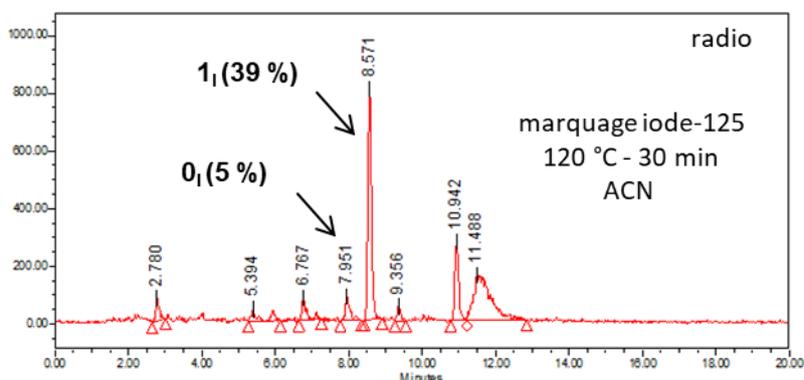


Iode-125 :

À une solution de précurseur iodonium 1_N (95 μ L, 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile est ajouté 5 μ L d'une solution d'iodure de sodium $Na[^{125}I]I$ (770 kBq). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H_2O / ACN 60:40 (100 μ L, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon 1_I a été identifié par comparaison avec le temps de rétention du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le synthon 1_I et l'iodoanisole 0_I sont extraits à l'éther diéthylique (2 x 50 μ L). L'éther diéthylique est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé 0_I par évaporation) pour donner le synthon 1_I à sec.

Conditions optimisées :

- température : **120 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **ACN**
- RRC : **39 %**
- RRC après purification : /



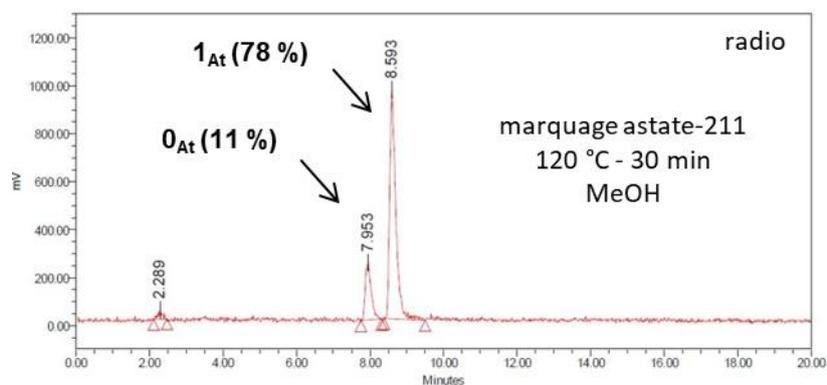
Astate-211 :

À une solution de précurseur iodonium 1_N (95 μ L, 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile ou du méthanol est ajouté 5 μ L d'une solution d'astature de sodium $Na[^{211}At]At$ (2 MBq) préparée auparavant à partir d'une solution de sulfite de sodium (1 mg/mL). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H_2O / ACN 60:40 (100 μ L, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon 1_{At} a été identifié par comparaison avec le temps de rétention

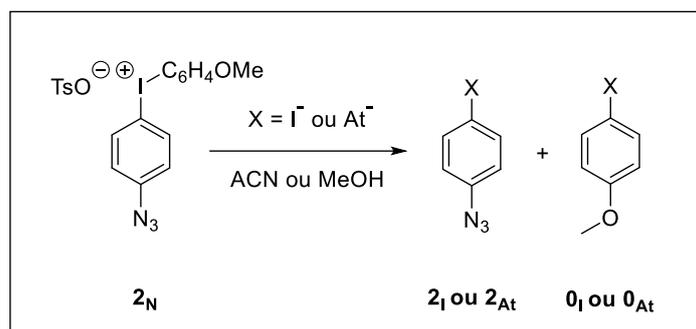
du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le synthon 1_{At} et l'astatoanisole 0_{At} sont extraits à l'éther diéthylique (2 x 50 μ L). L'éther diéthylique est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé 0_{At} par évaporation) pour donner le synthon 1_{At} à sec.

Conditions optimisées :

- température : **120 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **MeOH**
- RRC : **78 %**
- RRC après purification : /



Radiomarquage du précurseur iodonium **2_N** à l'iode-125 et à l'astate-211 :

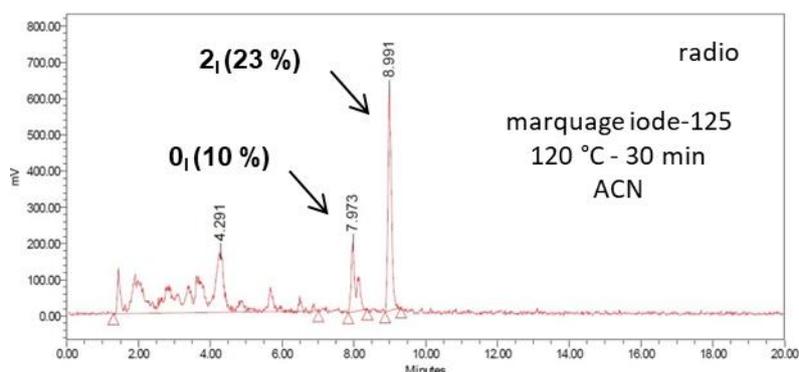


Iode-125 :

À une solution de précurseur iodonium **2_N** (95 μL , 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile est ajouté 5 μL d'une solution d'iodure de sodium $\text{Na}[^{125}\text{I}]\text{I}$ (770 kBq). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H_2O / ACN 60:40 (100 μL , 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon **2_I** a été identifié par comparaison avec le temps de rétention du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le synthon **2_I** et l'iodoanisole **0_I** sont extraits à l'éther diéthylique (2 x 50 μL). L'éther diéthylique est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé **0_I** par évaporation) pour donner le synthon **2_I** à sec.

Conditions optimisées :

- température : **120 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **ACN**
- RRC : **23 %**
- RRC après purification : /



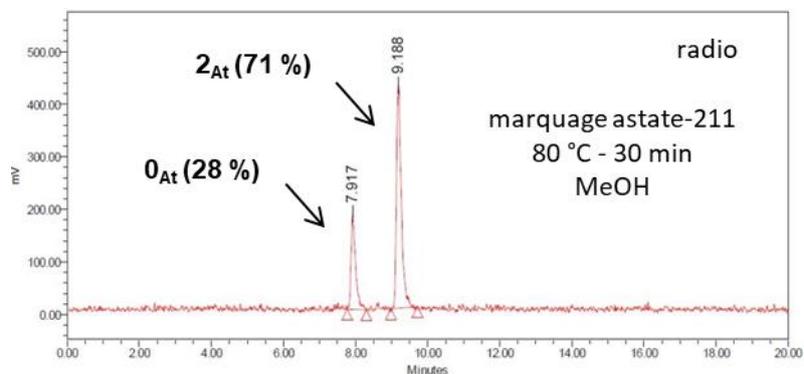
Astate-211 :

À une solution de précurseur iodonium **2_N** (95 μL , 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile ou du méthanol est ajouté 5 μL d'une solution d'astature de sodium $\text{Na}[^{211}\text{At}]\text{At}$ (2 MBq) préparée auparavant à partir d'une solution de sulfite de sodium (1 mg/mL). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H_2O / ACN 60:40 (100 μL , 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon **2_{At}** a été identifié par comparaison avec le temps de rétention

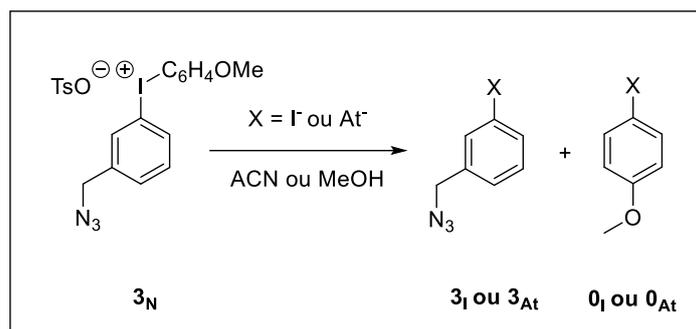
du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le synthon 2_{At} et l'astatoanisole 0_{At} sont extraits à l'éther diéthylique (2 x 50 μ L). L'éther diéthylique est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé 0_{At} par évaporation) pour donner le synthon 2_{At} à sec.

Conditions optimisées :

- température : **80 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **MeOH**
- RRC : **71 %**
- RRC après purification : /



Radiomarquage du précurseur iodonium 3_N à l'iode-125 et à l'astate-211 :

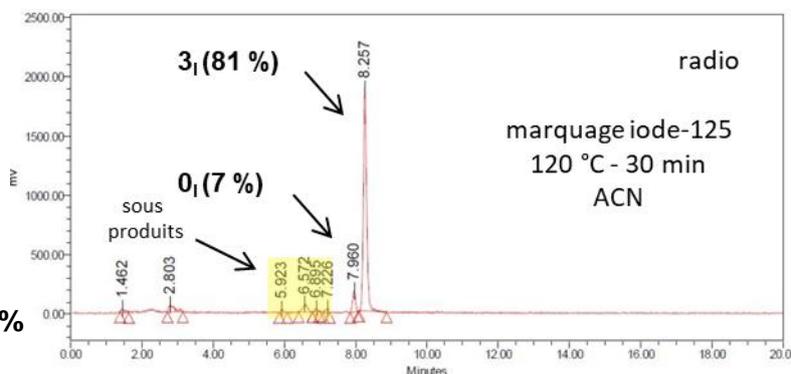


Iode-125 :

À une solution de précurseur iodonium 3_N (95 μ L, 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile est ajouté 5 μ L d'une solution d'iodure de sodium $Na[^{125}I]I$ (770 kBq). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H_2O / ACN 60:40 (100 μ L, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon 3_I a été identifié par comparaison avec le temps de rétention du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le synthon 3_I et l'iodoanisole 0_I sont extraits à l'éther diéthylique (2 x 50 μ L). L'éther diéthylique est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé 0_I par évaporation) pour donner le synthon 3_I à sec.

Conditions optimisées :

- température : **120 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **ACN**
- RRC : **81 %**
- RRC après purification : **65 %**



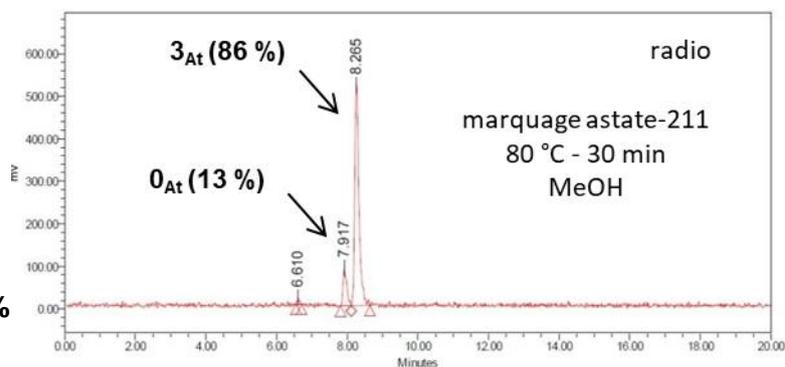
Astate-211 :

À une solution de précurseur iodonium 3_N (95 μ L, 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile ou du méthanol est ajouté 5 μ L d'une solution d'astature de sodium $Na[^{211}At]At$ (2 MBq) préparée auparavant à partir d'une solution de sulfite de sodium (1 mg/mL). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H_2O / ACN 60:40 (100 μ L, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon 3_{At} a été identifié par comparaison avec le temps de rétention

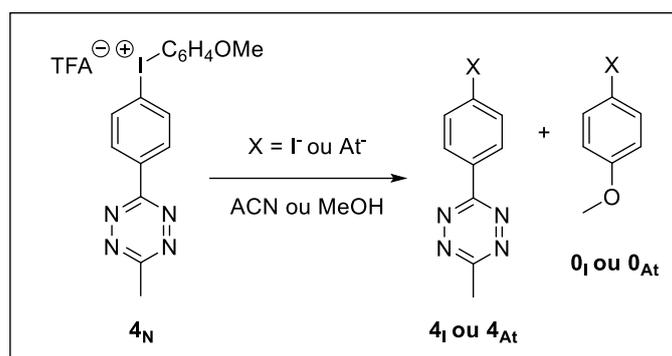
du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le synthon 3_{At} et l'astatoanisole 0_{At} sont extraits à l'éther diéthylique (2 x 50 μ L). L'éther diéthylique est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé 0_{At} par évaporation) pour donner le synthon 3_{At} à sec.

Conditions optimisées :

- température : **80 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **MeOH**
- RRC : **86 %**
- RRC après purification : **64 %**



Radiomarquage du précurseur iodonium 4_N à l'iode-125 et à l'astate-211 :

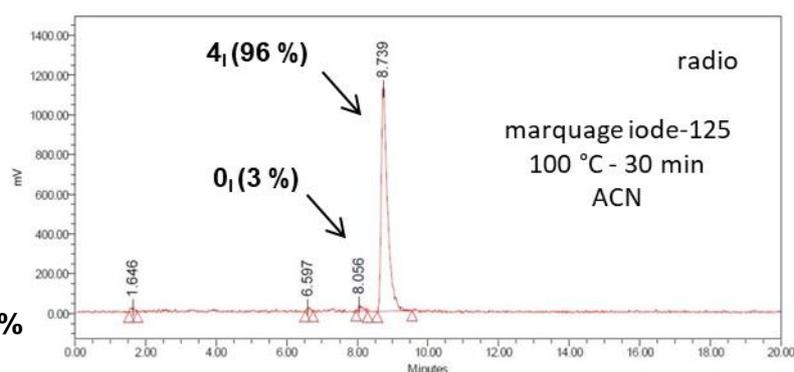


Iode-125 :

À une solution de précurseur iodonium 4_N (95 μ L, 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile est ajouté 5 μ L d'une solution d'iodure de sodium Na^{[125]I} (770 kBq). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été prélevé et dilué dans un mélange H₂O / ACN 60:40 (100 μ L, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon 4_I a été identifié par comparaison avec le temps de rétention du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le résidu obtenu est solubilisé dans de l'acétate d'éthyle (2 x 50 μ L) et introduit sur une petite cartouche de silice (Sep-Pak). Le synthon 4_I et l'iodoanisole 0_I sont élués avec de l'acétate d'éthyle (600 μ L) et récupérés dès les premières gouttes (200 μ L). L'acétate d'éthyle est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé 0_I par évaporation) pour donner le synthon 4_I à sec.

Conditions optimisées :

- température : 100 °C
- temps : 30 min
- solvant : ACN
- RRC : 96 %
- RRC après purification : 71 %



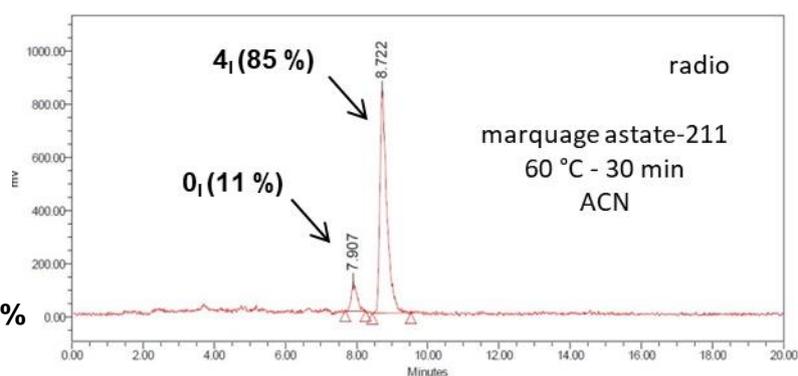
Astate-211 :

À une solution de précurseur iodonium 3_N (95 μ L, 5 mmol/L) dans de l'acétonitrile ou du méthanol est ajouté 5 μ L d'une solution d'astature de sodium Na^{[211]At} (2 MBq) préparée auparavant à partir d'une solution de sulfite de sodium (1 mg/mL). La solution est incubée aux températures choisies et aux temps voulus. Après chauffage, un aliquot a été

prélevé et dilué dans un mélange H₂O / ACN 60:40 (100 µL, 500 kBq) et analysé par CLHP en phase inverse. Le synthon **4_{At}** a été identifié par comparaison avec le temps de rétention du composé iodé non radioactif. Le mélange réactionnel est concentré sous flux d'azote. Le résidu obtenu est solubilisé dans de l'acétate d'éthyle (2 x 50 µL) et introduit sur une petite cartouche de silice (Sep-Pak). Le synthon **4_{At}** et l'astatoanisole **0_{At}** sont élués avec de l'acétate d'éthyle (600 µL) et récupérés dès les premières gouttes (200 µL). L'acétate d'éthyle est ensuite évaporé sous flux d'azote (élimination du composé **0_{At}** par évaporation) pour donner le synthon **4_{At}** à sec.

Conditions optimisées :

- température : **60 °C**
- temps : **30 min**
- solvant : **ACN**
- RRC : **85 %**
- RRC après purification : **76 %**



II-2. Radiomarquages peptides cliquables – Etude cinétique

Analyse chromatographique :

Les chromatographies liquides haute performance (CLHP) radioactives ont été réalisées sur le même système que les références analytiques non radioactives. En sortie de cellule de détection UV, l'éluant est redirigé vers un détecteur de radioactivité Flow Star LB 513 (BERTHOLD Technologies).

Radiomarquages des peptides cliquables **15** (TCO), **16** (DIBAC) et **17** (BCN) avec les synthons **3_I** / **3_{At}** et **4_I** / **4_{At}** (SPAAC / IEDDA) :

A une solution de peptide cliquable **15**, **16** ou **17** (90 µL, 200 µM) dans un mélange PBS / MeOH (99 : 1) est ajoutée une solution de synthon radioiodé (**3_I** ou **4_I**) ou astaté (**3_{At}** ou **4_{At}**) (1,5 MBq, 10 µL) dans du MeOH. La solution de couplage est agitée à température ambiante et analysée aux moments choisis par CLHP en phase inverse à partir d'un aliquot dilué dans un mélange H₂O / ACN (60 : 40) (100 µL, 600 kBq).

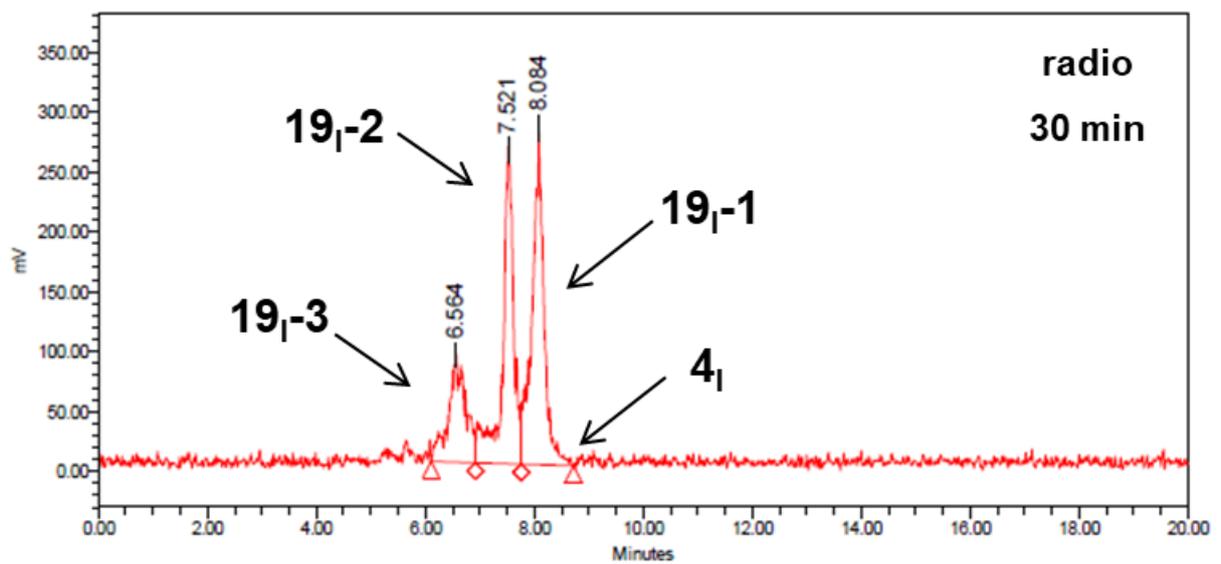
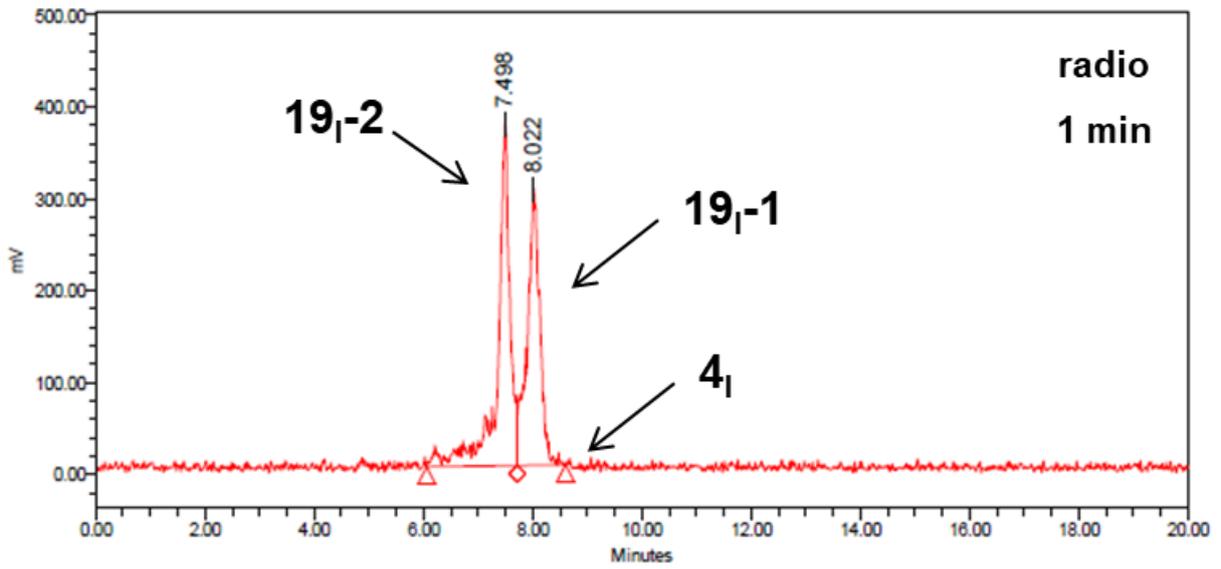
Les produits obtenus (**18_I** / **18_{At}** ; **19_I** / **19_{At}** ; **20_I** / **20_{At}** ; **21_I** / **21_{At}** ; **22_I** / **22_{At}**) ont été identifiés par comparaison avec les temps de rétention des peptides froids (**18** ; **19** ; **20** ; **21** ; **22**).

Radiomarquages du peptide cliquable **14** (**Alk**) avec les synthons **3_I** / **3_{At}** (CuAAC) :

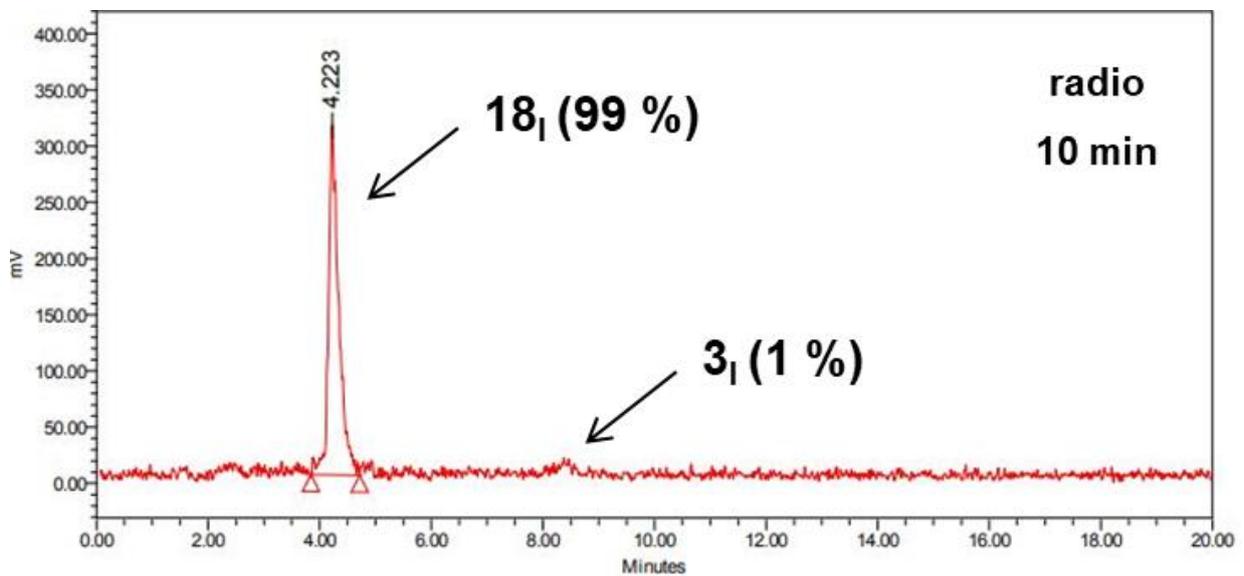
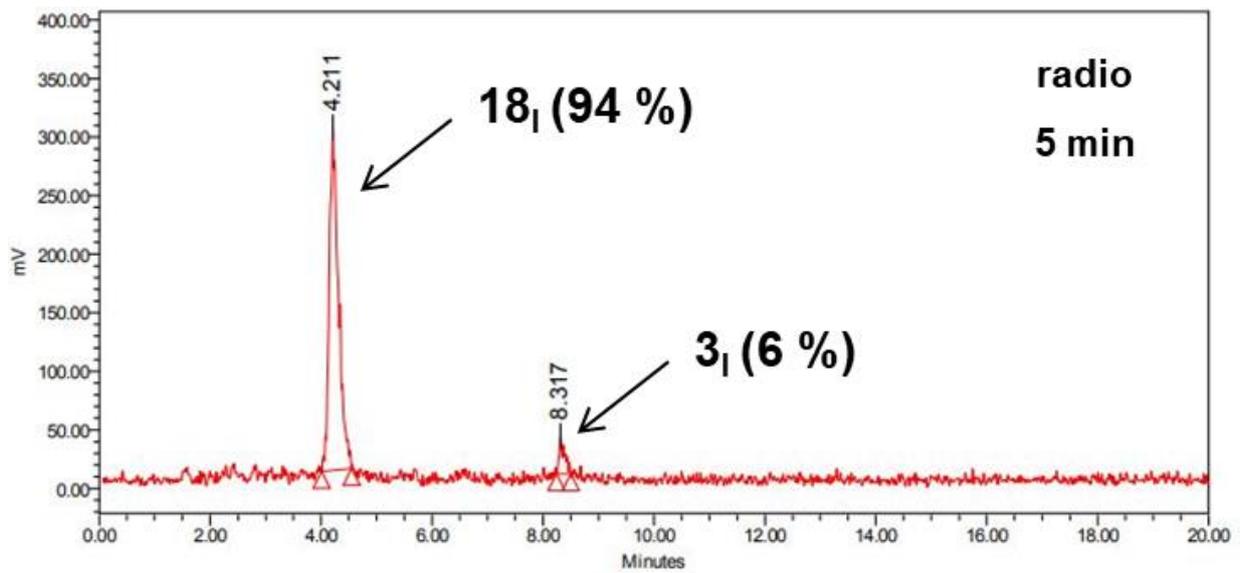
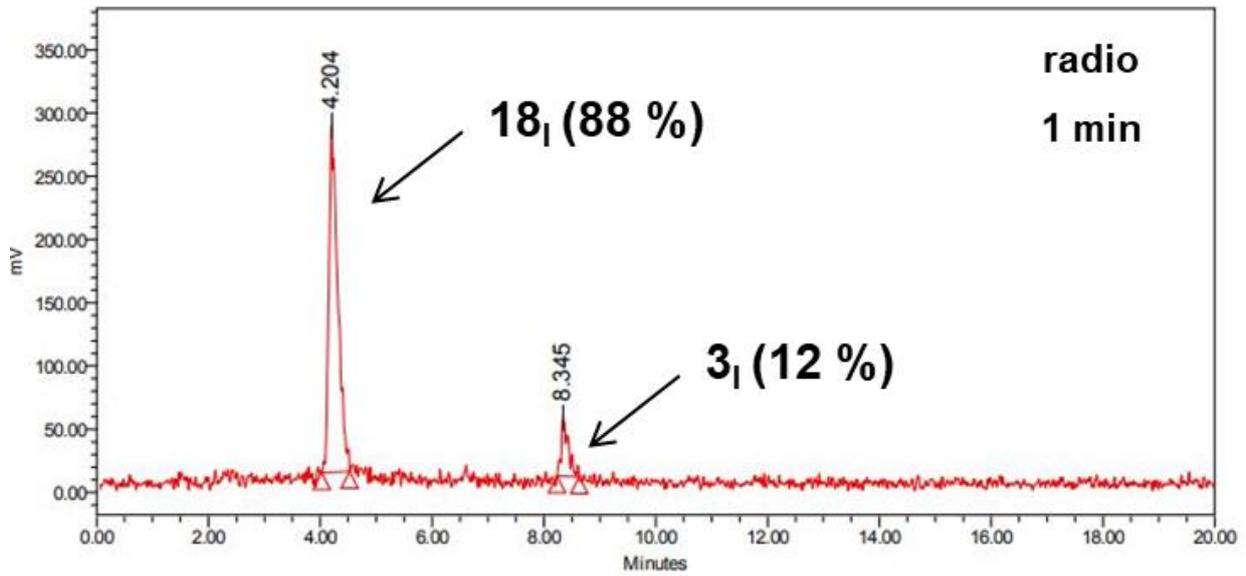
À une solution de peptide cliquable **14** (9 µL, 2,3 mM) dans un mélange PBS / MeOH (99: 1), sont ajoutés 58,5 µL d'eau déionisée, une solution d'ascorbate de sodium (7,5 µL, 15 mM), une solution de ligand THPTA (5 µL, 25 mM), une solution de Cu(OAc)₂ (10 µL, 20 mM) et une solution de synthon radioiodé (**3_I**) ou astaté (**3_{At}**) (1,5 MBq, 10 µL) dans du MeOH. La solution de couplage est agitée à température ambiante et analysée aux moments choisis par CLHP en phase inverse à partir d'un aliquot dilué dans un mélange H₂O / ACN (60 : 40) (100 µL, 600 kBq).

Les produits obtenus (**17_I** / **17_{At}**) ont été identifiés par comparaison avec le temps de rétention du peptide froid (**17**).

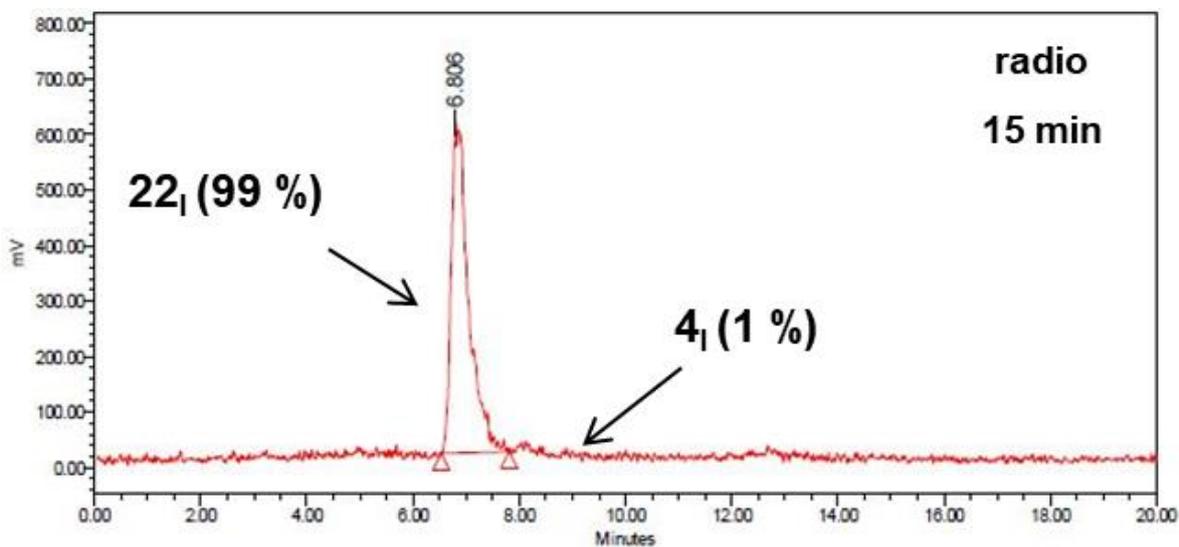
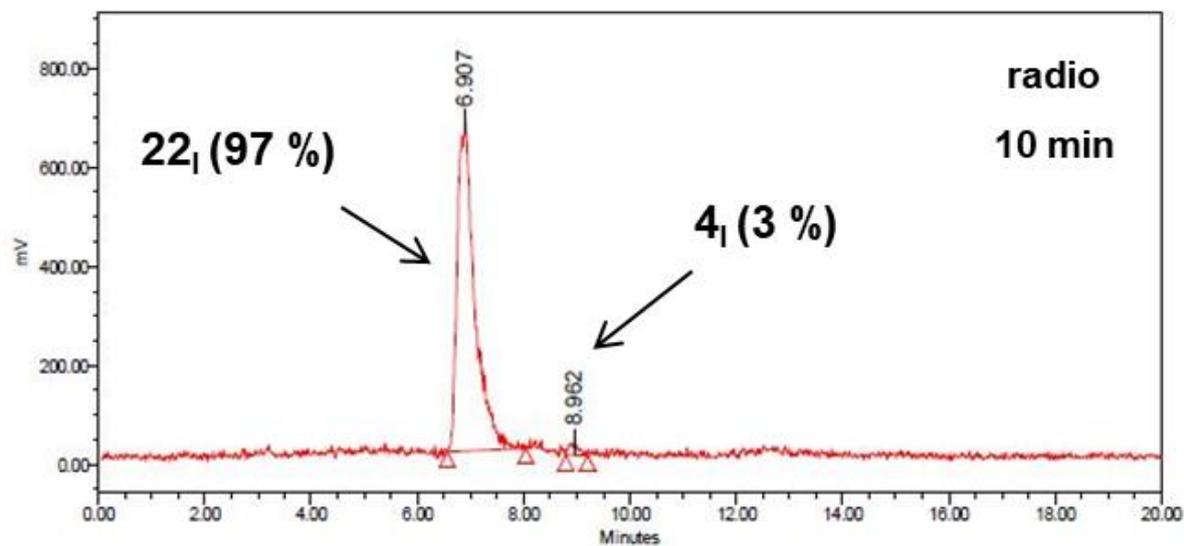
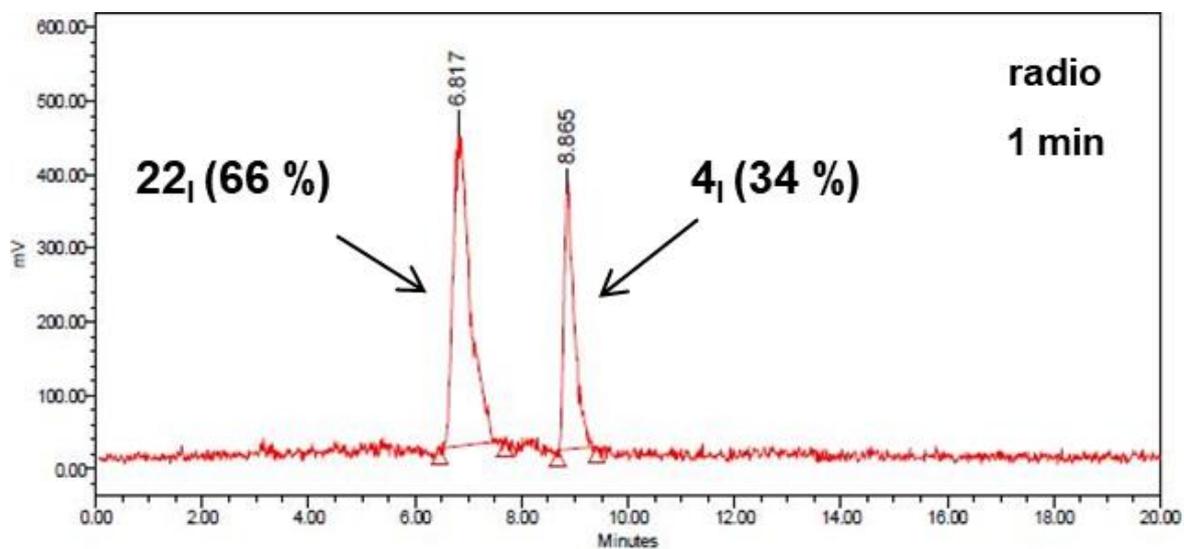
Exemples de radio-chromatogrammes pour le couple TCO-tétrazine (**15** + **4_I**) à l'iode-125 :



Exemples de radio-chromatogrammes pour le couple Alk-azoture (**14** + **3_I**) à l'iode-125 :

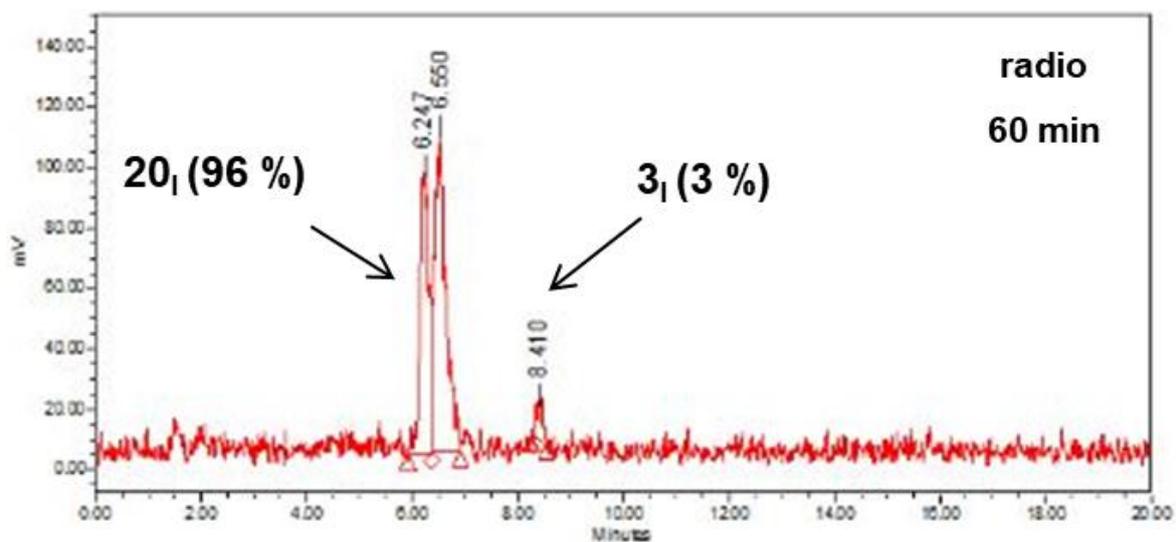
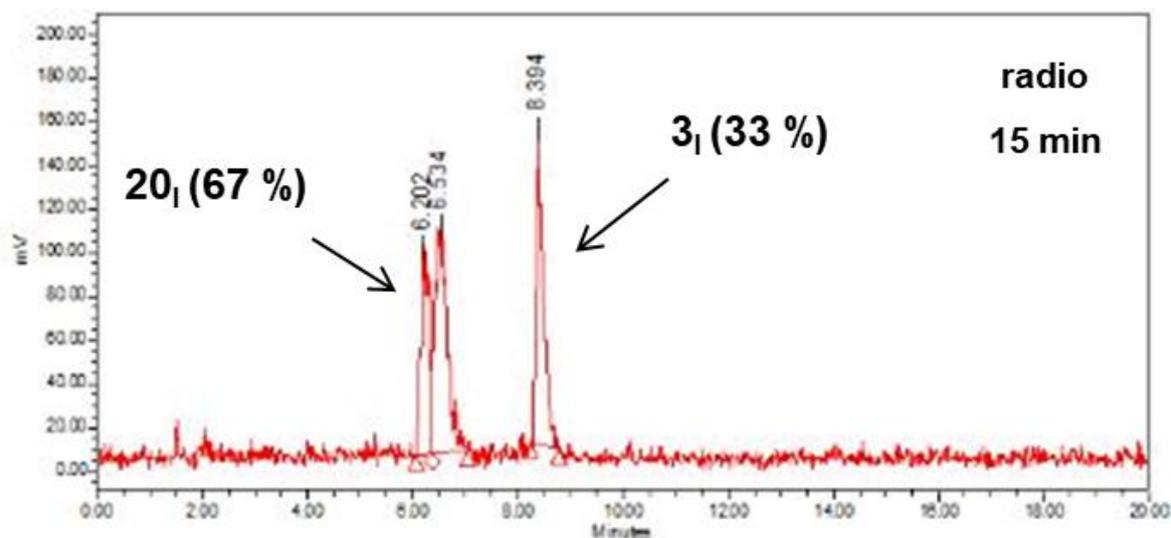
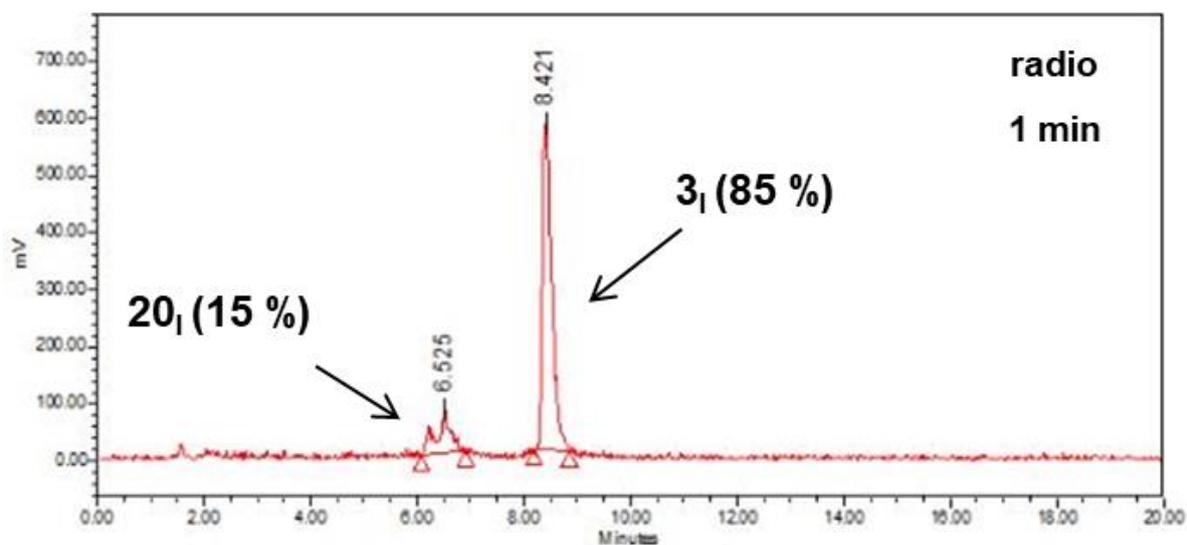


Exemples de radio-chromatogrammes pour le couple BCN-Tz (17 + 4₁) à l'iode-125 :

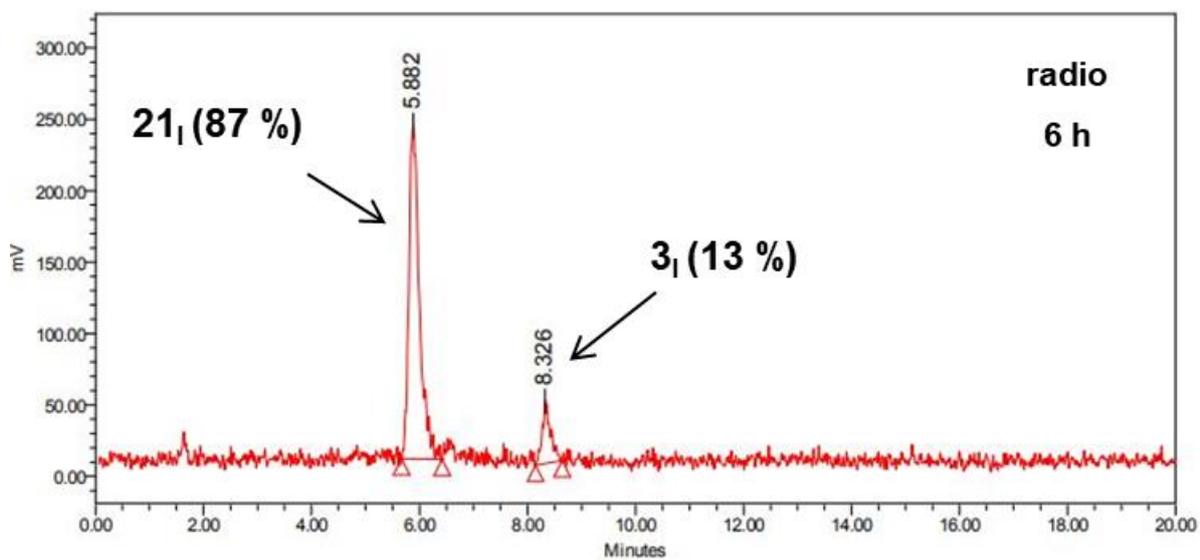
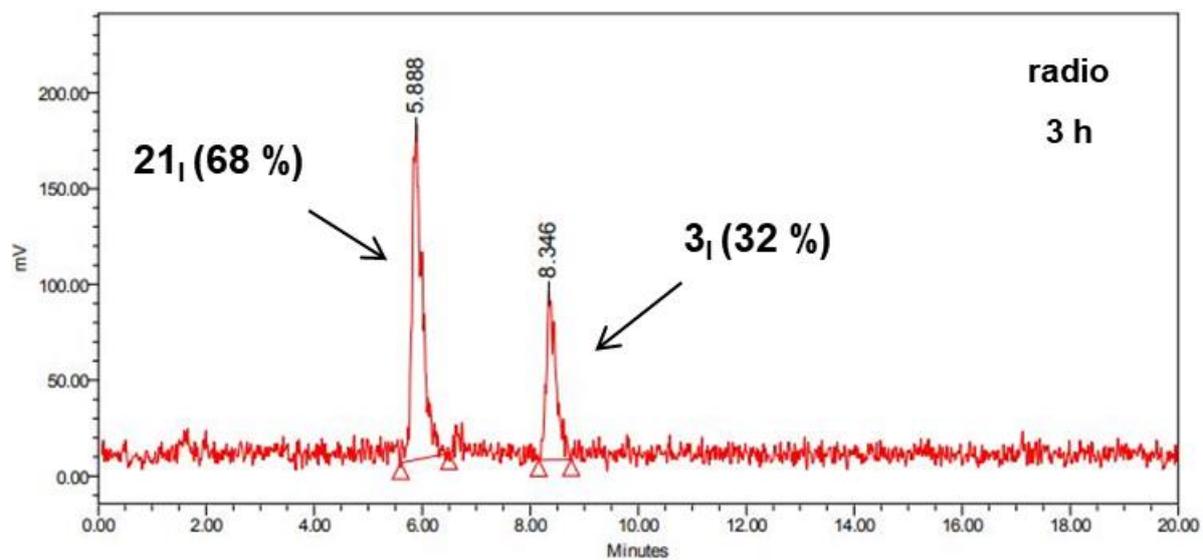
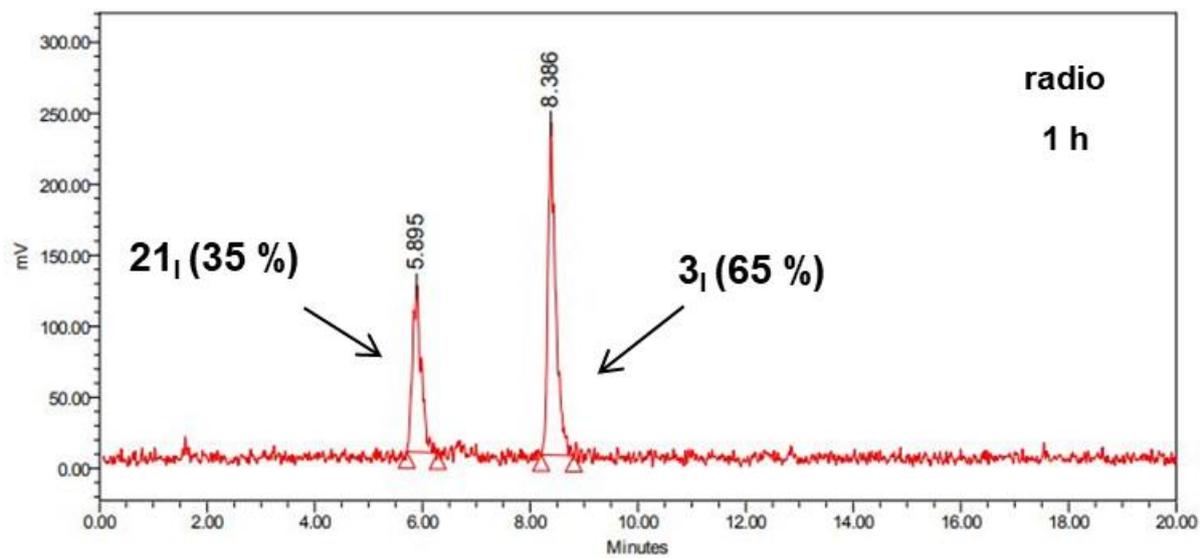


Exemples de radio-chromatogrammes pour le couple DIBAC-azoture (**16** + **3**) à l'iode-125

1 :



Exemples de radio-chromatogrammes pour le couple BCN-azoture ($17 + 3_1$) à l'iode-125 :



III. Modifications d'anticorps et radiomarquages

Purification des solutions d'anticorps greffés :

Les solutions d'anticorps 9E7.4 (anti CD-138) modifiés par les composés **11-PEG** (TCO) et **12** (DIBAC) ont été purifiées par ultrafiltration à l'aide de filtre de filtration (Amicon[®] Ultra-2mL-30K, Merck) avec comme éluant du PBS. Les concentrations des solutions obtenues après modifications ont été mesurées par densité optique (absorbance).

Analyse chromatographique :

Les analyses de quantification par fluorescence réalisées sur les solutions d'anticorps 9E7.4 (anti CD-138) modifiés par les composés **11-PEG** (TCO) et **12** (DIBAC) ont été effectuées sur des bandelettes de papier microfibre (chromatographique inverse) imprégnées de gel de silice (ITLC-SG, Agilent Technologies) avec comme éluant du méthanol. Ces bandes ont ensuite été intégrées à partir du système d'imagerie BioRad Chemidoc[™] en mode détection de fluorescence.

Les analyses réalisées après radiomarquage de solutions d'anticorps greffés (rendement de marquage / pureté radiochimique) ont été effectuées sur des bandelettes de papier microfibre (chromatographique inverse) imprégnées de gel de silice (ITLC-SG, Agilent Technologies) avec comme éluant du méthanol. Ces bandes ont ensuite été exposées sur des plaques phosphorimager, scannées sur un appareil Cyclone Plus (Perkin Elmer) et analysées à l'aide du logiciel Optiquant.

Purification des solutions d'anticorps radiomarqués :

Les solutions d'anticorps 9E7.4-TCO et 9E7.4-DIBAC radiomarqués à partir des synthons **3_I** / **3_{At}** / **4_I** / **4_{At}** ont été purifiées par exclusion stérique à l'aide de colonne chargée de résine Sephadex G-25 (PD-10, GE Healthcare) en utilisant du PBS comme éluant.

Immunoréactivité :

Les tests d'immunoréactivité ont été réalisés à l'aide de billes magnétiques (Pierce, Thermo Scientific) marquées avec un peptide de 40 acides aminés reconnu par l'anticorps 9E7.4 selon le protocole du fournisseur.

III-1. Anticorps 9E7.4-TCO

Modification de l'anticorps mAb 9E7.4 (anti CD138) par des groupements TCO :

A une solution d'anticorps 9E7.4 (320 μ L, 4,5 mg / mL) dans du tampon borate (0,3 M, pH 8,6) est ajoutée une solution de composé **11-PEG** (15 μ L, x eq) dans du DMSO. Après 60 min d'incubation à 23 °C, l'excès de composé **11-PEG** est éliminé par ultrafiltration (Amicon® Ultra-2mL-30K) avec du PBS et l'anticorps 9E7.4-(PEG)₄-TCO obtenu est stocké à 4 °C à une concentration de 2,0 mg/mL déterminée par densité optique.

Radiomarquage de l'anticorps mAb 9E7.4-(PEG)₄-TCO avec les synthons 4_I / 4_{At} :

A une solution d'anticorps 9E7.4-(PEG)₄-TCO (60 μ L, C_m = à 2,0 mg/mL, PBS) est ajoutée une solution de synthon 4_I ou 4_{At} (10 μ L, x MBq) dans du méthanol. Après 5 min d'incubation à 23 °C, le rendement de couplage est évalué par élution d'un aliquot déposé sur une bandelette ITLC-SG avec du méthanol comme éluant. La purification de l'anticorps radiomarqué est réalisée par exclusion stérique à l'aide de colonne chargée de résine Sephadex G-25 en utilisant du PBS comme éluant. La pureté radiochimique après purification est évaluée par ITLC-SG supérieure à 99 %.

Test d'Immunoréactivité :

A une solution d'anticorps 9E7.4 radiomarqués (1 pmol) dans du PBS est ajouté 20 μ L d'une solution de billes magnétiques revêtues par un peptide de 40 acides aminés reconnu par l'anticorps 9E7.4 (10 mg/mL). La solution est incubée pendant 15 min à température ambiante. En utilisant un support magnétique, le surnageant contenant les anticorps non réactifs et les billes magnétiques couplées à la fraction d'anticorps radiomarqués immunoréactifs sont recueillis séparément et la radioactivité dans chaque fraction est mesurée dans un compteur gamma. L'immunoréactivité de l'anticorps radiomarqué par IEDDA est évaluée à 82 \pm 3 %.

Stabilité sérique :

A une solution d'anticorps 9E7.4 radiomarqués (1 μ g, 3,2 μ L) dans du PBS est ajouté 100 μ L de sérum murin. La solution est incubée pendant 8 h à 37 °C. Une portion de cette solution est ensuite déposée sur une bande ITLC-SG éluee avec du méthanol et révélée à l'aide de plaques phosphorimager. La stabilité chimique du marquage est évaluée supérieure à 99 %.

III-2. Anticorps 9E7.4-DIBAC

Modification de l'anticorps mAb 9E7.4 (anti CD138) par des groupements DIBAC :

A une solution d'anticorps 9E7.4 (320 μ L, 4,5 mg / mL) dans du tampon borate (0,3 M, pH 8,6) est ajoutée une solution du composé **12** (15 μ L, 10 mM, 15 eq) dans du DMSO. Après 60 min d'incubation à 23 °C, l'excès de composé **12** est éliminé par ultrafiltration (Amicon® Ultra-2mL-30K) avec du PBS et l'anticorps 9E7.4-DIBAC obtenu est stocké à 4 °C à une concentration de 2,3 mg/mL déterminée par densité optique.

Quantification du nombre de groupement DIBAC greffés sur le l'anticorps 9E7.4 :

A une solution de 9E7.4-DIBAC IgG (16.4 pmol, 98 μ L) dans du PBS est ajoutée une solution de Cy5-azoture (0,1 à 2 eq., 2 μ L) dans du méthanol. Le mélange réactionnel est agité à 23 °C pendant une nuit et une partie est aliquotée et déposée sur une bande de ITLC-SG et éluée avec du MeOH. Les fractions de Cy5-Azoture liée à l'IgG (bas de l'ITLC-SG) et de Cy5-Azoture non liée (haut de l'ITLC-SG) sont déterminées à partir du système d'imagerie BioRad Chemidoc™ en mode détection de fluorescence. Un rapport de $0,21 \pm 0,05$ DIBAC/IgG a été mesuré.

Radiomarquage de l'anticorps mAb 9E7.4-DIBAC avec les synthons **3_I** / **3_{At}** :

A une solution d'anticorps 9E7.4-DIBAC (60 μ L, $C_m =$ à 2,3 mg/mL, PBS) est ajoutée une solution de synthon **3_I** ou **3_{At}** (10 μ L, 18 MBq) dans du méthanol. Après 40 min d'incubation à 23 °C, le rendement de couplage est évalué par élution d'un aliquot déposé sur une bandelette ITLC-SG avec du méthanol comme éluant. La purification de l'anticorps radiomarqué est réalisée par exclusion stérique à l'aide de colonne chargée de résine Sephadex G-25 en utilisant du PBS comme éluant. La pureté radiochimique après purification est évaluée par ITLC-SG supérieure à 99 %.

Test d'Immunoréactivité :

A une solution d'anticorps 9E7.4 radiomarqués (1 pmol) dans du PBS est ajouté 20 μ L d'une solution de billes magnétiques revêtues par un peptide de 40 acides aminés reconnu par l'anticorps 9E7.4 (10 mg/mL). La solution est incubée pendant 15 min à température ambiante. L'immunoréactivité de l'anticorps radiomarqué par SPAAC est évaluée à 82 ± 3 %.

Partie 2 : Développement d'un linker trifonctionnel pour le radiomarquage site-spécifique et bio-orthogonal de vecteurs immunologiques

I. Synthèses organiques

Produits commerciaux :

Les réactifs commerciaux ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Merk), FluoroChem et Tokyo Chemical Industry (TCI), à l'exception du composé **33** fourni par Click Chemistry Tools, et du composé **34** disponible à notre laboratoire.

Spectroscopie RMN :

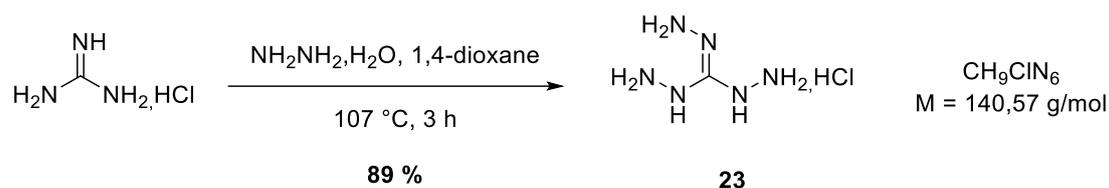
Les spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{19}F ont été enregistrés avec des spectromètres Bruker AC à 400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C). Les déplacements chimiques des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été rapportés en partie par million (ppm) relatifs au signal des protons ou des carbones résiduels des solvants CDCl_3 ($\delta = 7.25, 77.16$), $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 2.50, 39.52$), CD_3CN ($\delta = 1.94, 1.32$), CD_3OD ($\delta = 3.31, 49.00$). Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz) et se réfèrent aux multiplicités apparentes indiquées par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dt (doublet de triplet), td (triplet de doublet), m (multiplet).

Analyse chromatographique :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60 F₂₅₄ sur support plastique (Merck) et ont été révélées par lampe UV (254 nm) pour les composés aromatiques et par de la ninhydrine (10 mg/mL d'EtOH) pour les composés comportant des amines. La valeur des R_f est donnée à titre indicatif avec entre parenthèses les éluants utilisés.

Les purifications sur colonne ont été effectuées en utilisant un appareil Puriflash 600 (Interchim) avec des colonnes de silice de 30 μm .

Triaminoquanidine (23)

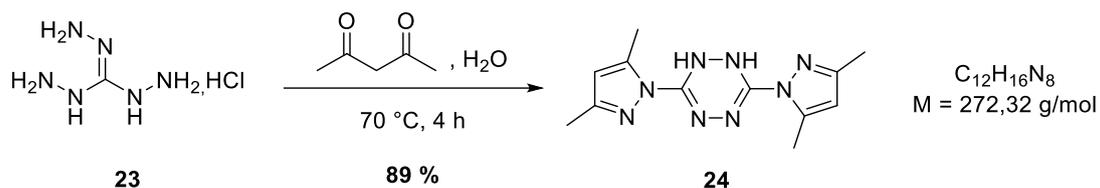


A une solution de guanidine (10,0 g, 0,103 mol, 1eq) dans du 1,4-dioxane (80 mL) est ajoutée de l'hydrazine monohydratée (17,87 g, 0,357 mol, 3,4 eq). Le mélange est chauffé à 107 °C pendant 3 h durant lesquelles on peut observer la formation d'un précipité. Le produit brut obtenu est filtré, lavé avec du 1,4-dioxane froid et séché sous vide. Le produit **23** obtenu se présente sous la forme d'un solide blanc (12,8 g, 89 %).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) : /

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) : δ 59,6.

3,6-bis(3,5-diméthyl-1H-pyrazol-1-yl)1,2-dihydro-tétrazine (24)

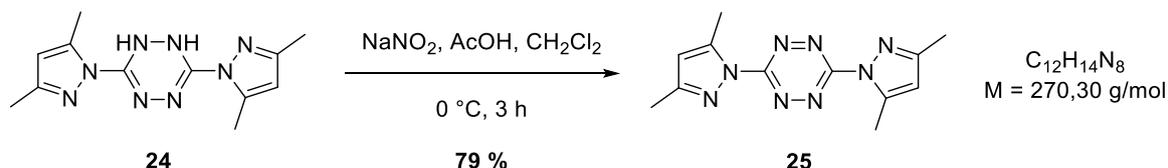


A une solution de triaminoguanidine **23** (10 g, 0,07 mol, 1eq) dans de l'eau distillée (71 mL) est ajoutée goutte à goutte de l'acétylacétone (14 g, 0,142 mol, 2eq). Le milieu réactionnel est chauffé à 70 °C pendant 4 h. Le mélange est ensuite mis à température ambiante et filtré sur Célite, lavé avec de l'eau, puis séché sous pression réduite. Le produit **24** obtenu se présente sous forme d'un solide légèrement jauni (8,56 g, 89 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 8,08 (2H, 2 NH) ; 5,99 (s, 2H, 2 CH) ; 2,51 (s, 6H, 2 CH_3) ; 2,25 (s, 6H, 2 CH_3) .

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 150,0 ; 145,8 ; 142,3 ; 109,9 ; 13,1 ; 13,5.

3,6-bis(3,5-diméthyl-1H-pyrazol-1-yl)-tétrazine (25)



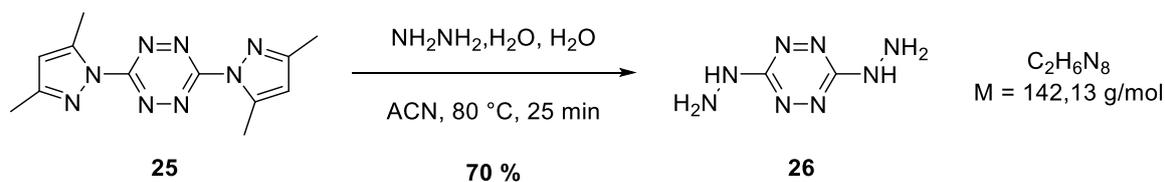
A une solution de nitrite de sodium (5,7 g, 0,103 mol, 2,8 eq) dans de l'eau distillée (130 mL) et de composé **24** (8 g, 0,029 mol, 1 eq) dans du dichlorométhane (25 mL) est ajouté goutte à goutte à 0°C de l'acide acétique (10 mL) jusqu'à disparition du dégagement gazeux (gaz nitreux toxique). La solution passe du jaune au rouge. La réaction est laissée sous agitation à 0 °C pendant 3 h. Le milieu réactionnel est ensuite mis à température ambiante, traité avec une solution de K₂CO₃ 5% et extrait avec du dichlorométhane (3 × 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est lavé avec de l'éther diéthylique, puis séché sous pression réduite. Le produit **25** obtenu se présente sous la forme d'un solide rouge (6,2 g, 79 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,21 (s, 2H, 2 CH) ; 2,73 (s, 6H, 2 CH₃) ; 2,41 (s, 6H, 2 CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 159,3 ; 154,5 ; 143,8 ; 111,9 ; 14,6 ; 13,8.

Rf : (dichlorométhane / méthanol : 95 / 5) : 0,52

3,6-dihydrazine-tétrazine (26)



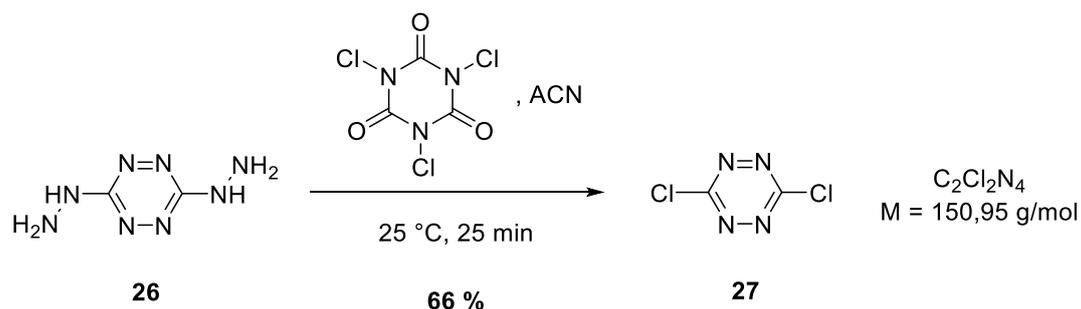
A une solution de composé **25** (5 g, 0,0185 mol, 1 eq) dans l'acétonitrile (31 mL) est ajoutée goutte à goutte de l'hydrazine monohydratée (1,9 mL, 0,039 mol, 2 eq). La solution est chauffée à 80 °C pendant 25 min. Le mélange réactionnel est ensuite filtré sur Célite, lavé avec de l'acétonitrile et séché sous pression réduite. Le produit **26** obtenu se présente sous la forme d'un solide rouge (1,83 g, 70 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,41 (s, 2H, 2 NH) ; 4,26 (s, 4H, 2 NH₂).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 167,2

Rf : (dichlorométhane / méthanol : 3 / 2) : 0,1

3,6-dichloro-tétrazine (27)



A une solution de composé **26** (1,5 g, 0.011 mol, 1 eq) dans l'acétonitrile (130 mL) est ajoutée goutte à goutte une solution d'acide trichloroisocyanurique (5,23 g, 0,0225 mol, 2eq) dans l'acétonitrile (40 mL). La réaction laissée sous agitation à température ambiante pendant 25 min. L'acide cyanurique formé (solide blanc) est éliminé par filtration et lavé avec de l'acétonitrile (300 mL). Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite. Le produit **27** obtenu se présente sous la forme d'un solide orange (1,1 g, 66 %).

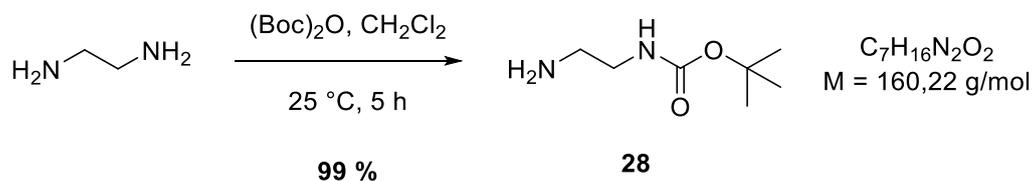
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : /

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 168,4

MS (ESI+) : non détecté

Rf : (dichlorométhane / éther diéthylique : 1 / 1) : 0,59

N-tert-butoxycarbonyl-1,2-diaminoéthane (28)

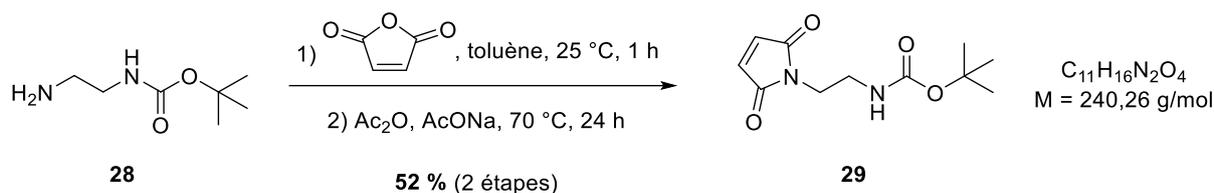


A une solution d'éthylènediamine (20 mL, 300 mmol, 6 eq) dans le dichlorométhane (200 mL) est ajoutée goutte à goutte à température ambiante une solution de dicarbonate de di-*tert*-butyle (10 g, 50 mmol, 1 eq) dans le dichlorométhane (200 mL). La réaction est laissée sous agitation pendant 5 h. Le mélange réactionnel est ensuite traité par une solution de carbonate de sodium à 20% massique (50 mL) et extrait au dichlorométhane (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le produit **28** obtenu se présente sous la forme d'une huile incolore (8 g, 99 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 4,98 (s, 1H, NH) ; 3,09 (dt, 2H, CH_2NH , 5,4 / 6,0 Hz) ; 2,72 (t, 2H, CH_2NH_2 , 5,9 Hz) ; 1,38 (s, 9H, 3 CH_3) ; 1,19 (2H, NH_2).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 156,5 ; 79,0 ; 43,3 ; 41,9 ; 28,3.

Tert-butyl-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-éthyl)carbamate (**29**)



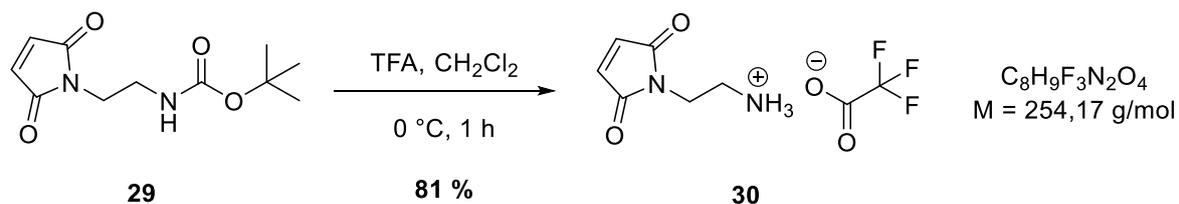
A une solution de composé **28** (1,4 g, 8,74 mmol, 1eq) dans le toluène anhydre (30 mL) est ajouté sous argon de l'anhydride maléique (0,86 g, 8,74 mmol, 1 eq). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. Après évaporation du toluène, de l'anhydride acétique (30 mL) et de l'acétate de sodium (0,85 g) sont ajoutés. La solution est chauffée à 70°C pendant 24 heures sous vive agitation. Le mélange réactionnel est ensuite mis à température ambiante, lavé avec de l'eau distillée (50 mL) et extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na_2SO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (*n*-heptane / acétate d'éthyle) pour donner le composé **29** sous la forme d'un solide blanc (1,1g, 52 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 6,82 (s, 2H, 2 CH) ; 4,88 (s, 1H, NH) ; 3,60 (m, 2H, CH_2) ; 3,22 (q, 2H, CH_2 , 6,1 Hz) ; 1,44 (s, 9H, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 172,3 ; 158,5 ; 135,3 ; 80,1 ; 39,7 ; 39,0 ; 28,9.

Rf : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 1 / 1) : 0,42

Sel de trifluoroacétate de *N*-(2-aminoéthyl)maléimide (**30**)

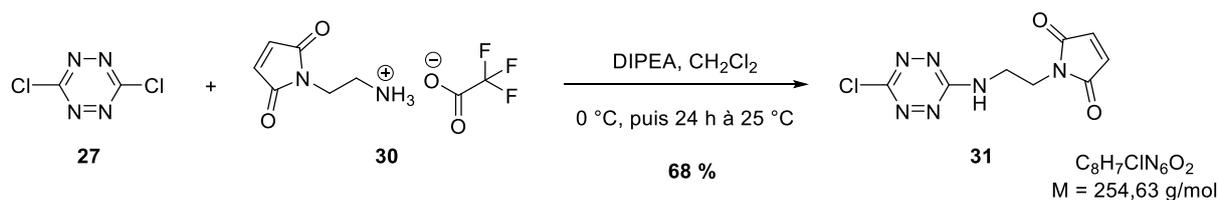


A une solution de composé **29** (1 g, 4,16 mmol, 1 eq) dans le dichlorométhane (8 mL) est ajouté de l'acide trifluoroacétique (6 mL, 78 mmol). La réaction est agitée à 0°C pendant 1 heure. Ensuite, 20 mL d'éther diéthylique froid sont ajoutés dans le milieu et la solution est laissée sous agitation pendant 10 min. Le mélange est filtré sur Célite avec de l'éther diéthylique froid et le filtrat obtenu est séché sous pression réduite. Le produit **30** obtenu se présente sous la forme d'un solide blanc (0,86 g, 81 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,83 (s, 2H, 2 CH) ; 3,77 (t, 2H, CH₂, 5,9 Hz) ; 3,16 (t, 2H, CH₂, 5,9 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 172,7 ; 134,8 ; 38,5 ; 35,1.

1-(2-((6-chloro-1,2,4,5-tétrazine-3-yl)amino)ethyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (31)



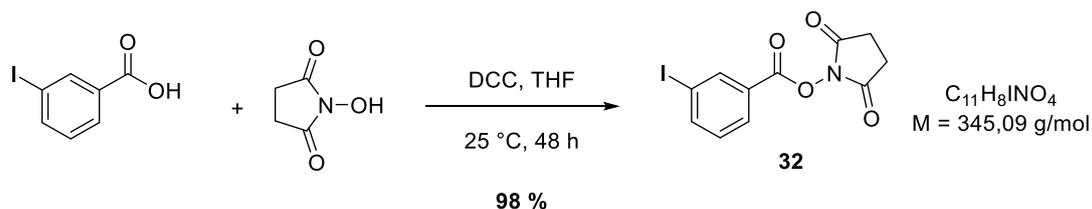
A une solution de composé **27** (100 mg, 0,67 mmol, 1 eq) dans du dichlorométhane anhydre (3 mL) est ajoutée goutte à goutte à température ambiante une solution de composé **30** (170 mg, 0,67 mmol, 1 eq) dans de dichlorométhane anhydre (5 mL) en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (0,6 mL, 9,8 mmol). La réaction est laissée sous agitation pendant 24 heures. Après évaporation, le résidu obtenu est purifié par gel de silice (DCM / Et₂O) pour donner le composé **31** sous la forme d'un solide orange (113 mg, 68 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,76 (s, 2H, 2 CH) ; 6,33 (s, 1H, NH) ; 3,93 (t, 2H, CH₂, 6,1 Hz) ; 3,84 (t, 2H, CH₂, 6,1 Hz),

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 170,6 ; 161,6 ; 161,1 ; 134,4 ; 41,3 ; 36,8.

Rf : (dichlorométhane / éther diéthylique : 1 / 1) : 0,74

(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)3-iodobenzoate (32)



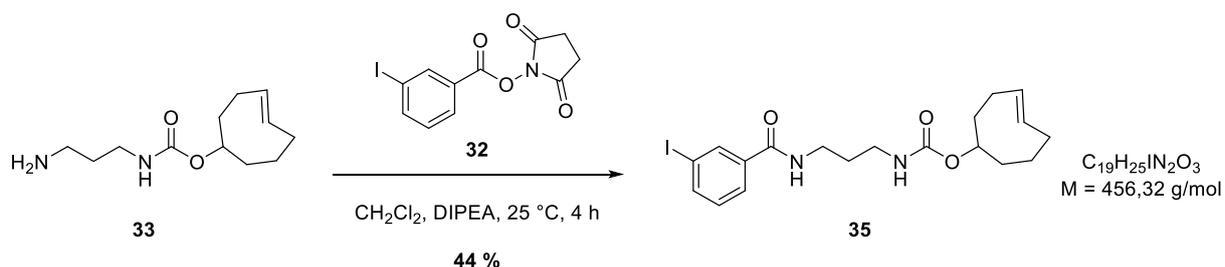
A une solution d'acide *m*-iodobenzoïque (500 mg, 2 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (10 mL) sont ajoutés à température ambiante le *N*-hydroxysuccinimide (254 mg, 2,2 mmol, 1,1 eq) et le *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (454 mg, 2,2 mmol, 1,1 eq). La réaction est laissée sous agitation pendant 48 h. Après filtration et lavage avec du THF, le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (Hept / AcOEt) pour donner le composé **32** sous la forme d'un solide blanc (0,68 g, 98 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 8,39 (s, 1H) ; 8,04 (td, 1H, 8,1 Hz / 1,2 Hz) ; 7,95 (td, 1H, 8,1 Hz / 1,2 Hz), 7,19 (t, 1H, 8,1 Hz) ; 2,84 (s, 4H, 2 CH₂, 6,1 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 169,0 ; 160,3 ; 143,7 ; 139,2 ; 130,4 ; 129,6 ; 126,8 ; 93,7 ; 25,7.

Rf : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 1 / 1) : 0,37

(E)-cyclooct-4-en-1-yl (3-(3-iodobenzamido)propyl)carbamate (35)



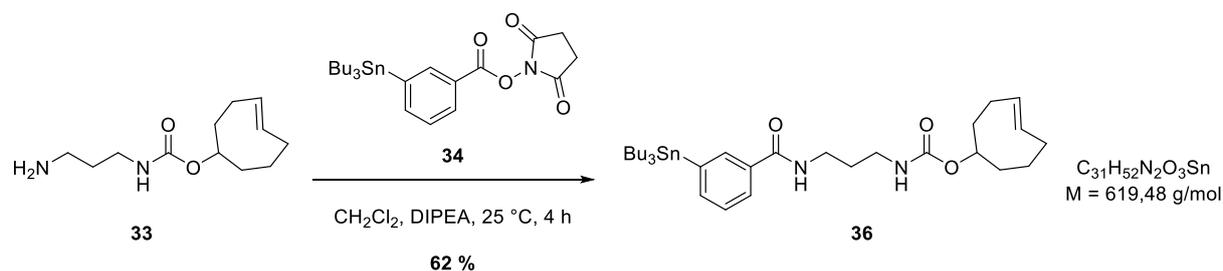
A une solution de TCO-amine **33** (55 mg, 0,209 mmol, 1 eq) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) sont ajoutés à température ambiante sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (99 μ L, 0,57 mmol, 2,7 eq)) et le composé **32** (72 mg, 0,209 mmol, 1 eq). La solution est laissée sous agitation pendant 4 h. Le produit brut obtenu est ensuite directement purifié sur gel de silice (Hept/AcOEt) pour donner le composé **35** sous la forme d'un solide blanc (41 mg, 44 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 8,14 (s, 1H) ; 7,75 (m, 2H) ; 7,2 (s, 1H, NH) ; 7,11 (t, 1H, 7,5 Hz) ; 5,4-5,51 (m, 2H) ; 4,93 (s, 1H, NH) ; 4,06 (m, 1H) ; 3,2 (m, 2H), 3,44 (m, 2H) ; 2,3 (m, 3H) ; 1,8-1,95 (m, 3H) ; 1,62-1,73 (m, 5H) ; 1,19 (m, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 165,9 ; 157,3 ; 140,2 ; 136,5 ; 136,2 ; 134,9 ; 133,0 ; 130,3 ; 126,0 ; 94,4 ; 81,1 ; 41,1 ; 38,7 ; 36,2 ; 32,5 ; 30,1 ; 30,1.

Rf : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 1 / 1) : 0,27

(E)-cyclooct-4-en-1-yl (3-(3-iodobenzamido)propyl)carbamate (36)



A une solution de TCO-amine **33** (47 mg, 0,18 mmol, 1 eq) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) sont ajoutés à température ambiante sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (99 μL , 0,57 mmol, 2,7 eq) et le composé **34** (92,4 mg, 0,18 mmol, 1 eq). La solution est laissée sous agitation pendant 4 h. Le produit brut obtenu est ensuite directement purifié sur gel de silice (Hept/AcOEt) pour donner le composé **36** sous la forme d'une huile incolore (69 mg, 62 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : 7,862 (s, 1H) ; 7,641 (d, 1H, 7,1 Hz) ; 7,52 (d, 1H, 7,1 Hz) ; 7,31 (t, 1H, 7,1 Hz) ; 6,91 (s, 1H, NH) ; 5,4-5,51 (m, 2H) ; 4,96 (s, 1H, NH) ; 4,06 (m, 1H) ; 3,44 (m, 2H) ; 3,2 (m, 2H) ; 2,3 (m, 3H) ; 1,8-1,95 (m, 3H) ; 1,62-1,67 (m, 5H) ; 1,43-1,49 (m, 8H) ; 1,26 (m, 6H) ; 1,02 (q, 6H, 7,5 Hz) ; 0,81 (t, 9H, 7,5 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 168,3 ; 157,1 ; 142,9 ; 139,5 ; 134,9 ; 134,6 ; 133,7 ; 133,0 ; 127,8 ; 126,4 ; 81,1 ; 41,1 ; 38,7 ; 36,2 ; 32,5 ; 30,1 ; 30,3 ; 29,1 ; 27,3 ; 13,7 ; 9,7.

Rf : (*n*-heptane / acétate d'éthyle : 1 / 1) : 0,31

II. Couplage sur l'affitine C5

Spectrométrie de masse :

Les analyses par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ont été effectuées sur un spectromètre de masse Synapt G2 HRMS Q-TOF équipé d'une interface d'ionisation par électrospray (ESI) fonctionnant en mode positif (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

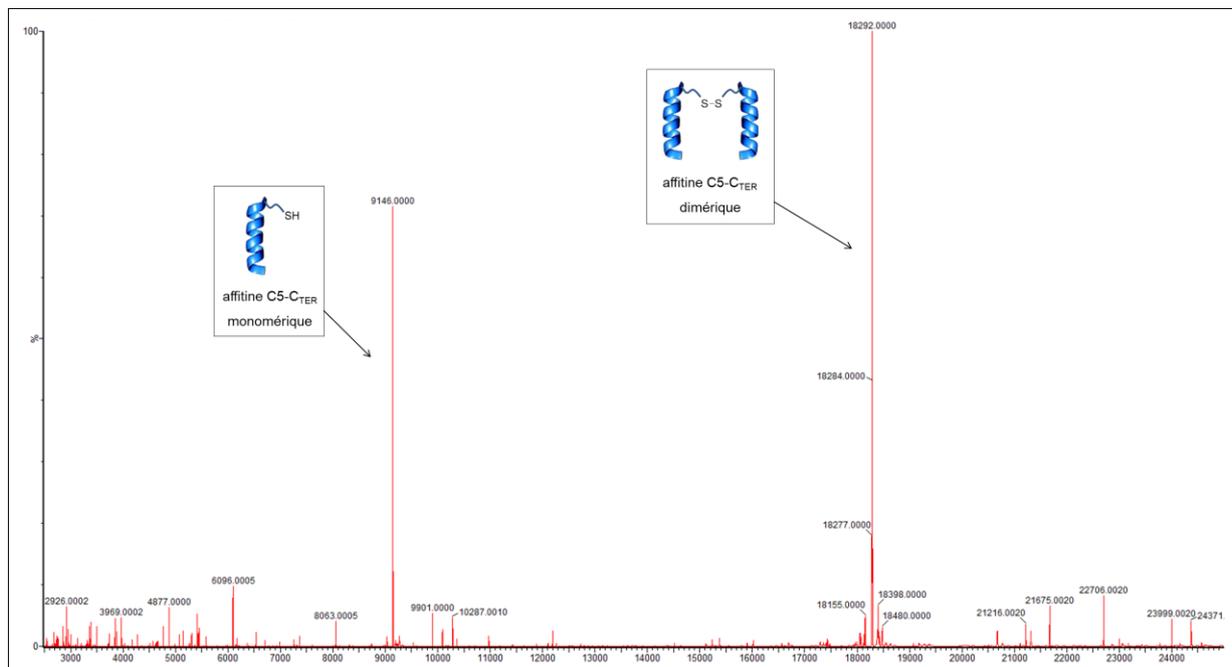
Réduction de l'affitine :

A une solution d'affitine-C5 (17,2 mg/mL, 25 μ L) dans du PBS sont ajoutés un mélange H₂O / MeOH / AcOH (500 μ L) et une solution de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP, 14,3 mg/mL, 50 μ L) en bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃). Après 2 h d'incubation à 23 °C, le TCEP est éliminé par ultrafiltration (Amicon® Ultra-2mL-3K) avec du PBS / EDTA pour éviter toute reformation des ponts disulfures. L'affitine C5 monomérique obtenue est stockée dans ce mélange (PBS / EDTA) à 4°C.

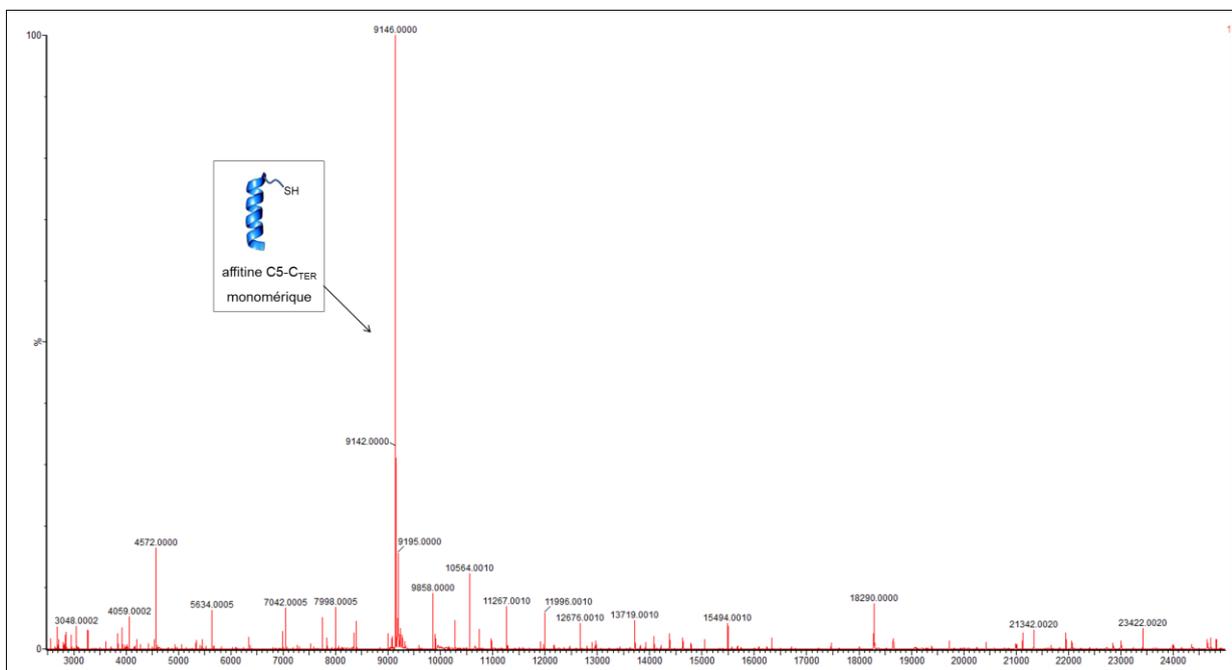
Couplage entre le linker (31) et l'affitine C5 :

A une solution d'affitine-C5 monomérique (47 μ mol, 250 μ L, 1 eq) en PBS / EDTA est ajoutée une solution de linker trifonctionnel **31** (12 μ mol, 20 μ L, 0,25 eq) en DMSO. La solution est agitée à température ambiante pendant 18 h. Le suivi du couplage a été réalisé par spectrométrie de masse (HRMS).

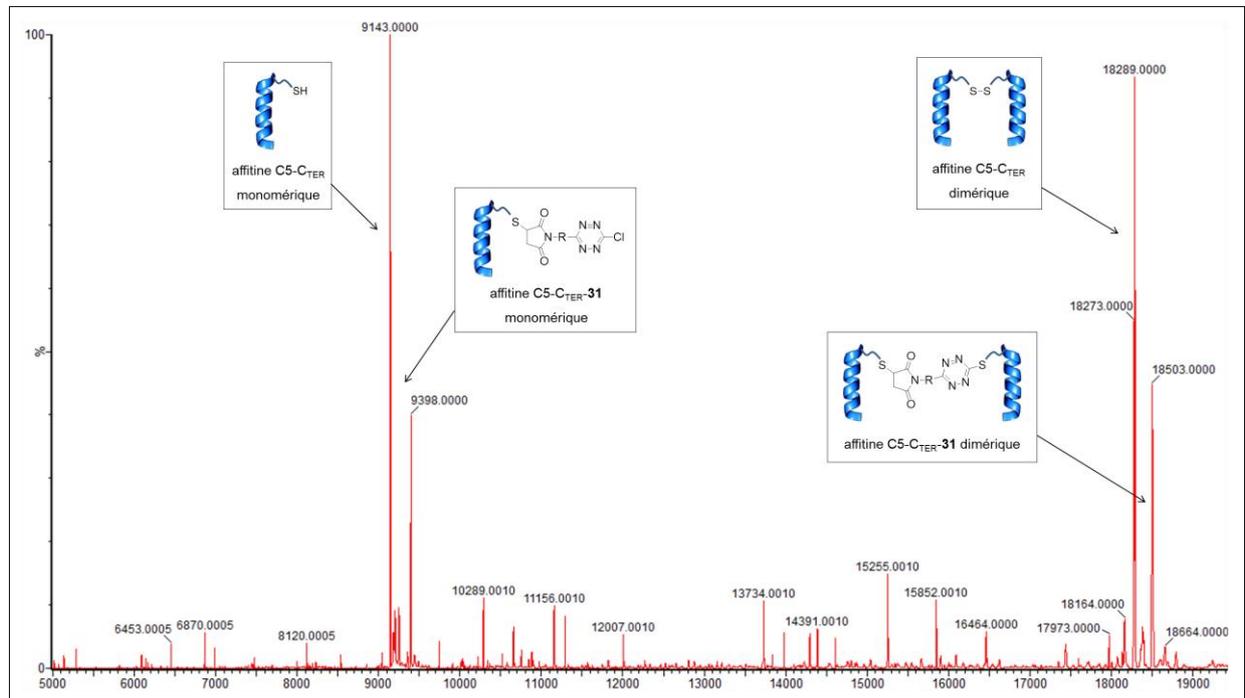
Spectre de masse HRMS de l'affitine-C5 avant réduction :



Spectre de masse HRMS de l'affitine-C5 après réduction (TCEP) :



Spectre de masse HRMS de l'affitine-C5 après couplage avec le linker **31** :



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Porter, R. R. Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972. *Scand. J. Immunol.* **34**, 381–389 (1991).
2. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
3. Dearling, J. L. J. & Pedley, R. B. Technological Advances in Radioimmunotherapy. *Clinical Oncology* **19**, 457–469 (2007).
4. McAfee, J. G., Edmondson, S. P., Datta, P. K., Shriver, J. W. & Gupta, R. Gene cloning, expression, and characterization of the Sac7 proteins from the hyperthermophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemistry* **34**, 10063–10077 (1995).
5. Knapp, S., Karshikoff, A., Berndt, K. D., Christova, P., Atanasov, B. & Ladenstein, R. Thermal unfolding of the DNA-binding protein Sso7d from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **264**, 1132–1144 (1996).
6. McCrary, B. S., Edmondson, S. P. & Shriver, J. W. Hyperthermophile protein folding thermodynamics: differential scanning calorimetry and chemical denaturation of Sac7d. *J. Mol. Biol.* **264**, 784–805 (1996).
7. Béhar, G., Bellinzoni, M., Maillason, M., Paillard-Laurance, L., Alzari, P. M., He, X., Mouratou, B. & Pecorari, F. Tolerance of the archaeal Sac7d scaffold protein to alternative library designs: characterization of anti-immunoglobulin G Affitins. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 267–275 (2013).
8. Mouratou, B., Béhar, G. & Pecorari, F. Artificial affinity proteins as ligands of immunoglobulins. *Biomolecules* **5**, 60–75 (2015).
9. Barbet, J., Kraeber-Bodéré, F., Vuillez, J. P., Gautherot, E., Rouvier, E. & Chatal, J. F. Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy. *Cancer Biother. Radio.* **14**, 153–166 (1999).
10. Goldenberg, D. M., Chatal, J.-F., Barbet, J., Boerman, O. & Sharkey, R. M. Cancer Imaging and Therapy with Bispecific Antibody Pretargeting. *Update Cancer Ther.* **2**, 19–31 (2007).
11. Knight, J. C. & Cornelissen, B. Bioorthogonal chemistry: implications for pretargeted nuclear (PET/SPECT) imaging and therapy. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **4**, 96–113 (2014).
12. Murayama, H. & Hasegawa, T. Hal Oscar Anger, D.Sc. (hon.) (1920–2005): a pioneer in nuclear medicine instrumentation. *Radiol. Phys. Technol.* **7**, 1–4 (2014).
13. Lewis, S. S., Cox, G. M. & Stout, J. E. Clinical utility of indium 111-labeled white blood cell scintigraphy for evaluation of suspected infection. *Open Forum Infect. Dis.* **1**, ofu089 (2014).
14. Banerjee, S., Pillai, M. R. & Ramamoorthy, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Semin. Nucl. Med.* **31**, 260–277 (2001).
15. Ben-Haim, S. & Eil, P. 18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response. *J. Nucl. Med.* **50**, 88–99 (2009).

16. Calabria, F. F., Chiaravalloti, A., Jaffrain-Rea, M. L., Zinzi, M., Sannino, P., Minniti, G., Rubello, D. & Schillaci, O. 18F-DOPA PET/CT Physiological Distribution and Pitfalls: Experience in 215 Patients. *Clin. Nucl. Med.* **41**, 753–760 (2016).
17. Schillaci, O., Calabria, F., Tavolozza, M., Ciccio, C., Carlani, M., Caracciolo, C. R., Danieli, R., Orlacchio, A. & Simonetti, G. 18F-choline PET/CT physiological distribution and pitfalls in image interpretation: experience in 80 patients with prostate cancer. *Nucl. Med. Commun.* **31**, 39–45 (2010).
18. Dollé, F. Carbon-11 and fluorine-18 chemistry devoted to molecular probes for imaging the brain with positron emission tomography. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **56**, 65–67 (2013).
19. Kurihara, H., Hamada, A., Yoshida, M., Shimma, S., Hashimoto, J., Yonemori, K., Tani, H., Miyakita, Y., Kanayama, Y., Wada, Y., Kodaira, M., Yunokawa, M., Yamamoto, H., Shimizu, C., Takahashi, K., Watanabe, Y., Fujiwara, Y. & Tamura, K. (64)Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging and HER2 specificity of brain metastases in HER2-positive breast cancer patients. *EJNMMI Res.* **5**, 8 (2015).
20. Yoon, J. T., Longtine, M. S., Marquez-Nostra, B. V. & Wahl, R. L. Evaluation of Next-Generation Anti-CD20 Antibodies Labeled with 89Zr in Human Lymphoma Xenografts. *J. Nucl. Med.* **59**, 1219–1224 (2018).
21. Goldsmith, S. J. Radioimmunotherapy of lymphoma: Bexxar and Zevalin. *Semin. Nucl. Med.* **40**, 122–135 (2010).
22. Claesson, A. K., Stenerlöv, B., Jacobsson, L. & Elmroth, K. Relative biological effectiveness of the alpha-particle emitter (211)At for double-strand break induction in human fibroblasts. *Radiat. Res.* **167**, 312–318 (2007).
23. Kitson, S. L., Cuccurullo, V., Moody, T. S. & Mansi, L. Radionuclide antibody-conjugates, a targeted therapy towards cancer. *Curr. Radiopharm.* **6**, 57–71 (2013).
24. Brechbiel, M. W. Targeted α -therapy: past, present, future? *Dalton Trans.* **0**, 4918–4928 (2007).
25. Rosenblat, T. L., McDevitt, M. R., Mulford, D. A., Pandit-Taskar, N., Divgi, C. R., Panageas, K. S., Heaney, M. L., Chanel, S., Morgenstern, A., Sgouros, G., Larson, S. M., Scheinberg, D. A. & Jurcic, J. G. Sequential cytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5303–5311 (2010).
26. Kratochwil, C., Bruchertseifer, F., Giesel, F. L., Weis, M., Verburg, F. A., Mottaghy, F., Kopka, K., Apostolidis, C., Haberkorn, U. & Morgenstern, A. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **57**, 1941–1944 (2016).
27. Santoro, L., Boutaleb, S., Garambois, V., Bascoul-Mollevi, C., Boudousq, V., Kotzki, P.-O., Pèlegri, M., Navarro-Teulon, I., Pèlegri, A. & Pouget, J.-P. Noninternalizing monoclonal antibodies are suitable candidates for 125I radioimmunotherapy of small-volume peritoneal carcinomatosis. *J. Nucl. Med.* **50**, 2033–2041 (2009).
28. Sastry, K. S. Biological effects of the Auger emitter iodine-125: a review. Report No. 1 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med. Phys.* **19**, 1361–1370 (1992).

29. Wängler, B., Schirmacher, R., Bartenstein, P. & Wängler, C. Chelating agents and their use in radiopharmaceutical sciences. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**, 968–983 (2011).
30. Adam, M. J. & Wilbur, D. S. Radiohalogens for imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 153–163 (2005).
31. Urhan, M., Dadparvar, S., Mavi, A., Houseni, M., Chamroonrat, W., Alavi, A. & Mandel, S. J. Iodine-123 as a diagnostic imaging agent in differentiated thyroid carcinoma: a comparison with iodine-131 post-treatment scanning and serum thyroglobulin measurement. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **34**, 1012–1017 (2007).
32. Rufini, V., Fisher, G. A., Shulkin, B. L., Sisson, J. C. & Shapiro, B. Iodine-123-MIBG imaging of neuroblastoma: utility of SPECT and delayed imaging. *J. Nucl. Med.* **37**, 1464–1468 (1996).
33. Piperkova, E., Georgiev, R., Daskalov, M., Stamenova, P., Katerinski, K., Beeva, M., Orozova, M. & Dimitrova, M. The brain scintiscan with iodine-123-ioflupane to diagnose early Parkinson's disease; seven months follow up. First results in Bulgaria. *Hell. J. Nucl. Med.* **9**, 31–35 (2006).
34. Rault, E., Vandenberghe, S., Van Holen, R., De Beenhouwer, J., Staelens, S. & Lemahieu, I. Comparison of Image Quality of Different Iodine Isotopes (I-123, I-124, and I-131). *Cancer Biother. Radio.* **22**, 423–430 (2007).
35. Chacko, A. M. & Divgi, C. R. Radiopharmaceutical chemistry with iodine-124: a non-standard radiohalogen for positron emission tomography. *Med. Chem.* **7**, 395–412 (2011).
36. Kayano, D. & Kinuya, S. Iodine-131 metaiodobenzylguanidine therapy for neuroblastoma: reports so far and future perspective. *ScientificWorldJournal* **2015**, 189135 (2015).
37. Hyde, E. K. The Present Status. of Elements 85 and 87. *J. Phys. Chem.* **58**, 21–26 (1954).
38. Milesz, S., Jovchev, M., Schumann, D., Khalkin, V. A. & Milanov, M. The EDTA complexes of astatine. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **127**, 193–198 (1988).
39. Yordanov, A. T., Deal, K., Garmestani, K., Kobayashi, H., Herring, B., Waldmann, T. A. & Brechbiel, M. W. Synthesis and biodistribution study of a new ²¹¹At-calix[4]arene complex. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **43**, 1219–1225 (2000).
40. Corson, D. R., MacKenzie, K. R. & Segrè, E. Possible Production of Radioactive Isotopes of Element 85. *Phys. Rev.* **57**, 459–459 (1940).
41. Fellman, A., Ralston, L., Hickman, D., Ayres, L. & Cohen, N. Polonium Metabolism in Adult Female Baboons. *Radiation Research* **137**, 238–250 (1994).
42. Almqvist, Y., Orlova, A., Sjöström, A., Jensen, H. J., Lundqvist, H., Sundin, A. & Tolmachev, V. In vitro characterization of ²¹¹At-labeled antibody A33--a potential therapeutic agent against metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* **20**, 514–523 (2005).
43. Andersson, H., Palm, S., Lindegren, S., Bäck, T., Jacobsson, L., Leser, G. & Horvath, G. Comparison of the therapeutic efficacy of ²¹¹At- and ¹³¹I-labelled monoclonal

- antibody MOv18 in nude mice with intraperitoneal growth of human ovarian cancer. *Anticancer Res.* **21**, 409–412 (2001).
44. Palm, S., Bäck, T., Claesson, I., Danielsson, A., Elgqvist, J., Frost, S., Hultborn, R., Jensen, H., Lindegren, S. & Jacobsson, L. Therapeutic efficacy of astatine-211-labeled trastuzumab on radioresistant SKOV-3 tumors in nude mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **69**, 572–579 (2007).
 45. Zhang, M., Yao, Z., Patel, H., Garmestani, K., Zhang, Z., Talanov, V. S., Plascjak, P. S., Goldman, C. K., Janik, J. E., Brechbiel, M. W. & Waldmann, T. A. Effective therapy of murine models of human leukemia and lymphoma with radiolabeled anti-CD30 antibody, HeFi-1. *PNAS* **104**, 8444–8448 (2007).
 46. Zalutsky, M. R., Reardon, D. A., Akabani, G., Coleman, R. E., Friedman, A. H., Friedman, H. S., McLendon, R. E., Wong, T. Z. & Bigner, D. D. Clinical experience with alpha-particle emitting ²¹¹At: treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* **49**, 30–38 (2008).
 47. Seever, R. H. & Counsell, R. E. Radioiodination techniques for small organic molecules. *Chem. Rev.* **82**, 575–590 (1982).
 48. Tolmachev, V. in *Targeted Radionuclide Tumor Therapy: Biological Aspects* 145–174 (2008). doi:10.1007/978-1-4020-8696-0_8
 49. Wilbur, D. S. Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labeling methods and reagents for conjugate labeling. *Bioconjugate Chem.* **3**, 433–470 (1992).
 50. Langone, J. J. in *Methods in Enzymology* **70**, 221–247 (Academic Press, 1980).
 51. Bolton, A. E. & Hunter, W. M. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. *Biochem. J.* **133**, 529–538 (1973).
 52. Amartei, J. K., Esguerra, C., Al-Otaibi, B., Al-Jammaz, I., Al-Qahtani, M. & Parhar, R. S. Prosthetic radioiodination of interleukin-8 ([^{123/131}I]-IL-8): biological behavior in a mouse infection model. *Appl. Radiat. Isot.* **62**, 39–47 (2005).
 53. Dumas, P., Maziere, B., Autissier, N. & Michel, R. Specificity of thyroidal and hepatic microsomal iodotyrosine deiodinase. *Biochim. Biophys. Acta* **293**, 36–47 (1973).
 54. Vaidyanathan, G. & Zalutsky, M. R. Protein radiohalogenation: observations on the design of N-succinimidyl ester acylation agents. *Bioconjugate Chem.* **1**, 269–273 (1990).
 55. Yang, Y., Liu, N., Zan, L., Liao, J. & Jin, J. Radioiodination of insulin using N-succinimidyl 5-(tributylstannyl)-3-pyridine-carboxylate (SPC) as a bi-functional linker: Synthesis and biodistribution in mice. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **268**, 205–210 (2006).
 56. Vaidyanathan, G., Affleck, D. J., Li, J., Welsh, P. & Zalutsky, M. R. A Polar Substituent-Containing Acylation Agent for the Radioiodination of Internalizing Monoclonal Antibodies: N-Succinimidyl 4-Guanidinomethyl-3-[¹³¹I]iodobenzoate ([¹³¹I]SGMIB). *Bioconjugate Chem.* **12**, 428–438 (2001).
 57. Wafelman, A. R., Konings, M. C. P., Hoefnagel, C. A., Maes, R. A. A. & Beijnen, J. H. Synthesis, radiolabelling and stability of radioiodinated m-iodobenzylguanidine, a review. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 997–1007 (1994).

58. Chattopadhyay, S., Das, M. K., Sarkar, B. R., Prabhakar, G., Mehra, K. S. & Ramamoorthy, N. Stabilisation of [¹³¹I]meta-iodobenzylguanidine at room temperature as organic extract in ethyl acetate/chloroform. *Appl. Radiat. Isot.* **54**, 241–244 (2001).
59. Guérard, F., Navarro, L., Lee, Y.-S., Roumesy, A., Alliot, C., Chérel, M., Brechbiel, M. W. & Gestin, J.-F. Bifunctional arylodonium salts for highly efficient radioiodination and astatination of antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 5975–5980 (2017).
60. Zhang, P., Zhuang, R., Guo, Z., Su, X., Chen, X. & Zhang, X. A Highly Efficient Copper-Mediated Radioiodination Approach Using Aryl Boronic Acids. *Chem. Eur. J.* **22**, 16783–16786 (2016).
61. Coenen, H. H., Moerlein, S. M. & Stoecklin, G. No-carrier-added radiohalogenation methods with heavy halogens. *Radiochim. Acta* **34**, 47–68 (1983).
62. Aaij, C., Tschroots WRJM, null, Lindner, L. & Feltkamp, T. E. The preparation of astatine labelled proteins. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **26**, 25–30 (1975).
63. Vaughan, A. T. M. & Fremlin, J. H. The preparation of astatine labelled proteins using an electrophilic reaction. *Nucl. Med. Biol.* **5**, 229–230 (1978).
64. Krohn, K. A. & Welch, M. J. Studies of radioiodinated fibrinogen-II. Lactoperoxidase iodination of fibrinogen and model compounds. *Appl. Radiat. Isot.* **25**, 315–323 (1974).
65. Visser, G. W. M., Diemer, E. L. & Kaspersen, F. M. The preparation and stability of astatotyrosine and astatiodotyrosine. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **30**, 749–752 (1979).
66. Visser, G. W. M., Diemer, E. L. & Kaspersen, F. M. The preparation and stability of ²¹¹At-astato-imidazoles. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **31**, 275–278 (1980).
67. Visser, G. W. M., Diemer, E. L. & Kaspersen, F. M. The nature of the astatine-protein bond. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **32**, 905–912 (1981).
68. Zalutsky, M. R. & Narula, A. S. Astatination of proteins using an N-succinimidyl tri-n-butylstannyl benzoate intermediate. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.* **39**, 227–232 (1988).
69. Lindegren, S., Andersson, H., Bäck, T., Jacobsson, L., Karlsson, B. & Skarnemark, G. High-efficiency astatination of antibodies using N-iodosuccinimide as the oxidising agent in labelling of N-succinimidyl 3-(trimethylstannyl)benzoate. *Nucl. Med. Biol.* **28**, 33–39 (2001).
70. Guérard, F., Lee, Y.-S., Baidoo, K., Gestin, J.-F. & Brechbiel, M. W. Unexpected Behavior of the Heaviest Halogen Astatine in the Nucleophilic Substitution of Arylodonium Salts. *Chem. Eur. J.* **22**, 12332–12339 (2016).
71. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2004–2021 (2001).
72. Grammel, M. & Hang, H. C. Chemical reporters for biological discovery. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 475–484 (2013).
73. Su, Y., Ge, J., Zhu, B., Zheng, Y.-G., Zhu, Q. & Yao, S. Q. Target identification of biologically active small molecules via in situ methods. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 768–775 (2013).

74. Zeng, D., Zeglis, B. M., Lewis, J. S. & Anderson, C. J. The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **54**, 829–832 (2013).
75. Evans, R. A. The Rise of Azide–Alkyne 1,3-Dipolar ‘Click’ Cycloaddition and its Application to Polymer Science and Surface Modification. *Aust. J. Chem.* **60**, 384–395 (2007).
76. Hang, H. C., Yu, C., Kato, D. L. & Bertozzi, C. R. A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14846–14851 (2003).
77. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 6974–6998 (2009).
78. Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 13–21 (2005).
79. Staudinger, H. & Meyer, J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **2**, 635–646 (1919).
80. Saxon, E., Armstrong, J. I. & Bertozzi, C. R. A ‘traceless’ Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org. Lett.* **2**, 2141–2143 (2000).
81. Saxon, E. & Bertozzi, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **287**, 2007–2010 (2000).
82. Agard, N. J., Baskin, J. M., Prescher, J. A., Lo, A. & Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **1**, 644–648 (2006).
83. Prescher, J. A., Dube, D. H. & Bertozzi, C. R. Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature* **430**, 873–877 (2004).
84. Kaiser, E. T. & Lawrence, D. S. Chemical mutation of enzyme active sites. *Science* **226**, 505–511 (1984).
85. Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D. & Baylin, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9821–9826 (1996).
86. Rideout, D. Self-assembling cytotoxins. *Science* **233**, 561–563 (1986).
87. Mahal, L. K., Yarema, K. J. & Bertozzi, C. R. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science* **276**, 1125–1128 (1997).
88. Michael, A. Ueber die Einwirkung von Diazobenzolimid auf Acetylcendicarbonsäuremethylester. *Journal für Praktische Chemie* **48**, 94–95 (1893).
89. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2**, 565–598 (1963).
90. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ‘ligation’ of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2596–2599 (2002).

91. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002).
92. Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. & Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3192–3193 (2003).
93. Worrell, B. T., Malik, J. A. & Fokin, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science* **340**, 457–460 (2013).
94. Deiters, A., Cropp, T. A., Mukherji, M., Chin, J. W., Anderson, J. C. & Schultz, P. G. Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11782–11783 (2003).
95. Link, A. J. & Tirrell, D. A. Cell Surface Labeling of *Escherichia coli* via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11164–11165 (2003).
96. Lin, C.-W. & Ting, A. Y. Transglutaminase-catalyzed site-specific conjugation of small-molecule probes to proteins in vitro and on the surface of living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4542–4543 (2006).
97. Ramil, C. P. & Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: strategies and recent developments. *Chem. Commun.* **49**, 11007–11022 (2013).
98. Hong, V., Steinmetz, N. F., Manchester, M. & Finn, M. G. Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **21**, 1912–1916 (2010).
99. Johansson, J. R., Beke-Somfai, T., Said Stålsmeden, A. & Kann, N. Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications. *Chem. Rev.* **116**, 14726–14768 (2016).
100. Wittig, G. & Krebs, A. Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkyne, I. *Chemische Berichte* **94**, 3260–3275 (1961).
101. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004).
102. Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J. & Bertozzi, C. R. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11486–11493 (2008).
103. Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A. & Boons, G.-J. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2253–2255 (2008).
104. Debets, M. F., van Berkel, S. S., Schoffelen, S., Rutjes, F. P. J. T., van Hest, J. C. M. & van Delft, F. L. Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem. Commun. (Camb.)* **46**, 97–99 (2010).
105. Jewett, J. C., Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 3688–3690 (2010).

106. Dommerholt, J., Schmidt, S., Temming, R., Hendriks, L. J. A., Rutjes, F. P. J. T., van Hest, J. C. M., Lefeber, D. J., Friedl, P. & van Delft, F. L. Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 9422–9425 (2010).
107. Meier, H., Schuh-Popitz, C. & Peiersen, H. Isolation of a Highly Strained Bicyclic Alkyne. *Angew. Chem. Int. Ed.* **20**, 270–271 (1981).
108. Thomas, J. D., Cui, H., North, P. J., Hofer, T., Rader, C. & Burke, T. R. Application of Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition and Tetrazine Ligation to Targeted Fc-Drug Conjugates. *Bioconjug Chem* **23**, 2007–2013 (2012).
109. Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A. & Bertozzi, C. R. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 16793–16797 (2007).
110. Kurra, Y., Odoi, K. A., Lee, Y.-J., Yang, Y., Lu, T., Wheeler, S. E., Torres-Kolbus, J., Deiters, A. & Liu, W. R. Two Rapid Catalyst-Free Click Reactions for In Vivo Protein Labeling of Genetically Encoded Strained Alkene/Alkyne Functionalities. *Bioconjugate Chem.* **25**, 1730–1738 (2014).
111. Diels, O. & Alder, K. Synthesen in der hydro-aromatischen Reihe, II. Mitteilung: Über Cantharidin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **62**, 554–562 (1929).
112. Oliveira, B. L., Guo, Z. & Bernardes, G. J. L. Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4895–4950 (2017).
113. Sauer, J., Heldmann, D. K., Hetzenegger, J., Krauthan, J., Sichert, H. & Schuster, J. 1,2,4,5-Tetrazine: Synthesis and Reactivity in [4+2] Cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2885–2896 (1998).
114. Rideout, D. C. & Breslow, R. Hydrophobic acceleration of Diels-Alder reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7816–7817 (1980).
115. Blackman, M. L., Royzen, M. & Fox, J. M. Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13518–13519 (2008).
116. Devaraj, N. K., Weissleder, R. & Hilderbrand, S. A. Tetrazine-based cycloadditions: application to pretargeted live cell imaging. *Bioconjugate Chem.* **19**, 2297–2299 (2008).
117. Taylor, M. T., Blackman, M. L., Dmitrenko, O. & Fox, J. M. Design and Synthesis of Highly Reactive Dienophiles for the Tetrazine–trans-Cyclooctene Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9646–9649 (2011).
118. Rossin, R., van den Bosch, S. M., Ten Hoeve, W., Carvelli, M., Versteegen, R. M., Lub, J. & Robillard, M. S. Highly reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for Diels-Alder chemistry in living systems. *Bioconjugate Chem.* **24**, 1210–1217 (2013).
119. Darko, A., Wallace, S., Dmitrenko, O., Machovina, M. M., Mehl, R. A., Chin, J. W. & Fox, J. M. Conformationally Strained trans-Cyclooctene with Improved Stability and Excellent Reactivity in Tetrazine Ligation. *Chem. Sci.* **5**, 3770–3776 (2014).

120. Patterson, D. M., Nazarova, L. A., Xie, B., Kamber, D. N. & Prescher, J. A. Functionalized Cyclopropenes As Bioorthogonal Chemical Reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18638–18643 (2012).
121. Yang, J., Šečkutė, J., Cole, C. M. & Devaraj, N. K. Live-cell imaging of cyclopropene tags with fluorogenic tetrazine cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 7476–7479 (2012).
122. Karver, M. R., Weissleder, R. & Hilderbrand, S. A. Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation. *Bioconjugate Chem.* **22**, 2263–2270 (2011).
123. Maggi, A., Ruivo, E., Fissers, J., Vangestel, C., Chatterjee, S., Joossens, J., Sobott, F., Staelens, S., Stroobants, S., Veken, P. V. D., Wyffels, L. & Augustyns, K. Development of a novel antibody–tetrazine conjugate for bioorthogonal pretargeting. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 7544–7551 (2016).
124. Row, R. D. & Prescher, J. A. Constructing New Bioorthogonal Reagents and Reactions. *Acc. Chem. Res.* **51**, 1073–1081 (2018).
125. Devaraj, N. K. The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent. Sci.* **4**, 952–959 (2018).
126. Stöckmann, H., Neves, A. A., Stairs, S., Brindle, K. M. & Leeper, F. J. Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 7303–7305 (2011).
127. Stairs, S., Neves, A. A., Stöckmann, H., Wainman, Y. A., Ireland-Zecchini, H., Brindle, K. M. & Leeper, F. J. Metabolic glycan imaging by isonitrile-tetrazine click chemistry. *ChemBioChem* **14**, 1063–1067 (2013).
128. Bernard, S., Audisio, D., Riomet, M., Bregant, S., Sallustrau, A., Plougastel, L., Decuypere, E., Gabillet, S., Kumar, R. A., Elyian, J., Trinh, M. N., Koniev, O., Wagner, A., Kolodych, S. & Taran, F. Bioorthogonal Click and Release Reaction of Iminosydones with Cycloalkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56**, 15612–15616 (2017).
129. Wu, Y., Hu, J., Sun, C., Cao, Y., Li, Y., Xie, F., Zeng, T., Zhou, B., Du, J. & Tang, Y. Nature-Inspired Bioorthogonal Reaction: Development of β -Caryophyllene as a Chemical Reporter in Tetrazine Ligation. *Bioconjugate Chem.* **29**, 2287–2295 (2018).
130. Pretze, M., Pietzsch, D. & Mamat, C. Recent trends in bioorthogonal click-radiolabeling reactions using fluorine-18. *Molecules* **18**, 8618–8665 (2013).
131. Glaser, M. & Årstad, E. “Click Labeling” with 2-[¹⁸F]Fluoroethylazide for Positron Emission Tomography. *Bioconjugate Chem.* **18**, 989–993 (2007).
132. Hofmann, S., Maschauer, S., Kuwert, T., Beck-Sickinger, A. G. & Prante, O. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of an (¹⁸F)-labeled neuropeptide Y analogue for imaging of breast cancer by PET. *Mol. Pharm.* **12**, 1121–1130 (2015).
133. Wang, L., Jacobson, O., Avdic, D., Rotstein, B. H., Weiss, I. D., Collier, L., Chen, X., Vasdev, N. & Liang, S. H. Ortho-Stabilized (¹⁸F)-Azido Click Agents and their Application in PET Imaging with Single-Stranded DNA Aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 12777–12781 (2015).

134. Ramenda, T., Kniess, T., Bergmann, R., Steinbach, J. & Wuest, F. Radiolabelling of proteins with fluorine-18 via click chemistry. *Chem. Commun.* **0**, 7521–7523 (2009).
135. Ramenda, T., Steinbach, J. & Wuest, F. 4-[18F]Fluoro-N-methyl-N-(propyl-2-yn-1-yl)benzenesulfonamide ([18F]F-SA): a versatile building block for labeling of peptides, proteins and oligonucleotides with fluorine-18 via Cu(I)-mediated click chemistry. *Amino Acids* **44**, 1167–1180 (2013).
136. Li, S., Cai, H., He, J., Chen, H., Lam, S., Cai, T., Zhu, Z., Bark, S. J. & Cai, C. Extent of the Oxidative Side Reactions to Peptides and Proteins During the CuAAC Reaction. *Bioconjugate Chem.* **27**, 2315–2322 (2016).
137. Gaulier, C., Hospital, A., Legeret, B., Delmas, A. F., Aucagne, V., Cisnetti, F. & Gautier, A. A water soluble CuI–NHC for CuAAC ligation of unprotected peptides under open air conditions. *Chem. Commun.* **48**, 4005–4007 (2012).
138. Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B. & Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **6**, 2853–2855 (2004).
139. Campbell-Verduyn, L. S., Mirfeizi, L., Schoonen, A. K., Dierckx, R. A., Elsinga, P. H. & Feringa, B. L. Strain-Promoted Copper-Free ‘Click’ Chemistry for 18F Radiolabeling of Bombesin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11117–11120 (2011).
140. Carpenter, R. D., Hausner, S. H. & Sutcliffe, J. L. Copper-Free Click for PET: Rapid 1,3-Dipolar Cycloadditions with a Fluorine-18 Cyclooctyne. *ACS Med Chem Lett* **2**, 885–889 (2011).
141. Evans, H. L., Carroll, L., Aboagye, E. O. & Spivey, A. C. Bioorthogonal chemistry for (68) Ga radiolabelling of DOTA-containing compounds. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **57**, 291–297 (2014).
142. Zeng, D., Guo, Y., White, A. G., Cai, Z., Modi, J., Ferdani, R. & Anderson, C. J. Comparison of conjugation strategies of cross-bridged macrocyclic chelators with cetuximab for copper-64 radiolabeling and PET imaging of EGFR in colorectal tumor-bearing mice. *Mol. Pharm.* **11**, 3980–3987 (2014).
143. Choi, M. H., Shim, H. E., Nam, Y. R., Kim, H. R., Kang, J. A., Lee, D.-E., Park, S. H., Choi, D. S., Jang, B.-S. & Jeon, J. Synthesis and evaluation of an (125)I-labeled azide prosthetic group for efficient and bioorthogonal radiolabeling of cyclooctyne-group containing molecules using copper-free click reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 875–878 (2016).
144. Hausner, S. H., Carpenter, R. D., Bauer, N. & Sutcliffe, J. L. Evaluation of an integrin $\alpha\beta_6$ -specific peptide labeled with [18F]fluorine by copper-free, strain-promoted click chemistry. *Nucl. Med. Biol.* **40**, 233–239 (2013).
145. Li, Z., Cai, H., Hassink, M., Blackman, M. L., Brown, R. C. D., Conti, P. S. & Fox, J. M. Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of 18F labeled probes. *Chem. Commun. (Camb.)* **46**, 8043–8045 (2010).
146. Liu, S., Hassink, M., Selvaraj, R., Yap, L.-P., Park, R., Wang, H., Chen, X., Fox, J. M., Li, Z. & Conti, P. S. Efficient 18F labeling of cysteine-containing peptides and proteins using tetrazine-trans-cyclooctene ligation. *Mol. Imaging* **12**, 121–128 (2013).

147. Wu, Z., Liu, S., Hassink, M., Nair, I., Park, R., Li, L., Todorov, I., Fox, J. M., Li, Z., Shively, J. E., Conti, P. S. & Kandeel, F. Development and evaluation of ¹⁸F-TTCCO-Cys40-Exendin-4: a PET probe for imaging transplanted islets. *J. Nucl. Med.* **54**, 244–251 (2013).
148. Albu, S. A., Al-Karmi, S. A., Vito, A., Dzandzi, J. P. K., Zlitni, A., Beckford-Vera, D., Blacker, M., Janzen, N., Patel, R. M., Capretta, A. & Valliant, J. F. ¹²⁵I-Tetrazines and Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Chemistry: A Convenient Radioiodination Strategy for Biomolecule Labeling, Screening, and Biodistribution Studies. *Bioconjugate Chem.* **27**, 207–216 (2016).
149. Choi, M. H., Shim, H. E., Yun, S.-J., Kim, H. R., Mushtaq, S., Lee, C. H., Park, S. H., Choi, D. S., Lee, D.-E., Byun, E.-B., Jang, B.-S. & Jeon, J. Highly efficient method for ¹²⁵I-radiolabeling of biomolecules using inverse-electron-demand Diels-Alder reaction. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 2589–2594 (2016).
150. Zeglis, B. M., Mohindra, P., Weissmann, G. I., Divilov, V., Hilderbrand, S. A., Weissleder, R. & Lewis, J. S. Modular strategy for the construction of radiometalated antibodies for positron emission tomography based on inverse electron demand Diels-Alder click chemistry. *Bioconjugate Chem.* **22**, 2048–2059 (2011).
151. Kumar, A., Hao, G., Liu, L., Ramezani, S., Hsieh, J.-T., Öz, O. K. & Sun, X. Click-chemistry strategy for labeling antibodies with copper-64 via a cross-bridged tetraazamacrocyclic chelator scaffold. *Bioconjugate Chem.* **26**, 782–789 (2015).
152. Vugts, D. J., Vervoort, A., Stigter-van Walsum, M., Visser, G. W. M., Robillard, M. S., Versteegen, R. M., Vuldurs, R. C. M., Herscheid, J. K. D. M. & van Dongen, G. A. M. S. Synthesis of phosphine and antibody-azide probes for in vivo Staudinger ligation in a pretargeted imaging and therapy approach. *Bioconjugate Chem.* **22**, 2072–2081 (2011).
153. van den Bosch, S. M., Rossin, R., Renart Verkerk, P., Ten Hoeve, W., Janssen, H. M., Lub, J. & Robillard, M. S. Evaluation of strained alkynes for Cu-free click reaction in live mice. *Nucl. Med. Biol.* **40**, 415–423 (2013).
154. Lee, S. B., Kim, H. L., Jeong, H.-J., Lim, S. T., Sohn, M.-H. & Kim, D. W. Mesoporous silica nanoparticle pretargeting for PET imaging based on a rapid bioorthogonal reaction in a living body. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 10549–10552 (2013).
155. Rossin, R., Verkerk, P. R., van den Bosch, S. M., Vuldurs, R. C. M., Verel, I., Lub, J. & Robillard, M. S. In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 3375–3378 (2010).
156. Rossin, R., van Duijnhoven, S. M. J., Läppchen, T., van den Bosch, S. M. & Robillard, M. S. Trans-cyclooctene tag with improved properties for tumor pretargeting with the diels-alder reaction. *Mol. Pharm.* **11**, 3090–3096 (2014).
157. Rossin, R., Läppchen, T., van den Bosch, S. M., Laforest, R. & Robillard, M. S. Diels-Alder reaction for tumor pretargeting: in vivo chemistry can boost tumor radiation dose compared with directly labeled antibody. *J. Nucl. Med.* **54**, 1989–1995 (2013).
158. van Duijnhoven, S. M. J., Rossin, R., van den Bosch, S. M., Wheatcroft, M. P., Hudson, P. J. & Robillard, M. S. Diabody Pretargeting with Click Chemistry In Vivo. *J. Nucl. Med.* **56**, 1422–1428 (2015).

159. Altai, M., Perols, A., Tsourma, M., Mitran, B., Honarvar, H., Robillard, M., Rossin, R., ten Hoeve, W., Lubberink, M., Orlova, A., Karlström, A. E. & Tolmachev, V. Feasibility of Affibody-Based Bioorthogonal Chemistry-Mediated Radionuclide Pretargeting. *J. Nucl. Med.* **57**, 431–436 (2016).
160. Meyer, J.-P., Houghton, J. L., Kozłowski, P., Abdel-Atti, D., Reiner, T., Pillarsetty, N. V. K., Scholz, W. W., Zeglis, B. M. & Lewis, J. S. (18)F-Based Pretargeted PET Imaging Based on Bioorthogonal Diels-Alder Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **27**, 298–301 (2016).
161. Houghton, J. L., Zeglis, B. M., Abdel-Atti, D., Sawada, R., Scholz, W. W. & Lewis, J. S. Pretargeted Immuno-PET of Pancreatic Cancer: Overcoming Circulating Antigen and Internalized Antibody to Reduce Radiation Doses. *J. Nucl. Med.* **57**, 453–459 (2016).
162. Shaunak, S., Godwin, A., Choi, J.-W., Balan, S., Pedone, E., Vijayarangam, D., Heidelberger, S., Teo, I., Zloh, M. & Brocchini, S. Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 312–313 (2006).
163. Brocchini, S., Godwin, A., Balan, S., Choi, J., Zloh, M. & Shaunak, S. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 3–12 (2008).
164. Pfisterer, A., Eisele, K., Chen, X., Wagner, M., Müllen, K. & Weil, T. Bioactive Unnatural Somatostatin Analogues through Bioorthogonal Iodo- and Ethynyl-Disulfide Intercalators. *Chem. Eur. J.* **17**, 9697–9707 (2011).
165. Wang, T., Pfisterer, A., Kuan, S. L., Wu, Y., Dumele, O., Lamla, M., Müllen, K. & Weil, T. Cross-conjugation of DNA, proteins and peptides via a pH switch. *Chem. Sci.* **4**, 1889–1894 (2013).
166. Balan, S., Choi, J.-W., Godwin, A., Teo, I., Laborde, C. M., Heidelberger, S., Zloh, M., Shaunak, S. & Brocchini, S. Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge. *Bioconjugate Chem.* **18**, 61–76 (2007).
167. Harris, J. M. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 214–221 (2003).
168. Bryant, P., Pabst, M., Badescu, G., Bird, M., McDowell, W., Jamieson, E., Swierkosz, J., Jurlewicz, K., Tommasi, R., Henseleit, K., Sheng, X., Camper, N., Manin, A., Kozakowska, K., Peciak, K., Laurine, E., Grygorash, R., Kyle, A., Morris, D., Parekh, V., Abhilash, A., Choi, J.-W., Edwards, J., Frigerio, M., Baker, M. P. & Godwin, A. In Vitro and In Vivo Evaluation of Cysteine Rebridged Trastuzumab-MMAE Antibody Drug Conjugates with Defined Drug-to-Antibody Ratios. *Mol. Pharm.* **12**, 1872–1879 (2015).
169. Badescu, G., Bryant, P., Bird, M., Henseleit, K., Swierkosz, J., Parekh, V., Tommasi, R., Pawlisz, E., Jurlewicz, K., Farys, M., Camper, N., Sheng, X., Fisher, M., Grygorash, R., Kyle, A., Abhilash, A., Frigerio, M., Edwards, J. & Godwin, A. Bridging Disulfides for Stable and Defined Antibody Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **25**, 1124–1136 (2014).
170. Schumacher, F. F., Nobles, M., Ryan, C. P., Smith, M. E. B., Tinker, A., Caddick, S. & Baker, J. R. In Situ Maleimide Bridging of Disulfides and a New Approach to Protein PEGylation. *Bioconjugate Chem.* **22**, 132–136 (2011).
171. Smith, M. E. B., Schumacher, F. F., Ryan, C. P., Tedaldi, L. M., Papaioannou, D., Waksman, G., Caddick, S. & Baker, J. R. Protein modification, bioconjugation, and disulfide bridging using bromomaleimides. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1960–1965 (2010).

172. Schumacher, F. F., Nunes, J. P. M., Maruani, A., Chudasama, V., Smith, M. E. B., Chester, K. A., Baker, J. R. & Caddick, S. Next generation maleimides enable the controlled assembly of antibody–drug conjugates via native disulfide bond bridging. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 7261–7269 (2014).
173. Jones, M. W., Strickland, R. A., Schumacher, F. F., Caddick, S., Baker, J. R., Gibson, M. I. & Haddleton, D. M. Polymeric dibromomaleimides as extremely efficient disulfide bridging bioconjugation and pegylation agents. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1847–1852 (2012).
174. Schumacher, F. F., Sanchania, V. A., Tolner, B., Wright, Z. V. F., Ryan, C. P., Smith, M. E. B., Ward, J. M., Caddick, S., Kay, C. W. M., Aeppli, G., Chester, K. A. & Baker, J. R. Homogeneous antibody fragment conjugation by disulfide bridging introduces ‘spinostics’. *Sci Rep* **3**, 1525 (2013).
175. Jones, M. W., Strickland, R. A., Schumacher, F. F., Caddick, S., Baker, J. R., Gibson, M. I. & Haddleton, D. M. Highly efficient disulfide bridging polymers for bioconjugates from radical-compatible dithiophenol maleimides. *Chem. Commun.* **48**, 4064–4066 (2012).
176. Nunes, J. P. M., Morais, M., Vassileva, V., Robinson, E., Rajkumar, V. S., Smith, M. E. B., Pedley, R. B., Caddick, S., Baker, J. R. & Chudasama, V. Functional native disulfide bridging enables delivery of a potent, stable and targeted antibody–drug conjugate (ADC). *Chem. Commun.* **51**, 10624–10627 (2015).
177. Lang, K. & Chin, J. W. Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins. *Chem. Rev.* **114**, 4764–4806 (2014).
178. Wällberg, H., Grafström, J., Cheng, Q., Lu, L., Martinsson Ahlzén, H.-S., Samén, E., Thorell, J.-O., Johansson, K., Dunås, F., Olofsson, M. H., Stone-Elander, S., Arnér, E. S. J. & Ståhl, S. HER2-positive tumors imaged within 1 hour using a site-specifically ¹¹C-labeled Sel-tagged affibody molecule. *J. Nucl. Med.* **53**, 1446–1453 (2012).
179. Wu, Y., Zhu, H., Zhang, B., Liu, F., Chen, J., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Wu, L., Si, L., Xu, H., Yao, T., Xiao, S., Xia, Q., Zhang, L., Yang, Z. & Zhou, D. Synthesis of Site-Specific Radiolabeled Antibodies for Radioimmunotherapy via Genetic Code Expansion. *Bioconjugate Chem.* **27**, 2460–2468 (2016).
180. Dawson, P. E. & Kent, S. B. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 923–960 (2000).
181. Rodriguez, E. A., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. In vivo incorporation of multiple unnatural amino acids through nonsense and frameshift suppression. *PNAS* **103**, 8650–8655 (2006).
182. Ramakrishnan, B. & Qasba, P. K. Structure-based Design of β 1,4-Galactosyltransferase I (β 4Gal-T1) with Equally Efficient N-Acetylgalactosaminyltransferase Activity POINT MUTATION BROADENS β 4Gal-T1 DONOR SPECIFICITY. *J. Biol. Chem.* **277**, 20833–20839 (2002).
183. Zeglis, B. M., Davis, C. B., Abdel-Atti, D., Carlin, S. D., Chen, A., Aggeler, R., Agnew, B. J. & Lewis, J. S. Chemoenzymatic strategy for the synthesis of site-specifically labeled immunoconjugates for multimodal PET and optical imaging. *Bioconjugate Chem.* **25**, 2123–2128 (2014).

184. Cook, B. E., Adumeau, P., Membreno, R., Carnazza, K. E., Brand, C., Reiner, T., Agnew, B. J., Lewis, J. S. & Zeglis, B. M. Pretargeted PET Imaging Using a Site-Specifically Labeled Immunoconjugate. *Bioconjugate Chem* **27**, 1789–1795 (2016).
185. van Geel, R., Wijdeven, M. A., Heesbeen, R., Verkade, J. M. M., Wasiel, A. A., van Berkel, S. S. & van Delft, F. L. Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N-Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **26**, 2233–2242 (2015).
186. Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grünberg, J., Honer, M., Hunziker, P., Struthers, H. & Schibli, R. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 9995–9997 (2010).
187. Fichou, N., Gouard, S., Maurel, C., Barbet, J., Ferrer, L., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Faivre-Chauvet, A., Bigot-Corbel, E., Davodeau, F., Gaschet, J. & Chérel, M. Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front. Med. (Lausanne)* **2**, 76 (2015).
188. Tucker, M. J., Courter, J. R., Chen, J., Atasoylu, O., Smith, A. B. & Hochstrasser, R. M. Tetrazine Phototriggers: Probes for Peptide Dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3612–3616 (2010).
189. Brown, S. P. & Smith, A. B. Peptide/Protein Stapling and Unstapling: Introduction of s-Tetrazine, Photochemical Release, and Regeneration of the Peptide/Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 4034–4037 (2015).
190. Canovas, C., Moreau, M., Bernhard, C., Oudot, A., Guillemin, M., Denat, F. & Goncalves, V. Site-Specific Dual Labeling of Proteins on Cysteine Residues with Chlorotetrazines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 10646–10650 (2018).
191. Yang, J., Karver, M. R., Li, W., Sahu, S. & Devaraj, N. K. Metal-Catalyzed One-Pot Synthesis of Tetrazines Directly from Aliphatic Nitriles and Hydrazine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5222–5225 (2012).
192. Pinner, A. Ueber die Einwirkung von Hydrazin auf die Imidoäther. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **30**, 1871–1890 (1897).
193. Telu, S., Chun, J.-H., Siméon, F. G., Lu, S. & Pike, V. W. Syntheses of mGluR5 PET radioligands through the radiofluorination of diaryliodonium tosylates. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 6629–6638 (2011).
194. Chun, J.-H. & Pike, V. W. Single-Step Radiosynthesis of “¹⁸F-Labeled Click Synthons” from Azide-Functionalized Diaryliodonium Salts. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4541–4547 (2012).
195. Qin, L., Hu, B., Neumann, K. D., Linstad, E. J., McCauley, K., Veness, J., Kempinger, J. J. & DiMagno, S. G. A Mild and General One-Pot Synthesis of Densely Functionalized Diaryliodonium Salts. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 5919–5924 (2015).
196. Debets, M. F., Prins, J. S., Merckx, D., Berkel, S. S. van, Delft, F. L. van, Hest, J. C. M. van & Rutjes, F. P. J. T. Synthesis of DIBAC analogues with excellent SPAAC rate constants. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 5031–5037 (2014).

197. Svatunek, D., Denk, C., Rosecker, V., Sohr, B., Hametner, C., Allmaier, G., Fröhlich, J. & Mikula, H. Efficient low-cost preparation of trans-cyclooctenes using a simplified flow setup for photoisomerization. *Monatsh. Chem.* **147**, 579–585 (2016).
198. Talanov, V. S., Garmestani, K., Regino, C. A. S., Milenic, D. E., Plascjak, P. S., Waldmann, T. A. & Brechbiel, M. W. Preparation and in vivo evaluation of a novel stabilized linker for ²¹¹At labeling of protein. *Nucl. Med. Biol.* **33**, 469–480 (2006).
199. Rajerison, H., Faye, D., Roumesy, A., Louaisil, N., Boeda, F., Faivre-Chauvet, A., Gestin, J.-F. & Legoupy, S. Ionic liquid supported organotin reagents to prepare molecular imaging and therapy agents. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 2121–2126 (2016).
200. Otto, S. & Engberts, J. B. Hydrophobic interactions and chemical reactivity. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 2809–2820 (2003).
201. Selvaraj, R., Giglio, B., Liu, S., Wang, H., Wang, M., Yuan, H., Chintala, S. R., Yap, L.-P., Conti, P. S., Fox, J. M. & Li, Z. Improved Metabolic Stability for ¹⁸F PET Probes Rapidly Constructed via Tetrazine trans-Cyclooctene Ligation. *Bioconjugate Chem.* **26**, 435–442 (2015).
202. Chérel, M., Gouard, S., Gaschet, J., Saï-Maurel, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Bourgeois, M., Gestin, J.-F., Bodéré, F. K., Barbet, J., Moreau, P. & Davodeau, F. ²¹³Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J. Nucl. Med.* **54**, 1597–1604 (2013).
203. Ménager, J., Gorin, J.-B., Maurel, C., Drujont, L., Gouard, S., Louvet, C., Chérel, M., Faivre-Chauvet, A., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Davodeau, F., Gaschet, J. & Guilloux, Y. Combining α -Radioimmunotherapy and Adoptive T Cell Therapy to Potentiate Tumor Destruction. *PLOS One*, **10**, e0130249 (2015).
204. Rondon, A., Ty, N., Bequignat, J.-B., Quintana, M., Briat, A., Witkowski, T., Bouchon, B., Boucheix, C., Miot-Noirault, E., Pouget, J.-P., Chezal, J.-M., Navarro-Teulon, I., Moreau, E. & Degoul, F. Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with trans-cyclooctene/tetrazine cycloaddition: in vitro and in vivo evaluation in colorectal cancer models. *Sci Rep* **7**, (2017).
205. Tolshchina, S. G., Rusinov, G. L. & Charushin, V. N. 1,2,4,5-Tetrazines and Azolo[1,2,4,5]tetrazines: Synthesis and Reactions with Nucleophiles. *Chem. Heterocycl. Comp.* **49**, 66–91 (2013).
206. Koniev, O., Leriche, G., Nothisen, M., Remy, J.-S., Strub, J.-M., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Baati, R. & Wagner, A. Selective irreversible chemical tagging of cysteine with 3-arylpropionitriles. *Bioconjugate Chem.* **25**, 202–206 (2014).
207. Toda, N., Asano, S. & Barbas, C. F. Rapid, Stable, Chemoselective Labeling of Thiols with Julia-Kocięński Like Reagents: A Serum-Stable Alternative to Maleimide-Based Protein Conjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, (2013).
208. Lindegren, S., Bäck, T. & Jensen, H. J. Dry-distillation of astatine-211 from irradiated bismuth targets: a time-saving procedure with high recovery yields. *Appl. Radiat. Isot.* **55**, 157–160 (2001).

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Communications poster**

« Synthesis of precursors for cycloaddition reactions applied to the peptide radiolabeling by heavy halogens for nuclear oncology »

Laurent Navarro, Sébastien Gouard, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Frédéric Pecorari, Jean-François Gestin, François Guérard

« New chemical and biological tools for targeting in cancer and therapy » Workshop - 21-24 Septembre 2016, Le Bono (France)

« Synthesis and evaluation of radioiodinated and astatinated prosthetic groups for bioorthogonal conjugation to antibodies for nuclear imaging and therapy »

Laurent Navarro, Sébastien Gouard, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Frédéric Pecorari, Jean-François Gestin, François Guérard

« 11^{ème} journées du Cancéropôle Grand Ouest » (CGO) - 29-30 Juin 2016, Vannes (France)

« Synthesis and evaluation of radioiodinated and astatinated prosthetic groups for bioorthogonal conjugation to antibodies for nuclear imaging and therapy »

Laurent Navarro, Sébastien Gouard, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Frédéric Pecorari, Jean-François Gestin, François Guérard

« CNRS / Institute of Nuclear Physics of the Polish Academy of Sciences (PAN) » Workshop, 11-12 Décembre 2017, Gif-sur-Yvette (France)

« Synthesis and evaluation of radioiodinated and astatinated prosthetic groups for bioorthogonal conjugation to antibodies for nuclear imaging and therapy »

Laurent Navarro, Sébastien Gouard, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Frédéric Pecorari, Jean-François Gestin, François Guérard

« 19TH European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals », 5-8 Avril 2018, Groningue (Pays-Bas)

« Synthesis and evaluation of radioiodinated and astatinated prosthetic groups for bioorthogonal conjugation to antibodies for nuclear imaging and therapy »

Laurent Navarro, Sébastien Gouard, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Frédéric Pecorari, Jean-François Gestin, François Guérard

« Tumour targeting and radiotherapies network » Workshop - 26-29 Septembre 2018, Le Bono (France)

« Synthesis of bioorthogonal trifunctional linkers for the elaboration and radiolabeling of immunological vectors »

Laurent Navarro, Liyan Ouyang, Frédéric Pecorari, Michel Chérel, Jean-François Gestin, François Guérard

« Tumour targeting and radiotherapies network » Workshop - 26-29 Septembre 2018, Le Bono (France)

- **Communications orales**

« Synthesis and evaluation of radioiodinated and astatinated prosthetic groups for bioorthogonal conjugation to antibodies for nuclear imaging and therapy »

Laurent Navarro, Cyrille Alliot, Michel Chérel, Frédéric Pecorari, Jean-François Gestin, François Guérard

« 19TH European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals », 5-8 Avril 2018, Groningue (Pays-Bas)

- **Publications**

F. Guérard, **L. Navarro**, Y-S. Lee, A. Roumesy, C. Alliot, M. Chérel, M.W. Brechbiel, J-F. Gestin
« Bifunctional arylidonium salts for highly efficient radioiodination and astatination of antibodies »
Bioorg. Med. Chem., 25, 21, **2017**, 5975-5980

L. Navarro, M. Berdal, M. Chérel, F. Pecorari, J-F. Gestin, F. Guérard
« Prosthetic groups for radioiodination and astatination of peptides and proteins: a comparative study of five potential bioorthogonal labeling strategies »
Bioorg. Med. Chem. 27, 1, **2019**, 167-174

Titre : Applications de la chimie bio-orthogonale au radiomarquage de vecteurs immunologiques à l'iode et à l'astate pour l'oncologie nucléaire

Mots clés : Chimie click, conjugaison bio-orthogonale, radiomarquage, radiohalogènes lourds, astate

Résumé : Les radiohalogènes lourds sont de plus en plus étudiés dans le domaine de la médecine nucléaire, que ce soit en imagerie (radio-isotopes de l'iode) ou bien en thérapie vectorisée avec l'astate-211. Cependant, les méthodes actuelles visant à coupler ces radionucléides sur des vecteurs immunologiques présentent de faibles rendements et des sites de fixation aléatoires pouvant freiner leur transfert vers des applications cliniques. Dans le but de s'affranchir de ces limites, de nouvelles approches de radiomarquage basées sur la chimie bio-orthogonale ont été étudiées pour améliorer le procédé de couplage de ces radio-isotopes. La première partie de cette thèse présente l'étude comparative entre différents systèmes bio-orthogonaux afin d'identifier les plus adaptés au marquage d'anticorps aux halogènes lourds.

Pour cela, un ensemble de précurseurs portant des fonctions clickables ont été conçus et radiomarqués à l'I-125 et à l'At-211. Les cinétiques de conjugaison ont été étudiées sur des peptides modèles munis de fonctions clickables complémentaires à celles présentes sur les précurseurs radiomarqués. Une seconde partie concerne le développement de nouveaux vecteurs immunologiques à site unique de radiomarquage par chimie bio-orthogonale. Un linker trifonctionnel muni d'une fonction de radiomarquage clickable a été développé. Il permet de coupler deux protéines, résultant en un nouveau vecteur possédant un site contrôlé de radiomarquage. Les résultats obtenus offrent de nouvelles perspectives dans le développement de vecteurs radiomarqués pour l'oncologie nucléaire.

Title: Applications of bioorthogonal chemistry to the radiolabeling of immunological vectors with iodine and astatine for nuclear oncology

Keywords: click chemistry, bioorthogonal conjugation, radiolabeling, heavy radiohalogens, astatine

Abstract: Heavy radiohalogens are increasingly studied in the field of nuclear medicine, whether for imaging (iodine radioisotopes) or for targeted radiotherapy with astatine-211. However, current methods for coupling these radionuclides to immunological vectors lead to low yields and random binding sites that can slow down transfer to clinical applications. In order to overcome these limitations, new radiolabeling approaches based on bioorthogonal chemistry have been studied to improve the coupling process of these radioisotopes. The first part of this thesis details the comparative study between different bioorthogonal systems in order to identify the most suitable for antibodies labeling with heavy halogens.

In that aim, a set of precursors with clickable functions were designed and radiolabeled with I-125 and At-211. Conjugation kinetics were studied on model peptides bearing clickable functions complementary to those present on the radiolabeled precursors. The second part concerns the development of new immunological vectors with single radiolabeling site using bioorthogonal chemistry. A trifunctional linker with a clickable radiolabeling function has been developed allowing two proteins to be coupled, resulting in a new vector with a controlled radiolabeling site. The results obtained offer new perspectives in the development of radiolabeled vectors in nuclear oncology.