



HAL
open science

C-glycosides fluorés pour le marquage de peptides : Applications en imageries TEP et bimodale TEP/FPIR

Timothé Vucko

► **To cite this version:**

Timothé Vucko. C-glycosides fluorés pour le marquage de peptides : Applications en imageries TEP et bimodale TEP/FPIR. Chimie organique. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0186 . tel-02526487

HAL Id: tel-02526487

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02526487>

Submitted on 31 Mar 2020

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale C2MP (Chimie-Mécanique-Matériaux-Physique)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Chimie et Physico-chimie Moléculaires

Timothé VUCKO

**C-glycosides fluorés pour le marquage de peptides
Applications en imageries TEP et bimodale TEP/FPIR**

6 Décembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Jean-Bernard BEHR	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire, Reims
	M. Patrick EMOND	Professeur, Université de Tours, INSERM U 1253, Tours
Examineurs :	Mme Christine GOZE	Maître de Conférences, Université de Bourgogne, Institut de Chimie Moléculaire, Dijon
	Mme Andreea PASC	Professeur, Université de Lorraine, L2CM UMR 7053, Nancy
	Mme Nadia PELLEGRINI-MOISE	Maître de Conférences HDR, Université de Lorraine, L2CM UMR 7053, Nancy, directeur de thèse
	Mme Sandrine LAMANDE-LANGLE	Maître de Conférences HDR, Université de Lorraine, L2CM UMR 7053, Nancy, co-directeur de thèse

UMR CNRS 7053 L2CM

Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine
BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Directeur de Recherche Philippe Gros, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire tout au long de ma thèse.

Je remercie très chaleureusement les Docteurs Nadia Pellegrini-Moïse et Sandrine Lamandé-Langle pour m'avoir dirigé pendant ces trois années, pour tout le savoir qu'elles m'ont transmis, pour leur confiance et leur bonne humeur. Je les remercie également pour leur disponibilité constante et toute l'aide qu'elles m'ont apportées durant ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Professeur Jean-Bernard Behr, de l'Institut de Reims, et Monsieur le Professeur Patrick Emond de l'Université de Tours, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger mes travaux et d'en être les rapporteurs.

Je remercie également Madame la Docteur Christine Goze, de l'Université de Bourgogne, de Dijon et le Professeur Andreea Pasc, de l'Université de Lorraine, pour l'intérêt qu'elles veulent bien accorder à cette thèse en acceptant de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Gilles Karcher m'avoir accueilli à Nancyclotep et le Docteur Charlotte Collet pour son encadrement au cours des radiosynthèses. Je remercie également Romain Filosa pour tout le support technique qu'il a fourni et sa bonne humeur quotidienne et Julien Pierson, Pierre-Yves Marie et Fatiha Maskali pour leurs travaux sur mes composés.

Je remercie le Professeur Véronique Regnault et Cécile Lakomy de l'Inserm, et le Docteur Cédric Boura et Valérie Jouan-Hureau du CRAN pour leurs travaux effectués en biologie.

Je remercie les Docteurs François Dehez, Antonio Monari et Alexandrine Lambert du LPCT pour leurs travaux effectués en dynamique moléculaire.

Je remercie le Docteur Katalin Selmeczi pour ses travaux effectués en fluorescence.

Je remercie également les Docteurs Nadia Canilho, Maxime Mourer et Sabrina Touchet pour leur soutien, leurs précieux conseils et leur bonne humeur quotidienne. Je remercie le Professeur Jean-Bernard Regnouf De Vains et les Docteurs Rosella Spina et Michel Boisbrun pour leurs conseils avisés.

Je remercie François Dupire et Fabien Lachaud pour les analyses en spectrométrie de masse et leur bonne humeur quotidienne, et Pascal Lemièrre pour son soutien et sa joie de vivre quotidienne. Je remercie également Sandrine Adach, Paule Bazard, Catherine Colson, Nathalie Petitjean, Dominique Dodin et Lionel Richaudeau pour leur sympathie quotidienne.

Je remercie les stagiaires que j'ai encadrés, je leur souhaite une bonne réussite professionnelle et tous mes collègues doctorants que j'ai côtoyé pendant ces trois années, Violeta, Hiba, Dalel, Mohamed, Youssef, Jimmy, Elodie, Dorian, Julien...

Je remercie mes amis qui m'ont soutenu, aidé depuis bien longtemps et sur qui je peux compter à tous moments, Arnaud, Jordan, Hitcliff, Bertrand, Kévin, Maxime, Florian, Hélène, Mickäel, Thomas, Vincent, Cécile, Charles, Sébastien, Patrick, Julian.

Pour finir je remercie ma famille, mes parents René et Nathalie, mon frère Yoann et mes cousins Florian, Flavien et Franklin pour leur soutien sincère et constant tout au long de cette période.

Production scientifique

Publications

Collet, C., Vucko, T., Ariztia, J.; Karcher, G., Pellegrini-Moïse, N., Lamandé-Langle, S.; Fully Automated radiosynthesis of [¹⁸F]Fluoro-C-glyco-c(RGDfC): Exploiting all the abilities of the AllInOne synthesizer. **2019**, Accepted in *Reaction Chem & Eng.*

Vucko, T.; Petry, N.; Dehez, F.; Lambert, A.; Monari, A.; Lakomy, C.; Regnault, V.; Lacolley, P.; Collet, C.; Karcher, G.; Pellegrini-Moïse, N.; Lamandé-Langle, S.; C-glyco“RGD” as $\alpha_{11b}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$ integrin ligands for imaging applications: Synthesis, *in vitro* evaluation and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.*, **2019**, 27, 4101-4109

Vucko, T.; Pellegrini-Moïse, N.; Lamandé-Langle, S. Value-added carbohydrate building blocks by regioselectivity O-alkylation of C-glucosyl compounds. *Carbohydr. Res.*, **2019**, 477, 1-10.

Petry, N.; Vucko, T.; Collet, C.; Lamandé-Langle, S.; Pellegrini-Moïse, N.; Chrétien, F. Synthesis and Revised Stereochemical Assignment of C-Allyl Glucopyranosides and Derivatives. *Carbohydr. Res.*, **2017**, 445, 61–64.

Communications

Orales

Vucko T., Dehez F., Monari A., Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***Nouveaux dérivés C-glycoRGD : Synthèse, évaluation biologique et modélisation moléculaire*** ; 10 Décembre **2018**, Journée Institut Jean Barriol, Nancy, France

Vucko T., Petry N., Regnault V., Lakomy C., Collet C., Karcher G., Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***New development in fluorinated carbohydrate derivatives for peptides radiolabeling*** ; 18 - 19 Octobre **2018**, Carbohydrate and Fluorine Symposium, Poitiers, France

Lamandé-Langle S., Vucko T., Petry N., Regnault V., Lakomy C., Collet C., Karcher G., Pellegrini-Moïse N. ***Recent development in glyco-RGD conjugates: synthesis, biological evaluation and PET application*** ; 15 - 19 Juillet **2018**, International Carbohydrate Symposium, Lisbonne, Portugal

Vucko T., Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***Glycoside derivatives as prosthetic groups for peptide [¹⁸F]radiolabeling: Synthesis, radiosynthesis and applications*** ; 5 Juin **2018**, Journées du Groupement De Recherche Agents d'Imagerie Moléculaire, Orléans, France

Vucko T., Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***Synthèse et radiosynthèse de dérivés C-glycosides. Application en imagerie TEP*** ; 19 Juin **2017**, Journée de printemps, ED SESAMES, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Vucko T., Collet C., Karcher, Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***Développement de O- et C-glycosides pour le marquage de peptides au fluor-18. Application en imagerie TEP*** ; 9 Décembre 2016, Journée Institut Jean Barriol, Nancy, France

Par affiche

Vucko, T., Ariztia, J., Pellegrini-Moïse, N., Lamandé-Langle, S. ***Development of platforms as dyes for combined [¹⁸F]PET/NIRF imaging*** ; 26 - 31 Mai 2019, International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences, Pékin ,Chine

Vucko, T., Petry, N., Regnault, V., Lakomy, C., Pellegrini-Moïse, N., Lamandé-Langle S. ***Development, biological evaluation and PET applications of [¹⁸F]fluoro-glyco "RGD"*** ; 26 - 31 Mai 2019, International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences, Pékin, Chine

Ariztia, J., Vucko, T., Pellegrini-Moïse, N., Lamandé-Langle, S. ***Development of platforms as dyes for combined [¹⁸F]PET/NIRF imaging*** ; 20 - 22 Mai 2019, 2^{ème} Journées du Groupement De Recherche Agents d'Imagerie Moléculaire, Dijon, France

Lamandé-Langle S., Vucko T., Petry N., Regnault V., Lakomy C., Collet C., Karcher G., Pellegrini-Moïse N. ***Recent development in glyco-RGD conjugates : synthesis, biological evaluation and PET application*** ; 15 - 19 Juillet 2018, International Carbohydrate Symposium, Lisbonne, Portugal

Vucko, T., Petry, N., Regnault, V., Lakomy, C., Pellegrini-Moïse, N., Lamandé-Langle S. ***Glyco-RGD derivatives : synthesis and biological evaluation*** ; 18 - 22 Mars 2018, Rencontres en Chimie Organique Biologie 17, Aussois, France

Vucko T., Petry N., Collet C., Chrétien F., Karcher G., Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***Synthesis of [^{19/18}F]fluoro-C-glycosides to radiolabel peptides for PET imaging*** ; 2 - 6 Juillet 2017, 19th European Carbohydrate Symposium (EUROCARB), Barcelone, Espagne

Vucko T., Collet C., Petry N., Chrétien F., Karcher, Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***Synthesis of new prosthetic groups based on C-glycosides for peptides labeling*** ; 15 Juin 2017, DocSciLor, Nancy, France

Vucko T., Collet C., Petry N., Chrétien F., Karcher G., Pellegrini-Moïse N., Lamandé-Langle S. ***Development of C-glycoside-based prosthetic groups for ¹⁸F-labeling of peptides*** ; 14 - 19 Mai 2017, International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences, Dresde, Allemagne

Collet C., Vucko T., Karcher G., Lamandé-Langle S. ***Automation of peptides radiolabeling by click-[¹⁸F]-glycosylation on AllInOne module*** ; 14 - 19 Mai 2017, International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences, Dresde , Allemagne

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
AcOEt : Acétate d'éthyle
AIO : AllInOne
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
APTS : Acide para-toluène sulfonique
9-BBN : 9-borabicyclo[3.3.1]nonane
BH₃.THF : Borane-tétrahydrofurane
Bm : Biomolécule
BnBr : Bromure de benzyle
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CB : Cross-Bridged
CCD : Charged Coupled Device
CCM : Chromatographie sur Couche-Mince
CH₃I : Iodométhane
CI₅₀ : Concentration Inhibitrice médiane
CML : Cellules Musculaires Lisses
COSY : COrrélation SpectroscopY
CuAAC : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre
DABCO : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAST : Trifluorure de diéthyl-Amino-Sulfur
DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DCM : Dichlorométhane
DIC : Diisopropylcarbodiimide
DIEA : *N,N*-diisopropyléthylamine
4-DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EA : Electro-Attracteur
éq. : Equivalent
FDG : 2-Désoxy-Fluoro-Glucose
FPIR : Fluorescence en Proche Infra-Rouge
GBq : GigaBecquerel
GP : Groupe Partant
GPr : Groupe Prosthétique
GRP : Gastring-Releasing-Peptide
GRPR : Gastring-Releasing-Peptide-Receptor
H₂O₂ : Eau oxygénée
HBr : Acide bromhydrique
HCl : Acide chlorhydrique
HDA : Hédécylamine
IBCF : chloroformiate d'isobutyle
ICG : IndoCyanine Green

IEDDA : Cycloadditions de Diels-Alder à demande d'électrons inverse
IR : Infra-Rouge
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
K₂CO₃ : Bicarbonate de potassium
MBq : MégaBecquerel
MeOH : Méthanol
MOMIAs : MonomOlecular Multimodality Imaging Agents
NaH : Hydrure de sodium
NaHCO₃ : Hydrogénocarbonate de sodium
NaOAc : Acétate de sodium
NaOH : Hydroxyde de sodium
NHS : *N*-hydroxysuccinimide
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NT : NeuroTensine
PIR : Proche Infra-Rouge
PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen
PyBOP : Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
QY : Rendement quantique
RGD : Arginine-Glycine-Acide aspartique
RGDC : Arginine-Glycine-Acide aspartique-Cystéine
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SN : Substitution Nucléophile
SPAAC : Cycloaddition alcyne-azoture contrainte
SPION : Oxyde de fer super paramagnétique
t_{1/2} : Temps de demi-vie
TDM : Tomodensitométrie
TEA : Triéthylamine
TEMP : Tomographie par Emission Mono-Photonique
TEP : Tomographie par Emission de Positron
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
TMSOTf : Triflate de triméthylsilane
t_R : Temps de rétention
TrCl : Chlorure de trityle
TSTU : *N,N,N',N'*-tétraméthyluronium tétrafluoroborate
US : UltraSon
USPION : Oxyde de fer super paramagnétique ultra petite
UV : Ultra-Violet

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	1
CHAPITRE 1 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	7
I- IMAGERIE MOLECULAIRE	9
I.1- Généralités.....	9
I.2- Les techniques d'imagerie moléculaire.....	10
I.2.1) Imagerie par rayons-X.....	10
I.2.2) Imagerie par ultrasons.....	10
I.2.3) Imagerie optique.....	10
I.2.4) Imagerie par Résonance Magnétique.....	11
I.2.5) Imagerie par radionucléide.....	12
II- IMAGERIE DE TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITON (TEP).....	13
II.1- Principe de fonctionnement de l'imagerie TEP.....	13
II.2- Les différents radioisotopes utilisés en imagerie TEP.....	15
II.2.1) Caractéristiques des différents isotopes.....	15
II.2.2) Production des radioisotopes.....	16
II.2.3) Les radionucléides donnant lieu à des liaisons covalentes.....	17
II.2.4) Les radionucléides coordinants.....	18
II.3- Radiotraceurs pour l'imagerie TEP.....	19
II.4- Méthodes de [¹⁸ F]fluoruration.....	21
II.4.1) [¹⁸ F]Fluoruration électrophile.....	21
II.4.2) [¹⁸ F]Fluoruration nucléophile.....	22
II.4.2.1) Substitution nucléophile en série aliphatique.....	23
II.4.2.2) Substitution nucléophile en série aromatique et hétéroatomatique.....	24
III- IMAGERIE PAR FLUORESCENCE PROCHE INFRA-ROUGE (FPIR)	26
III.1- Principe de la FPIR.....	26
III.2- Cahier des charges pour des applications <i>in vivo</i>	27
III.3- Les différents types de fluorophores.....	29
III.3.1) Les xanthènes.....	29
III.3.2) Les BODIPY.....	31
III.3.3) Les cyanines.....	33
IV- IMAGERIE BIMODALE	34
IV.1- Intérêt du couplage de deux techniques d'imagerie et exemples de combinaisons.....	35
IV.2- Intérêt de la combinaison TEP/FPIR.....	38
V- MARQUAGE DE PEPTIDES	40
V.1- Intérêt des peptides en imagerie.....	40
V.2- Marquage de peptides pour l'imagerie TEP.....	44
V.2.1) Marquage par radiométaux.....	45
V.2.2) Marquage par le fluor-18.....	48
V.2.2.1) Marquage direct.....	49
V.2.2.2) Marquage indirect.....	50
V.3- Différentes méthodes de conjugaison.....	50

V.4- Nature des groupements prosthétiques pour le radiomarquage de biomolécules.....	55
V.4.1) Les groupements prosthétiques aromatiques et hétéroaromatiques	55
V.4.2) Les groupements prosthétiques à base de dérivés saccharidiques.....	56
V.5- Marquage de biomolécules avec une sonde bimodale TEP/FPIR : vers la	
construction de MOMIAs	60
V.5.1) Radiométaux / fluorophore.....	60
V.5.2) Fluor-18 / fluorophore.....	62
CHAPITRE 2 SYNTHÈSE DE FLUORO C-GLYCOSIDES ET	
CONJUGAISON AVEC DES DÉRIVÉS RGD POUR DES	
APPLICATIONS EN IMAGERIE TEP	67
I- INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	69
II- RETROSYNTHÈSE DE LA RÉFÉRENCE FROIDE ET DU PRÉCURSEUR DE	
MARQUAGE.....	70
III- PRINCIPALES MÉTHODES DE SYNTHÈSE DE C-GLYCOSIDES : ASPECT	
BIBLIOGRAPHIQUE	71
III.1.1) Synthèse de C-glycoside <i>via</i> des sucres électrophiles.....	72
III.1.2) Synthèse de C-glycosides <i>via</i> des sucres nucléophiles	75
III.1.3) Synthèse de C-glycoside <i>via</i> les métaux de transition	76
III.1.4) Synthèse de C-glycoside <i>via</i> des radicaux anomériques.....	78
III.1.5) Autre méthode de synthèse	78
IV- SYNTHÈSE DE GROUPEMENTS PROSTHÉTIQUES C-GLYCOSIDIQUES.....	79
IV.1- Introduction d'un bras allylique en position anomérique.....	79
IV.2- Introduction d'un azoture	80
IV.3- Fonctionnalisation de la position 6.....	83
IV.3.1) Synthèse du précurseur de marquage.....	83
IV.3.2) Synthèse de la référence froide	84
V- SYNTHÈSE DE GLYCOPEPTIDES PAR CONJUGAISON AVEC DES DÉRIVÉS DE RGD	
.....	85
V.1- Propargylation des peptides RGDC et c(RGDfC).....	86
V.2- Couplage par CuAAC.....	86
VI- ÉVALUATION BIOLOGIQUE <i>IN VITRO</i> DES GLYCOPEPTIDES.....	87
VII- ÉTUDES PAR DYNAMIQUE MOLECULAIRE DES GLYCOPEPTIDES	90
VIII- DÉVELOPPEMENT RADIOCHIMIQUE SUR LE COMPOSÉ [¹⁸ F]33.....	93
VIII.1- Mise au point des conditions CLHP	94
VIII.2- L'automate AllInOne (AIO).....	96
VIII.3- Préparation de l'automate et de la cassette	97
VIII.4- Radiomarquage du composé [¹⁸ F]33	98
VIII.5- Contrôle qualité et données physico-chimiques	104
VIII.6- Tests <i>in vivo</i> sur petit animal	106
IX- CONCLUSION.....	108

CHAPITRE 3 SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS DE TYPE C-GLYCOSIDES RADIOFLUORES ET FLUORESCENTS POUR DES APPLICATIONS EN IMAGERIE BIMODALE TEP/FPIR.....	111
I- INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	113
II- SYNTHÈSE DE LA CYANINE 5.....	114
III- FONCTIONNALISATION CONTRÔLÉE DE LA PLATEFORME SACCHARIDIQUE.....	118
III.1- Protection de l'hydroxyle primaire en position 6.....	118
III.2- Acylation régiosélective du composé 39	119
III.3- Protection par un 4,6- <i>O</i> -benzylidène.....	121
III.4- Alkylation régiosélective du composé 49	123
III.4.1) Aspect bibliographique concernant les alkylations régiosélectives.....	123
III.4.2) Mise au point avec le bromure de benzyle.....	124
III.4.3) Alkylation.....	126
III.5- Méthylation de la position 2.....	128
III.6- Ouverture régiosélective du 4,6- <i>O</i> -benzylidène.....	130
IV- SYNTHÈSE DE LA RÉFÉRENCE NON-RADIOACTIVE ET DU PRÉCURSEUR DE MARQUAGE.....	133
IV.1- Synthèse de la référence non-radioactive.....	133
IV.1.1) Fluoration de la position 6.....	134
IV.1.2) Déprotection du groupement phtalimide.....	134
IV.1.3) Couplage de la cyanine avec des amines modèles : propylamine, benzylamine et éthanolamine.....	135
IV.1.4) Couplage de la cyanine avec le C-glycoside 69	137
IV.1.5) Synthèse de la référence glycopeptidique.....	138
IV.2- Synthèse du précurseur de marquage.....	140
IV.2.1) Déprotection du phtalimide.....	140
IV.2.2) Couplage entre la cyanine 5 et le composé 78	140
IV.2.3) Triflation de la position 6.....	141
V- CONCLUSION.....	142
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	145
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	149
BIBLIOGRAPHIE.....	215

INTRODUCTION GENERALE
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Plusieurs facteurs tel que le vieillissement de la population, l'augmentation du nombre de cancers et une utilisation étendue de la médecine nucléaire en cardiologie, neurologie ou oncologie conduisent à une expansion du marché des radiopharmaceutiques. La création de nouveaux radiopharmaceutiques permet un développement accéléré de la médecine nucléaire. Un diagnostic rapide et efficace participe au bien-être de la population offrant une intervention thérapeutique rapide et adaptée évitant ainsi la morbidité et les dépenses médicales dramatiques qui menacent la viabilité des systèmes de santé. Avec l'augmentation du nombre de cancers, un diagnostic précoce apparaît comme la solution préconisée et chaque cas étant particulier, la médecine personnalisée est donc d'actualité. Dans ce contexte, la tendance est donc d'utiliser certaines biomolécules permettant de cibler des pathologies précises et de les conjuguer à une sonde spécifique à la technique d'imagerie visée.

Au cours de ces deux dernières décennies, deux techniques d'imagerie médicale, l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP) et l'imagerie par fluorescence proche infra-rouge (FPIR) ont émergé et commencent à avoir un impact significatif sur la prise en charge clinique en général et du cancer en particulier. La TEP s'est largement développée grâce à l'implantation de cyclotrons biomédicaux pour produire du 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG), radiotracer utilisé en routine pour le diagnostic de cancers. Aujourd'hui, l'imagerie TEP assistée par la diversification des produits radiopharmaceutiques commercialisés, est devenue un outil de référence grâce à sa sensibilité et spécificité en oncologie et en neurologie^[1,2]. L'imagerie FPIR est une technique très prometteuse pour la résection guidée par imagerie de tissus tumoraux, car elle offre la haute résolution de la délimitation des marges tumorales en temps réel.^[1,3] Plusieurs essais cliniques sont aujourd'hui en cours pour évaluer le ciblage moléculaire en imagerie de fluorescence pour la chirurgie-guidée utilisant, dans la plupart des cas, des anti-corps marqués avec un fluorophore dérivé de cyanine (IRDye800).

Dans ces essais cliniques, l'addition pré-opératoire d'un composé de diagnostic pour les imageries TEP/FPIR combinées utilisant un agent d'imagerie bimodale portant une sonde fluorescente et un radioisotope serait d'un grand bénéfice pour la santé du patient. Seulement,

quelques essais cliniques combinant l'imagerie duale TEP/FPIR et la chirurgie sont réalisés aujourd'hui, en dépit des avantages qu'une telle combinaison représente pour le patient.

Dans cette association de techniques d'imagerie TEP/FPIR, la combinaison radiométaux/fluorophore est la plus décrite dans la littérature. Les radiométaux présentent l'avantage d'un radiomarquage par complexation facile à mettre en œuvre, ne nécessitant pas de liaison covalente. Néanmoins, les édifices moléculaires construits avec les chélatants des radiométaux peuvent donner lieu à des transchélation et transmétallation *in vivo*. Une alternative prometteuse, très peu explorée à ce jour est la combinaison fluor-18/fluorophore. Le fluor-18, couramment utilisé en TEP, a l'avantage de former des liaisons covalentes conduisant à des outils de diagnostic plus stables.

Les peptides sont considérés comme une classe prometteuse de médicaments et de candidats radiopharmaceutiques. Ils sont connus pour leur haute sélectivité envers leur cible. Ils démontrent une distribution rapide, une bonne clairance et une faible immunogénécité (contrairement aux anti-corps) ainsi qu'une faible toxicité (contrairement aux nanoparticules métalliques). Par ailleurs, leur facilité de synthèse et leur tolérance chimique permet de réaliser des modifications chimiques, couplage avec une petite molécule par exemple, en accord avec leurs propriétés biologiques. La présence d'un fluorophore ou d'autres sondes chimiques modifie peu leurs propriétés pharmacologiques. A l'inverse, les modifications chimiques de petites molécules ainsi que de petits peptides (tri-, tétra-, pentapeptides) peuvent induire une modification des propriétés biologiques qu'il convient donc de réévaluer après l'étape de fonctionnalisation.

L'objectif de ces travaux de thèse est de réaliser la synthèse d'outils moléculaires radiomarqués au fluor-18 pour l'imagerie TEP dans un premier temps et pour l'imagerie bimodale TEP/FPIR dans un second temps (*Figure 1*). L'utilisation de dérivés de sucres en tant que plate-forme fonctionnalisable à façon et connus pour augmenter la biodistribution, semble tout à fait pertinente dans ce contexte. Plus précisément, l'utilisation de dérivés de type C-glycoside est particulièrement étudiée compte tenu de leur stabilité supérieure à celle des O-glycosides.

Ce manuscrit est articulé en trois chapitres : le premier chapitre présente l'état de l'art sur les différentes techniques d'imagerie moléculaire, notamment la TEP et FPIR, l'imagerie bimodale TEP/FPIR et le marquage des biomolécules, en particulier les peptides. Centré sur une application en imagerie TEP, le deuxième chapitre décrit la synthèse, la radiosynthèse, les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* ainsi que les études de dynamique moléculaire des groupes prosthétiques de type C-glycosides et glycopeptides correspondants. Après ce développement de groupements prosthétiques et radiotraceurs au fluor-18, nous nous sommes intéressés à l'élaboration des sondes duales utilisant à nouveau des unités de type C-glycoside. Ces sondes duales portent donc un fluor-18 et un fluorophore adapté à la FPIR. La conjugaison de cette sonde avec une biomolécule, conduit un agent d'imagerie bimodal leur synthèse est présentée dans le troisième chapitre.

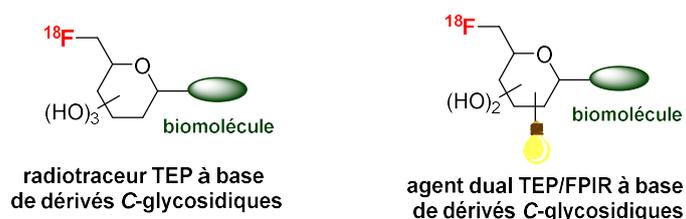


Figure 1 : Schéma des outils moléculaires pour l'imagerie TEP et l'imagerie bimodale TEP/FPIR

CHAPITRE 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I- Imagerie moléculaire

I.1- Généralités

A l'heure actuelle, la caractérisation *in vivo* de processus biologiques est réalisée notamment grâce à l'imagerie moléculaire. Ce domaine scientifique permet de réaliser de manière non-invasive et en temps réel la visualisation d'un processus physiologique ou pathologique d'un organisme vivant à l'échelle cellulaire ou moléculaire. L'imagerie moléculaire joue un rôle important dans le diagnostic de maladies ainsi que dans le développement et la découverte de nouveaux médicaments. Ce type d'imagerie requiert d'une part, des instruments de mesure ayant des hautes résolution et sensibilité et d'autre part, des agents d'imagerie propres à chaque technique d'imagerie. L'imagerie moléculaire comprend cinq principales techniques d'imagerie qui sont : l'imagerie numérisée par tomographie des rayons-X (ex : tomodensitométrie TDM), l'imagerie optique (ex : de fluorescence), l'imagerie par radionucléide (incluant l'imagerie par Tomographie par Emission de Positron (TEP) et l'imagerie par Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP)), l'imagerie par ultrason (US) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).^[4,5] Au cours de ces deux dernières décennies, les instruments de ces techniques d'imagerie ont connu d'importantes avancées technologiques. Grâce au développement de ces instruments, il est possible d'obtenir des images à haute résolution ce qui permet d'observer de très petites lésions ainsi que le suivi d'un processus biologique. En parallèle à ce développement, la préparation d'agents d'imagerie pouvant se lier de manière très spécifique et avec une très bonne affinité est en plein essor.

Dans le but de comprendre de manière concrète un phénomène biologique à l'aide de l'imagerie moléculaire, un ciblage moléculaire est nécessaire. En fonction de la technique d'imagerie moléculaire utilisée, le design de l'agent d'imagerie est adapté. Après une mise au point de la synthèse de l'agent d'imagerie, des tests en pré-clinique sur petit animal sont réalisés permettant d'obtenir des images par l'intermédiaire de traitement informatique. En fonction des résultats obtenus les tests pré-cliniques continuent et évoluent vers des tests cliniques.^[6] Les différentes techniques d'imagerie moléculaire sont expliquées de manière succincte dans le paragraphe suivant.

I.2- Les techniques d'imagerie moléculaire

I.2.1) Imagerie par rayons-X

L'imagerie par rayons-X fonctionne par l'intermédiaire d'un scanner qui mesure l'absorption de ces rayons par les tissus du corps humain en fonction de leur densité. Avec cette technique d'imagerie, il est possible d'obtenir des images en 2D (par radiographie) et en 3D (par TDM). Grâce à la différence de densité des tissus humains, un contraste apparaît et permet de visualiser des anomalies *in vivo*. Ce sont les os qui ont le plus fort contraste au sein de l'organisme. Pour améliorer le contraste entre les différentes zones du corps, il existe plusieurs agents de contrastes utilisés de manière courante en TDM.^[7] Cette technique d'imagerie est utilisée pour visualiser des anomalies structurales ou volumiques comme des tumeurs, des hémorragies, des infections ou pour suivre un traitement médical.^[8]

I.2.2) Imagerie par ultrasons

L'imagerie par ultrasons connue sous le nom d'échographie consiste à utiliser les ondes ultra-sonores pour créer un contraste entre les différents tissus. La diversité des tissus crée une réflexion des ondes-sonores différente en fonction de chaque tissu. Pour recevoir la réflexion des ondes sonores, il faut un transducteur qui transforme les ondes réfléchies en image. Cette technique d'imagerie permet la visualisation d'une grande partie du corps, comme l'abdomen, le cou et certains organes (foie, reins, vessie, rate, thyroïde). L'échographie permet aussi l'observation de tumeurs ou d'infection. Cependant, l'utilisation de l'imagerie par ultrasons est limitée pour les organes qui contiennent de l'air, qui est un mauvais conducteur d'ondes sonores.^[7,8] Pour améliorer le contraste entre les parties saines et les parties infectées, il existe des micro-bulles, d'environ 3 μm de diamètre, injectées par perfusion dans le sang. L'utilisation de ces micro-bulles reste cependant peu courante.^[9,10] Récemment des micro-bulles chargées avec des molécules ont été développées permettant un ciblage plus spécifique.^[11-13]

I.2.3) Imagerie optique

L'imagerie optique inclut une variété de techniques qui ont en commun l'utilisation de sources lumineuses et d'outils capables de capturer la distribution des photons résultants de ces sources. Ces techniques sont classées selon leurs types de sources et de détecteurs et du mécanisme de contraste employés. Les techniques d'imagerie optique couramment utilisées

sont la bioluminescence, la fluorescence et la fluorescence dans le proche Infra-Rouge. Ces différentes techniques utilisent la lumière à différentes longueurs d'onde pour permettre l'identification ou le suivi de pathologie.^[8] L'imagerie optique permet aussi de faire de l'histopathologie et de la chirurgie guidée.

1.2.4) Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie reposant sur la résonance magnétique nucléaire. Par l'intermédiaire d'un aimant supraconducteur, un champ magnétique fort et stable est produit autour du patient en observation. C'est grâce à ce champ magnétique que les protons contenus dans l'eau des tissus sont magnétisés. Ce champ aligne les spins parallèles et anti-parallèles. Un autre champ magnétique, plus faible, intervient pour décaler légèrement l'alignement des spins dans le but de faire apparaître un contraste entre ces différents spins. Les spins vont ensuite revenir à leur état fondamental en se relaxant. Cette relaxation produit un signal électromagnétique mesurable par les détecteurs permettant de construire des images. Les images obtenues par IRM peuvent être en deux ou trois dimensions. Des agents dits de contrastes existent dans le but de faire varier le temps de relaxation des molécules d'eau. Les plus fréquemment utilisés sont des complexes au gadolinium, le Gadovist[®], le Gd-DTPA et le Gd-BOPTA (Figure 2).

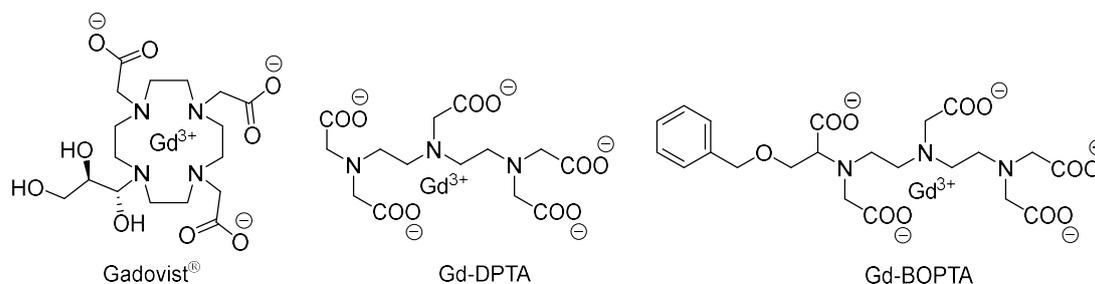


Figure 2 : Structures des complexes au gadolinium

Il existe aussi des nanoparticules d'oxyde de fer, les SPION (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) et les USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) qui sont des agents dits "négatifs", leur utilisation est moins courante que les complexes au gadolinium. L'IRM est utilisée pour visualiser des processus biologiques dans le cas, par exemple, de métabolisme tumoral, d'angiogénèse tumorale, etc.^[7,8]

I.2.5) Imagerie par radionucléide

L'imagerie par radionucléide consiste à utiliser un atome radioactif qui est lié de manière covalente ou non-covalente à une molécule spécifique ayant une cible biologique d'intérêt médical. Il existe plusieurs types de rayonnement radioactifs : alpha (α), bêta (β) et gamma (γ). Lors de la désintégration de ces radioéléments des rayonnements sont émis, ceux-ci sont captés par des détecteurs de radioactivité permettant d'obtenir par traitement des données des images montrant des processus biologiques. Les techniques d'imagerie par radionucléide les plus couramment utilisées sont l'imagerie par Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP) et l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP).

- Imagerie par Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP)

L'imagerie TEMP est basée sur la détection de radioéléments émetteurs de photons γ . Les radioéléments principalement utilisés sont l'iode-123 et le technétium-99m. Les images obtenues par cette technique sont en trois dimensions permettant de suivre la distribution des radiotraceurs *in vivo*. Ce type d'imagerie est principalement utilisé en oncologie, cardiologie et neurologie.^[7,8]

- Imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP)

L'imagerie TEP est une technique d'imagerie reposant sur des radionucléides émetteurs de positons (β^+). Avec cette technique, il est possible de suivre la distribution du radiotraceur *in vivo* et aussi de quantifier la radioactivité provenant du radiotraceur.^[7,8] L'imagerie TEP est principalement utilisée en oncologie mais aussi en cardiologie et en neurologie.^[14] Cette technique d'imagerie au cœur de ce travail de thèse et est décrite plus en détail ci-dessous.

II- Imagerie de Tomographie par Emission de Positron (TEP)

L'imagerie TEP offre la possibilité de suivre la distribution *in vivo* d'une molécule préalablement radiomarquée par un isotope émetteur de positons. Ces isotopes peuvent être séparés en deux catégories :

- Les radiométaux, ce sont des radioisotopes métalliques, par exemple : le cuivre-64 (^{64}Cu), le gallium-68 (^{68}Ga) et le zirconium (^{89}Zr), liés aux molécules par liaison de coordination.
- Les radioisotopes covalents, par exemple : le carbone (^{11}C) et le fluor-18 (^{18}F), liés par une liaison covalente.

L'imagerie TEP donne des informations sur le fonctionnement d'un organe et non sur son anatomie, elle est dite imagerie fonctionnelle (comme d'autres types d'imagerie vu précédemment). Pour combler les informations que l'imagerie TEP seule ne peut fournir, elle est souvent couplée à une autre technique d'imagerie, la TDM. Le couplage de ces deux modes d'imagerie permet donc d'étudier des processus biologiques de manière plus précise qu'avec une imagerie monomodale. Les données fournies par l'imagerie TEP ont une précision qui est dépendante du radioisotope utilisé mais aussi de la performance du tomographe, des détecteurs de photons et de la puissance des techniques de reconstruction de l'image.^[14,15] Les quantités de radiotraceur injectées sont très faibles, de l'ordre de quelques nanomoles, chez l'humain. Classiquement les doses injectées chez un patient sont de 370 MégaBecquerel (MBq), voire moins en fonction du phénomène à observer.^[14,16]

II.1- Principe de fonctionnement de l'imagerie TEP

Les radioisotopes utilisés en TEP émettent un positon β^+ parcourant une distance qui dépend de l'énergie cinétique qu'il a initialement. Ce parcours est appelé le libre parcours moyen faisant quelques millimètres au grand maximum. Plus ce parcours est court plus la résolution des images sera grande. Le positon ayant terminé son parcours et perdu son énergie (E_{max}), entre en collision avec un électron générant deux photons émis en coïncidence ayant chacun une énergie de 511 keV, c'est l'annihilation (*Figure 3*).^[17,18]

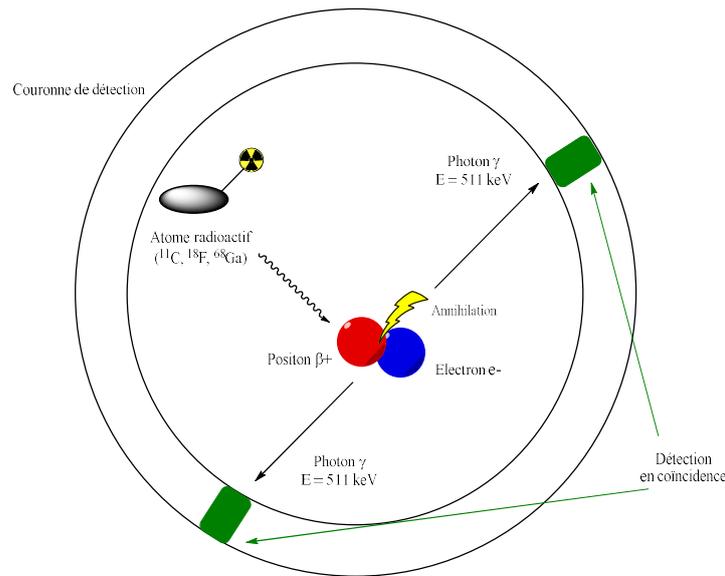


Figure 3 : Schéma du principe de fonctionnement de l'imagerie TEP

Ces photons émis en coïncidence sont détectés par une couronne de détection composée de plusieurs anneaux contenant chacun des blocs de détections constitués de plusieurs cristaux scintillants et de photomultiplicateurs. Les deux photons sont validés par le système de détection sous deux conditions : la première est qu'ils doivent avoir une énergie la plus proche de 511 keV, la seconde est qu'ils doivent être détectés dans un intervalle de temps très court, cet intervalle est appelé la fenêtre de coïncidence. Cette fenêtre de coïncidence a une durée comprise entre 10 et 20 nanosecondes, ce qui est très court et permet de différencier les autres photons émis par les autres annihilations présentes. Dans la fenêtre de coïncidence, les deux photons doivent parvenir en même temps aux deux détecteurs placés face à face pour que le système déduise qu'il s'agisse de deux photons issus de la même annihilation. Il est ainsi possible de remonter à l'origine d'annihilation et donc de visualiser le radiotracteur.

Les données obtenues par image après traitement montrent la distribution statistique de tous les points d'annihilation qui ont été observés. Chaque isotope émet des positons avec une énergie initiale propre à l'isotope utilisé, ce qui implique que la distance du libre parcours moyen du positon est différente pour chaque isotope. La relation liant l'énergie du positon et sa distance de libre parcours moyen est la suivante : plus l'énergie sera faible, plus la distance sera courte. Cette relation implique donc que la résolution de l'image sera meilleure pour des isotopes émettant des positons de faibles énergies, comme c'est le cas avec le fluor-18 (*Tableau 1*). La résolution de l'image est aussi impactée par la non-colinéarité des deux photons émis qui est d'environ 0.2° provenant d'un reste d'énergie cinétique d'un positon après son annihilation.

Cela explique donc que la résolution des caméras utilisées pour l'imagerie TEP soit de l'ordre de quelques millimètres.^[14,17,18]

II.2- Les différents radioisotopes utilisés en imagerie TEP

Les principaux isotopes émetteurs de positons utilisés en imagerie TEP sont le fluor-18 (¹⁸F), le carbone-11 (¹¹C), le gallium-68 (⁶⁸Ga), le cuivre-64 (⁶⁴Cu) et le zirconium-89 (⁸⁹Zr). Dans cette partie seront décrites les propriétés des radiosotopes ainsi que leur production.

II.2.1) Caractéristiques des différents isotopes

Les différentes caractéristiques des radioisotopes cités précédemment sont résumées dans le Tableau 1.^[19]

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des isotopes émetteurs de positons

Radioélément	Demi-vie	E _{max} (keV)	Activité molaire théorique (GBq.μmol ⁻¹)	Libre parcours maximal dans l'eau (mm)	Mode de décroissance (%)
¹¹ C	20.4 min	981	3.41.10 ⁵	4.1	β ⁺ (99.8)
¹⁸ F	109.8 min	635	6.33.10 ⁴	2.4	β ⁺ (96.9) CE (3.1)
⁶⁴ Cu	12.7 h	653	9.13.10 ³	1.4	β ⁺ (17.6) β ⁻ (38.5) CE (43.9)
⁶⁸ Ga	1.13 h	1899	1.02.10 ⁵	8.2	β ⁺ (89) CE (11)
⁸⁹ Zr	3.2 j	901	/	3.8	β ⁺ (22.4) CE (76.6)

*CE = capture électronique

Comme décrit dans le *Tableau 1*, les radioisotopes ont des caractéristiques qui leurs sont propres. Ces caractéristiques se définissent de la manière suivante :

- La demi-vie : c'est la période au bout de laquelle l'activité de l'isotope est divisée par deux. Cette donnée est obtenue grâce à la constante de désintégration λ , chaque isotope a une constante λ qui lui est propre.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

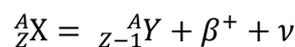
- L'énergie maximale : c'est l'énergie permettant au radioisotope de se déplacer avant son annihilation. Cette énergie a un impact sur la résolution spatiale et sur le libre parcours moyen du radioisotope.

- L'activité molaire théorique : cette activité se réfère à la quantité de radioactivité par unité molaire. Cette activité est calculée en fonction de la demi-vie des radionucléides :

$$AM(Bq/mol) = \frac{\ln(2) * N_A}{t_{1/2}}$$

N_A représente la constante d'Avogadro pour obtenir une activité molaire théorique en $Bq \cdot mol^{-1}$ et le temps de demi-vie est exprimé en secondes. Le maximum de l'activité molaire théorique est atteint lorsque que le radionucléide est pur.

- Le libre parcours moyen : c'est la distance parcourue par le radioélément avant d'être annihilé. Cette distance est fonction de l'énergie cinétique initiale (E_{max}) du radionucléide, plus elle est grande plus la distance parcourue sera grande.
- Le mode de désintégration : cette caractéristique décrit le devenir d'un radionucléide lors d'une réaction d'annihilation.



Cette équation ci-dessus montre que le radionucléide se désintègre en émettant un positon β^+ et un neutrino ν . Le noyau Y obtenu lors de la désintégration est appelé noyau fils, il est stable pour certains radionucléides comme le carbone-11, le fluor-18, le gallium-68 ou encore le zirconium-89.

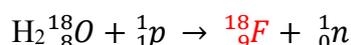
II.2.2) Production des radioisotopes

Tous les radioisotopes énoncés dans le Tableau 1 sont produits par un cyclotron, excepté le gallium-68 généralement produit par un générateur.



Figure 4 : Cyclotron

Le cyclotron (*Figure 4*) permet d'accélérer des particules chargées à l'aide d'un champ magnétique et d'un champ électrique. La trajectoire suivie par ces particules est une spirale, qui part du centre du cyclotron pour aller à son extrémité, avec une vitesse croissante. Les particules sont accélérées à des énergies allant de quelques MeV à 70 MeV, pour former au final un faisceau de particules. Ces particules peuvent être des protons, des deutons ou des noyaux d'hélium. Dans le cas général, une cible est bombardée par ce faisceau de particules qui génère le radioélément désiré et une particule issue de la transmutation nucléaire. Le fluor-18 est obtenu par bombardement de protons sur des noyaux d'oxygène-18 (*Equation 1*) sur une cible d'eau enrichie en oxygène-18.



Equation 1 : Réaction nucléaire permettant la production de fluor-18

II.2.3) Les radionucléides donnant lieu à des liaisons covalentes

Les principaux radionucléides dits "covalents" utilisés en imagerie TEP sont le carbone-11, l'azote-13, l'oxygène-15 et le fluor-18. L'azote-13 et l'oxygène-15 ayant respectivement des demi-vies de 9.96 minutes et 2.07 minutes sont peu utilisés. Le carbone-11 et le fluor-18 ont des demi-vies plus longues, respectivement 20.4 minutes et 109.8 minutes, leur utilisation est donc plus courante. Pour synthétiser une molécule radiomarquée (radiotraceur), le radionucléide est introduit sur une molécule appelée précurseur de marquage, fonctionnalisée de façon à permettre une bonne incorporation du radionucléide. L'introduction du radioisotope doit être idéalement réalisée en dernière étape, compte-tenu de la demie-vie courte des isotopes. Cependant ce n'est pas toujours possible car il y a souvent une étape de déprotection par exemple à réaliser. Pour s'assurer de l'obtention du produit radiomarqué, il est nécessaire d'avoir préalablement synthétisé une référence non-radioactive, molécule identique à la molécule radiomarquée mais comportant l'isotope stable. La durée d'une radiosynthèse doit être courte à cause de la décroissance des radioisotopes. La radiosynthèse doit être réalisée afin d'obtenir le meilleur rendement radiochimique (rendement basé sur la quantité d'activité introduite et non sur la quantité chimique). Ce rendement se calcule corrigé de la décroissance, c'est à dire, tenant compte de la décroissance du radioisotope utilisé.

Le carbone est un atome présent dans chaque molécule organique, le radiomarquage au carbone-11 ne dénature donc pas la molécule radiomarquée. Le carbone-11 est généralement incorporé par N, O et S méthylation comme par exemple pour la [^{11}C]méthionine (*Figure 5*)

utilisée pour imager des tumeurs cérébrales et thyroïdiennes.^[20] Le carbone-11 a néanmoins une demi-vie assez courte, 20.4 minutes, ce qui peut restreindre son utilisation.^[14,16]

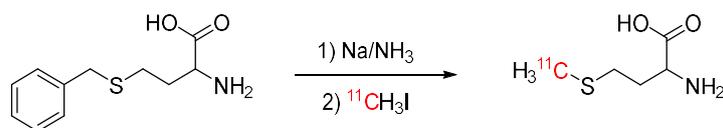


Figure 5 : [¹¹C]méthionine

Le fluor-18 est le radioisotope le plus utilisé en imagerie TEP. En effet, le fluor-18 a une demi-vie intéressante (109.8 minutes), une énergie maximale de 635 keV donnant une très bonne résolution spatiale^[14,16] et est produit par de nombreux cyclotrons. Cependant, le fluor est un élément assez peu présent dans les molécules d'intérêt biologique. Le fluor étant bioisostère de l'atome d'hydrogène et du groupement hydroxyle, il est généralement introduit en remplacement de ceux-ci. La présence d'un atome de fluor peut même améliorer les propriétés pharmacocinétiques d'une molécule.^[21] Cet isotope est utilisé par exemple dans la radiosynthèse du 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) *Figure 6*) servant à visualiser des cellules cancéreuses.^[22] Le précurseur de marquage portant un triflate en position 2 permet l'incorporation du ¹⁸F par substitution nucléophile et après déprotections des hydroxyles, le [¹⁸F]FDG est obtenu.

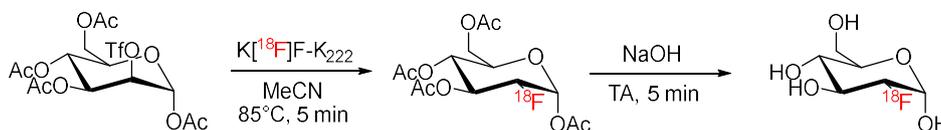


Figure6 : Radiosynthèse du [¹⁸F]FDG

II.2.4) Les radionucléides coordinants

Les radiométaux sont des radionucléides dits "coordinants", les plus utilisés sont le gallium-68, le cuivre-64 et le zirconium-89. Les radiométaux étant incorporés de manière non covalente, les radiosynthèses sont ainsi très aisées à mettre en œuvre. Ces radioisotopes sont généralement utilisés pour le radiomarquage de biomolécules (protéines, peptides, anticorps...). En effet, les biomolécules sont résistantes aux conditions de marquage douces des radiométaux. Afin de complexer les radiométaux, il faut fonctionnaliser la biomolécule avec un groupement chélateur. Plusieurs chélatants sont couramment utilisés : DOTA, NODAGA, NOTA... L'ajout d'un groupement chélateur sur la biomolécule peut modifier les propriétés pharmacocinétiques de celle-ci. De plus, le relargage partiel du radiométal dans le corps est parfois observé si la

complexation n'est pas optimale.^[23] Un des exemples le plus utilisé est l'octréotide (peptide) portant un chélatant de type DOTA radiomarké au gallium-68 ([⁶⁸Ga]DOTA-TOC) (Figure 7) ayant pour application l'imagerie des tumeurs endocrines digestives.^[24-26]

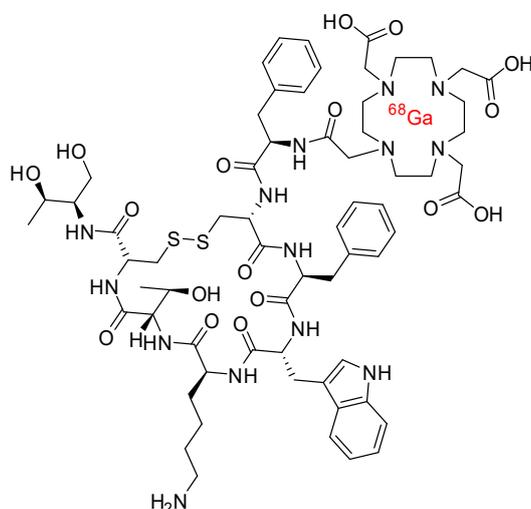


Figure 7 : [⁶⁸Ga]DOTA-TOC

II.3- Radiotraceurs pour l'imagerie TEP

De nombreux radiotraceurs sont utilisés en imagerie TEP, ceux comportant un fluor-18 sont les plus utilisés et seront traités dans cette partie. Dans le cadre d'applications pré-cliniques, plusieurs centaines de radiotraceurs sont actuellement en développement. Concernant les applications cliniques, beaucoup sont utilisés en tant que médicaments expérimentaux mais seulement très peu ont une autorisation de mise sur le marché (AMM) leur permettant d'être commercialisés. Les cinq radiotraceurs ayant une AMM à ce jour sont : le 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG), la [¹⁸F]fluoro-dopamine ([¹⁸F]F-DOPA), le [¹⁸F]fluorure de sodium ([¹⁸F]FNa), la [¹⁸F]fluoro-choline ([¹⁸F]F-Choline) et le [¹⁸F]Florbetapir (AMYVID®) présentés Figure 8. Le plus connu est le [¹⁸F]FDG.^[15,16,27] Ce radiotraceur permet le diagnostic de cancer car les cellules cancéreuses consomment énormément de glucose. Ce radiotraceur (Figure 6, page X) est issu des travaux de Warburg^[28] concernant un désoxyglucose marqué au carbone-14 pour suivre la molécule. Ils ont montré l'importance du groupement hydroxyle en position 2 sur le glucose. L'absence de ce groupement a montré que cette molécule n'était plus reconnue en tant que glucose par les enzymes consommatrices de glucose, évitant donc sa métabolisation. Les travaux de Sokoloff^[29] ont montré que le [¹⁸F]FDG pénétrait les cellules cancéreuses comme du glucose grâce aux transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3. La reconnaissance du [¹⁸F]FDG comme sucre et l'absence de sa métabolisation permet ainsi de

diagnostiquer les tumeurs. Le [^{18}F]FDG a très vite montré un fort potentiel pour le diagnostic de cancers, c'est pourquoi il est le radiotracteur le plus utilisé en imagerie TEP, il a obtenu son AMM en 1998. Le [^{18}F]FDG n'est cependant pas sélectif du fait de sa forte ressemblance au glucose, étant distribué comme celui-ci. La 6- ^{18}F fluoro-L-DOPA, appelée [^{18}F]F-DOPA, est un radiotracteur également très utilisé en imagerie TEP car sa structure est celle d'un précurseur de la dopamine. La [^{18}F]FDOPA est utilisée pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer et de différents cancers.^[30] Le [^{18}F]FNa est utilisé pour la scintigraphie osseuse. Ce radiotracteur permet de faire l'imagerie du squelette.^[31] La [^{18}F]F-Choline est utilisée dans l'imagerie des tumeurs hépatiques et du cancer de la prostate. Elle permet le suivi du cancer de la prostate sous ses différentes formes.^[31] Le Florbetapir est le radiotracteur ayant la masse moléculaire la plus importante parmi les radiotraceurs possédant une AMM. Il est commercialisé sous le nom d'AMYVID[®] et est utilisé pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.^[32]

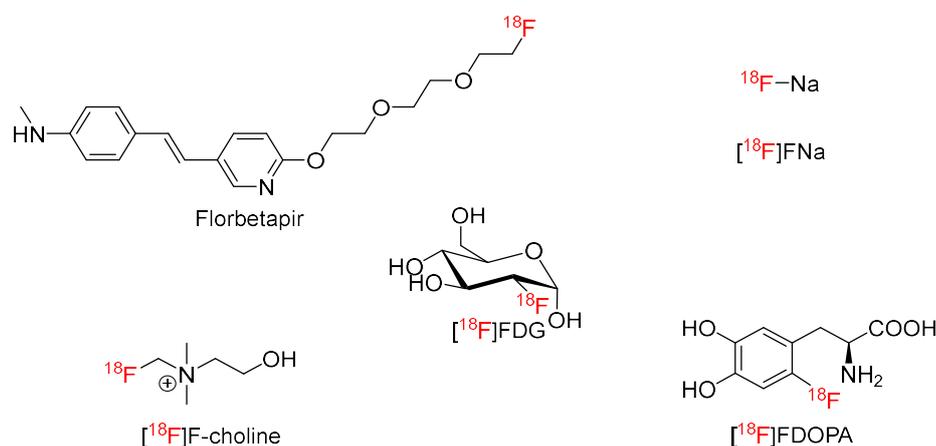


Figure 8 : Radiotraceurs possédant une AMM pour des applications en imagerie TEP

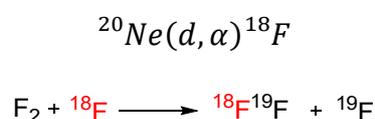
Les cinq radiotraceurs décrits précédemment sont de "petites molécules". La radiosynthèse de petites molécules de ce type comporte généralement la radiofluoration puis une étape de déprotection suivie d'une purification. A ce jour, les macromolécules (peptides, protéines, oligonucléotides, anticorps ...) sont aussi très intéressantes, le développement de stratégie pour les radiomarquer est un enjeu majeur actuel.

II.4- Méthodes de [¹⁸F]fluoration

Il existe deux méthodes de fluoration : la fluoration électrophile et la fluoration nucléophile qui est la plus courante.

II.4.1) [¹⁸F]Fluoration électrophile

Le marquage par voie électrophile se fait par introduction du fluor sous la forme [¹⁸F]F₂. La production de fluor moléculaire [¹⁸F]F₂ se fait de deux manières différentes. La méthode la plus courante consiste à irradier une cible de néon-20 par des deutons puis ensuite du ¹⁹F₂ gazeux est ajouté pour former le [¹⁸F]F₂ moléculaire (Equation 2).^[16] Les activités molaires obtenues avec cette méthode sont inférieures ou égales à 0.40 GBq/μmol.



Equation 2 : Formation du fluor-18 moléculaire

Cette méthode engendre une faible activité molaire due à la présence de fluor-19. Une autre méthode existe donnant une activité molaire plus élevée malgré la présence de fluor-19. Cette méthode se déroule en plusieurs étapes : la première étape est une substitution nucléophile de CH₃I par des ions fluorures [¹⁸F]F⁻ pour former du [¹⁸F]FCH₃, la seconde étape consiste à transmettre une charge électrique (~ 35 keV) sur le [¹⁸F]FCH₃ en présence de ¹⁹F₂ pour former [¹⁸F]F₂ par échange isotopique entre le ¹⁸F et ¹⁹F. Cette méthode permet d'obtenir une activité molaire allant jusqu'à 55 GBq/μmol.^[33,34]

Le [¹⁸F]F₂ peut être introduit par addition, substitution électrophile aromatique et échange halogène-métal. Les réactions par échange halogène-métal sont régiosélectives contrairement aux additions et aux substitutions électrophiles aromatiques.^[35] Pour remédier à ce problème de régiosélectivité, d'autres composés ont vu le jour en tant qu'agent de fluoration électrophile, ils peuvent être inorganiques comme [¹⁸F]XeF₂,^[16] des sels de [¹⁸F]fluoropyridinium,^[36] [¹⁸F]AcOF,^[37] [¹⁸F]FCIO₃^[38] et d'autres illustrés sur la Figure 9.^[16,33,35-38]

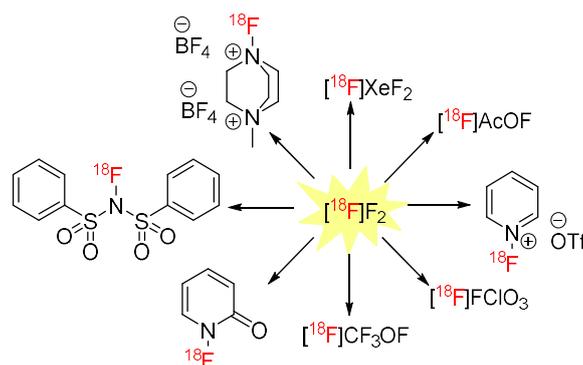


Figure 9 : Différents agents de ^{18}F -fluoration électrophile

L'exemple le plus connu de fluoration électrophile régiosélective par échange halogène-métal est celui de la ^{18}F FDOPA qui est un traceur très utilisé^[38] (Figure 10). Le ^{18}F F₂ est introduit sur le précurseur de marquage stannylé suit à un échange halogène-métal en 45 minutes avec un rendement de 26%. La molécule est ensuite déprotégée par action de HBr à 130°C pendant 5 minutes. La ^{18}F FDOPA est obtenue avec un rendement corrigé de la décroissance de $12.1 \pm 3.7\%$. Cet exemple illustre l'utilisation d'un précurseur de marquage pour introduire le ^{18}F sur une molécule.



Figure 10 : Synthèse de la ^{18}F FDOPA

Ce type de marquage reste peu fréquent du fait des inconvénients comme la faible activité molaire et le manque de régiosélectivité (excepté via la réaction par échange-halogène-métal). La fluoration électrophile n'est pas la seule méthode d'incorporation du fluor-18, il existe aussi la fluoration nucléophile qui à ce jour est une meilleure technique de radiofluoration.

II.4.2) ^{18}F Fluoration nucléophile

La fluoration nucléophile est réalisée avec des anions fluorures $^{18}\text{F}^-$ produits par un cyclotron par bombardement de protons sur des noyaux d'oxygène-18 de l'eau enrichie H_2^{18}O (Equation 2 II.4.1). Les anions fluorures $^{18}\text{F}^-$ sont obtenus dans une solution aqueuse ce qui solvate les ions, entraînant une diminution du caractère nucléophile de ces ions. Pour augmenter le caractère nucléophile des ions fluorures et envisager une substitution nucléophile, il faut préalablement retirer l'eau du milieu. La technique la plus courante est d'utiliser une cartouche contenant une résine échangeuse d'anions (cartouche QMA), les fluorures sont piégés par cette

résine, puis ils sont ensuite élués par une solution acétonitrile/eau contenant du K_2CO_3 , permettant de libérer les fluorures-18 par échange d'anion avec les carbonates. Un cryptand tel que le Kryptofix-222 (K_{222}) est ajouté à la solution (Figure 11).^[39] La solution éluée est ensuite évaporée pour former le complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ et permettre l'incorporation du $^{18}F^-$ sur la molécule via une substitution nucléophile.



Figure 11 : Structure du cryptand Kryptofix K_{222}

Le K_{222} est le complexant le plus utilisé pour les radiomarquages en fluoration nucléophile. Il permet d'exalter la nucléophilie du fluorure lors de la SN. Les ^{18}F -radiofluorations se font dans des solvants comme le DMF, le DMSO ou encore l'acétonitrile car ils sont aprotiques et peu polaires ce qui est nécessaire au bon déroulement du marquage. La fluoration nucléophile peut être réalisée par substitution nucléophile en série aliphatique et par substitution nucléophile en série aromatique et hétéroaromatique.

II.4.2.1) Substitution nucléophile en série aliphatique

La substitution nucléophile aliphatique est une réaction de type SN_2 . Le précurseur de marquage, c'est-à-dire la molécule qui va être radiomarquée, doit porter un bon groupe partant (GP) pour permettre la SN.

Par exemple, le $[^{18}F]LBT-999$, le (*E*)-*N*-(4-fluorobut-2-ényl)-2 β -carbométhoxy-3 β -(4'totyl)nortropane, actuellement en phase 3 pour une utilisation en clinique, a comme précurseur de marquage un dérivé chloré, le Cl-LBT-999. Ce radiotraceur tient son origine du PE2I,^[40-42] (*N*-(3-iodopro-2*E*-ényl)-2 β -carbométhoxy-3 β -(4'-méthylphényl) nortropane) qui est un dérivé de la cocaïne non fluoré. Le $[^{18}F]LBT-999$ est utilisé pour imager le transporteur membranaire de la dopamine (DAT). Le DAT est impliqué dans la régulation de la dopamine, neurotransmetteur impliqué dans de nombreux troubles cérébraux et phénomènes physiologiques.^[43]

Le $[^{18}F]LBT-999$ est synthétisé en mettant en solution le Cl-LBT-999 dans le DMSO en présence du complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ en chauffant à 165°C pendant 10 min (Figure 12). Le $[^{18}F]LBT-999$ est obtenu en une étape après purification avec une pureté chimique et

radiochimique supérieure à 95% et un rendement isolé non-corrigé de la décroissance de 37%.^[41,44,45]

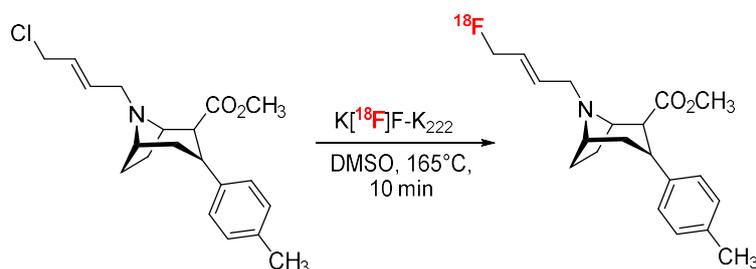


Figure 12 : radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{LBT-999}$

II.4.2.2) Substitution nucléophile en série aromatique et hétéroatomatique

Les marquages par substitution nucléophile aromatique se font avec des anions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ comme en série aliphatique. Le noyau aromatique doit être fonctionnalisé par un bon groupe partant et par un groupement électro-attracteur (EA) pour que les ions fluorures puissent réagir de manière régiosélective. Le positionnement du groupement électro-attracteur doit être en ortho- ou en para- du groupe partant pour que l'effet induit soit favorable. La présence du groupement électro-attracteur permet de stabiliser l'état de transition, appelé complexe de Meisenheimer, avant le départ du groupe partant. Le choix du groupe partant influence beaucoup les conditions de fluoration, les groupements les plus utilisés sont un groupe nitro, un triméthylammonium et les halogénures. Le fluor est peu préconisé pour éviter tout problème de dilution isotopique engendrant une chute de l'activité molaire. Les sels de triméthylammonium sont décrits comme les plus réactifs et sont ceux qui sont le plus utilisés.^[46]

Il existe plusieurs groupements électro-attracteurs employés dans ce type de réaction : nitro, cyano, trifluorométhyle, éthers et carbonyles.^[47-49] Ces groupements sont utilisés pour la synthèse de nombreuses sondes radioactives comme, par exemple, le $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ (Figure 13).^[50] Dans ce cas, le groupe partant est un sel de triméthylammonium et le groupe électro-attracteur est un ester éthylique. En présence de $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}-\text{K}_{222}$ dans le DMSO à 120°C pendant 15 minutes, l'introduction du fluor-18 par S_N est régiosélective avec un rendement de $77 \pm 5\%$. L'ester est ensuite saponifié en présence de NaOH (aq) à 90°C pendant 8 minutes avec un rendement quantitatif. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé avec HCl (aq). L'acide est ensuite activé par une N,N -hydroxylsuccinimide introduite par activation avec le N,N,N',N' -tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TSTU) en deux minutes à 90°C . Le $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ est obtenu avec un rendement corrigé de la décroissance de $46 \pm 5\%$.

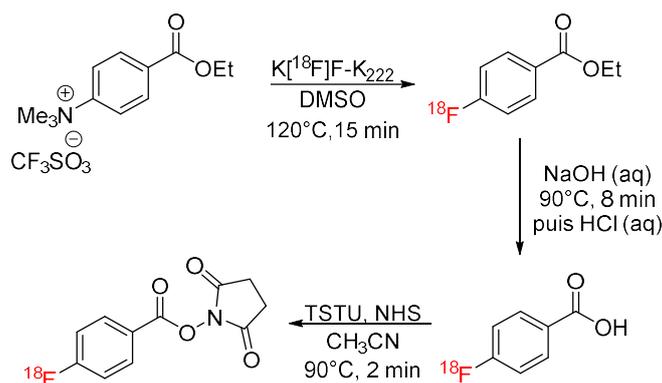


Figure 13 : Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ ^[37,50]

Les conditions de marquage en série aromatique nécessitent des températures élevées. Afin de mettre en œuvre ce type de marquage en conditions plus douces, de nouvelles méthodes de radiofluoration ont été développées avec des précurseurs de type organoboranes et iodoniums ^[17,51].

Les composés hétéroaromatiques sont aussi largement utilisés, les motifs pyridiniques étant les plus courants. ^[52-54] Un exemple est illustré Figure 14 avec la radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FPyMe}$ sonde radioactive utilisée en imagerie TEP. ^[37,55] Le groupe partant est un sel de triméthylammonium, le groupe électro-attracteur est un éther portant une amine protégée par un Boc pour l'introduction ultérieure d'un groupe maléimide. Le radiomarquage est réalisé dans le DMSO en présence de $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$ à 145°C pendant 2 minutes avec un rendement compris entre 64 et 76%. Ensuite, l'amine est déprotégée rapidement en présence de TFA. Le maléimide est introduit à température ambiante en 10 minutes dans une solution de dioxane saturée en NaHCO_3 . Le $[^{18}\text{F}]\text{FPyMe}$ est obtenu avec un rendement corrigé de la décroissance compris entre 28 et 37%.



Figure 14 : Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FPyMe}$ ^[55]

Compte tenu des performances du radioisotope ^{18}F pour la TEP, les outils radiomarqués au ^{18}F sont à l'heure actuelle l'objet de nombreuses recherches en chimie, radiochimie et application médicale.

III- Imagerie par Fluorescence Proche Infra-Rouge (FPIR)

III.1- Principe de la FPIR

L'imagerie par FPIR est une technique d'imagerie nécessitant l'usage d'un fluorophore. Le principe de la fluorescence est décrit au travers du diagramme de Jablonski (*Figure 15*). A partir d'un état singulet stationnaire d'une molécule (S_0), un photon avec une énergie donnée est absorbé. L'énergie de ce photon conduit un électron vers un état excité de la molécule (S_1 ou S_2). En fonction de l'énergie du photon, l'électron est transféré sur un état excité de plus ou moins haute énergie, S_1 ou S_2 . Deux phénomènes peuvent se produire : la conversion interne et le croisement inter-système.

La conversion interne correspond à une relaxation rapide, de l'ordre de la picoseconde à la milli-seconde, du niveau le plus élevé de l'état excité vers le niveau le plus bas de l'état excité de même multiplicité, *i.e.* singulet ou triplet.

Le croisement inter-système est une relaxation plus lente que la conversion interne, de l'ordre de la micro-seconde à quelques heures, vers un état d'une autre multiplicité différente, *i.e.* singulet vers triplet par exemple.

Le retour de l'électron de l'état excité S_1 ou S_2 vers l'état fondamental S_0 émet un photon, ce phénomène est appelé la fluorescence. Le retour de l'électron de l'état triplet T_1 vers l'état fondamental S_0 est appelé la phosphorescence.^[56]

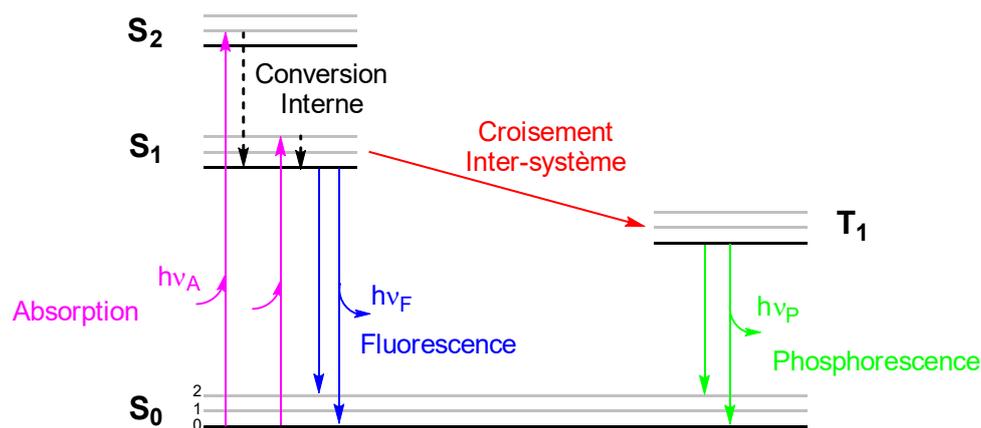


Figure 15 : Diagramme de Jablonski

Pour observer la fluorescence, de manière classique, il est nécessaire d'avoir les outils adéquats : le fluoromètre (*Figure 16*).^[56] Une source lumineuse émet de la lumière au travers d'un monochromateur d'excitation et d'un polariseur avant d'atteindre l'échantillon.

L'échantillon est excité, il émet une onde qui passe au travers d'un polariseur puis d'un monochromateur d'émission avant d'atteindre le détecteur. Les données collectées par le détecteur sont ensuite analysées pour donner les spectres d'excitation et d'émission.

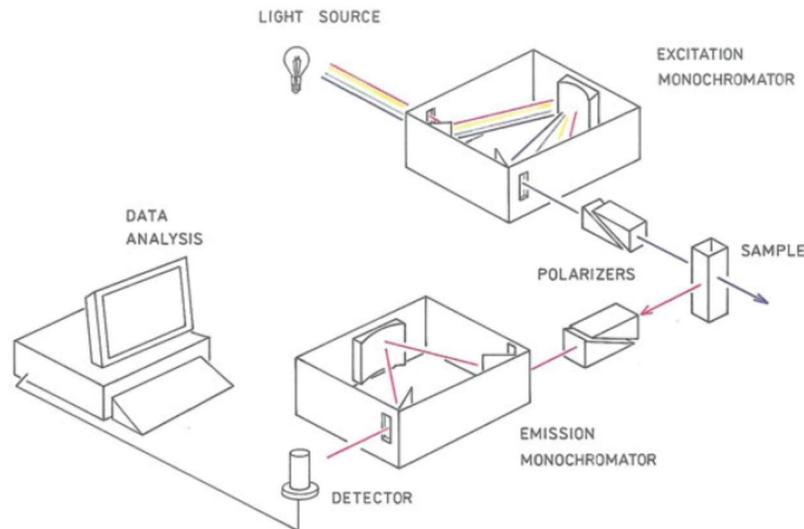


Figure 16 : Schéma de fonctionnement d'un fluoromètre^[56]

Le principe du fluoromètre est adapté aux outils d'imagerie pour faire du diagnostic mais aussi de la chirurgie guidée. L'instrumentation pour imager la fluorescence doit être compatible au maximum avec l'acte chirurgical. Dans ce but, des microscopes à fluorescence sont adaptés pour assurer la chirurgie dans les meilleures conditions. Ces microscopes sont équipés d'un laser pour exciter les molécules fluorescentes, d'une lumière LED filtrée et d'une lentille filtrante pour observer uniquement l'excitation de la fluorescence et d'une caméra Charge Coupled Device (CCD) pour collecter les données. Lors de l'opération chirurgicale, le chirurgien voit la tumeur fluorescente qu'il doit retirer, son geste est donc plus précis. Plus récemment, des systèmes endoscopiques plus performant sont développés pour la chirurgie des tumeurs au foie.^[57]

III.2- Cahier des charges pour des applications *in vivo*

Tous les fluorophores ne peuvent pas être utilisés pour l'imagerie FPIR. Certaines caractéristiques sont nécessaires pour faire des applications *in vivo*. Parmi toutes ces caractéristiques, certaines sont des caractéristiques générales nécessaires à toute sonde utilisée pour une application *in vivo* et d'autres sont spécifiques à la FPIR :^[3,58]

- La solubilité, la clairance et la toxicité

Pour être utilisable en imagerie optique, une sonde fluorescente doit avoir une solubilité adéquate à des applications *in vivo*, avoir une bonne clairance et une toxicité très faible. Ceci est valable pour toute sonde utilisée en imagerie moléculaire.

- La longueur d'onde

La longueur d'onde d'émission de sondes fluorescentes doit, en général, être comprise entre 700 et 900 nm, c'est la fenêtre biologique. En effet, en dessous de cet intervalle, c'est le domaine du visible dans lequel beaucoup de tissus émettent de la fluorescence. Au-dessus de cet intervalle, après 900 nm, l'eau absorbe très fortement ce qui diminue grandement l'efficacité de transmission de la lumière. L'utilisation de fluorophore ayant une longueur d'onde d'émission comprise entre 650 et 700 nm est tout de même compatible avec une utilisation *in vivo*.

- Le rendement quantique

Le rendement quantique en fluorescence exprime l'efficacité du processus de fluorescence du fluorophore. Il est défini par le ratio du nombre de photons émis sur le nombre de photons reçus.

$$QY = \frac{\text{nb photons émis}}{\text{nb photons reçus}}$$

Un rendement quantique de 1.0 signifie que 100% des photons émis ont été reçus. Une molécule est considérée comme fluorescente lorsque son rendement quantique est compris entre 0.1 et 1.0. L'idéal est d'avoir un rendement quantique de 1.0, cependant cette valeur n'est jamais atteinte. Par exemple l'ICG (IndoCyanine Green) qui est un fluorophore très utilisé, a un rendement quantique de 0.13, les cyanines 5.5 et 7 ont respectivement des rendements quantiques de 0.25 et 0.27.^[3] Les rhodamines peuvent atteindre un rendement quantique de 0.95.^[59]

- Le photoblanchiment (photobleaching)

Le photoblanchiment est la destruction irréversible de la sonde fluorescente lorsque le fluorophore est dans l'état excité. Ce terme désigne une diminution de l'intensité du rayonnement de fluorescence sous l'effet de collision entre les particules fluorescentes et les espèces présentes dans le milieu de mesure.

- Le ratio signal sur bruit

Ce ratio est le rapport entre le signal émis par la sonde fluorescente et les signaux fluorescents autres que ceux de la sonde fluorescente. Les quatre critères mentionnés

précédemment : longueur d'onde, rendement quantique, solubilité et photoblanchiment, influencent tous le ratio signal sur bruit.

Beaucoup de sondes fluorescentes remplissent ces critères ce qui offre un large choix d'outils pour l'imagerie optique par FPIR.

III.3- Les différents types de fluorophores

Actuellement trois familles de sondes fluorescentes sont à retenir : les xanthènes, les BODIPY et les cyanines. Ce sont des molécules issues de ces trois familles qui sont généralement utilisées en imagerie optique par FPIR.

III.3.1) Les xanthènes

Les xanthènes sont des composés organiques tricycliques constitués d'un cycle pyrane entourés de deux cycles benzéniques. En fonction des substituants des cycles, la longueur d'onde d'émission varie. Parmi les xanthènes, il existe plusieurs types de sondes fluorescentes, qui sont majoritairement utilisées en fluorescence dans le domaine du visible ainsi que dans le proche IR :

- Les xanthènes émettant dans le domaine du visible

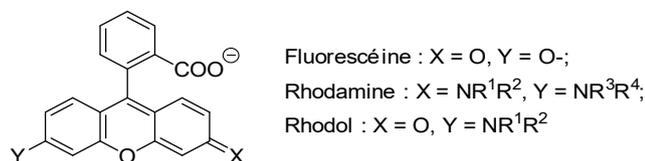


Figure 17 : Structure générale des xanthènes émettant dans le visible

La fluorescéine (*Figure 17*) est une sonde fluorescente très connue, elle est beaucoup utilisée en imagerie optique par fluorescence. Cependant elle n'émet pas dans le PIR, elle est utilisée en angiographie du fond de l'œil.^[60-64]

La rhodamine est une plateforme fluorescente, les plus connues sont la rhodamine B, la rhodamine 6G, la rhodamine 123^[65-67] (*Figure 18*). Elles ont des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission supérieures à celles de la fluorescéine (allant jusqu'à 580 nm) mais elles restent toujours dans le domaine du visible, excepté pour les dérivés silylés et les sulfonates (*Figure 18*) qui émettent dans le proche IR.^[59,61,68-70] Les sulfonates ont été ajoutés aux rhodamines dans le but d'augmenter leur solubilité en vue d'applications *in vivo*.^[59,68] Les rhodamines

silylées sont utilisées pour des applications *in vivo* car elles présentent très peu de photobleaching.^[65]

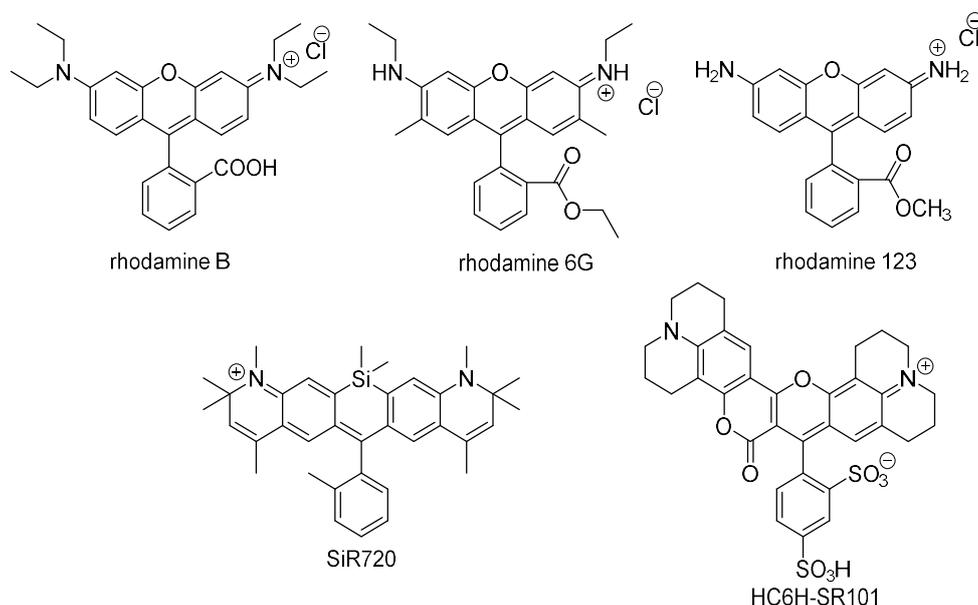


Figure 18 : Structures des rhodamines B, 6G, 123, SiR720 et HC6H-SR101

Le rhodol est lui aussi, comme la rhodamine, une plateforme fluorescente pouvant être fonctionnalisée pour avoir une plus large gamme de longueurs d'ondes d'émission et d'excitation dans le domaine du visible (jusqu'à 700 nm). Ces longueurs d'ondes sont plus élevées que la plupart des dérivés de rhodamine.^[61,71-73] Ces sondes fluorescentes dont la longueur d'onde d'émission est compatible avec la fenêtre biologique sont utilisées *in vivo*.

- Les xanthènes émettant dans le proche IR

Le rosol est un dérivé de la famille des xanthènes émettant dans le domaine du proche IR (entre 700 et 800 nm). Il est utilisé *in vivo* en imagerie FPIR. Hettie *et al.* ont notamment développé un dérivé de type rosol, le THQ-Rosol (Figure 19). Ce fluorophore est utilisé pour cartographier les systèmes lymphatiques dans le but de visualiser totalement les ganglions lymphatiques.^[61]

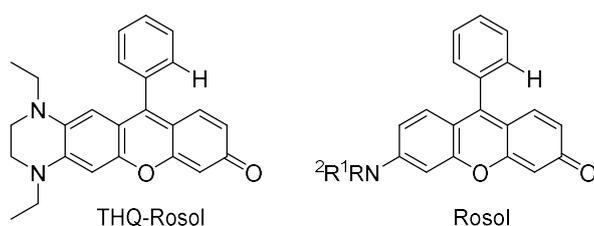


Figure 19 : Structure du THQ-Rosol

III.3.2) Les BODIPY

Le BODIPY (squelette bore-dipyrrrométhène) (*Figure 20*) est un fluorophore utilisé pour l'imagerie optique par fluorescence majoritairement dans le domaine du visible et dans une moindre mesure en proche IR.^[74] Les BODIPY dérivent tous du squelette 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène par substitution en diverses positions.

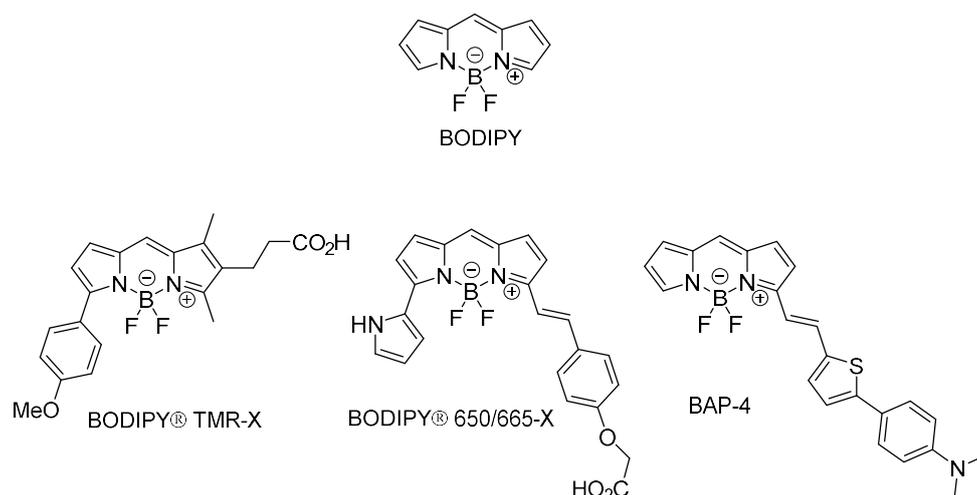


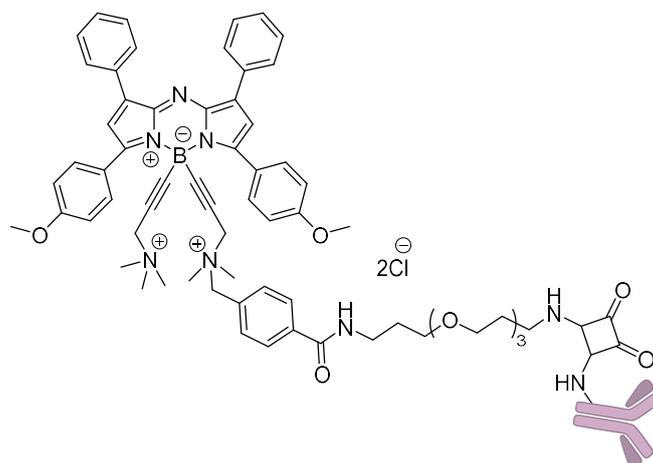
Figure 20 : Structures du BODIPY et d'exemples de dérivés du BODIPY

Il existe de nombreux BODIPY différents (*Figure 20*) (*Tableau 2*)^[75] ayant différentes applications. Dans le but de faire varier les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission, des BODIPY présentant diverses fonctionnalisations sont envisageables. De manière générale, ce sont des groupements aromatiques et hétéroaromatiques qui sont ajoutés pour avoir un effet bathochrome en augmentant la conjugaison des liaisons. Ces groupes fonctionnels sont introduits en général en positions α et γ des atomes d'azotes liés à l'atome de bore. Avec l'ajout de ces groupes fonctionnels, il est ainsi possible d'observer un déplacement vers des longueurs d'onde se rapprochant du proche IR.

Tableau 2 : longueurs d'ondes d'absorption et d'émission de différents BODIPY

Nom	λ_{\max} / nm (absorption)	λ_{\max} / nm (émission)
BODIPY® 493/503	500	506
BODIPY® R5G	528	550
BODIPY® TMR-X	542	574
BODIPY® 564/570	565	571
BODIPY® 581/591	584	592
BODIPY® TR-X	589	617
BODIPY® 650/665-X	646	660
BAP-4	623	704
BAP-5	639	723

Récemment, Pliquet *et al.* ont développé des aza-BODIPY hydrosolubles pour des applications *in vivo* en imagerie moléculaire.^[76] Ces aza-BODIPY ont des longueurs d'ondes d'émission comprises entre 712 et 731 nm ce qui correspond à la fenêtre du proche IR. L'aza-BODIPY Wazaby4-anti-PD-L1 ne porte plus d'atomes de fluor sur le bore, il est fonctionnalisé par des alcynes portant des amines quaternaires pouvant être fonctionnalisées pour introduire un anticorps. Le corps central du BODIPY est modifié dans le but d'augmenter la conjugaison des doubles liaisons, permettant un déplacement vers des longueurs d'ondes plus élevées (Figure 21).

**Figure 21** : Structure de Wazaby4-anti-PD-L1^[76]

III.3.3) Les cyanines

Les cyanines sont des fluorophores ayant une structure composée de deux noyaux indols liés par une chaîne carbonée conjuguée allant de trois à sept carbones (*Figure 22*). Leur type est déterminé par le nombre de carbones composant la chaîne conjuguée. Par exemple, si la chaîne est composée de trois carbones, c'est une cyanine 3.

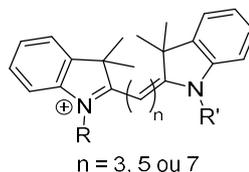


Figure 22 : Structure générale des cyanines

De nombreuses cyanines (*Tableau 3*) sont utilisées comme sondes fluorescentes pour l'imagerie optique.^[77] Seule une partie des cyanines utilisées figure dans ce tableau.

Tableau 3 : longueurs d'ondes d'absorption et d'émission de différentes cyanines

Nom	λ_{max} / nm (absorption)	λ_{max} / nm (émission)
Cy3	555	570
Cy3.5	591	604
Cy5	646	662
Cy5.5	684	710
Cy7	750	773
Cy7.5	788	808
IR-783	766	782
MHI-148	785	808
IR-780	777	823
ICG	780	812

Comme indiqué ci-dessous, la cyanine 3 possède des longueurs d'onde d'émission dans le visible. Pour les cyanines 5 et 7 et leurs dérivés (*Figure 23*), les longueurs d'ondes sont compatibles avec des applications *in vivo*. En effet, leurs longueurs d'ondes d'absorption et d'émission sont dans la fenêtre biologique, leur toxicité est très faible et leurs rendements quantiques sont suffisants, même si peu élevés par rapport aux rhodamines par exemple. Leur solubilité dans l'eau ainsi que leur photoblanchiment et le rapport signal sur bruit est propre à chacun des dérivés.^[3]

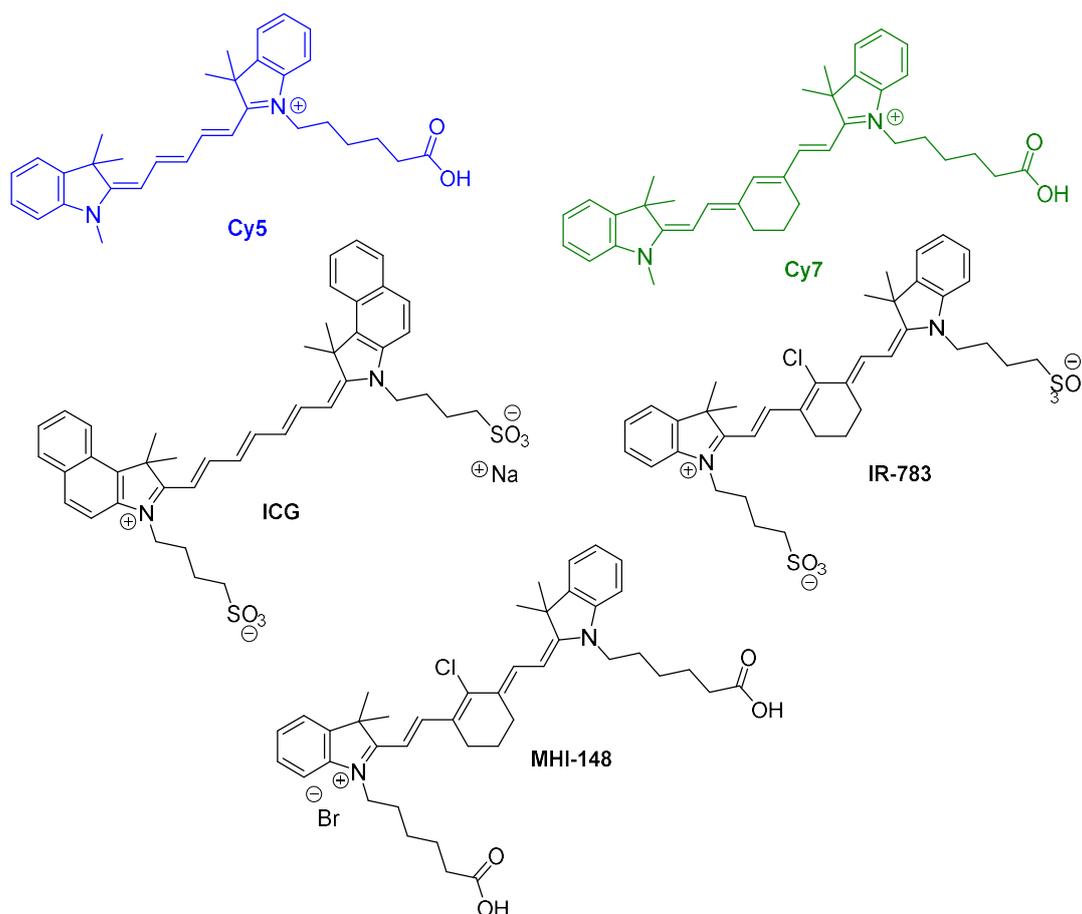


Figure 23 : Exemples de structures de dérivés de cyanine

Les cyanines sont utilisées dans de nombreuses applications *in vivo* en imagerie FPIR. Parmi les dérivés des cyanines 7, il existe l'indocyanine green (ICG) (Figure 23) qui est actuellement très utilisée.^[62] A ce jour l'ICG est la seule sonde fluorescente de type cyanine à posséder une AMM.

Ces sondes fluorescentes sont parfois couplées à une biomolécule (peptide, anti-corps, ...) afin de la suivre *in vivo*. Le couplage peut être réalisé de diverses manières, tout en modifiant peu les propriétés fluorescentes de ces sondes.

IV- Imagerie bimodale

La solution la plus simple pour mettre en œuvre une approche par imagerie bimodale (combinaison de deux techniques d'imagerie) est d'injecter de façon séquentielle ou en "cocktail" la molécule d'intérêt portant la sonde spécifique aux techniques d'imagerie visées. Cette solution soulève plusieurs problématiques, notamment le fait que les propriétés pharmacocinétiques des deux traceurs peuvent être différentes, puisque la sonde greffée est

différente. Il peut ainsi y avoir une divergence entre les images obtenues. Pour contourner cet écueil, la solution actuelle est de construire des sondes duales portant simultanément les deux types de sondes spécifiques à chaque imagerie. Ces sondes ensuite couplées à une molécule d'intérêt biologique ou médical deviennent des agents d'imagerie monomoléculaire multimodaux (Monomolecular Multimodality Imaging Agents ou MOMIAs) sont des outils pertinents en imagerie moléculaire bimodale.

IV.1- Intérêt du couplage de deux techniques d'imagerie et exemples de combinaisons

L'imagerie moléculaire regroupe cinq grandes techniques d'imagerie montrant des applications dans plusieurs domaines médicaux. (Tableau 4, de [78]).

Tableau 4 : tableau comparatif des différentes techniques d'imagerie moléculaire

Technique d'imagerie	Résolution spatiale (clinique)	Limite de pénétration tissulaire	Sensibilité de détection (mol)	Agents d'imagerie
US	50-500 μm (surface) 1-2 mm (profondeur)	sans limite ^a	nd ^b	micro-bulles ^c
TDM	0.5-1 mm (clinique)	sans limite	mmol	molécule iodée
Fluorescence	1-2 mm	< 1 cm	nmol-pmol	fluorophore
IRM	1 mm (clinique)	sans limite	mmol- μmol	molécule para ou ferromagnétique
TEMP	8-10 mm (clinique)	sans limite	nmol-pmol	molécule radioactive
TEP	5-7 mm (clinique)	sans limite	pmol	molécule radioactive

^adépend de la fréquence utilisée, signal réduit pour les tissus profonds ; ^bnd = non-déterminée ; ^cagent de contraste

Chaque technique d'imagerie moléculaire présente des avantages et inconvénients, que ce soit au niveau de la sensibilité, de la pénétrabilité ou de la résolution. Chaque technique d'imagerie présentée ci-dessus permet d'obtenir des informations souvent complémentaires, c'est pourquoi ces différentes techniques sont de plus en plus combinées entre elles.

L'imagerie par Ultrasons US a une résolution spatiale intéressante, une pénétrabilité et une sensibilité de détection dépendante de la cible visée et de la fréquence utilisée. L'imagerie par TomoDensitométrie par rayons-X (TDM) a une résolution spatiale presque équivalente à l'imagerie par US, une pénétrabilité sans limite et une faible sensibilité nécessitant l'ajout d'une molécule iodée pour créer un contraste dans le but d'obtenir une meilleure visualisation.

L'imagerie optique par fluorescence a une bonne résolution spatiale, une faible pénétrabilité et une très bonne sensibilité de détection. L'IRM a une très bonne résolution spatiale, une pénétrabilité sans limite mais une faible sensibilité de détection. Les imageries TEMP et TEP ont une résolution spatiale de l'ordre du millimètre, une très bonne pénétrabilité et une très bonne sensibilité. La TEP est légèrement plus sensible et mieux résolue que la TEMP. Ces deux techniques sont couramment couplées à l'imagerie par TDM afin d'avoir une vision anatomique complémentaire.

La combinaison de deux techniques d'imagerie est donc une solution appropriée pour parvenir à des outils diagnostics plus performant ou des applications théranostiques par exemple.

La combinaison de deux techniques apporte donc une complémentarité dans les informations obtenues lors des analyses effectuées.^[5,79,80] L'intérêt de coupler deux techniques d'imagerie entre elles est d'optimiser la sensibilité, la résolution ou encore la pénétrabilité que possèdent ces techniques utilisées seules.

Par exemple, l'imagerie bimodale IRM/FPIR permet de palier à la faible sensibilité de l'IRM et cette combinaison permet également de compenser la faible pénétrabilité de l'imagerie optique par FPIR.^[64,81-85] Wang *et al.*^[82] ont développé des nanoparticules contenant plusieurs dizaines de "petites" nanoparticules composées d'un chélatant du gadolinium-III (Gd-DOTA), d'un fluorophore de type cyanine (Cy7) et d'acide folique, tous trois étant fonctionnalisés avec de l'hexadécylamine (HDA) (*Figure 24*). L'acide folique présent dans les petites nanoparticules et dans les nanoparticules englobant ces dernières sert à rigidifier la structure formée avec les entités de gadolinium et de cyanine. Ces nanoparticules, appelées GCF (Gadolinium-Cyanine-Folic acid), ciblent les récepteurs d'acide folique exprimés dans les gliomes (tumeurs cérébrales). Avec la combinaison de ces deux techniques d'imagerie et ces nanoparticules, il est possible d'imager la tumeur ciblée en IRM et FPIR jusqu'à 144 heures après l'injection. Cette combinaison pose néanmoins quelques problèmes, car le fort ratio en sonde IRM lié à la faible sensibilité de l'IRM par rapport à la FPIR nécessite l'utilisation de grosses architectures ce qui n'est pas idéal en termes de biodistribution, toxicité et mise en oeuvre.

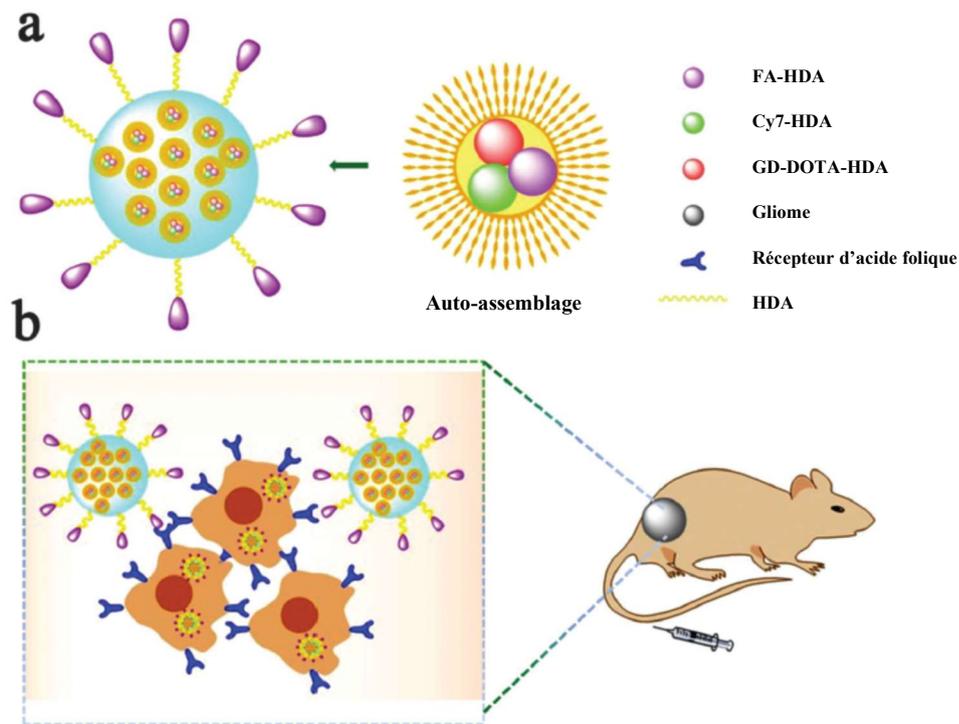


Figure 24 : Radiotracer GCF-HDA NPs synthétisé par H. Wang *et al.*

La combinaison TEP/IRM est une combinaison intéressante tirant parti de l'excellente résolution de l'IRM et de la bonne sensibilité de la TEP. Cependant, comme dans l'exemple précédent, l'IRM ayant une faible sensibilité comparée à l'imagerie TEP, la recherche actuelle porte principalement sur l'incorporation de plusieurs chélates de gadolinium dans des systèmes de type nanoparticules. Thomas *et al.* ont utilisés des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIONs) fonctionnalisées avec de la LDOPA pour accrocher un motif PEG sur la fonction carboxyle et un macrocyclique chélatant du cuivre-64 MANOTA sur la fonction amine (*Figure 25*). Ces nanoparticules ont été testées sur une lignée de cellules hépatiques carcinoma HepG2. Les nanoparticules ont montré une bonne biodistribution dans le foie ainsi que dans la rate et les reins. Les cellules HepG2 sont exprimées dans le cancer du foie, ces nanoparticules sont un bon outil pour le diagnostic du cancer du foie.^[86]

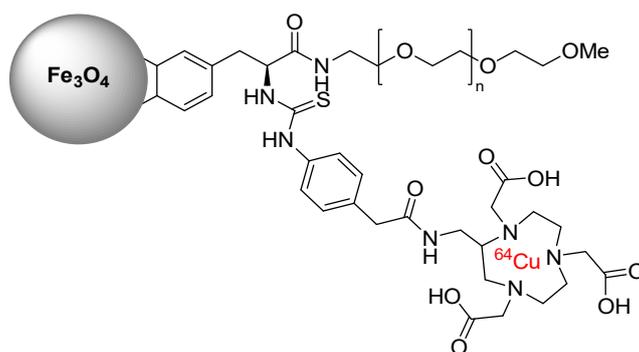


Figure 25 : Structure des nanoparticules Fe₃O₄-LDOPA-PEG-MANOTA

La bimodalité IRM/FPIR et IRM/TEP ou IRM/TEMP est donc très intéressante, cependant la forte différence de sensibilité de ces techniques est une problématique importante dans la construction des sondes bimodales, celles-ci seront nécessairement de grosses architectures (nanoparticules, rotaxanes par exemple).

IV.2- Intérêt de la combinaison TEP/FPIR

Combiner deux techniques d'imagerie comme l'imagerie TEP et l'imagerie optique par FPIR offre un énorme potentiel pour améliorer le diagnostic et le traitement du patient. La combinaison TEP/FPIR paraît idéale en termes de sensibilité, l'imagerie optique par FPIR permet d'améliorer la résolution apportée par l'imagerie TEP seule et cette dernière permet de compenser la faible pénétrabilité de l'imagerie optique par FPIR. Ces deux techniques d'imagerie ayant une sensibilité similaire allant du nano au picomolaire, il est tout à fait envisageable de concevoir des sondes duales basées sur des structures moléculaires de petite taille. Cette dualité donne accès à des informations à de multiples échelles allant du tissu "dysfonctionnel" (TEP) à l'échelle cellulaire (FPIR). De plus, la combinaison de l'imagerie TEP et de l'imagerie optique par FPIR permet d'associer deux techniques non-invasives, fonctionnelles et quantitatives pour un diagnostic sur le corps entier (TEP) et de la micro-chirurgie (FPIR) permettant ainsi des applications théranostiques.

De nombreux exemples dans la littérature illustrent la force de la combinaison TEP/FPIR. Cependant, la majorité des outils moléculaires décrits sont construits avec des chélatants des radiométaux (TEP). Très peu d'exemples concernent l'utilisation du fluor-18 comme radioisotope. Ceci sera d'ailleurs plus largement explicité dans le paragraphe III.4.4.1.

Pour citer un exemple concernant les radiométaux, les travaux de Deng *et al.* montrent la création d'une sonde bimodale avec du cuivre-64 et une cyanine 5.5 (Figure 26).^[87] Cette sonde

bimodale est fonctionnalisée par une molécule ciblant les récepteurs de la neurotensine (neuropeptide NT surexprimé dans différents types de tumeurs). L'objectif de cet agent bimodal est de réaliser un diagnostic *in vivo* puis de faire de la chirurgie guidée des tumeurs diagnostiquées.

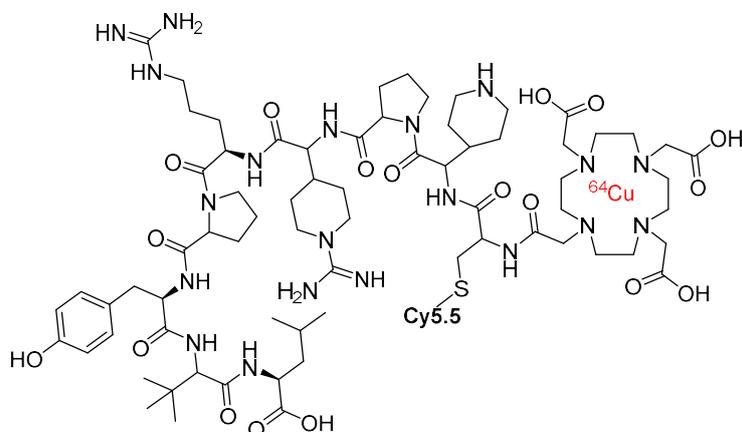


Figure 26 : Structure de $[^{64}\text{Cu}]\text{-DOTA-NT-Cy5.5}$ ^[87]

La combinaison TEP/FPIR est donc idéale pour les raisons suivantes : elle permet de faire de l'imagerie *in vivo* mais aussi de l'histopathologie *ex vivo* et de la chirurgie guidée. Cette combinaison d'imagerie offre outre les applications diagnostiques, des applications théranostiques.

Quelle qu'elle soit, une sonde doit être liée par liaison covalente à la molécule à suivre. Actuellement, plusieurs méthodes d'accrochage existent et ces liens covalents sont d'ailleurs couramment utilisés pour coupler différents types de sonde à une biomolécule. Les principales méthodes^[88] employées sont : la formation d'un lien amide,^[89] la création d'un lien thioéther,^[87] et la formation d'oxime ou d'hydrazone.^[90] Cependant, la méthode la plus utilisée à ce jour est la cycloaddition de Huisgen azoture-alcyne catalysée par du cuivre (copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC)), réaction de "Click Chemistry" qui conduit à un triazole entre les deux entités couplées.^[91,92]

Par exemple, Paulus *et al.*^[92] ont fonctionnalisé un BODIPY avec un groupement azoture couplé ensuite à un dérivé de la bombésine fonctionnalisé avec un propargyle (Figure 27).

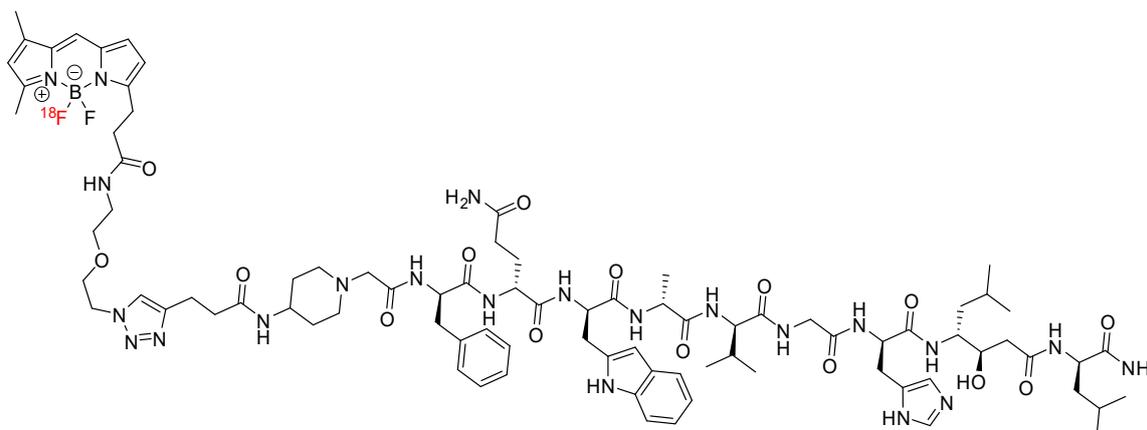


Figure 27 : Structure du [¹⁸F]BODIPY-BBN^[92]

L'objectif de cette sonde d'imagerie est d'imager les récepteurs GRP (Gastrin-Releasing-Peptide) surexprimés dans certaines tumeurs du système digestif grâce au ciblage via le peptide de type bombésine.

Les différentes techniques d'accrochage d'une sonde d'imagerie avec une biomolécule sont explicitées en détails dans le paragraphe V.3.

V- Marquage de peptides

V.1- Intérêt des peptides en imagerie

Actuellement, les peptides retiennent l'attention en raison de leur efficacité thérapeutique *in vivo* compte tenu de leurs propriétés favorables à savoir une forte spécificité pour le ciblage et une faible toxicité mais aussi une biocompatibilité et biodégradabilité adéquate pour des applications médicales.^[93-95] Dans une industrie pharmaceutique actuellement en stagnation, les peptides peuvent constituer une solution potentielle dans les traitements de maladies. Ceci a incité également le développement de peptides radiomarqués pour la TEP.^[21,96,97] Les peptides sont ainsi une classe importante de ligands utilisés pour l'imagerie moléculaire. Les peptides présentent de nombreux avantages, comme une sélectivité et une spécificité supérieures envers la cible biologique visée, et une fonctionnalisation facile sans modifier leurs propriétés ou de distribution. En outre, les peptides ont une immunogénicité plus faible que les anticorps. La facilité de synthèse et la tolérance chimique des peptides sont entièrement adaptées à la construction modulaire de MOMIAs.

Les peptides sont spécifiques de diverses cibles et sont généralement utilisés pour effectuer des diagnostics de cancer. Ils apportent un diagnostic plus sélectif que le [¹⁸F]FDG peu sélectif. Les peptides couramment utilisés en imagerie sont des ligands comme des pseudo-peptides inhibiteurs du PSMA (prostate-specific membrane antigen), l'octréotide, la bombésine et des dérivés de la séquence RGD.

- Dérivés de RGD

La séquence d'acides aminés arginine-glycine-acide aspartique (RGD) (*Figure 28*) est l'un des peptides de petite taille les plus étudiés.^[98,99] Les séquences linéaires RGD ont été les premières étudiées mais ont montré de faibles affinités et de la dégradation en environnement biologique.^[98,100] Les RGD cycliques, comme le c(RGDfK)^[101,102] ou le c(RGDyK), présentant une conformation contrainte de la séquence RGD montrent une meilleure stabilité *in vivo*.^[103-106]

L'application la plus connue de ce peptide en imagerie est le diagnostic de cancers. Lors de la croissance d'une tumeur, l'angiogenèse, processus fondamental extrêmement régulé, intervient avec des conditions physiologiques et pathologiques variables.^[107] L'angiogenèse est la création de nouveaux vaisseaux sanguins destinés à alimenter la tumeur. Au cours de cette angiogenèse les intégrines, des protéines transmembranaires, sont surexprimées sur les cellules endothéliales. Un grand nombre d'intégrines^[105] existe ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$) et chacune est exprimée de manière spécifique en fonction du type de tumeur. Les dérivés RGD sont affins et sélectifs envers les intégrines et sont donc très adaptés pour leur ciblage.^[108] L'intégrine la plus largement étudiée est l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui représente un biomarqueur hautement spécifique, en particulier pour le suivi de la progression des tumeurs.^[109-111]

Il existe de nombreux exemples d'application de ces dérivés RGD en imagerie TEP pour le diagnostic de cancer, plus particulièrement avec les dérivés cycliques de type c(RGDfK)^[112] mais aussi c(RGDfC) utilisé précédemment au laboratoire^[113] (*Figure 28*).

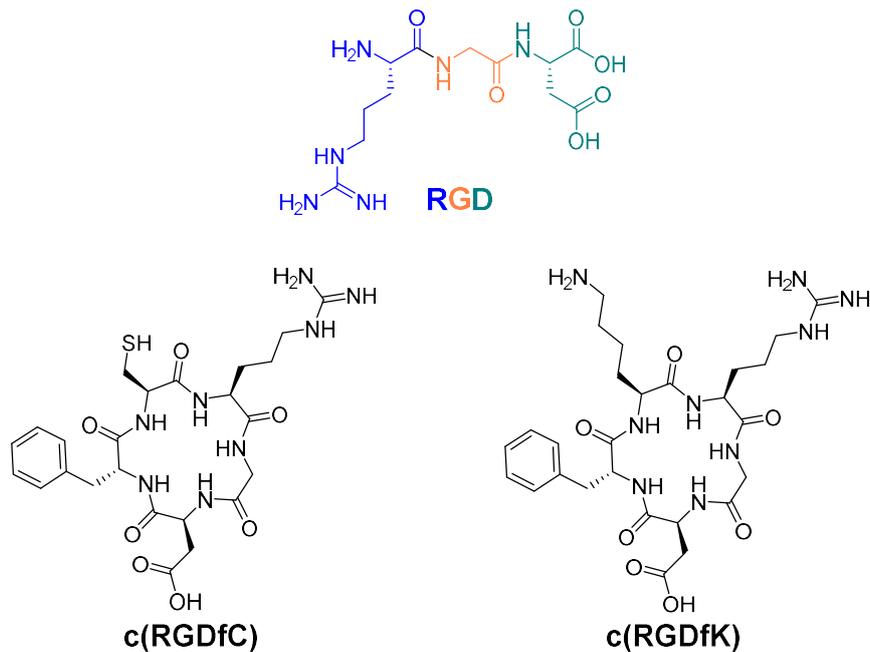


Figure 28 : Structures du RGD, c(RGDfC) et du c(RGDfK)

Ces dérivés RGD servent aussi au ciblage d'un autre sous-type d'intégrine, les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$. La fonction physiologique est intimement liée au processus d'activation des plaquettes et de la thrombose.^[114–116] Les sondes de RGD marquées sont aussi largement appliquées dans la biologie des plaquettes pour l'imagerie de la thrombose.^[108,116–119]

Les dérivés de la séquence RGD montrent un intérêt majeur du fait de leurs larges gammes de propriétés pharmacologiques et biologiques. De plus, ils sont biodégradables dans le corps ce qui ne crée pas de réponse immunitaire provenant de l'environnement avoisinant. Dans le cadre de cette thèse, des dérivés de la séquence RGD sont utilisés pour le ciblage des intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$.

- L'octréotide

L'octréotide est un octapeptide (*Figure 29*) imitant pharmacologiquement la somatostatine naturelle. L'octréotide inhibe l'augmentation pathologique de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) ainsi que de peptides et de la sérotonine produits par le système endocrinien gastro-entéro-pancréatique (GEP). L'octréotide est souvent fonctionnalisé avec des chélatants du gallium-68 ou avec un groupement prosthétique marqué au fluor-18 pour le diagnostic en imagerie TEP.^[25,120,121] Par exemple, Chilug *et al.* ont développé un radiotracer avec du gallium-68 et de l'octréotide dans le but de visualiser des cellules cancéreuses pour les cancers du pancréas et du colon.^[25] Allott *et al.* ont utilisé le 2-^[18F]fluoroéthylazide couplé par réaction de "Click Chemistry" à un dérivé de l'octréotide dans le but d'imager les tumeurs

neuroendocrines. Ils ont optimisé l'automatisation de la radiosynthèse.^[121] Cet octapeptide est aussi utilisé dans la thérapie de tumeurs se localisant dans le système digestif de l'être humain.^[24,122-124] L'octréotide peut être aussi utilisé dans la thérapie contre les neuroblastomes, qui sont des tumeurs intra-crâniennes.^[125]

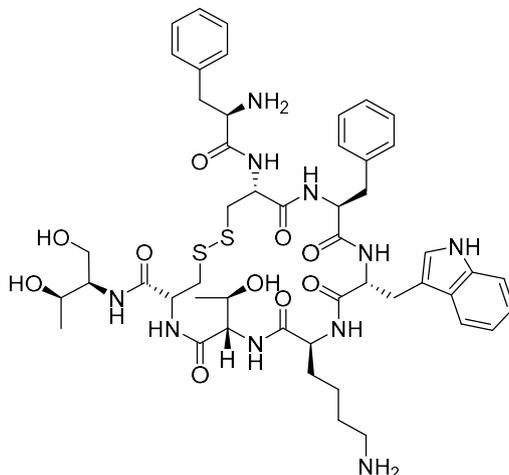


Figure 29 : Structure de l'octréotide

- La bombésine

La bombésine (*Figure 30*) appelé aussi GRP (Gastrin Releasing Peptide) est utilisé pour imager les cancers exprimant des tumeurs GRPR (Gastrin Releasing Peptide Receptor) que l'on retrouve dans le cancer de la prostate, du sein, des poumons, du pancréas, de l'estomac et du colon. Des dérivés de la bombésine sont beaucoup utilisés en imagerie TEP pour diagnostiquer le cancer de la prostate.^[126-129] Par exemple, Mansour *et al.* ont synthétisé le [⁶⁴Cu]DOTHA₂-PEG-RM26 pour cibler les GRPR avec un rendement de marquage supérieur à 95% en cinq minutes à température ambiante et une activité molaire de 56±3 GBq/μmol.^[126] Hajiramezanali *et al.* utilisent ce peptide en imagerie bimodale TEP/IRM en utilisant des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec des chélatants du gallium-68 pour l'imagerie TEP, eux-mêmes fonctionnalisés avec de la bombésine pour le ciblage des cellules GRP-avid BC T-47D exprimés dans le cancer du sein.^[130]

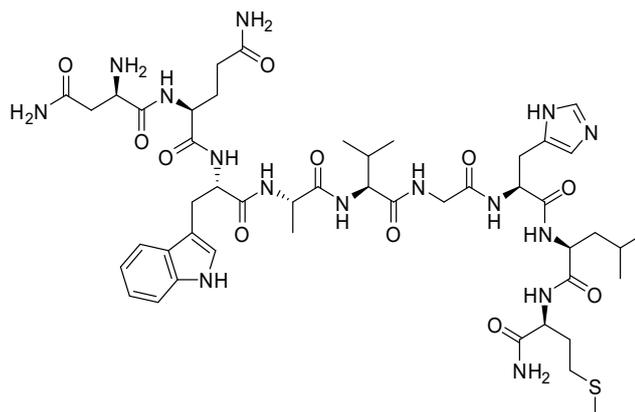


Figure 30 : Structure de la bombésine

- Le pseudo-peptide inhibiteur du PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen)

Le PSMA-11 (Glu-NH-CO-NH-Lys) est un pseudo peptide ciblant le PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) (Figure 31) utilisé dans le diagnostic et en développement dans le théranostique pour le cancer de la prostate. Ce n'est pas un véritable peptide car il comporte un motif urée. Il est beaucoup utilisé en imagerie TEP avec du fluor-18,^[131] du cuivre-64^[132] et du gallium-68.^[133-136] L'utilisation de ce pseudo-peptide en imagerie est assez récent comparé aux dérivés RGD, à l'octréotide et à la bombésine.

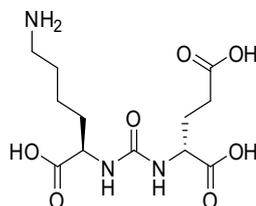


Figure 31 : Structure du ligand du PSMA-11

L'importance des peptides est croissant dans le domaine pharmaceutique et diagnostique, il est donc d'un grand intérêt de les équiper d'un agent d'imagerie afin d'évaluer leur distribution *in vivo* et avoir ainsi accès à des outils de diagnostic performants.

V.2- Marquage de peptides pour l'imagerie TEP

Les biomolécules, telles que les peptides, protéines, oligosaccharides, etc, sont des molécules fragiles qui ne supportent pas des conditions de synthèse impliquant des températures élevées et des conditions basiques. Ceci est une problématique majeure pour des applications en imagerie TEP car le marquage classique au [¹⁸F]F- nécessite justement de telles conditions.

Le radiomarquage de peptides peut se faire selon trois stratégies : marquage par radiométaux, marquage direct au ^{18}F et marquage indirect au ^{18}F .

V.2.1) Marquage par radiométaux

En imagerie TEP, trois radiométaux sont le plus couramment utilisés : le gallium-68, le cuivre-64 et le zirconium-89. Les radiométaux sont introduits par l'intermédiaire d'un chélatant bifonctionnel accroché au préalable sur la biomolécule. Le radiométal est ensuite complexé à cet outil d'imagerie. Cette technique est donc très intéressante pour le marquage de biomolécules, car celle-ci est fonctionnalisée en amont par le chélatant, puis les conditions d'incorporation du radiométal se déroulent en conditions assez douces compatibles avec la stabilité de la biomolécule.

- *Gallium-68*

De nombreux exemples dans la littérature décrivent l'utilisation de dérivés RGD radiomarqués au gallium-68 par complexation du radiométal par divers chélatants de type macrocycles polyazotés : DOTA, NOTA, NODAGA, TETA (*Figure 32*) etc.^[137-143]

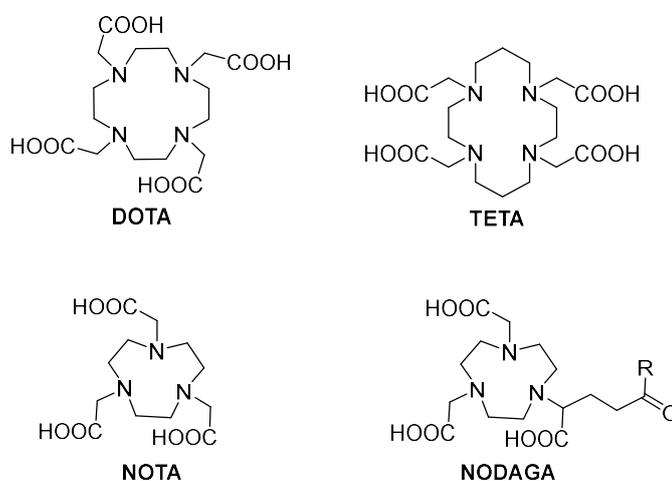


Figure 32 : Structures des chélatants DOTA, NOTA, NODAGA et TETA

Par exemple, les travaux de Chakraborty *et al.* montrent la fonctionnalisation de NODAGA avec deux peptides RGD (*Figure 33*) ce qui permet d'améliorer le ciblage des intégrines,^[144] les intégrines ciblées dans cet exemple étant les intégrines $\alpha\text{v}\beta_3$. Le radiomarquage est réalisé à température ambiante en présence d'une solution de 1 mL de HCl 0.1 M contenant du ^{68}Ga et une solution de 1 mL de NaOAc 0.1M (pH ~ 5.5) contenant 10 μg de NODAGA-(RGD)₂. Le rendement de marquage est de $98.8\pm 0.4\%$. Cette

sonde d'imagerie est utilisée pour imager le cancer du sein en ciblant les tumeurs de mélanomes.

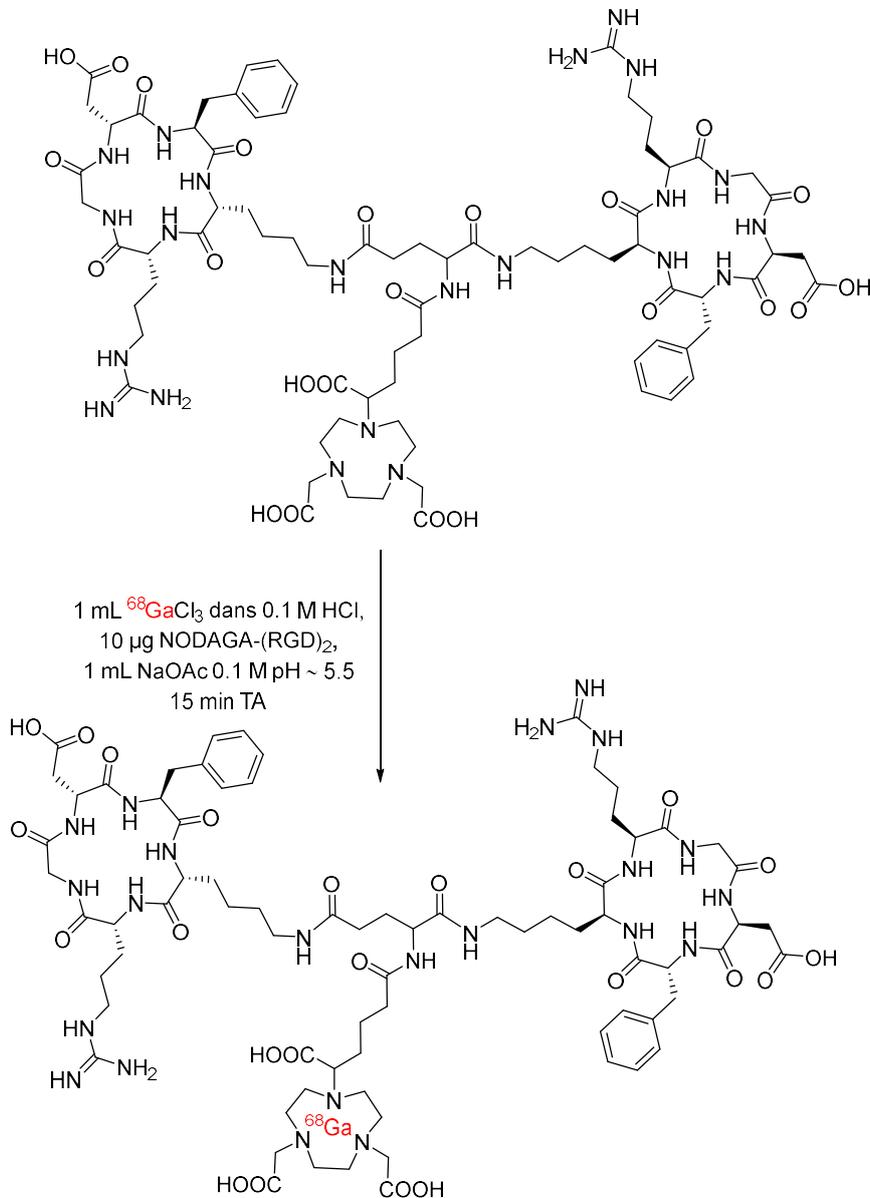


Figure 33 : Structure du NODAGA avec deux dérivés de RGD développé par Chakraborty *et al.*

Cependant, la courte demi-vie (1.13h) du gallium-68 ne permet pas d'utiliser des biomolécules ayant une distribution lente. Le ^{68}Ga est donc généralement utilisé pour le marquage de petits peptides ayant une distribution plus rapide.

- *Cuivre-64*

Comme tous les radiométaux, le cuivre-64 est principalement utilisé pour radiomarquer des biomolécules afin de réaliser des diagnostic de cancers.^[145–151] Le ^{64}Cu ayant une demi-

vie assez longue (12.7h), il peut être utilisé pour de nombreux type de biomolécules. Cependant, peu de cyclotrons peuvent produire le cuivre-64 et donc son utilisation n'est pas encore routinière. Récemment, Sarkar *et al.*^[145] ont utilisé plusieurs chélatants (*Figure 34*) du cuivre-64 (NOTA, TE2A, ECB-TE2A et PCB-TE2A) lié à un c(RGDyK). Ce chélatants sont des macrocycles de taille plus grande et pontés ("cross-bridged"-CB) pour favoriser la stabilité du complexe.

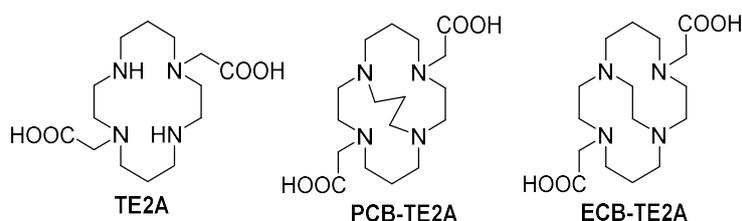


Figure 34 : Structures des chélatants utilisés par Sarkar *et al.*

L'objectif de leurs travaux est de montrer l'impact du chélatant sur la stabilité de la complexation du cuivre-64, dans des applications en imagerie *in vivo*. Chaque chélatant ne complexe pas le cuivre de la même manière, il est donc intéressant d'observer quel est le meilleur chélatant du cuivre. Ceci est valable pour tous les radiométaux. Les radiométaux étant coordonnés à la sonde d'imagerie, ils peuvent se décoordonner *in vivo* ce qui diminue son efficacité. En effet, des transmétaillations sont souvent observées notamment par le fer présent dans le sang. Des transchélatations par diverses protéines peuvent également avoir lieu. Sarkar *et al.* ont montré qu'un chélatant de type PCB-TE2A (*Figure 35*) est performant pour chélater le cuivre-64 sur une longue durée.^[145]

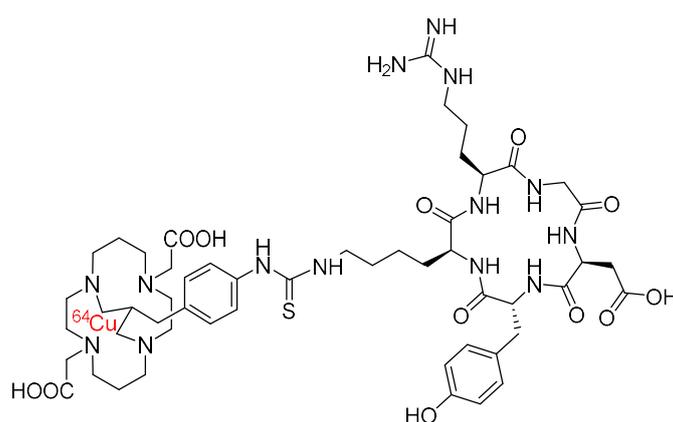


Figure 35 : Structure de la plateforme PCB-TE2A-Bn-NCS-c(RGDyK) développé par Sarkar *et al.*

- *Zirconium-89*

L'utilisation du zirconium-89 pour l'imagerie TEP est en plein essor. Cependant, peu d'exemples d'utilisation avec un peptide existent dans la littérature. En effet, ce radiométal a une demi-vie longue (3,2 jours), il est donc généralement utilisé pour radiomarquer des biomolécules ayant une biodistribution lente, comme les anticorps par exemple. Concernant les peptides, un exemple publié en 2011 par Jacobson *et al.* montre l'utilisation du zirconium-89 chélaté par la desferroxiamine-p-SCN (Figure 36) et couplé à un peptide dérivé de RGD pour imager certaines tumeurs.^[152] Le chélatant utilisé par Jacobson *et al.* est différent des chélatants utilisés pour les autres radiométaux, sa structure n'est pas cyclique mais linéaire.

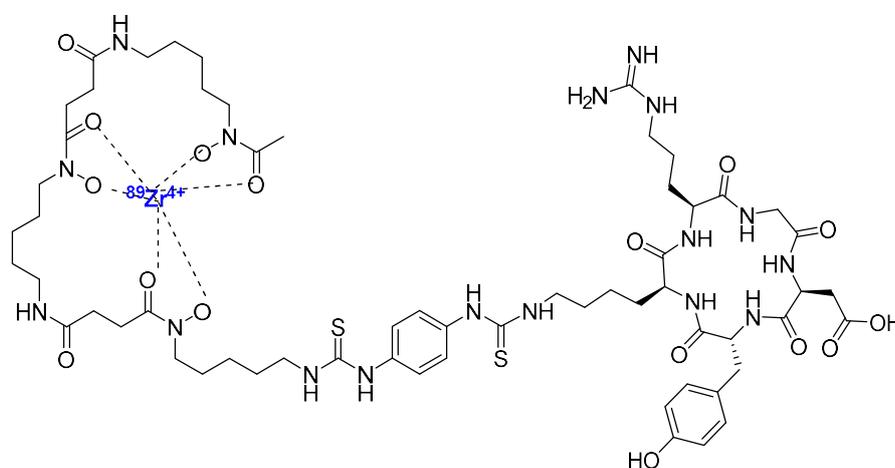


Figure 36 : Structure du radiotracer ^{89}Zr -FK développé par Jacobson *et al.*

Le marquage par des radiométaux est simple à mettre en œuvre du fait des conditions douces de marquage. Cependant, les radiométaux peuvent subir des transmétalements et transchélatations *in vivo*, puisqu'ils effectuent des interactions non covalentes avec leur chélatant. D'autres stratégies de marquage existent, comme le marquage direct et indirect avec le fluor-18 où une liaison covalente stable est créée entre le radioisotope et la molécule d'intérêt.

V.2.2) Marquage par le fluor-18

Le fluor-18 (^{18}F) est le radioélément idéal pour le radiomarquage de peptide grâce à sa facilité de production, sa faible énergie de positon, sa haute activité molaire et sa demi-vie appropriée ($t_{1/2} = 109.8 \text{ min}$).^[36,153]

V.2.2.1) Marquage direct

Le marquage direct de peptides au fluor-18 est une méthode peu développée à ce jour, il n'y a que quelques exemples décrits dans la littérature.^[88] En effet, comme explicité auparavant, les conditions classiques de ^{18}F -radiofluoruration se font classiquement à température élevée en présence d'une base, conditions non compatibles avec la fragilité des biomolécules. Des études récentes ont mis au point une stratégie permettant l'introduction du fluor en conditions plus douce. Une des stratégies est d'utiliser une molécule silylée portant un fluore, introduite au préalable sur le peptide. Le silicium portant un fluor non radioactif est marqué par échange isotopique entre le ^{19}F et le ^{18}F . Le marquage se fait alors à température peu élevée (maximum 50°C).^[154,155] Cette réaction est possible à de basses températures en raison de la forte affinité entre le fluor et le silicium (*Figure 37*). Cette stratégie reste encore peu développée, la stratégie la plus communément utilisée avec le fluor-18 est le marquage indirect.

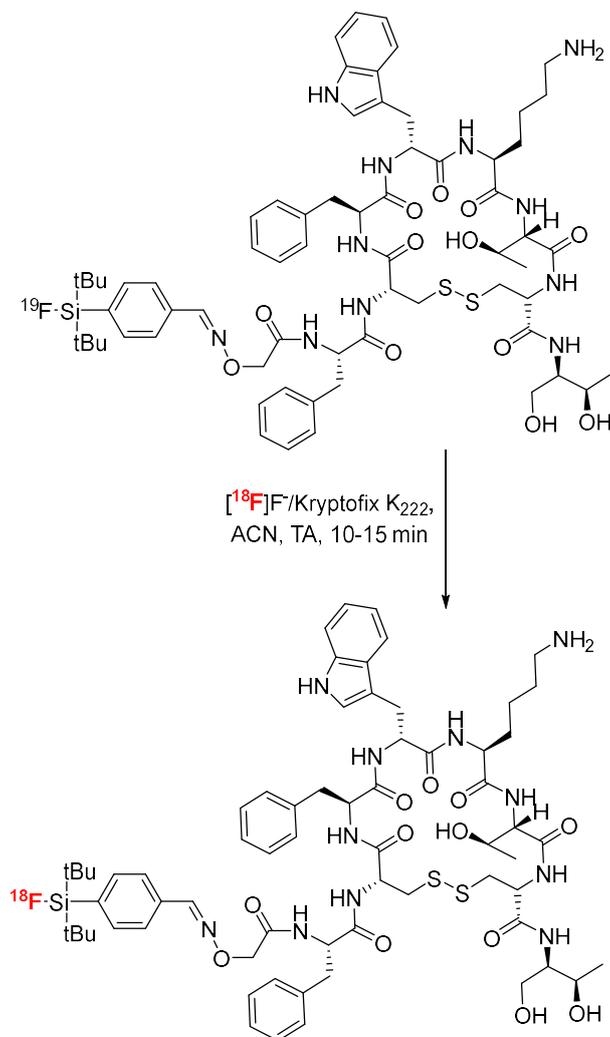


Figure 37 : Radiomarquage direct au fluor-18 sur un *para*-di-*tert*-butylfluorosilyle ^[156]

V.2.2.2) Marquage indirect

De manière générale, les biomolécules sont trop fragiles pour être marquées directement, sauf dans les cas particuliers vus ci-dessus. La stratégie du marquage indirect repose donc sur l'utilisation d'un groupement prosthétique, petite molécule facilement radiomarquable, liée ensuite dans des conditions douces à la biomolécule (*Figure 38*). Le groupement prosthétique est radiomarké dans les conditions classiques de ^{18}F -radiofluoration. L'utilisation d'un groupement prosthétique permet de synthétiser des agents d'imagerie en évitant que la biomolécule ne subisse les conditions de radiofluoration qui peuvent la dénaturer. Un groupe partant (GP) est nécessaire à l'incorporation du ^{18}F . Le groupement prosthétique et la biomolécule sont chacun fonctionnalisés d'une fonction, respectivement Z et Y, qui réagissent rapidement entre elles dans des conditions douces.

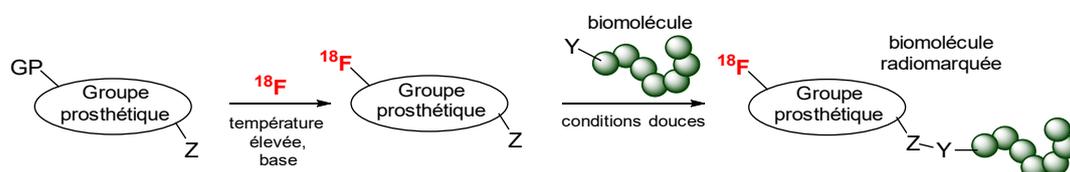


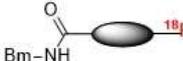
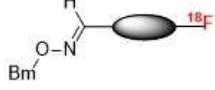
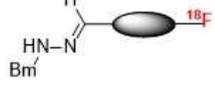
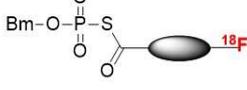
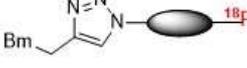
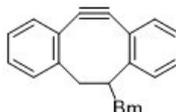
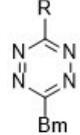
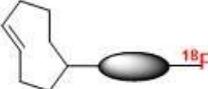
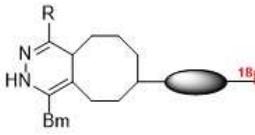
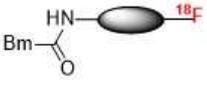
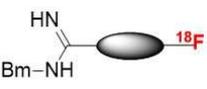
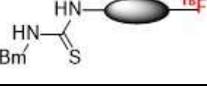
Figure 38 : Schéma général de la stratégie de marquage indirect *via* utilisation d'un groupement prosthétique

L'ajout d'un groupement prosthétique implique une modification de la biomolécule. Afin de limiter au maximum les modifications engendrées par l'incorporation de ce groupe radiomarké, il est préférable que celui-ci soit de petite taille. De plus, la réaction entre les groupes fonctionnels Y et Z conduisant à la conjugaison doit être chimio- et régiosélective.

V.3- Différentes méthodes de conjugaison

Pour introduire le groupement prosthétique de façon douce et régiosélective, des méthodes de couplage de type "Click" sont utilisées. Ces réactions dites Click se déroulent en conditions douces, sur un temps court et avec de bons rendements. Ce couplage doit être rapide car la demie-vie du fluor-18 n'est que de 109.8 min. Les stratégies de couplage les plus couramment utilisées sont listées dans le tableau (*Tableau 5*) ci-dessous :^[37,88]

Tableau 5 : différents types de couplages entre biomolécule et groupement prosthétique

Méthode de couplage	Biomolécule (Bm)	Groupe prosthétique (GPr)	Résultat du couplage (GPr-Bm)
Acylation	Bm-NH ₂	ROOC-  R = H ou ester activé	
Formation d'oxime	Bm-O-NH ₂	O H-C- 	
Formation d'hydrazone	Bm-NH-NH ₂	O H-C- 	
Formation d'un thioester (S-alkylation)	Bm-O-P(=O)(OH)-SH	Br-CH ₂ -C(=O)- 	
CuACC (Cu catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition)	Bm-CH ₂ -C≡CH	N ₃ - 	
SPAAC (Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition)		N ₃ - 	
IEDDA (Inverse Electron Demand Diels-Alder cycloadditions)			
Amidation	Bm-COOH	H ₂ N- 	
Amidination	Bm-NH ₂	H ₃ CO-C(=O)-NH- 	
Formation de Thiourée	Bm-NH ₂	S=C=N- 	

Pour chacune de ces méthodes de couplage, différents groupements prosthétiques et biomolécules sont utilisés :

- Acylation

Largement utilisée, cette réaction requiert la présence d'un acide carboxylique ou d'un ester activé sur le groupement prosthétique et d'une fonction amine sur la biomolécule, qui peut être l'amine du côté *N*-terminal ou l'amine d'une lysine par exemple. Il existe de nombreux groupements prosthétiques couplés par réaction d'acylation, par exemple le [¹⁸F]SFMeB, le [¹⁸F]FBenzAc, le [¹⁸F]FPA et le [¹⁸F]SFB.^[46,157] Le [¹⁸F]SFB possède une fonction ester

activé permettant le couplage avec des peptides, des protéines, des anti-corps ou des oligonucléotides (Figure 39).^[37,158] La réaction d'accrochage est réalisée dans un mélange tampon borate (pH 8.5)/DMF à 40°C en 30 minutes donnant le radiotraceur avec un rendement estimé de 20%.

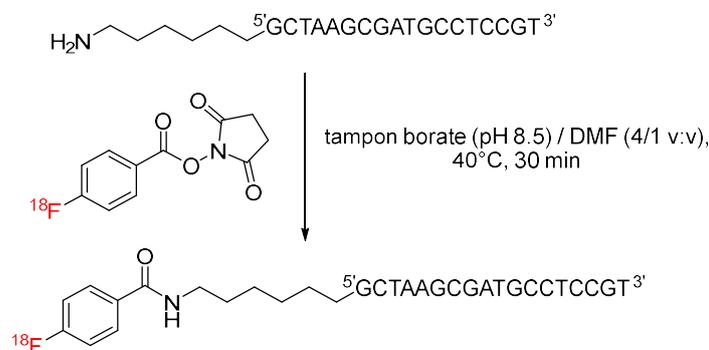


Figure 39 : Couplage d'un oligonucléotide avec le [¹⁸F]SFB

Cependant cette méthode n'est pas suffisamment régiosélective, toute amine libre est susceptible de réagir avec la fonction ester activé du groupement prosthétique, elle est donc à ce jour de moins en moins utilisée au profit d'autres méthodes.

- Formation d'oxime et d'hydrazone

La formation d'une oxime (-C=N-O) se fait entre un groupe prosthétique portant une fonction aldéhyde et une biomolécule modifiée par une fonction alkoxy-amine.^[159,160] La formation d'hydrazone (-C=N-N) est réalisée à partir d'un groupement prosthétique portant une fonction aldéhyde qui va réagir avec une hydrazine de la biomolécule modifiée.^[161,162] Dans ces réactions, les conditions douces utilisées ne conduisent à aucun sous-produits. Les biomolécules sont généralement des peptides.^[37,88,90]

- S-alkylation

Les S-alkylations qui donnent de manière générale une liaison C-S entre le groupement prosthétique et la biomolécule. De nombreux exemples décrivent cette méthode d'accrochage en mettant en œuvre un électrophile de type maléimide (addition thiol-Michael). Il existe de nombreux groupements prosthétiques utilisés pour cette réaction tel que le [¹⁸F]FPyBrA, le [¹⁸F]FPyMe ou encore le [¹⁸F]FBAM.^[37,88] Ces groupements prosthétiques sont couplés à des peptides, des protéines ou des oligonucléotides (Figure 40).^[37,163-165] Comme montré sur l'exemple Figure 40, cette réaction procède rapidement (15 min) en milieu tamponné permettant une préservation de la biomolécule même si une température de 120°C est nécessaire.

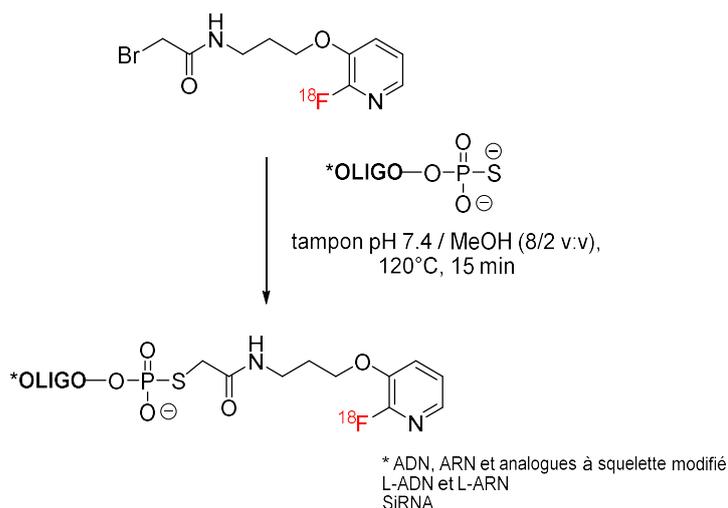


Figure 40 : Couplage d'un oligonucléotide avec le [^{18}F]FPyBrA

- CuAAC

La méthode de couplage par CuAAC (Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition) est une des réactions de "Click Chemistry" la plus connue et la plus utilisée de nos jours. C'est une cycloaddition 1,3-dipolaire qui est régiosélective grâce à la catalyse au cuivre.^[166] Le groupement prosthétique et la biomolécule doivent avoir l'un ou l'autre un groupement azoture ou un propargyle pour réaliser ce couplage. Cette méthode a été utilisée au laboratoire dans le cadre du développement de groupements prosthétiques de type *O*-glycoside^[167] (Figure 41) fonctionnalisés par un bras propyle portant un azoture en bout de chaîne. Ils sont couplés à des dérivés RGD portant une cystéine fonctionnalisée par un propargyle. La réaction est réalisée en 25 minutes dans l'eau à 55°C en présence de cuivre-II réduit en cuivre-I par action de l'ascorbate de sodium. Les différents radiotraceurs ont été obtenus avec des rendements compris entre 63 et 68%. La réaction CuAAC est une réaction de "Click Chemistry" souvent utilisée, elle nécessite cependant un apport de chaleur pour que la réaction soit réalisée dans un temps suffisamment court.

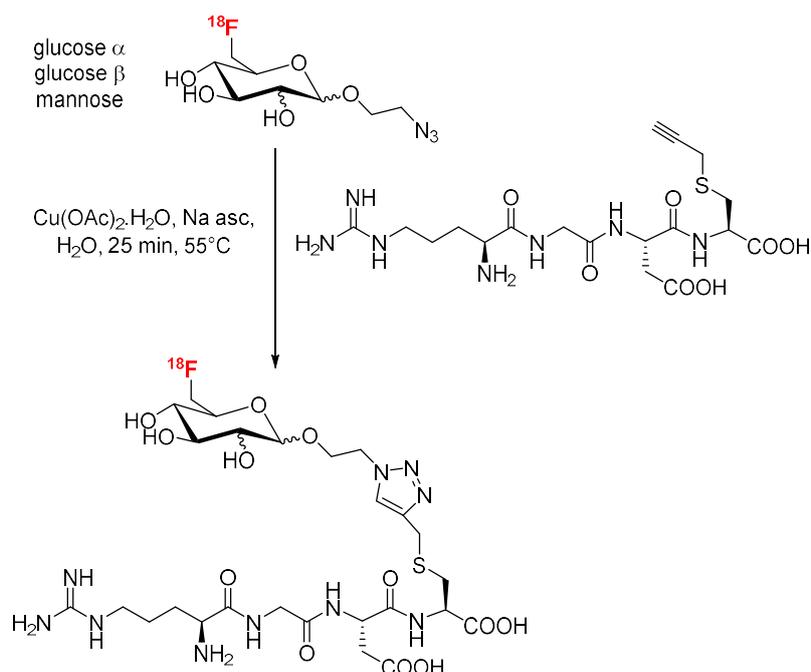


Figure 41 : Couplage de groupes prosthétiques de type *O*-glycoside par CuAAC et RGD linéaire

- SPAAC

La méthode par SPAAC (Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) est une stratégie de couplage assez récente. Comme la CuAAC, elle met en jeu un azoture et une triple liaison. De manière générale, le groupe prosthétique est porteur de l'azoture et le peptide est fonctionnalisé par une dibenzylcyclooctyne.^[88,168] Cette réaction est réalisée sur un cyclooctyne "tendu" qui nécessite une énergie d'activation plus faible, permettant ainsi de réaliser cette réaction à des températures plus basses que la CuAAC voir même à température ambiante. Cependant, cette réaction est plus lente que la CuAAC et conduit à deux régiosomères ce qui peut représenter un inconvénient pour la purification des composés obtenus.

- IEDDA

La méthode par IEDDA (Inverse Electron Demand Diels-Alder cycloadditions) met en jeu deux entités l'une fonctionnalisée par une tétrazine et l'autre par un *trans*-cyclooctène. Cette réaction a l'avantage d'être autant voire plus rapide que la CuAAC. Il existe des exemples où le groupement prosthétique porte la tétrazine et le peptide le *trans*-cyclooctène ou l'inverse comme le montre les travaux de Keliher *et al.* (Figure 42).^[88,169] Keliher *et al.* ont fonctionnalisé un peptide exendine-4 (E4) avec une tétrazine pour réaliser un couplage par IEDDA avec un groupement prosthétique radiomarqué portant un *trans*-cyclooctène. La

réaction est réalisée à température ambiante dans un mélange PBS/DMSO en 20 minutes avec un rendement corrigé de la décroissance de $47\pm 17\%$. Pour des applications en imagerie, ce couplage présente l'avantage de pouvoir être réalisé *in vivo*. Cependant, le *trans*-cyclooctène n'est pas très stable en milieu aqueux, il peut s'isomériser avant la réaction de couplage en donnant le composé *cis*, moins réactif que le composé *trans*. En milieu aqueux certaines tétrazines peuvent conduire à une ouverture du cycle donnant des composés 1,3,4-oxadiazole. Pour éviter l'ouverture du cycle les tétrazines sont souvent fonctionnalisées par des groupements aryles. Cette réaction est la plus rapide parmi les réactions de chimie "Click". Elle est souvent utilisée *in vivo* avec des fonctionnalisations adaptées au milieu biologique.

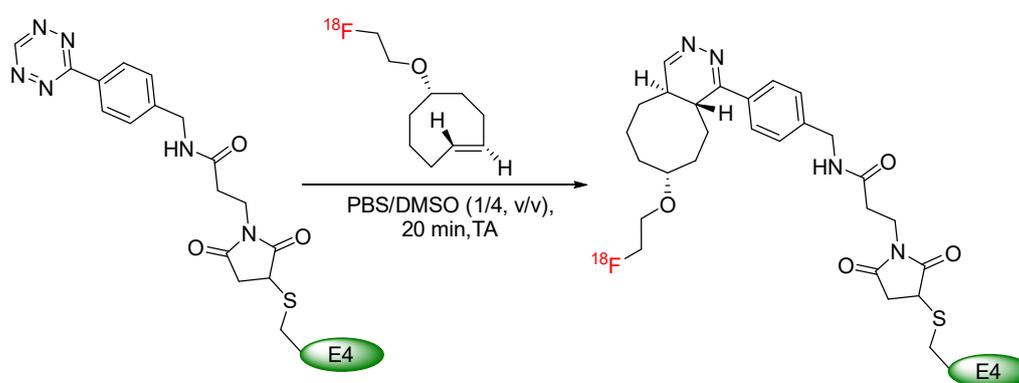


Figure 42 : Couplage d'un exendine-4 à un groupement prosthétique par IEDDA

V.4- Nature des groupements prosthétiques pour le radiomarquage de biomolécules

La nature du groupement prosthétique est importante car cela peut jouer sur la balance lipophilie/hydrophilie du radiotracer. Le groupement prosthétique doit être petit pour dénaturer le moins possible la biomolécule. La nature des groupements prosthétiques peut être très variable : aromatique, hétéroaromatique, simple chaîne aliphatique ou encore dérivés de sucre.

V.4.1) Les groupements prosthétiques aromatiques et hétéroaromatiques

De nombreux groupements prosthétiques aromatiques existent comme le $[^{18}\text{F}]\text{FBenzAmMeCC}$, le $[^{18}\text{F}]\text{FBenzAc}$, le $[^{18}\text{F}]\text{FSMeB}$ et le $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ (Figure 43).^[88]

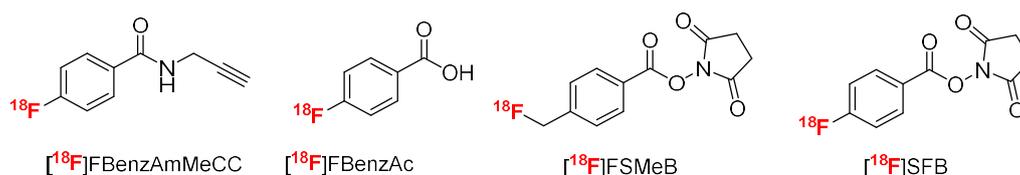


Figure 43 : Structures des $[^{18}\text{F}]\text{FBenzAmMeCC}$, $[^{18}\text{F}]\text{FBenzAc}$, $[^{18}\text{F}]\text{FSMeB}$ et $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$

Un des plus connus est le $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ couplé à de nombreuses biomolécules comme le $[1\text{-NaI}^4]\text{G-7039}$ via une réaction d'acylation.^[170] Il peut aussi être modifié et effectuer un couplage via une formation d'oxime (*Figure 44*),^[171,172] ou comme l'annevine V via une réaction d'acylation.^[173]

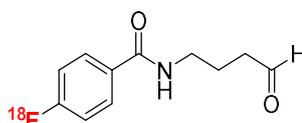


Figure 44 : Structure du 4- $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-N-(4-oxobutyl)-benzamide}$ ^[171]

La majorité des groupements prosthétiques hétéroaromatiques sont constitués d'un noyau pyridine. Ils sont utilisés en imagerie TEP dans le domaine de l'oncologie. Par exemple, le $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ (*Figure 45*)^[174] couplé à des biomolécules contenant un groupement propargyle. Le $[^{18}\text{F}]\text{FPyBrA}$ ^[52] (*Figure 45*) est un autre exemple de groupement prosthétique hétéroaromatique couplé à des oligonucléotides.



Figure 45 : Structures du $[^{18}\text{F}]\text{FPyZIDE}$ (à gauche) et du $[^{18}\text{F}]\text{FPyBrA}$ (à droite)

V.4.2) Les groupements prosthétiques à base de dérivés saccharidiques

Les propriétés physico-chimiques inhérentes aux peptides peuvent poser des soucis de biodistribution,^[175] limitant leur utilisation directe dans un contexte *in vivo*. Il a été démontré que l'introduction d'une unité saccharidique sur les peptides bioactifs réduit considérablement leur lipophilie et améliore par conséquent leur biodisponibilité, leur pharmacocinétique et leurs propriétés de clairance *in vivo*, qui sont des propriétés fondamentales pour les applications thérapeutiques et diagnostiques.^[112,176,177] Kessler *et al.* ont montré en 2001 avec le $[^{18}\text{F}]\text{Galacto-RGD}$ (*Figure 46*), l'impact du sucre sur la biodisponibilité du dérivé RGD.^[177] Dans le cas du $[^{18}\text{F}]\text{Galacto-RGD}$, le sucre n'est pas utilisé comme groupement prosthétique.

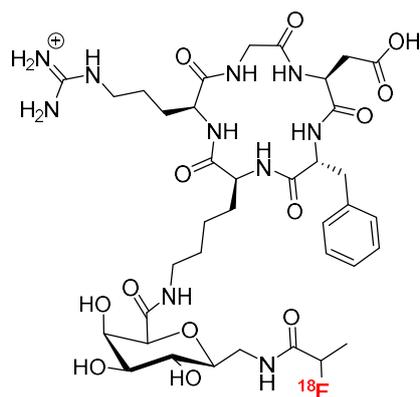


Figure 46 : Structure du $[^{18}\text{F}]$ Galacto-RGD

Les premiers groupements prosthétiques à base de dérivés saccharidiques ont été développés par Maschauer en 2007 avec le $\text{Ac}_3\text{-}[^{18}\text{F}]\text{FGlc-PTS}$ (Figure 47).^[178] Ce groupement prosthétique comme le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ présente un fluor-18 en position 2. L'incorporation du fluor-18 est réalisée avec un rendement non corrigé de la décroissance de 55%.

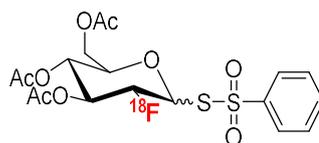


Figure 47 : Structure du $\text{Ac}_3\text{-}[^{18}\text{F}]\text{FGlc-PTS}$

Ce groupement prosthétique est fonctionnalisé par un groupement para-toluène sulfonique servant à l'accrochage d'une biomolécule, le c(RGDfC), via la formation d'une liaison disulfure. En 2009, Maschauer *et al.* ont développé une série de quatre groupements prosthétiques a, b, c et d (Figure 48)^[179] en configuration α et β et en mélange racémique. Ces groupements prosthétiques sont porteurs soit d'un azoture soit d'un alcyne en vue d'une réaction de CuAAC pour être couplé à la biomolécule. Le couplage est réalisé soit directement sur la position anomérique (c-d) soit avec un petit bras espaceur (a-b). Le fluor-18 est toujours introduit en position 2, les rendements de marquage sont assez faibles pour trois des groupements prosthétiques (a : 7%, b : 8-9%, c : $71\pm 10\%$ et d : 14%). Ces groupements prosthétiques ont été couplés à une glycine modifiée. Les auteurs ont montré que la glycosylation des peptides améliore les propriétés de biodistribution et la clairance *in vivo* des peptides.

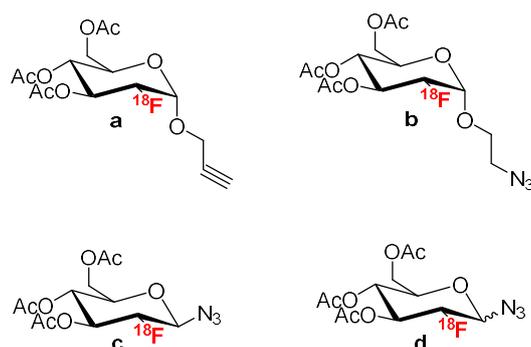


Figure 48 : Structures des quatre groupements prosthétiques synthétisés par Maschauer *et al.*

En 2010, Maschauer *et al.*^[180] ont utilisé le groupement prosthétique b (*Figure 48*) pour coupler la neurotensine (neuropeptide exprimé dans le tube digestif et le système nerveux central). Le traceur se dégradant totalement dans le sérum humain à 37°C après 30 minutes, ils ont choisi un dérivé du peptide RGD comme biomolécule montrant de meilleurs résultats. Le [¹⁸F]FGlc-RGD est utilisé en imagerie TEP pour visualiser l'expression des intégrines $\alpha v\beta_3$.

En 2014, Maschauer *et al.*^[181] ont changé de stratégie pour l'incorporation du fluor-18. Celui-ci n'est plus incorporé en position 2 du dérivé saccharidique mais en position 6 par laquelle les rendements de radiomarquage sont meilleurs 84% vs 71±10%. Deux nouveaux groupements prosthétiques, 6FGlc et Mlt (disaccharide), (*Figure 49*) sont synthétisés puis couplés via CuAAC à des dérivés RGD donnant les traceurs suivants : le [¹⁸F]6FGlc-RGD et le [¹⁸F]Mlt-RGD. Ces deux radiotraceurs sont utilisés en imagerie TEP pour imager des intégrines. En 2016, le 6FGlc a été aussi utilisé pour radiomarquer un dérivé ocréotide (TATE) via CuAAC. Le [¹⁸F]FGlc-TATE est utilisé en imagerie TEP pour imager les tumeurs positives aux récepteurs de la somatostatine.

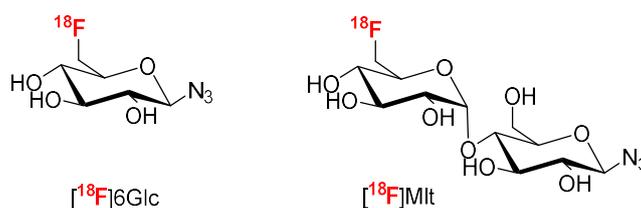


Figure 49 : Structures des groupements prosthétiques [¹⁸F]6FGlc et [¹⁸F]Mlt

En 2018, Maschauer *et al.*^[182] utilisent ce même GP pour radiomarquer un acide boronique couplé à un *N*-alkylaminoferrocène (*Figure 50*) utilisé comme prodrogue réagissant avec les espèces réactives à l'oxygène (Reactive species oxygen, ROS). Les ROS sont présents dans tout l'organisme et de manière plus importante dans les cellules cancéreuses. Le fluor-18 est

incorporé en position 6 avec un rendement de radiomarquage corrigé de la décroissance de 85%.

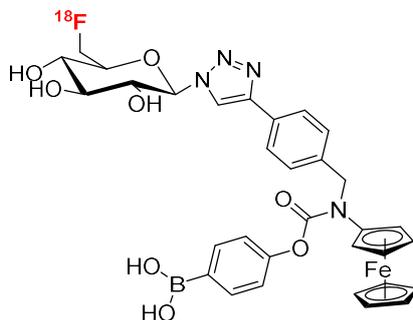


Figure 50 : Structure du radiotracteur^[182]

A partir de 2007, compte tenu de son expertise en chimie des sucres, notre laboratoire s'intéresse au développement de groupements prosthétiques à base de dérivés *O*-glycosidiques portant un fluor en position 6.^[113,117,183] En 2016,^[167] trois groupements prosthétiques à base de dérivés *O*-pyranosides, (*Figure 51*) le [¹⁸F]F- α -manno, le [¹⁸F]F- β -gluco et le [¹⁸F]F- α -gluco ont été publiés. Le fluor-18 est incorporé en position 6 avec des rendements radiochimiques corrigés de la décroissance respectifs de 58 \pm 3%, 68 \pm 6% et 54 \pm 5%. Ces trois groupements prosthétiques sont fonctionnalisés en position anomérique par un bras espaceur portant un groupement azoture dans le but d'être couplé à des dérivés du peptide RGD, pour des applications dans le domaine de l'oncologie. Cependant, ces groupements prosthétiques n'ont pas montré une stabilité optimale (environ 1h) pour des applications en imagerie, car ils sont sensibles aux glycosidases présentes dans le sang. La stabilité *in vivo* de ces composés a été testée par suivi CLHP à différents temps d'incubation : 0, 10, 30, 60, 90 et 120 minutes. Les travaux développés dans cette thèse trouvent ainsi leur origine dans ces premiers développements de groupes prosthétiques saccharidiques.

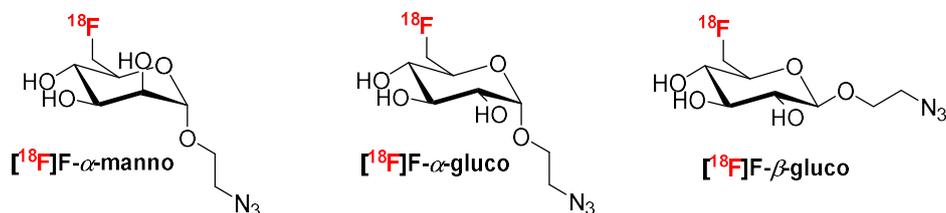


Figure 51 : Structures des trois groupements prosthétiques *O*-pyranosides développés au laboratoire

La stratégie de groupement prosthétique à base de sucre est donc très intéressante pour augmenter la biodisponibilité des biomolécules.

V.5- Marquage de biomolécules avec une sonde bimodale TEP/FPIR : vers la construction de MOMIAs

La création de MOMIAs est une stratégie judicieuse pour l'imagerie bimodale. Compte tenu de notre intérêt pour la combinaison TEP/FPIR, seules les sondes adaptées à cette application sont rapportées ici. Pour accéder à des systèmes applicables en TEP/FPIR, les possibilités de construction sont l'utilisation d'un radiométal ou du fluor-18 pour la TEP combiné à un fluorophore.

V.5.1) Radiométaux / fluorophore

De nombreux exemples de sondes bimodales avec des radiométaux pour la TEP et diverses sondes fluorescentes pour la FPIR sont décrits dans la littérature.^[1,87,184,185] Par exemple, Ghosh *et al.* ont développé un agent d'imagerie bimodale avec du cuivre-64 et une cyanine 7 (Figure 52).^[64] Le cuivre-64 est chélaté par une cage de type DOTA fonctionnalisée de manière à pouvoir être liée au fluorophore de type cyanine 7, l'IRDye800CW. La cage DOTA est également fonctionnalisée par un anti-corps (mAb7) ciblant des récepteurs exprimés dans des cellules cancéreuses. Cet agent bimodal est utilisé pour imager les tumeurs du cancer de la prostate.

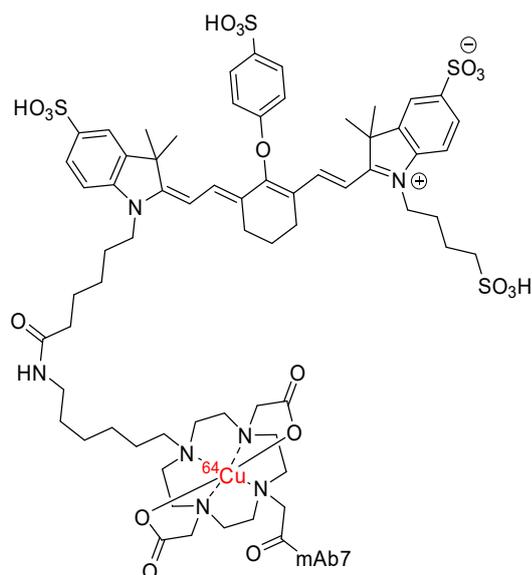


Figure 52 : Structure du [^{64}Cu]-DO2A-IRDye800CW-mAb7^[64]

Adumeau *et al.* ont développé une sonde bimodale avec un chélatant du cuivre-64 fonctionnalisé par une tétrazine et un anti-corps (huA33), portant quatre fluorophores (IRDye800CW) et un *trans*-cyclooctène^[1] (Figure 53). La tétrazine et le *trans*-cyclooctène se couple *in vivo* par une réaction de type IEDDA (Inverse Electron Demand Diels-Alder cycloaddition) pour former un cyclooctane. Dans un premier temps, l'anti-corps fonctionnalisé est injecté au petit animal. Les anticorps se distribuant très lentement, la sonde radiomarquée au cuivre-64 et fonctionnalisée avec une tétrazine est injectée seulement 48 heures après l'administration de l'anticorps. La bioconjugaison est réalisée *in vivo* par formation d'un cyclooctane. L'application de ses travaux a pour objectif de visualiser un carcinome colorectal.

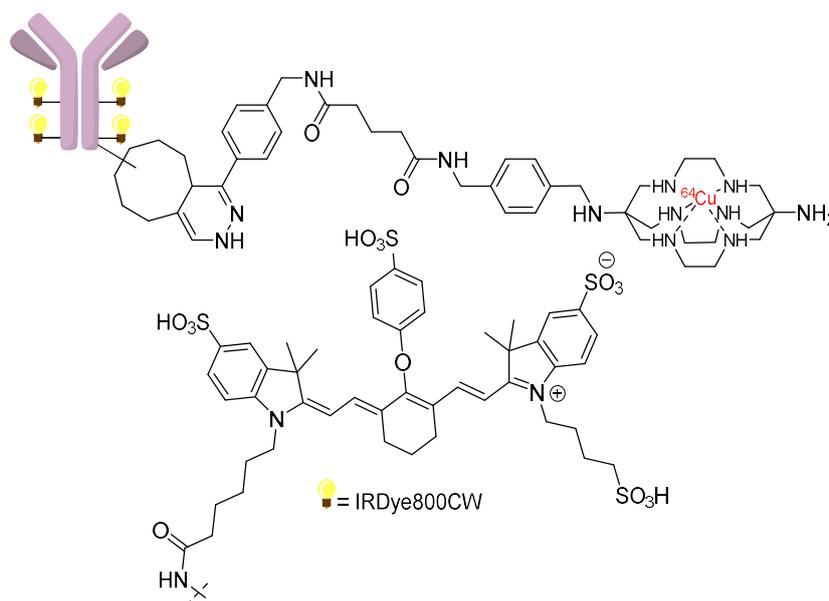


Figure 53 : Structure du $[^{64}\text{Cu}]$ -Tz-SarAr couplé à l'anticorps fonctionnalisé avec 4 IRDye800CW^[1]

La combinaison radiométaux/fluorophore s'applique la compréhension, le diagnostic et le traitement des diabètes de type 1 et l'insulinome (tumeur pancréatique rare).^[185] Cette sonde bimodale (Figure 54) est constituée d'un chélatant pour complexer le cuivre-64, d'une cyanine 5 et d'un peptide E4-F1 (exendine 4 fonctionnalisé pour le ciblage des récepteurs GLP-1R (glucagon-like peptide 1 receptor) exprimés dans les tumeurs pancréatiques.

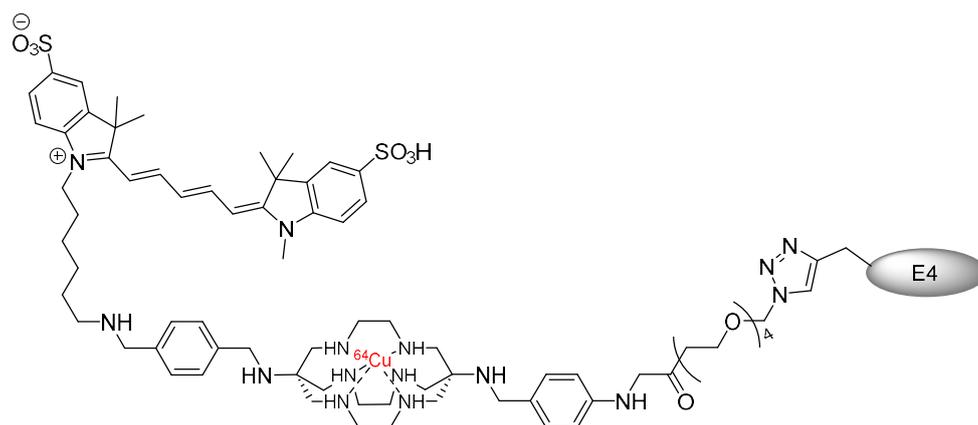


Figure 54 : Sonde bimodale [^{64}Cu]-E4-FI^[185]

Ces types d'agents d'imagerie bimodaux ont le potentiel pour faire de la chirurgie guidée et de l'histopathologie *ex vivo*, offrant ainsi accès à une approche théranostique. Plusieurs biomolécules sont couplées à ces sondes bimodales comme par exemple des dérivés RGD, des dérivés de la bombésine, de la neurotensine ou bien aussi l'octréotide (structures représentées dans le paragraphe V.1). Dans cette combinaison radiométal/fluorophore, beaucoup de dérivés de cyanine 7 ou de cyanine 5 sont utilisés pour leur gamme de longueurs d'onde idéale pour le proche-IR. Ces dérivés de cyanine sont souvent fonctionnalisés avec des sulfonates pour améliorer la solubilité.

Le nombre important d'exemples avec les radiométaux est dû à la facilité de mise en œuvre du radiomarquage par complexation. Cependant, les complexes radiométal/chélatant possèdent une stabilité *in vivo* moins élevée que celle d'un composé radiomarqué possédant une liaison covalente C-F. De plus, l'énergie émise lors de la désintégration du positon provenant d'un radiométal est plus élevée que celle du fluor donnant des images présentant une moins bonne précision.

À l'heure actuelle, cette combinaison TEP/FPIR implique majoritairement des radiométaux et très peu d'exemples existent avec du fluor-18.

V.5.2) Fluor-18 / fluorophore

Actuellement, il existe très peu d'exemples dans la littérature de sondes d'imagerie bimodales impliquant le fluor-18 pour l'imagerie TEP et une sonde fluorescente pour l'imagerie optique par FPIR. Quelques exemples mettant en œuvre une liaison B- ^{18}F existent dans la littérature. Ces composés borés portant un fluor-18 sont majoritairement des BODIPY^[92,186–188] tirant parti de la fluorescence de ceux-ci. Le fluor-18 est introduit par substitution d'un fluor-19

lié au bore (*Figure 55*). C'est un marquage par substitution isotopique ce qui abaisse forcément l'activité molaire.

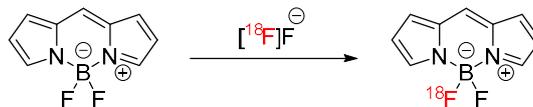


Figure 55 : Schéma de marquage au fluor-18 d'un BODIPY

Les travaux de Keliher *et al.* ont montré que l'activité molaire était au maximum de 2.7 GBq/ μ mol dans le cas du marquage des BODIPY.^[169] Une activité molaire de cet ordre de grandeur est faible comparée à celle obtenue avec le [¹⁸F]FDG par exemple qui est de 370 GBq/ μ mol. De plus, la liaison bore-fluor, connue pour être une liaison stable, a montré une certaine instabilité *in vivo*, d'après les travaux de Carlucci *et al.*^[188] De plus, la majorité des BODIPY n'émet pas dans la fenêtre spectrale du proche-IR.

Il existe également des entités B[¹⁸F]F₃ marqués de la même manière que les BODIPY comme le montrent les travaux de An *et al.*^[189] Certaines de ces sondes bimodales ont été couplées à des biomolécules.^[92,190,191] Par exemple, Rodriguez *et al.* ont couplé l'anti-corps mAb, par réaction d'acylation dans des conditions douces, à une sonde bimodale portant une cyanine 7 comme fluorophore et un dérivé borane de type B[¹⁸F]F₃ pour l'imagerie TEP (*Figure 56*).^[191]

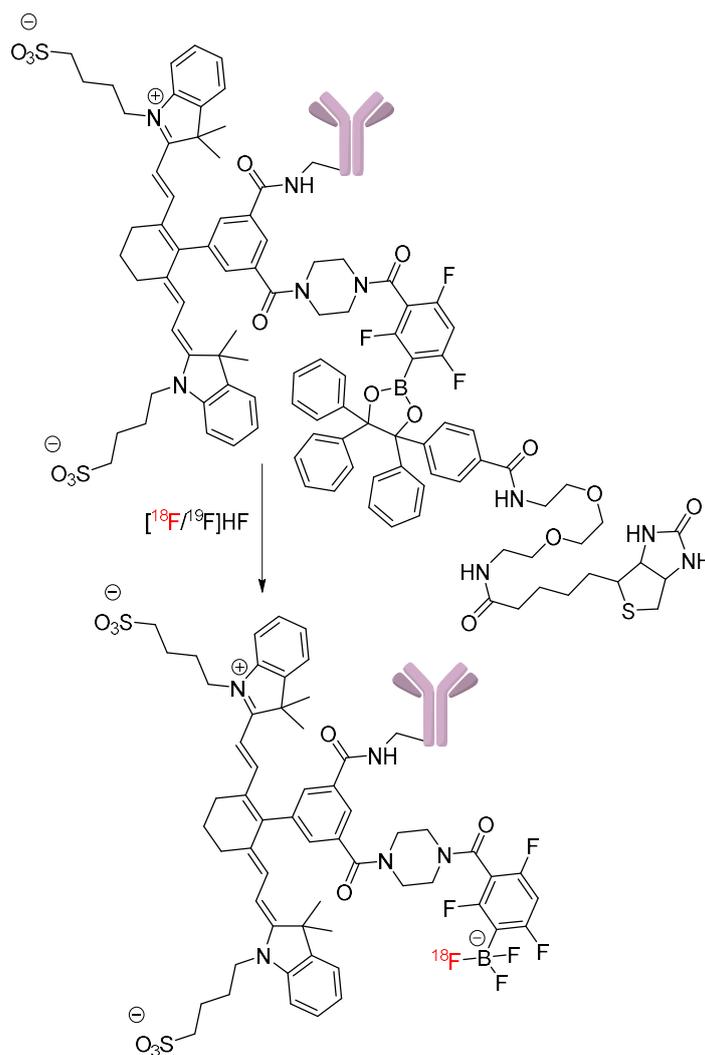


Figure 56 : Couplage par acylation de l’anti-corps mAb sur la sonde bimodale^[190]

La liaison carbone-fluor est plus stable *in vivo* et la stratégie de marquage permettant cette fluoruration donne une meilleure activité molaire. Il est donc très intéressant et innovant de construire des sondes bimodales comportant une liaison $^{18}\text{F-C}$. A ce jour, il existe, dans la littérature, un seul exemple décrivant une liaison carbone-fluor. Il s’agit des travaux de Priem *et al.*^[192] décrivant la synthèse d’une sonde bimodale TEP/FPIR avec un fluor-18 pour la TEP et une cyanine 5.5 pour la FPIR (*Figure 57*). Ils obtiennent un rendement de marquage corrigé de la décroissance compris entre 35 et 45% avec une pureté radiochimique comprise entre 80 et 95%. De plus, la cyanine 5.5 a un rendement quantique de 38% ce qui est un bon rendement. Ces résultats sont donc très intéressants pour le développement de sonde bimodale avec une liaison carbone-fluor. Cette sonde duale est couplée par formation d’un lien amide entre le groupe prosthétique portant une fonction acide activée par une hydroxysuccinimide et une cyanine portant une fonction amine. La cyanine porte une fonction amide pour améliorer sa solubilité, cette fonction n’est cependant pas idéale pour réaliser un couplage avec une

biomolécule. La sonde développée par Priem *et al.* ne comporte pas de fonction d'accrochage permettant le couplage à une biomolécule et n'est donc pas utilisable directement pour des applications en imagerie.

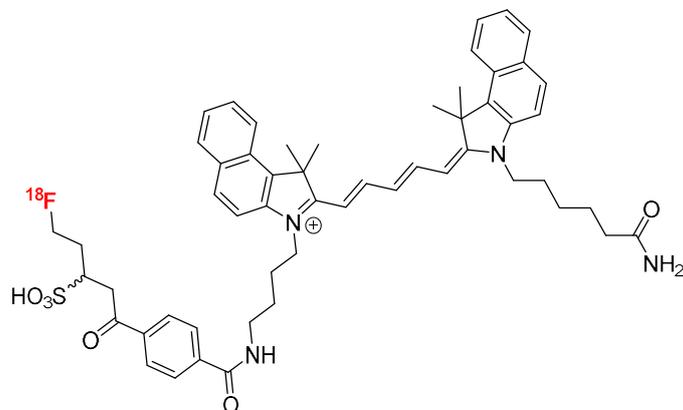


Figure 57 : Sonde bimodale synthétisée par Priem *et al.*

Il est donc innovant et pertinent de développer une sonde bimodale ayant une bonne stabilité *in vivo* et une bonne activité molaire, ce qui est possible avec la liaison carbone-fluor. Cependant, le challenge synthétique est important pour gérer l'orthogonalité des fonctions permettant l'incorporation du ^{18}F , du fluorophore ainsi que la biomolécule (*Figure 58*).

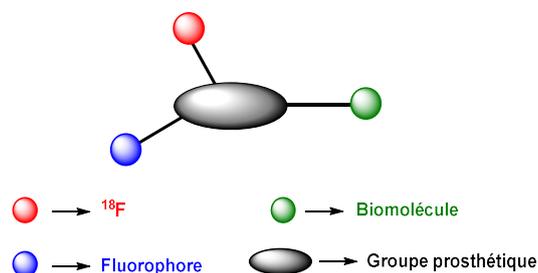


Figure 58 : Schéma général d'un agent dual fluoré TEP/FPIR à base d'un groupement prosthétique

CHAPITRE 2

SYNTHESE DE FLUORO C-GLYCOSIDES

ET CONJUGAISON AVEC DES DERIVES

RGD POUR DES APPLICATIONS EN

IMAGERIE TEP

I- Introduction et objectifs

Ce chapitre s'appuie sur des travaux préalablement réalisés au laboratoire concernant le développement de groupements prosthétiques *O*-glycosidiques (cf chapitre I, V.4.2). Les dérivés *O*-glycosides préalablement synthétisés ont été couplés à des biomolécules, notamment des peptides dérivés de la séquence RGD (Figure 59). Ces dérivés RGD sont utilisés pour le ciblage d'intégrines notamment $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$ respectivement surexprimées dans les plaquettes du sang et sur les cellules impliquées dans l'angiogénèse. Ces dérivés *O*-glycosides fluorés en position 6 ont montré l'intérêt de l'utilisation de dérivés saccharidiques comme groupement prosthétique. La radiofluoration sur la position 6 a permis de bons rendements d'incorporation et le couplage par CuAAC sur le bras anomérique s'est avéré efficace. L'effet inhibiteur de ces *O*-glyco-RGD a été évalué vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par un test d'agrégation plaquettaire. Les dérivés gluco-RGDC, **R2** et **R3** ont montré une activité inhibitrice de 26 et 66 μM pour les configurations α et β respectivement. Le dérivé α -mannose-RGDC **R1** et le dérivé β -glucose-c(RGDfC) **R4** ont une activité inhibitrice respective de 23 et 147.5 μM . Les dérivés glycopeptidiques linéaires obtenus ont donc montré une affinité notable *in vitro* envers les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le dérivé cyclique **R4** a donné des résultats intéressants *in vivo* sur un modèle d'inflammation en imagerie TEP.

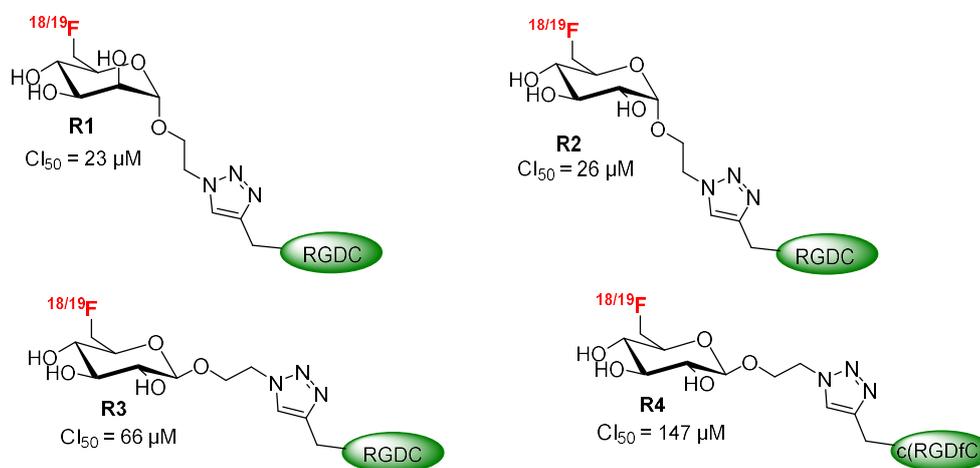


Figure 59 : Structures des dérivés *O*-glycosides pré-synthétisés

Cependant, ces dérivés ont montré une stabilité non optimale (environ 1h) dans le sérum humain. En effet, une dégradation due aux glycosidases provoquant la lyse de la liaison C-O anomérique est observée^[193] Afin d'augmenter la stabilité des dérivés *O*-glycosides, il a été envisagé de se tourner vers les dérivés *C*-glycosides, (Figure 60) la liaison C-C étant plus stable que la liaison C-O en milieu biologique.^[194–197]

Les groupements prosthétiques C-glycosidiques envisagés sont donc fonctionnalisés en tirant parti des résultats concernant les dérivés O-glycosidiques i.e. fluorés en position 6 et azidés sur un bras pseudo-anomérique. Ils sont ainsi liés à des peptides dérivés de la séquence RGD (Figure 60). Ces agents d'imagerie sont destinés au diagnostic en imagerie TEP dans le domaine de l'oncologie particulièrement.

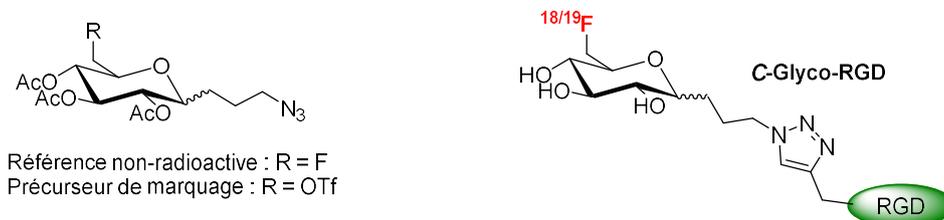


Figure 60 : Structures des dérivés C-glycosides envisagés

Dans le cadre du développement d'agents d'imagerie, il est nécessaire de synthétiser les références froides et les précurseurs de marquage correspondants. Une fois la synthèse des C-glyco-RGD réalisée en chimie non-radioactive, les agents d'imagerie sont radiosynthétisés sur automate. Ces agents d'imagerie ont pour cible les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$ respectivement impliquées dans la thrombose et l'angiogénèse tumorale. L'évaluation biologique *in vitro* et *in vivo* de ces agents d'imagerie sera réalisée.

Ce chapitre structuré en plusieurs parties débute par la rétrosynthèse des molécules envisagées suivie d'un aspect bibliographique concernant les méthodes de synthèse de C-glycosides. Ensuite, la synthèse du précurseur de marquage et de la référence froide du groupement prosthétique est présentée. La troisième partie décrit le couplage du groupement prosthétique aux dérivés RGD par une réaction CuAAC, la quatrième partie détaille les évaluations biologiques *in vitro* des glycopeptides synthétisés puis la cinquième partie décrit les études de dynamiques moléculaires réalisées sur les glyco-RGD. Enfin la radiosynthèse et l'imagerie *in vivo* de l'agent d'imagerie est présentée.

II- Rétrosynthèse de la référence froide et du précurseur de marquage

Dans un premier temps, la stratégie de synthèse permettant l'accès au précurseur de marquage et à sa référence froide est décrite. La référence froide est l'équivalent du radiotracer mais dans sa version non radioactive, c'est-à-dire comportant un fluor-19 classique et non un fluor-18. Cette référence froide est nécessaire car elle permet de caractériser par la suite, par

CLHP, le groupement prosthétique radioactif obtenu lors de la radiosynthèse. Le précurseur de marquage est la molécule comportant un bon groupe partant qui permet l'incorporation du fluor-18 via S_N2 pour former le groupement prosthétique radioactif. La stratégie de synthèse envisagée est décrite sur le schéma rétrosynthétique ci-dessous (Schéma 1) :

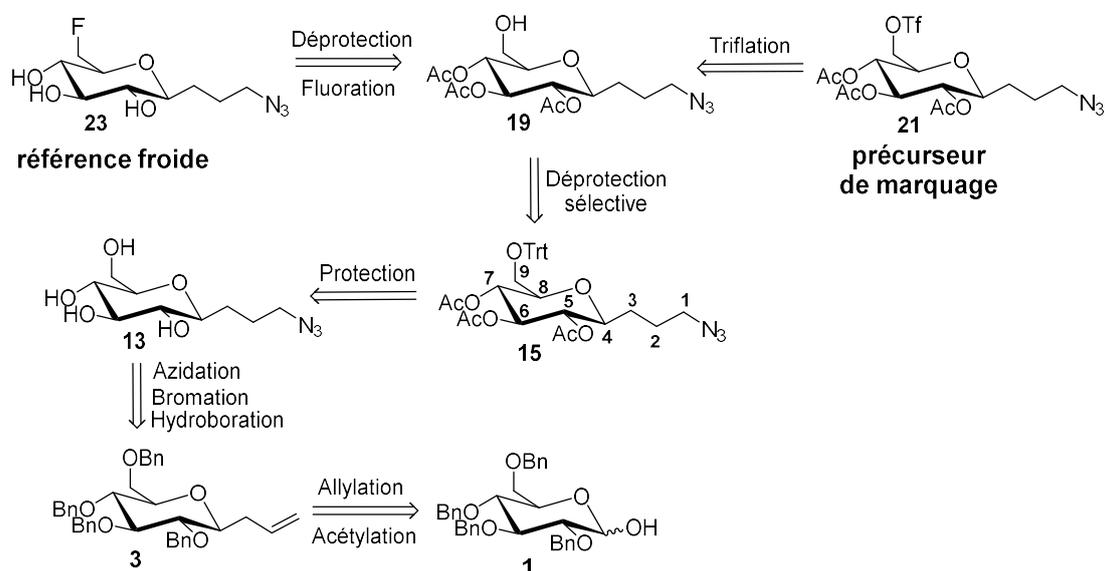


Schéma 1 : Schéma rétrosynthétique en série β

La synthèse commence à partir de la molécule **1** (2,3,4,6-tétrakis-*O*-benzyl- β -D-glucopyranose) qui est un produit commercial. La position anomérique de ce composé va être fonctionnalisée en premier lieu avec pour objectif de permettre un couplage entre le groupement prosthétique et différents peptides par l'intermédiaire d'un groupement azoture. Une fois la fonctionnalisation de la position anomérique terminée, une alternance de protection/déprotection des hydroxyles du dérivé C-glycoside est effectuée. Le composé **19** permet, par deux voies de synthèse différentes, d'obtenir le précurseur de marquage **21** et la référence froide **23**. Cette stratégie sera aussi utilisée pour l'anomère α .

Pour plus de commodité et simplifier la compréhension, la numérotation prise en compte pour les positions des groupements sur le dérivé saccharidique correspond à la numérotation classique des sucres et non pas la numérotation correspondant à la nomenclature IUPAC.

III- Principales méthodes de synthèse de C-glycosides : Aspect bibliographique

Avant d'aborder les résultats de ce chapitre, un rappel bibliographique concernant les principales méthodes de synthèse de C-glycosides est abordé. Ce paragraphe a pour objectif de

donner un aperçu des principales méthodes de synthèse puisque ces dérivés font l'objet de ces travaux de thèse.

Les *O*-glycosides sont des dérivés très utilisés en chimie et pour des applications biologiques. Cependant, les *O*-glycosides sont sensibles aux enzymes présentes *in vivo*. Pour palier à cet inconvénient, les *C*-glycosides sont une solution de choix car ils sont stables en milieu biologique, leur insensibilité face aux enzymes leur donne de l'intérêt pour des applications *in vivo*.^[194-198] Les *C*-glycosides sont utilisés dans la synthèse de produits ayant une application biologique et pharmaceutique.^[197,199] Il existe diverses méthodes de synthèse de dérivés *C*-glycoside dont quatre sont très couramment utilisées (Schéma 2).

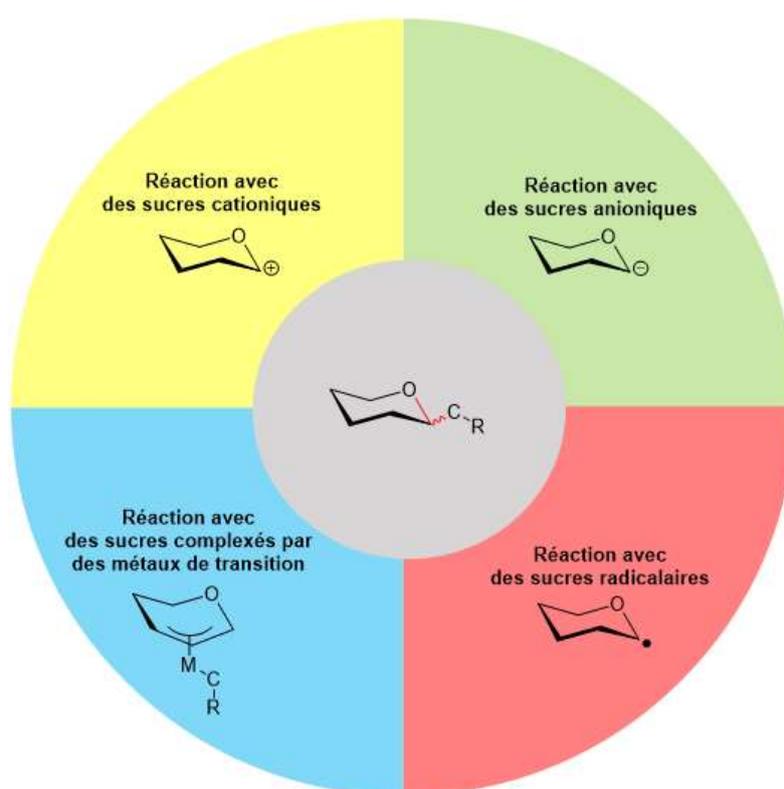


Schéma 2 : Principales méthodes de synthèse de *C*-glycosides

Les quatre principales méthodes indiquées sur le Schéma 2 ci-dessus sont illustrées par quelques exemples.

III.1.1) Synthèse de *C*-glycoside *via* des sucres électrophiles

La synthèse de *C*-glycoside mettant en œuvre un dérivé saccharidique électrophile est la méthode la plus souvent mise en œuvre (Schéma 3). Un dérivé saccharidique protégé est mis en présence d'un agent "promoteur" pour former un carbocation anomérique ou donner un

caractère électrophile au carbone anomérique, conduisant à une réaction avec une espèce nucléophile. Dans ce cas, le mécanisme peut être de type S_N1 ou S_N2 en fonction du carbocation formé en position anomérique. Le solvant joue un rôle important dans la formation du carbocation, ce qui influe aussi sur le type du mécanisme.

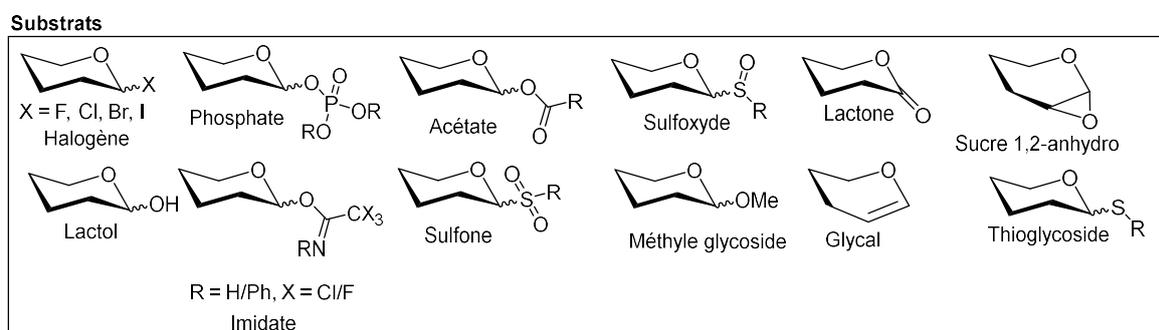
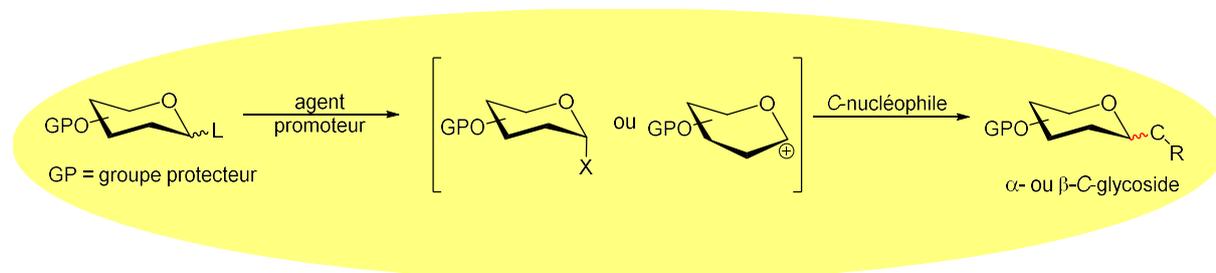


Schéma 3 : Synthèse de C-glycoside *via* un sucre électrophile

Comme le montre le Schéma 3, de nombreux dérivés saccharidiques peuvent être utilisés pour la synthèse des C-glycosides et seulement quelques uns sont illustrés dans ce paragraphe.

En 1982 Lewis *et al.*^[200] utilisent des lactones pour former des dérivés C-glycosides par introduction d'un motif alkyle. Leur méthode consiste à mettre une gluconolactone tétrabenzylée en présence de bromure d'allylmagnésium dans l'éther puis le triéthylsilane est ajouté pour réduire le lactol formé (*Schéma 4*).

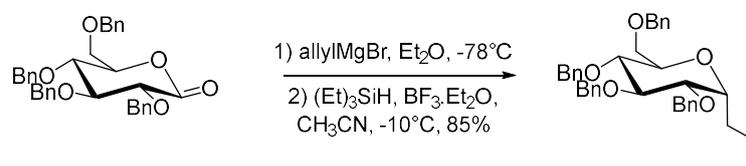


Schéma 4 : Formation d'un dérivé C-glycoside à partir d'une lactone

Les dérivés halogénés en position anomérique sont des électrophiles, ils sont activés par $BF_3.Et_2O$ et via un mécanisme de type S_N2 un C-glycoside de configuration β est obtenu. Les travaux de Misawa *et al.*^[199,201] décrivent la synthèse de la saponarine, molécule ayant une activité antioxydante, hypoglycémique et hématoprotective. La saponarine est synthétisée à partir d'un dérivé glycosidique tétrabenzylé portant un fluor en position anomérique. Cette

position est activée par $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, puis par réarrangement de Fries, le composé C-glycoside de configuration β (Schéma 5) est obtenu.

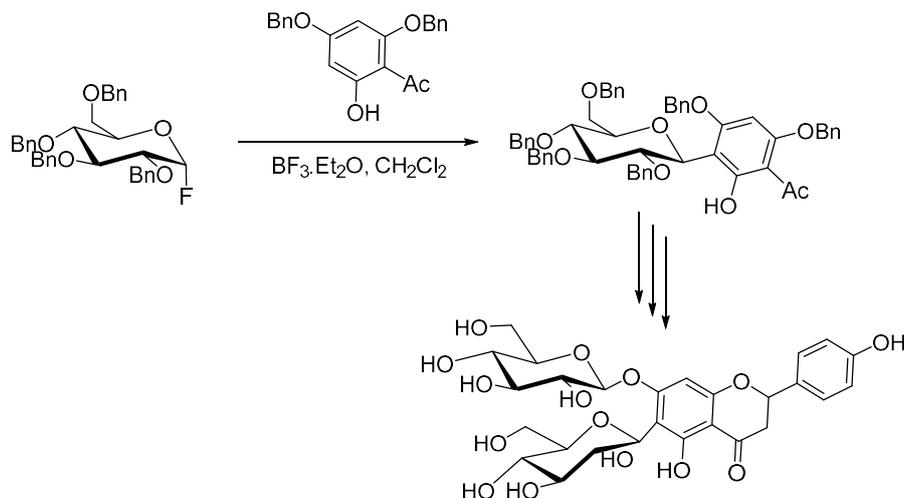


Schéma 5 : Synthèse de la saponarine

Les acétates sont également utilisés comme groupe partant dans les réactions visant à former des dérivés C-glycosides. Les travaux de Wiebe *et al.*^[202] décrivent la synthèse d'un dérivé C-glycoside par couplage d'un organostannane catalysé par le TMSOTf dans le dichlorométhane. Dans ces conditions, un intermédiaire triflé de configuration β est formé permettant la formation, du composé de configuration α par réaction avec l'organostannane (Schéma 6). Le composé est ensuite désilylé par l'ajout de fluorure de tétrabutylammonium.

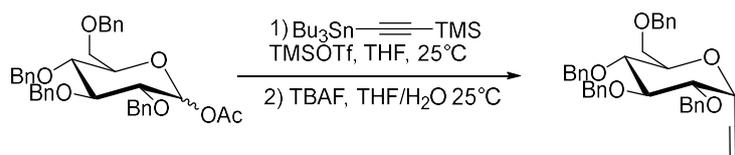


Schéma 6 : Synthèse d'un dérivé C-glycoside à partir d'un O-glycoside acétylé électrophile

Les imidates sont aussi des dérivés utilisés dans la synthèse de composés C-glycosides. Les travaux d'Ishida *et al.*^[203] décrivent la synthèse de la chafuroside A (Schéma 7). Le sucre est activé en position anomérique sous forme de trichloroacétimidate. Le départ de l'imidate est activé par le TMSOTf, puis la réaction avec le dérivé phénolique, par réarrangement de Fries, conduit au dérivé C-glycoside de configuration β .

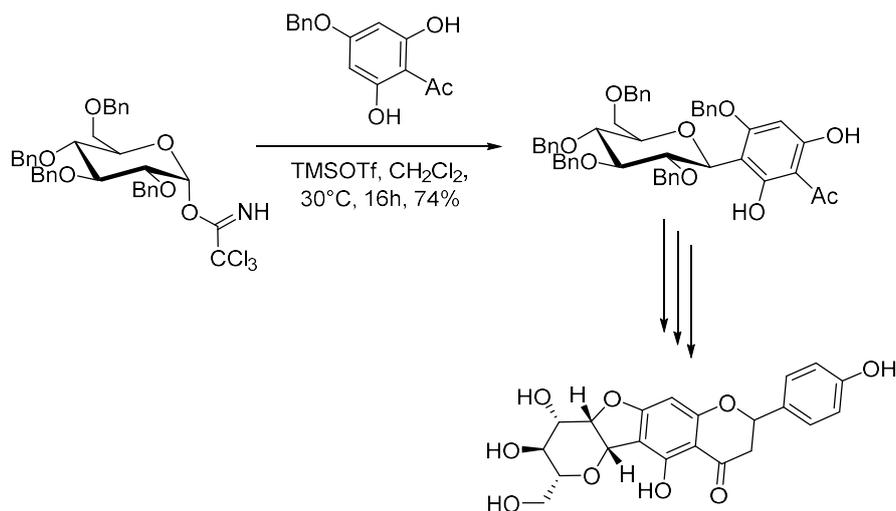


Schéma 7 : Synthèse de la chafuroside A

III.1.2) Synthèse de C-glycosides *via* des sucres nucléophiles

La synthèse de C-glycoside mettant en jeu des dérivés saccharidiques nucléophiles est représentée de manière schématique sur le Schéma 8. Un dérivé saccharidique protégé est mis en présence d'une base ou placé dans des conditions permettant la formation d'un carbanion anomérique réagissant avec un dérivé ayant un caractère électrophile.

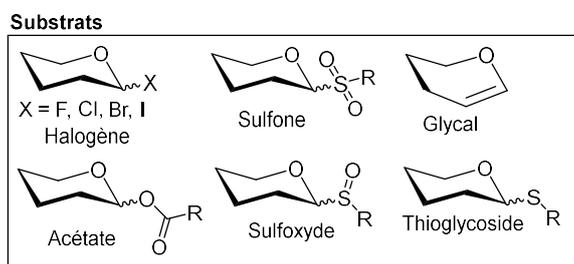
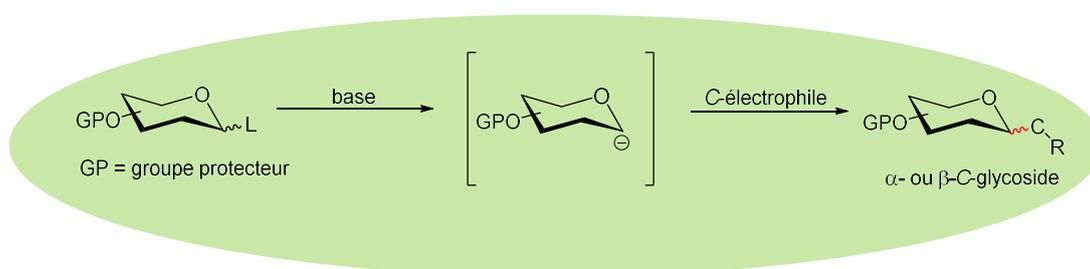


Schéma 8 : Synthèse de C-glycosides *via* un sucre nucléophile

Plusieurs dérivés saccharidiques peuvent être utilisés dans ce type de réaction comme par exemple les dérivés halogénés, les glycals ou les acétates.

Les travaux de Koyama *et al.*^[204] montrent la synthèse d'un C-glycoside à partir d'un glycal activé par métallation au *t*-BuLi puis une addition nucléophile sur le carbone portant la cétone conduisant alors à un alcool tertiaire (Schéma 9).

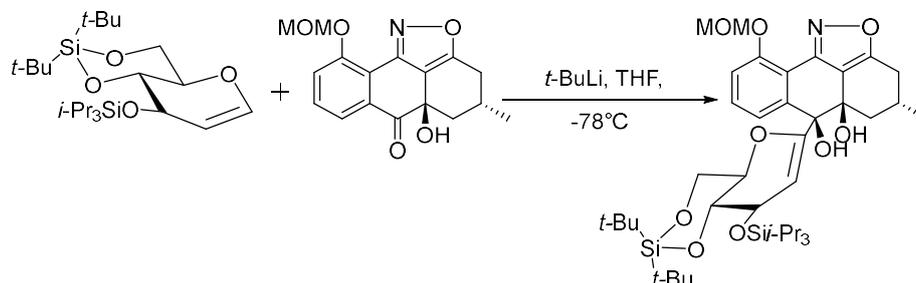


Schéma 9 : Synthèse d'un C-glycoside à partir d'un glycal

Les travaux de Li *et al.*^[205] décrivent la synthèse de dérivés C-glycosides à partir d'une pyridyl-sulfone. La sulfone est réduite par le diiodure de samarium formant une espèce glycosyl-samarium (III) en position anomérique en configuration β . L'acrylate de *tert*-butyl se coordine au glycosyl-samarium (III) puis le diiodure de nickel (II) réduit l'alcène en alcane formant le C-glycoside (Schéma 10).

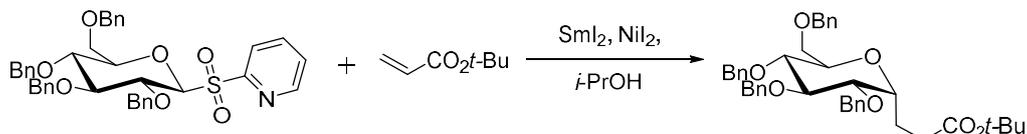


Schéma 10 : Synthèse d'un C-glycoside à partir d'un sucre sulfone

La synthèse d'un dérivé C-glycoside à partir d'un sucre bromé via un échange halogène-métal est illustrée par Lichtenhaler *et al.*^[206] Par attaque nucléophile sur le carbone électrophile de l'aldéhyde, le C-glycoside est formé (Schéma 11).

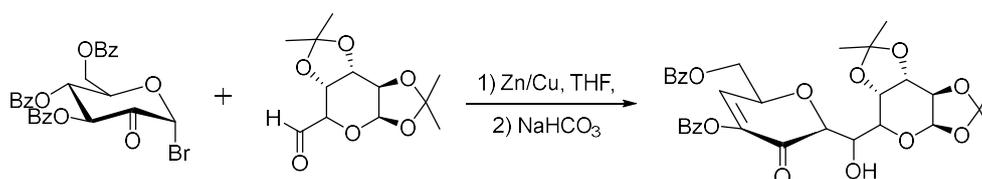


Schéma 11 : Synthèse d'un C-glycoside à partir d'un sucre chloré

III.1.3) Synthèse de C-glycoside *via* les métaux de transition

La synthèse de C-glycosides mettant en jeu un métal de transition peut être réalisée avec différents substrats de types : dérivés halogénés anomériques, 1,2-glycals activés ou non en position anomérique par un halogène (Schéma 12). De nombreux couplages organométalliques

interviennent dans la préparation de C-glycosides et deux exemples représentatifs sont décrits ici.

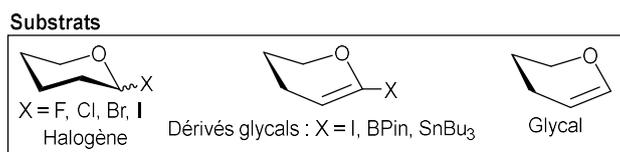
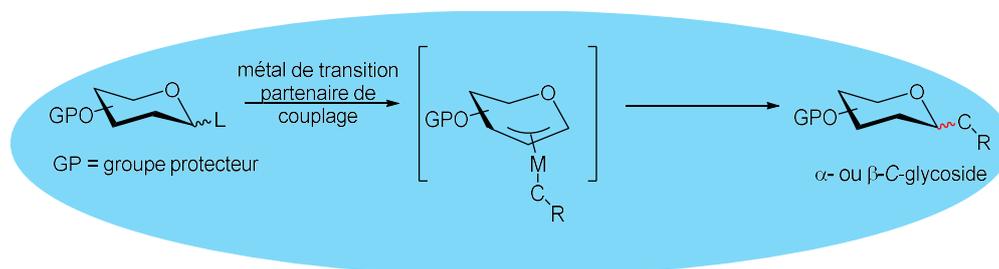


Schéma 12 : Formation de C-glycoside *via* un métal de transition

Par exemple les travaux de Hartung *et al.*^[207] décrivent la formation d'un C-glycoside par couplage pallado-catalysé entre un 1,2-glycol activé en position anomérique par un groupement stannylé et un dérivé bromé (*Schéma 13*).

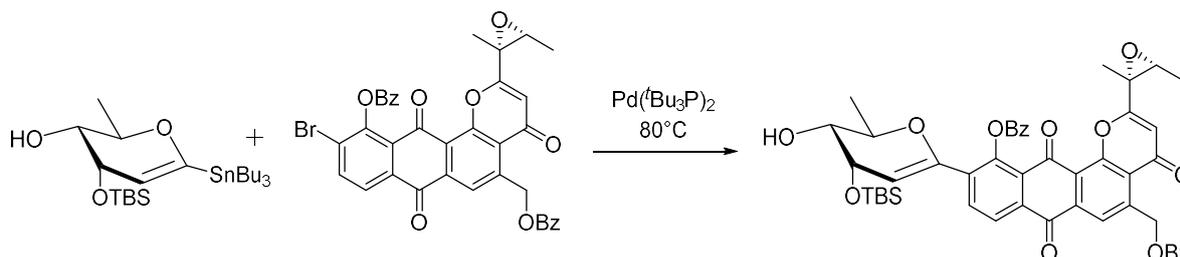


Schéma 13 : Synthèse de C-glycosides par couplage pallado-catalysé avec un 1,2-glycol stannylé en position anomérique

L'utilisation de dérivés halogénés dans la formation de C-glycosides peut être illustrée avec les travaux de Gong *et al.*^[208] Ils utilisent le couplage de Negishi pour former des C-glycosides en utilisant par exemple, un sucre tétrabenzylé bromé en position anomérique avec un dérivé du nickel comme catalyseur et un organozincique pour apporter le groupement alkyle (*Schéma 14*).

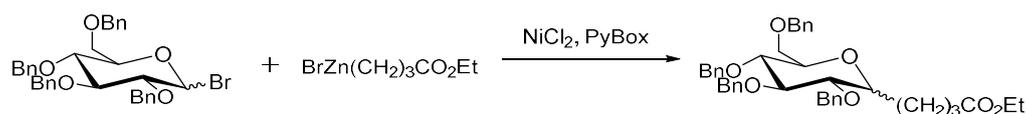


Schéma 14 : Synthèse de C-glycosides par couplage de type Negishi à partir d'un sucre halogéné

III.1.4) Synthèse de C-glycoside *via* des radicaux anomériques

La synthèse de C-glycoside par réaction radicalaire avec des radicaux anomériques peut être représentée de la manière suivante (*Schéma 15*). Le dérivé saccharidique protégé est mis en présence d'un initiateur de radicaux permettant la formation de radicaux anomériques réagissant sur un carbone électrophile.

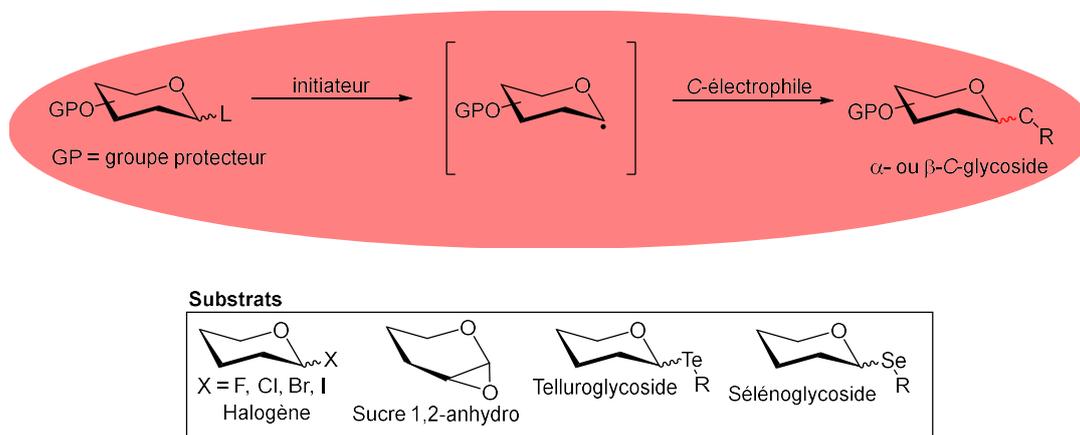


Schéma 15 : Formation de C-glycosides par réaction radicalaire

Les réactions radicalaires anomériques sont, par exemple, réalisées sur dérivés halogénés. Juhasz *et al.*^[209] décrivent la synthèse d'un C-glycoside en mettant un dérivé saccharidique bromé, en présence d'un complexe de chrome (II) pour initier le radical et le faire réagir avec l'acrylate de méthyle, formant le C-glycoside (*Schéma 16*).

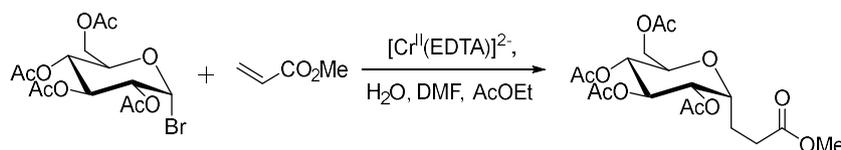


Schéma 16 : Formation d'un C-glycoside par réaction radicalaire

III.1.5) Autre méthode de synthèse

Le laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années à la synthèse de C-glycosides par réduction d'un *exo*-glycal, composé insaturé avec une double liaison *exo*-cyclique anomérique.^[210] Par exemple, la réduction d'une double liaison tétrasubstituée conduit à des composés C-glycosyl avec la formation d'un nouveau centre chiral (*Schéma 17*). Cette réduction requiert des conditions assez dures (50 bars de H₂ en présence de dioxyde de platine pendant 24h) lorsque R₁ est un substituant aryl. Lorsque le substituant R₁ est un hydrogène, l'hydrogénation en présence de palladium sur charbon sous une pression de 3 bars conduit au

C-glycoside correspondant avec un excellent rendement. Dans tous les cas, la réduction se produit stéréospécifiquement sur la face β qui est la moins encombrée du glycal.

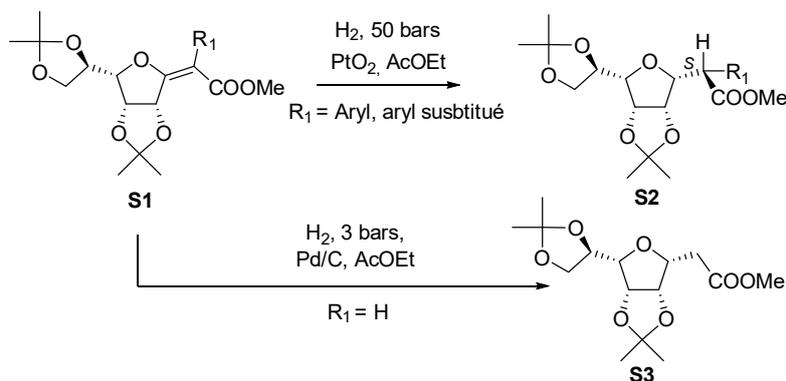


Schéma 17 : Réduction d'*exo*-glycal pour former des C-glycosides

Ces exemples illustrent la diversité des méthodes d'accès aux composés de type C-glycoside. Dans notre cas, la méthode de synthèse utilisée requiert un dérivé saccharidique portant un acétate en position anomérique.

IV- Synthèse de groupements prosthétiques C-glycosidiques

La synthèse du groupement prosthétique débute par l'introduction d'un bras allylique en position anomérique puis sa fonctionnalisation. La fonctionnalisation régiosélective de la position 6 sera ensuite réalisée.

IV.1- Introduction d'un bras allylique en position anomérique

L'installation du bras allylique en position anomérique nécessite l'activation de cette position sous forme d'acétate. A partir du tétrabenzyl-D-glucose commercial, le composé **2** est obtenu avec un rendement quantitatif par action de l'anhydride acétique dans la pyridine.^[211] Dans ces conditions le dérivé acétylé **2** obtenu est un mélange des deux isomères de configurations (*Schéma 18*).

Deux méthodes différentes, inspirées de la littérature, sont utilisées pour introduire le bras allylique conduisant chacune majoritairement à l'anomère α ou β (*Schéma 18*). L'anomère β est obtenu en deux étapes (méthode A) : la première étape consiste à substituer l'acétate par un iode, ce qui permet dans un second temps d'introduire le bras allylique. Le dérivé iodé de configuration alpha sur lequel une réaction S_N2 avec le bromure d'allylmagnésium est réalisée

conduit majoritairement au dérivé de configuration β . Cette réaction se déroule dans le dichlorométhane anhydre avec de l'iodure de triméthylsilane et du bromure d'allylmagnésium.^[212,213] L'intermédiaire iodé préparé est instable et doit donc être conservé sous atmosphère inerte tout au long de la réaction pour éviter qu'il se dégrade. L'instabilité de cet intermédiaire rend la mise en œuvre de cette réaction assez délicate. Le rendement de cette réaction est de 65% avec des proportions β/α : 95/5.

L'anomère α est obtenu avec le triméthylsilane d'allyle et le trifluorure de bore diéthylétherate dans l'acétonitrile (méthode B)^[214] avec un rendement de 74% avec des proportions β/α : 20/80.^[212] Dans ce cas, un intermédiaire oxonium est formé avec une double liaison C=O orientant l'attaque du groupement allyle majoritairement en configuration α . Pour les deux méthodes, les C-glycosides α **3** et β **4** sont obtenus en mélange et sont séparés par chromatographie sur gel de silice.

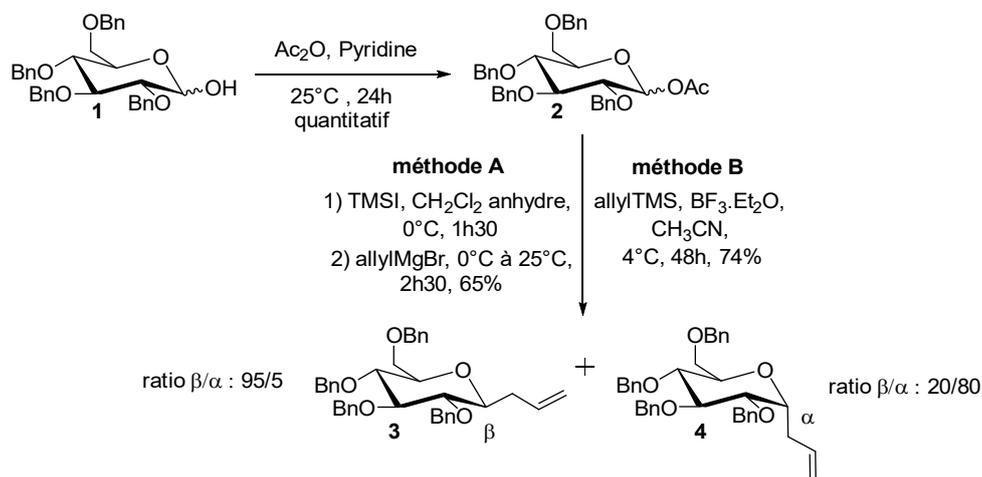


Schéma 18 : Synthèse des composés **3** et **4**

Le bras allylique installé sur le carbone pseudo-anomérique est ensuite modifié afin d'introduire un motif azoture.

IV.2- Introduction d'un azoture

L'objectif des prochaines des étapes de cette synthèse est de fonctionnaliser le bras allylique préalablement introduit sur le carbone pseudo-anomérique. Cette fonctionnalisation est articulée en quatre étapes : une hydroboration, une bromation, une hydrogénolyse et une azidation. La synthèse est effectuée sur les deux anomères séparément.

Deux modes opératoires ont été essayés pour l'étape d'hydroboration, l'un avec BH₃ et l'autre avec le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN). Le mode opératoire avec BH₃ nécessite

un traitement délicat par une quantité importante d'un mélange H₂O₂/NaOH (2M) (réaction fortement exothermique). Dans ce cas, les composés **5** (anomère β) et **6** (anomère α) sont obtenus tous les deux avec un rendement de 46%. Le mode opératoire avec le 9-BBN nécessite l'emploi d'une quantité plus faible du mélange H₂O₂/NaOH (2M) et dans ce cas, le rendement est de 97% pour **5** et 93% pour **6**. Ce mode opératoire a donc été retenu (Schéma 19).^[215] Cette étape est réalisée sur une quantité de 4 g au maximum. Au-delà de cette quantité, le rendement diminue de manière significative.

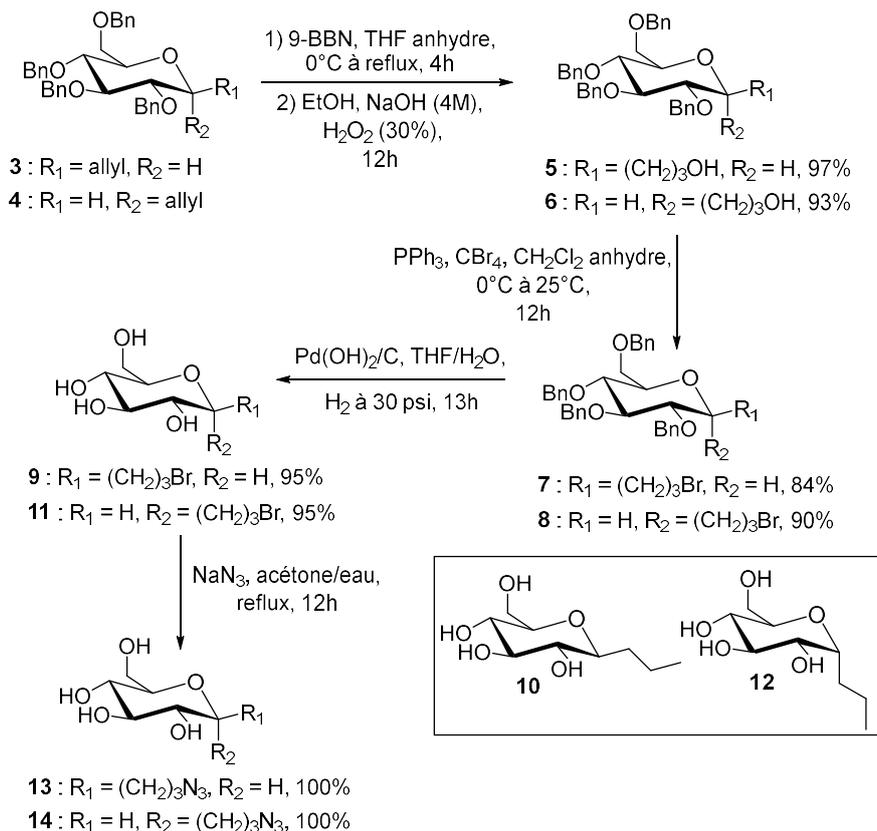


Schéma 19 : Synthèse des composés **13** et **14**

La seconde étape consiste à substituer le groupement hydroxyle terminal par un brome. La réaction est réalisée dans le dichlorométhane anhydre avec PPh₃ et CBr₄ (Schéma 19).^[216] Les composés **7** et **8** sont obtenus avec des rendements respectifs de 84% et 90%.

La troisième étape consiste à déprotéger les fonctions alcools (Schéma 19). Cette étape a nécessité une optimisation des conditions opératoires en faisant varier le solvant, le catalyseur, le temps de réaction et la pression de dihydrogène dans le but d'obtenir des produits totalement déprotégés avec un rendement optimum (Schéma 19). Les différents résultats obtenus pour cette réaction sont rassemblés dans le Tableau 6. La réaction d'hydrogénolyse dans le 1,4-dioxane avec du Pd(OH)₂ (20%, w/w) ne conduit pas aux produits débenzylés **9** et **11**, le produit de départ n'est pas consommé (Tableau 6, entrée 1). L'hydrogénolyse des composés **7** et **8** a

ensuite été réalisée dans un mélange THF/H₂O avec du Pd(OH)₂ (20%, w/w). Lors de ces réactions d'hydrogénolyse, la formation d'un sous-produit **10** et **12** a été observée par RMN ¹H avec l'apparition d'un triplet à 0.9 ppm indiquant la présence d'un CH₃ et la disparition du motif CH₂Br. Dans ces conditions d'hydrogénolyse, la liaison CH₂-Br peut être clivée donnant un motif CH₃. L'objectif est donc double : un rendement optimum en **9** et **11** et limiter la formation de **10** et **12**. L'hydrogénolyse des composés **7** et **8** a d'abord été réalisée sur une petite quantité (500 mg) avec une pression de H₂ de 50 psi, pendant 3h30 donnant les composés **9** et **11** avec un rendement de 99% (Tableau 6, entrée 2). Ensuite un scale-up a été réalisé, la quantité a été augmentée de 500 mg de sucre tétrabenzylé à 5 g. Avec une pression de H₂ de 50 psi et un temps de réaction de 13 heures, les composés **9** et **11** ont tous deux été formés avec un rendement de 66%, les composés **10** et **12** ont été formés à hauteur de 34% (Tableau 6, entrée 3). Ces conditions opératoires ne sont donc pas optimales pour cette réaction. Il a été choisi de diminuer le temps de réaction à 6 heures et d'augmenter la pression de H₂ à 60 psi. Ces conditions opératoires ont permis d'obtenir les composés **9** et **11** avec un rendement de 80% et les composés **10** et **12** avec un rendement de 20% (Tableau 6, entrée 4). Dans le but de réduire la formation des composés **10** et **12**, la pression de H₂ a été diminuée à 40 psi. Dans ces conditions, les produits **9** et **11** ont été formés avec un rendement de 89% et les composés **10** et **12** avec un rendement de 11% (Tableau 6, entrée 5). La formation des composés **10** et **12** ayant diminuée avec la pression de H₂, la pression de H₂ a encore été diminuée à 33 psi. A cette pression, avec un temps de réaction de 13 heures, les composés **9** et **11** sont obtenus avec un rendement de 95% et les composés **10** et **12** avec un rendement de 5%. Ces conditions opératoires sont satisfaisantes (Tableau 6, entrée 6) sur une quantité de 5g de dérivé C-glycosidiques. Les produits **10** et **12** ayant des rapports frontaux très proches des produits **9** et **11**, ils ne sont pas séparables à ce stade. La synthèse est poursuivie avec ce mélange de produits, ce qui n'a pas posé de souci étant donné la très faible proportion de composés débromés.

Tableau 6 : Essais d'hydrogénolyse

Entrée	Solvant	Pression de H ₂ (psi)	Temps (h)	Rendement 9/11 (%)	Produit débromé 10/12 (%) ^a
1	1,4-dioxane	33	4	0	0
2	THF/eau	50	3.5	99	0
3	THF/eau	50	13	66	34
4	THF/eau	60	6	80	20
5	THF/eau	40	13	89	11
6	THF/eau	33	13	95	5

^abasé sur l'intégration du signal du groupe CH₃ en RMN ¹H

La dernière étape de fonctionnalisation du bras est une azidation. Pour cette étape, deux modes opératoires ont été essayés : dans le DMF à 50°C pendant 13 heures avec 5 éq de NaN₃^[217] et dans un mélange acétone/eau (6/1) porté à reflux pendant 13 heures avec 2 éq de NaN₃^[218] (*Schéma 19*). Le rendement obtenu avec ces deux modes opératoires est quantitatif, ce qui est très satisfaisant. Le mode opératoire utilisant le mélange acétone/eau, plus facile à éliminer que le DMF, et nécessitant moins d'équivalents de NaN₃ a été néanmoins préféré. Les composés **13** et **14** sont obtenus avec un rendement quantitatif après purification.

IV.3- Fonctionnalisation de la position 6

La position 6 doit être fonctionnalisée de manière régiospécifique, par un fluor pour la référence froide et par un triflate pour le précurseur de marquage.

IV.3.1) Synthèse du précurseur de marquage

L'obtention du précurseur de marquage se fait à partir des composés **13** et **14** en trois étapes : une tritylation/acétylation "one pot", suivi d'une détritylation et d'une triflation.

La première étape consiste à protéger régiosélectivement l'hydroxyle en position 6 par un groupe trityle suivie d'une acétylation des hydroxyles secondaires.^[219] Cette réaction est réalisée en "one pot", dans la pyridine avec du chlorure de trityle (TrCl) et de la 4-diméthylaminopyridine (4-DMAP). L'incorporation de ce groupement étant longue, le milieu réactionnel est chauffé à 45°C pour accélérer la réaction (*Schéma 20*). Au cours de cette étape, les composés **10** et **12** présents en faible quantité, ont été également tritylés et acétylés ce qui a

permis, à ce stade, de les séparer lors de la purification sur gel de silice. Les composés **15** et **17** sont obtenus avec des rendements respectifs de 62% et 69%.

La seconde étape consiste à déprotéger de manière sélective la position 6 (Schéma 20). Le premier mode opératoire utilisé est réalisé avec de l'acide formique dans l'éther.^[220] La déprotection se produit en 45 minutes avec un rendement après purification de 52% et 48% respectivement pour les composés **19** et **20**. Dans le but d'optimiser le rendement de cette déprotection, d'autres conditions opératoires sont essayées. Cette réaction est réalisée à température ambiante dans le dichlorométhane avec une solution de 20% de TFA dans le dichlorométhane.^[221] Le rendement obtenu pour les composés **19** et **20** est de 60%. Finalement, la réaction a été réalisée à 0°C dans le dichlorométhane avec une solution de 20% de TFA dans le dichlorométhane en 15 minutes. Les rendements après purification des composés **19** (configuration β) et **20** (configuration α) sont respectivement de 73% et 70%.^[193]

La troisième étape est une triflation de l'hydroxyle primaire.^[222] La réaction est réalisée dans le dichlorométhane avec de la pyridine et de l'anhydride triflique (Schéma 20). Le produit brut est purifié très rapidement par chromatographie sur gel de silice afin d'éviter toute dégradation. Les précurseurs de marquage **21** et **22** sont obtenus après purification avec des rendements respectifs de 80% et 48%. Ils seront utilisés ultérieurement pour effectuer les radiosynthèses des groupements prosthétiques.

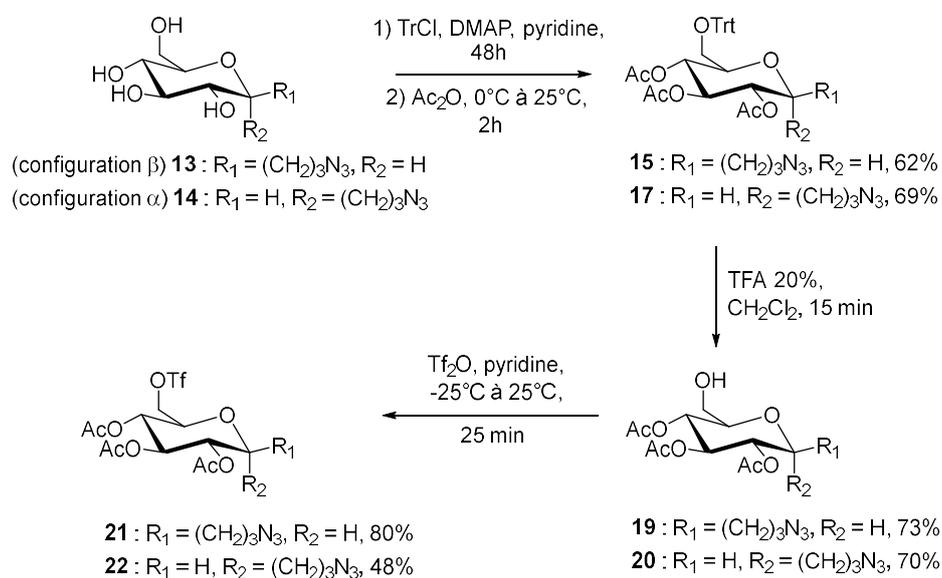


Schéma 20 : Synthèse des précurseurs de marquage **21** et **22**

IV.3.2) Synthèse de la référence froide

Les références froides sont synthétisées en deux étapes à partir des composés **19** et **20**.

La fluoruration de l'hydroxyle primaire est réalisée dans le diglyme avec le DAST comme agent de fluoruration.^[27] Les composés **23** et **24** sont obtenus avec des rendements de 61% et 52% respectivement (Schéma 21).

La déprotection des acétates se fait à température ambiante en une heure par action du méthanolate de sodium formé *in situ* dans le milieu réaction.^[223] Les composés **25** et **26** sont obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice avec des rendements quantitatifs (Schéma 21).

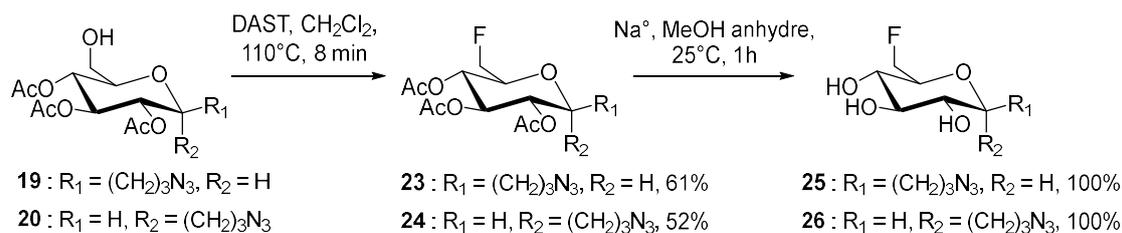


Schéma 21 : Synthèse des références froides

V- Synthèse de glycopeptides par conjugaison avec des dérivés de RGD

Les références froides des groupements prosthétiques étant synthétisées, différents glycopeptides obtenus par conjugaison avec des dérivés RGD ont été préparés. Ces composés sont utiles pour les études biologiques *in vitro* et pour la caractérisation des radiotraceurs.

Les dérivés RGD sont des ligands des intégrines dont il convient de rappeler ici brièvement les principales caractéristiques et propriétés. Les intégrines sont des protéines hétérodimériques impliquées dans les voies de signalisation de l'angiogénèse. L'intégrine la plus étudiée est l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui représente un biomarqueur très spécifique en particulier pour surveiller la progression des tumeurs. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, protéine transmembranaire, est également très étudiée. Sa fonction physiologique est intimement liée au processus d'activation plaquettaire de la thrombose.^[108,118,119] Grâce à sa capacité à se lier aux intégrines, le RGD est la séquence peptidique la plus étudiée.^[98,99] Les dérivés linéaires contenant cette séquence RGD ont été les premiers étudiés mais ont montré de faibles affinités et une dégradation dans un environnement biologique. Les dérivés RGD cycliques tel que le c(RGDfK) ou le c(RGDyC) possédant une conformation plus contrainte de la séquence montrent une meilleure stabilité *in vivo* et une meilleure affinité avec certaines intégrines.^[100,108,111] Les sondes radiomarquées couplées à des dérivés RGD sont utilisées dans la recherche sur le cancer (intégrine $\alpha_v\beta_3$) pour réaliser des

diagnostics,^[101,108,109,119] mais aussi appliquées en biologie plaquettaire et pour l'imagerie de la thrombose (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$).^[108,116-119]

V.1- Propargylation des peptides RGDC et c(RGDfC)

Les peptides choisis ici sont des dérivés de la séquence RGD : un composé linéaire RGDC et un composé cyclique c(RGDfC). Dans le but de coupler par liaison covalente les peptides et les dérivés glycosidiques, il faut au préalable fonctionnaliser les peptides. Au sein du laboratoire, une méthode de propargylation régiosélective de peptides contenant une cystéine a été développée précédemment. La propargylation consiste à additionner du bromure de propargyle sur les dérivés commerciaux RGDC **27** et c(RGDfC) **28** en présence d'hydroxyde d'ammonium dans un mélange H₂O/MeOH (Schéma 22).^[117,224] Cette méthode de fonctionnalisation tire son efficacité de la forte réactivité de la fonction thiol de la cystéine qui réagit très facilement avec le bromure de propargyle.

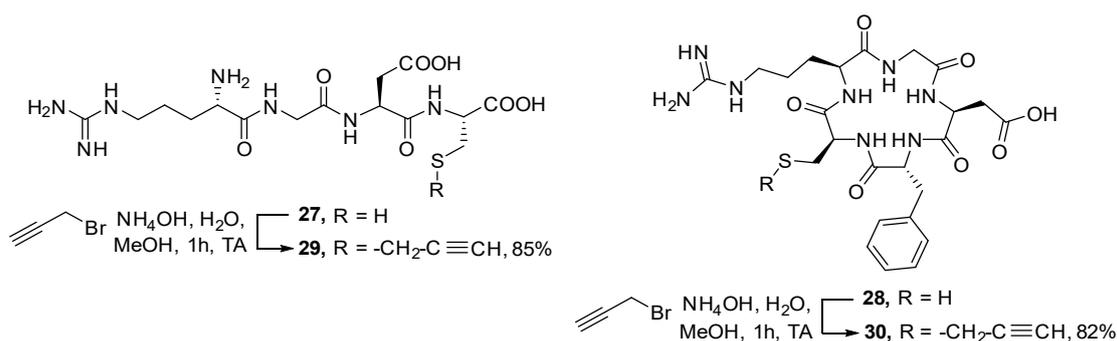


Schéma 22 : Propargylation des peptides RGDC et c(RGDfC)

La propargylation conduit aux peptides propargylés **29** et **30**, avec des rendements respectifs de 85% et 82%. Ces deux composés sont utilisés par la suite sans purification.

V.2- Couplage par CuAAC

Le couplage des peptides *S*-propargylés **29** et **30** avec les dérivés *C*-glycosidiques **25** et **26** est réalisé par CuAAC (Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition).^[113,117,166] C'est une réaction régiosélective de cycloaddition conduisant à un triazole 1,4 disubstitué et réalisée dans des conditions douces, rapides et sans formation de sous-produits. La réaction se fait dans l'eau avec du Cu(OAc)₂ et de l'ascorbate de sodium comme agent réducteur (Schéma 23).

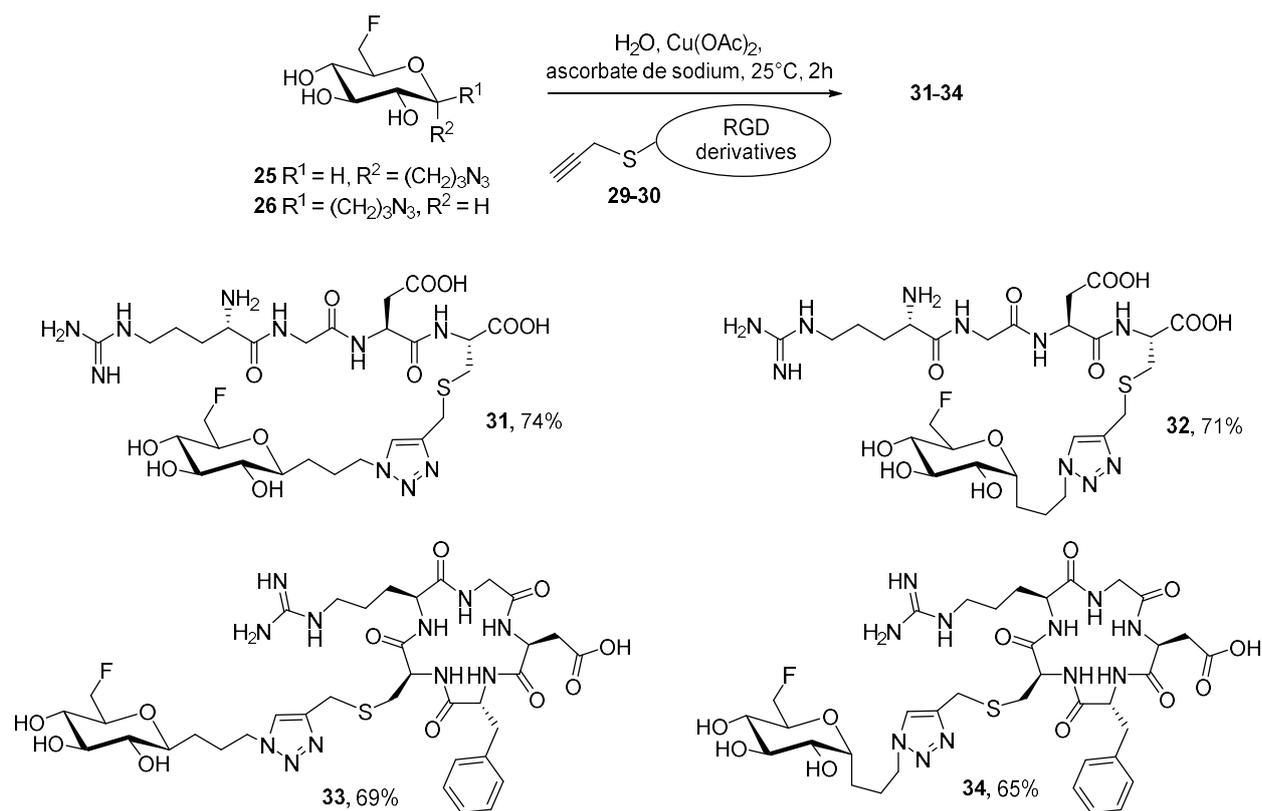


Schéma 23 : Synthèse et structure des différents glycopeptides

Les composés **25** et **26** ainsi que les peptides **29** et **30** sont mis en réaction à température ambiante pendant deux heures. Après contrôle par CCM pour observer la consommation du dérivé glycosidique, la réaction est stoppée par ajout de résine échangeuse de cations (Chelex®). Le milieu réactionnel est ensuite filtré puis lyophilisé. Les composés **31**, **32**, **33** et **34** sont obtenus après purification sur colonne d'exclusion stérique (LH20®) avec des rendements respectifs de 74%, 71%, 69% et 65%. Dans le cas du peptide cyclique, les synthèses des glycopeptides sont mises en œuvre sur une très petite quantité de peptide, de l'ordre de 5 mg, ceci étant dû à son coût élevé.

VI- Evaluation biologique *in vitro* des glycopeptides

L'évaluation biologique *in vitro* a été réalisée en collaboration avec le Dr. Véronique Regnault et Cécile Lakomy du laboratoire Défaillance Cardiovasculaire Aigüe et Chronique (DCAC) de l'Inserm_S 1116.

Les peptides RGDc **29** et c(RGDfC) **30**, ainsi que les glycopeptides **31-34** ont été évalués dans des tests d'agrégations plaquettaires pour les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 61, Tableau 7) et des tests sur des cellules musculaires lisses (CML) pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Figure 62, Tableau

7). L'intégrine la plus exprimée sur les plaquettes est l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, son expression est limitée aux cellules de la lignée mégacaryocytaire qui est un récepteur adhésif crucial pour l'agrégation plaquettaire.^[225] Dans la paroi vasculaire, la sous-unité α_V est associée β_1 , β_3 , β_5 , β_6 et β_8 qui jouent différents rôles dans l'attachement et la migration, mais la sous-unité α_V est associée qu'à la sous-unité β_3 à la surface des CML^[226] et seulement $\alpha_V\beta_3$ interagit avec les principaux ligands matriciels.^[227] La première fonction identifiée de $\alpha_V\beta_3$ est sa capacité à assurer la médiation de l'attachement des cellules, y compris les CML, à la vitronectine. Par conséquent l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et l'inhibition de l'adhérence des CML à la vitronectine sont des essais pertinents et significatifs pour évaluer la liaison des différents composés vis-à-vis des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_V\beta_3$.

Les tests d'agrégaions plaquettaires ont été réalisés dans le but de mesurer l'effet inhibiteur induit par l'adénosine diphosphate (ADP) sur l'agrégation plaquettaire (*Figure 61*). Le tableau 7 recense toutes les valeurs des CI_{50} relatives aux activités inhibitrices. Pour les tests d'agrégation plaquettaire, les références peptidiques RGDC et c(RGDfC) ont des activités inhibitrices respectives de 223 et 139 μ M (Tableau 7, entrées 1 et 2). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui montrent que les peptides cycliques sont plus fins que les linéaires. Ces résultats montrent qu'à toutes les concentrations testées les glycopeptides linéaires **31** et **32** ont un meilleur potentiel inhibiteur que le RGDC et c(RGDfC) alors que les glycopeptides cycliques **33** et **34** ($CI_{50} > 250 \mu$ mol) inhibent faiblement l'agrégation plaquettaire. En effet, les CI_{50} pour les C-glyco-RGD linéaires **31** et **32** sont respectivement de 100 ± 5 et $65 \pm 7 \mu$ M (Tableau 7, entrées 3 et 4), ce qui est surprenant compte tenu des données de la littérature et des résultats sur le peptide linéaire natif montrant une moins bonne affinité des peptides linéaires envers les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$.^[108] L'ajout du sucre a clairement un impact sur l'affinité.

L'activité des glyco-RGD vis-à-vis des intégrines $\alpha_V\beta_3$ a aussi été évaluée par un test d'adhésion cellulaire. L'inhibition de la liaison intégrine vitronectine par les glyco-RGD est mesurée par un test d'adhésion cellulaire CML. Le peptide RGDC et les glyco-RGD linéaires **31** et **32** montrent un faible déplacement de la vitronectine. Ces composés ont les plus basses activités inhibitrices (Tableau 7, entrées 1, 3 et 4) avec des valeurs supérieures à 2000 μ M. Contrairement aux composés linéaires, le c(RGDfC) et les C-glyco-RGD cycliques **33** et **34** montrent une activité inhibitrice très intéressante. Les CI_{50} pour les composés **28**, **33** et **34** sont respectivement de 2.8 ± 0.7 , 4.4 ± 6 et $9.3 \pm 0.6 \mu$ M (Tableau 7, entrées 2, 5 et 6). Ces résultats sont en accord avec la littérature, c'est-à-dire que les peptides cycliques sont plus fins envers

les intégrines $\alpha_v\beta_3$. L'ajout du motif glycosidique, dans ce cas ne semble pas modifier l'affinité du peptide cyclique. Ceci est un résultat très positif car l'ajout d'un groupement prosthétique sur un peptide et la modification en général d'un ligand peut entraîner une perte significative d'affinité et cela n'est pas le cas pour **33** et **34**.

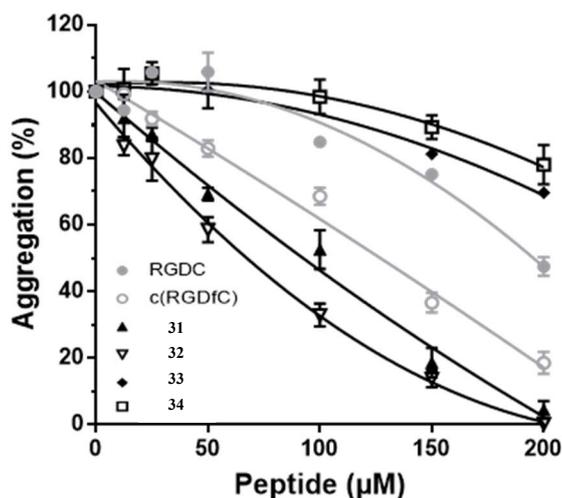


Figure 61 : Evaluations *in vitro* des dérivés RGD et C-glyco-RGD envers les intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$

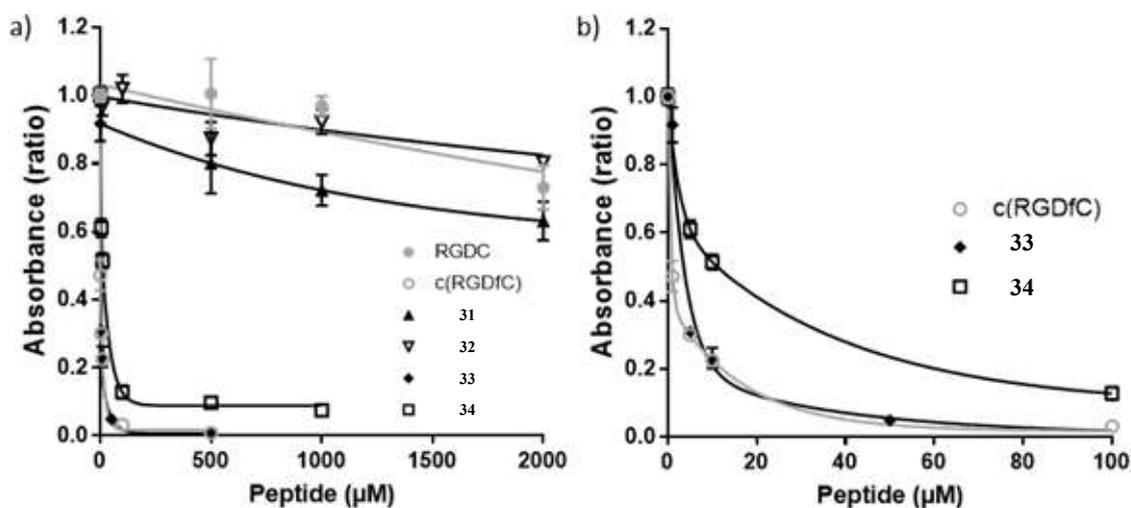


Figure 62 : Evaluation *in vitro* des dérivés RGD et des C-glyco-RGD envers les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (a) de 0 à 2000 μM , (b) zoom de 0 à 100 μM

Tableau 7 : Evaluations biologiques *in vitro* sur les plaquettes et les CML

Entrée	(glyco)peptide	CI ₅₀ (μM)	
		agrégation plaquettaire	adhésion CML
1	RGDC 27	223 ± 11	> 2000
2	c(RGDfC) 28	139 ± 6	2.8 ± 0.7
3	31	100 ± 5	> 2000
4	32	65 ± 7	> 2000
5	33	> 250	4.4 ± 0.6
6	34	> 250	9.3 ± 0.6

En résumé, de façon surprenante, les C-glyco-RGD linéaires **31** et **32** ont une meilleure affinité vis à vis des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ par rapport aux C-glyco-RGD cycliques **33** et **34**, laissant ainsi supposer l'effet bénéfique engendré par la présence de la partie C-glycosidique. En qui concerne les intégrines $\alpha_v\beta_3$, nous retrouvons la tendance de la littérature indiquant que les dérivés cycliques sont plus affins que les dérivés linéaires

VII- Etudes par dynamique moléculaire des glycopeptides

En collaboration avec le laboratoire LPCT UMR 7019 (Dr. François Dehez, Dr. Antonio Monari et Dr. Alexandrine Lambert), des études de dynamiques moléculaires ont été effectuées afin d'analyser la structuration des glycopeptides et leur interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et ainsi avoir une explication des résultats biologiques obtenus.

La structure dynamique des composés **31** et **33** de la série β (*Figure 63*) a été déterminée en milieu aqueux (*Figure 64*). Pour le composé **33**, il a été montré que le squelette cyclique du peptide est essentiellement rigide tandis que le bras espaceur portant la partie glycosidique est principalement dans une conformation étendue empêchant les interactions intramoléculaires. Par conséquent, la partie glycosidique se déplace dans un volume opposé à la partie peptidique. Pour le composé **31**, il a été montré que la partie glycosidique se déplace d'un seul côté par rapport à la partie peptidique cyclique, cela est dû à des interactions intramoléculaires avec l'arginine et l'acide carboxylique terminal de la cystéine. De plus, la seule interaction intramoléculaire entre la partie saccharidique et le peptide a lieu avec l'arginine, ce qui fait que le déplacement de la partie glycosidique est plus libre. Les glycopeptides linéaires sont donc plus flexibles que les glycopeptides cycliques.

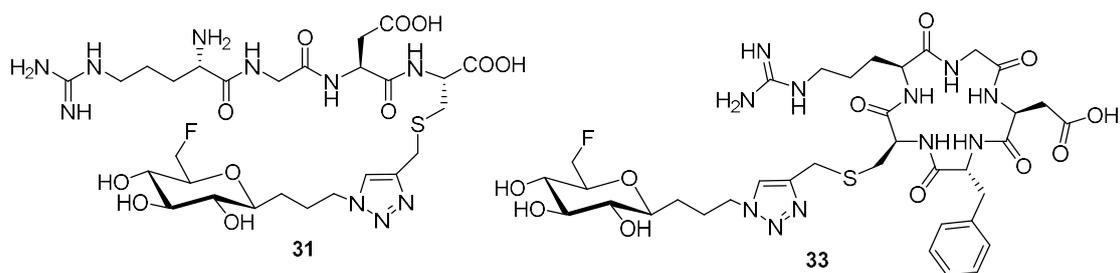


Figure 63 : Structures des composés 31 et 33

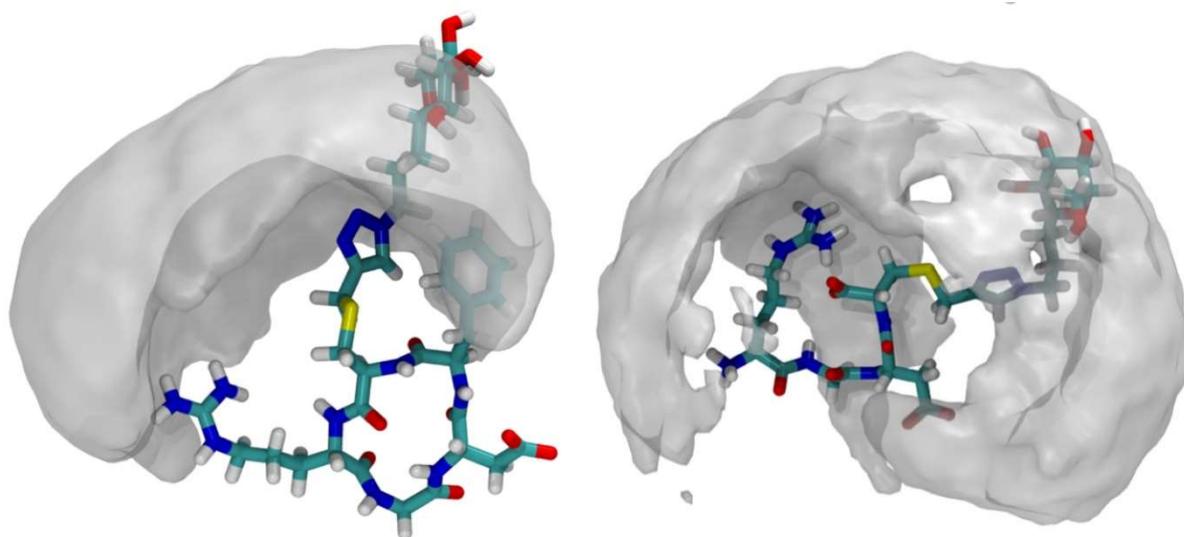


Figure 64 : Structure dynamique des composés 31 (à droite) et 33 (à gauche)

Ces études de dynamique moléculaire ont permis de montrer que le sucre sur le peptide linéaire a un mouvement large et non localisé, générant finalement peu de gêne stérique. Ceci permet aux glyco-RGD linéaires d'avoir une bonne affinité avec les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ possédant un site de fixation plus enfoui (comme le montre la *Figure 65*). Les glycopeptides cycliques quant à eux, sont plus encombrés avec un déplacement du sucre latéralisé et de ce fait, ont donc une mauvaise affinité envers les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$.

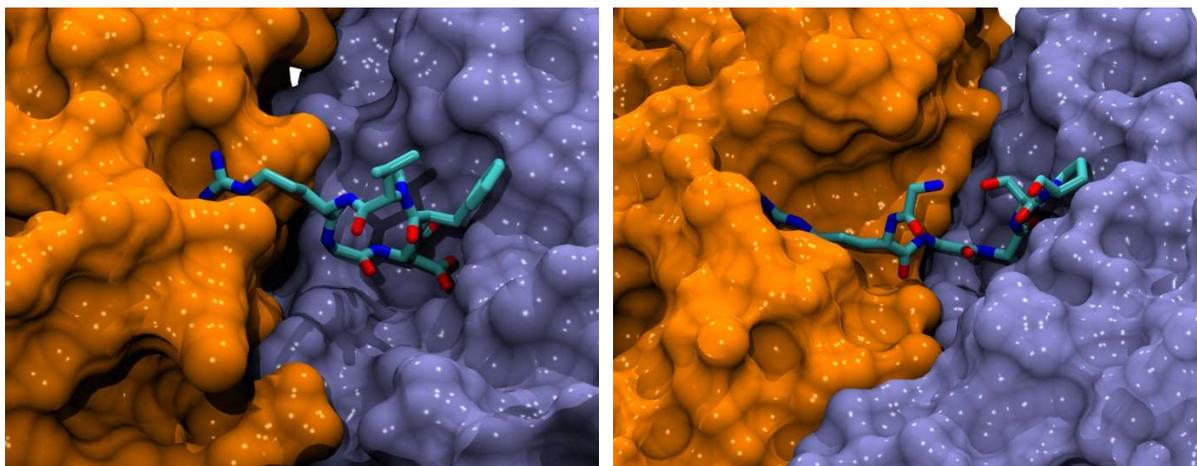


Figure 65 : Peptide RGD cyclique c(RGDfVNMe) interagissant avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (gauche) et RGD linéaire interagissant avec les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ (droite) observés respectivement dans les structures cristallines PDB:1L5G et PDB:3ZE2. Les sous-unités α et β sont représentées respectivement par des surfaces moléculaires orange et bleue.

L'interaction du composé **33** avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été étudiée. Les modèles ont été construits en utilisant le composé **33** et la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (structure PDB : 1L5G)^[228]. Le composé **33** a été choisi pour ces études de dynamique moléculaire suite aux résultats biologiques sur les CML montrant une CI_{50} de $4.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$. Cette simulation est réalisée dans une boîte à eau contenant une solution de 150 mM de NaCl (*Figure 66*). Les ions chlorure, sodium et magnésium sont représentés respectivement en violet, gris et vert par des sphères de Van der Waals. Les molécules d'eau sont représentées par une surface de couleur cyan. Les hélices des intégrines et les domaines βA sont respectivement représentés par des bandes orange et bleue.

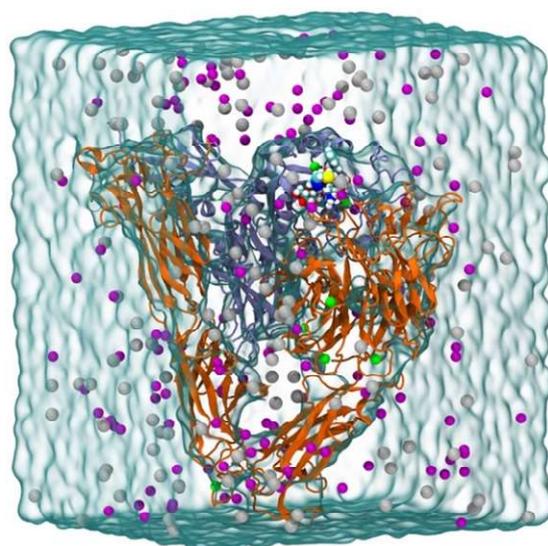


Figure 66 : Boîte de simulation pour la molécule **33** complexée avec un segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$; atomes représentés par des sphères de Van der Waals colorés en fonction des atomes : rouge = oxygène, blanc = hydrogène, jaune = soufre, bleu = azote et cyan = carbone

Une modélisation de la liaison entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le peptide α (RGDfC) ($IC_{50} = 4.4 \mu M$) ainsi que le composé **33** ($IC_{50} = 2.8 \mu M$) ont été effectuées (Figure 67). Une faible interaction est observée entre l'acide aspartique des peptides et les ions magnésium, une plus forte interaction est associée aux acides aminés S121, S123 et E220. Une liaison hydrogène est observée entre l'acide aspartique des peptides et l'acide aminé Y122. La fonction guanidine de l'arginine forme un fort pont salin avec l'acide aminé D218. La partie glycosidique interagit avec le domaine βA de l'intégrine et aussi avec les résidus chargés K125 et D126.

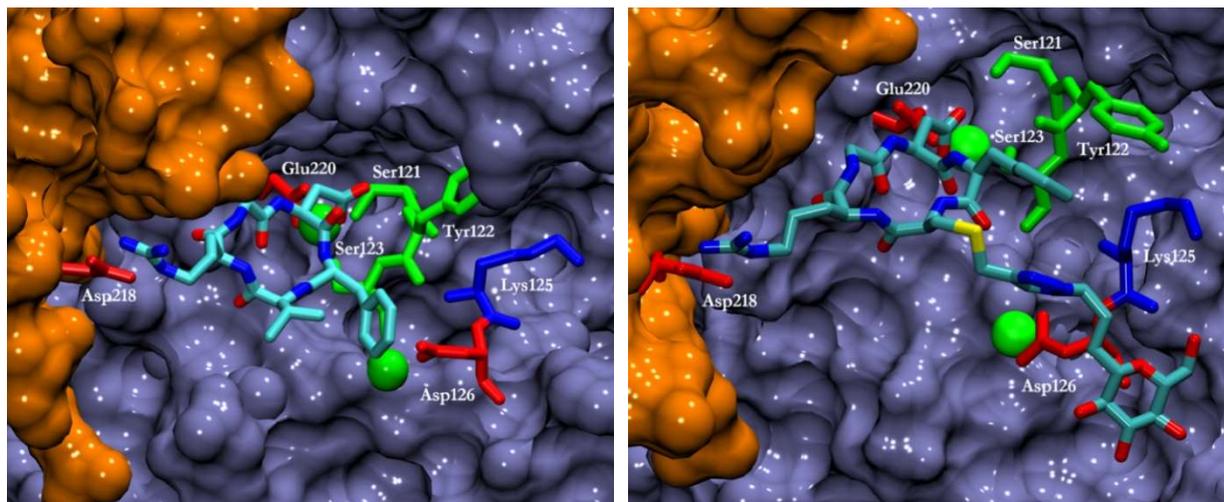


Figure 67 : Aperçus de l'interface de liaison entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le α (RGDfC) (à gauche) et le composé **33** (à droite)

Ces études montrent que le binding de la partie peptide cyclique était assez identique à celle du peptide natif. La présence de la partie glycosidique génère de plus quelques interactions stabilisantes. La présence du bras flexible entre le sucre et la partie RGD apparaît donc clairement comme un avantage pour le maintien de l'affinité.

Les simulations et la modélisation moléculaire rationalisent les propriétés biologiques distinctes des C-glyco-RGD linéaires et cycliques. L'obtention d'un profil d'affinité distinct est clairement un résultat pertinent pour des applications *in vivo*.^[193]

VIII- Développement radiochimique sur le composé $[^{18}F]$ **33**

La radiosynthèse du composé $[^{18}F]$ **33** a été effectuée au sein de la plateforme d'imagerie moléculaire NancycloTEP au CHRU à Vandoeuvre-lès-Nancy en collaboration avec le Docteur Charlotte Collet et avec l'assistance de Romain Filosa. D'une manière générale, les radiosynthèses sont réalisées sur des automates et nécessitent la mise au point de conditions

CLHP. Une procédure de radiosynthèse multi-étapes (approche prosthétique) pour la production de peptides radiomarqués au ^{18}F est nécessaire.

L'utilisation d'agents radioactifs nécessite une séquence radiochimique totalement automatisée qui permet une radioprotection de l'utilisateur et améliore la reproductibilité et la répétabilité, favorisant la translation du préclinique vers des études cliniques. L'automatisation est une étape cruciale dans le développement du radiotraceur afin d'assurer sa production avec un minimum d'intervention humaine. Cependant, compte tenu de la complexité d'un procédé automatisé, seuls un petit nombre de publications décrivent une automatisation complète ou presque de radiosynthèses de peptides marqués au ^{18}F via une approche par groupement prosthétique.^[121,229-232] La plupart de ces exemples nécessitent une certaine forme de manipulation manuelle pour la reformulation ou la purification finale notamment. En effet, une radiosynthèse multi-étapes n'est pas facilement automatisable et seulement peu d'automates ont la versatilité nécessaire à la mise en œuvre une telle séquence. Parmi les automates commerciaux disponibles, le module AllInOne (AIO) de Trasis[®] (paragraphe VIII.2) est un module versatile qui peut facilement mettre en œuvre un large panel de séquences radiochimiques. Cet automate est l'un des automates les plus adaptés pour réaliser des radiosynthèses multi-étapes grâce à ses deux réacteurs chauffants et son système CLHP intégré avec deux positions pour des colonnes CLHP. La radiosynthèse développée est effectuée sur cet automate.

VIII.1- Mise au point des conditions CLHP

Un des pré-requis en radiochimie est d'effectuer une mise au point des conditions de purification CLHP des composés impliqués dans la radiosynthèse. En effet, la purification des produits radioactifs doit être réalisée dans des temps très courts et les seules techniques utilisables sont la purification par cartouche d'extraction en phase solide (cartouche SPE) ou la CLHP. Cette mise au point permettra dans un premier temps de pouvoir ultérieurement identifier et caractériser les radiotraceurs, mais aussi d'avoir une purification par CLHP efficace et optimisée des produits issus des réactions. Les conditions d'élution ont été optimisées en élution isocratique pour permettre la meilleure séparation possible avec au moins 2 min de différence de temps de rétention et des temps de rétention compatibles avec la radiochimie (< 20 min). Les cinq composés cités précédemment ont été analysés en CLHP pour déterminer leurs temps de rétention.

- CLHP du précurseur de marquage **21** et du composé fluoré **23**

Après optimisation, les conditions idéales pour séparer les dérivés **21** et **23** impliqués dans l'étape de radiomarquage au fluor-18 sont d'utiliser une colonne Alltima C8, 5 μ m, 150x4.6 mm dans un éluant ACN/H₂O 55/45 en isocratique avec un débit de 1.0 mL/min.

Dans ces conditions, ces dérivés montrent des temps de rétention inférieurs à 20 minutes, le composé issu de la fluoration **23** est élué en 7.5 minutes et est facilement séparable du précurseur de marquage qui a un temps de rétention de 15.7 minutes (*Figure 68*).

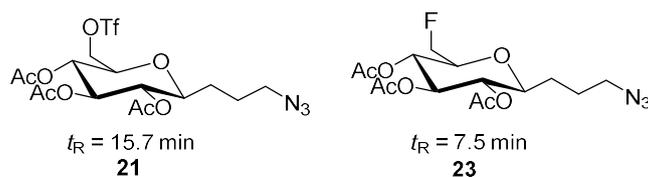


Figure 68 : temps de rétention des composé **21** et **23**

- CLHP du groupement prosthétique **25**, du peptide propargylé **30** et du glycopeptide **33**

Après optimisation, les conditions idéales pour séparer les composés **25**, **30** et **33** impliqués dans l'étape de CuAAC sont d'utiliser une colonne Vydac 218TP C18, 5 μ m, 250x4.6 mm dans un éluant ACN/H₂O : 17/83 avec 0.1% de TFA en isocratique avec un débit de 1.0 mL/min.

Dans ces conditions, ces dérivés montrent des temps de rétention inférieurs à 20 minutes, le composé **33** issu de la réaction CuAAC est élué en 7.3 minutes et est facilement séparable des composés de départ **25** et **30** ayant respectivement des temps de rétention de 4.7 min et 13.2 min (*Figure 69*).

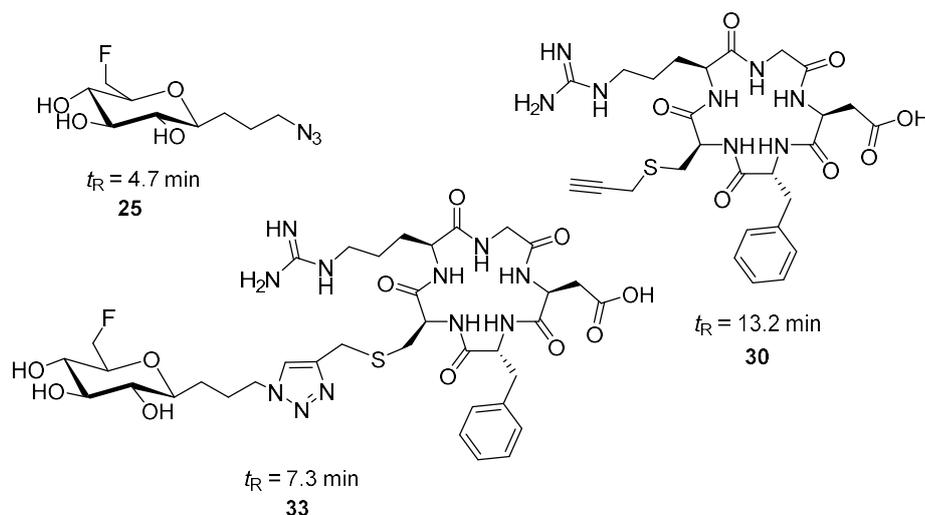


Figure 69 : temps de rétention des composés **25**, **30** et **33**

VIII.2- L'automate AllInOne (AIO)

Cet automate (*Figure 70*) est très polyvalent avec un équipement contenant deux étages de dix-huit mécanismes de rotation ayant plusieurs positions, deux réacteurs chauffants et sept détecteurs de radiations. Il possède également un système CLHP intégré disposant de deux positions pour des colonnes CLHP avec un détecteur UV et un détecteur de radioactivité intégrés. AIO fonctionne avec des cassettes à usage unique et des sets de réactifs. Cela facilite les conformités BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) et prévient des contaminations. Les composants disponibles en vrac permettent d'assembler ces cassettes pour des problématiques liées à la recherche sur lesquelles de nombreux composants peuvent être positionnés : des pics (pour les vials des réactifs), des cartouches SPE, des seringues ou des tubulures. Tous ces matériaux sont compatibles avec les acides, les bases, les solvants et sont appropriés pour des applications médicales.



Figure 70 : Automate AllInOne

Le logiciel convivial reproduit l'image de la disposition de la cassette (*Figure 71*) et montre en temps réel tous les mouvements de l'automate pendant la production du radiotraceur.

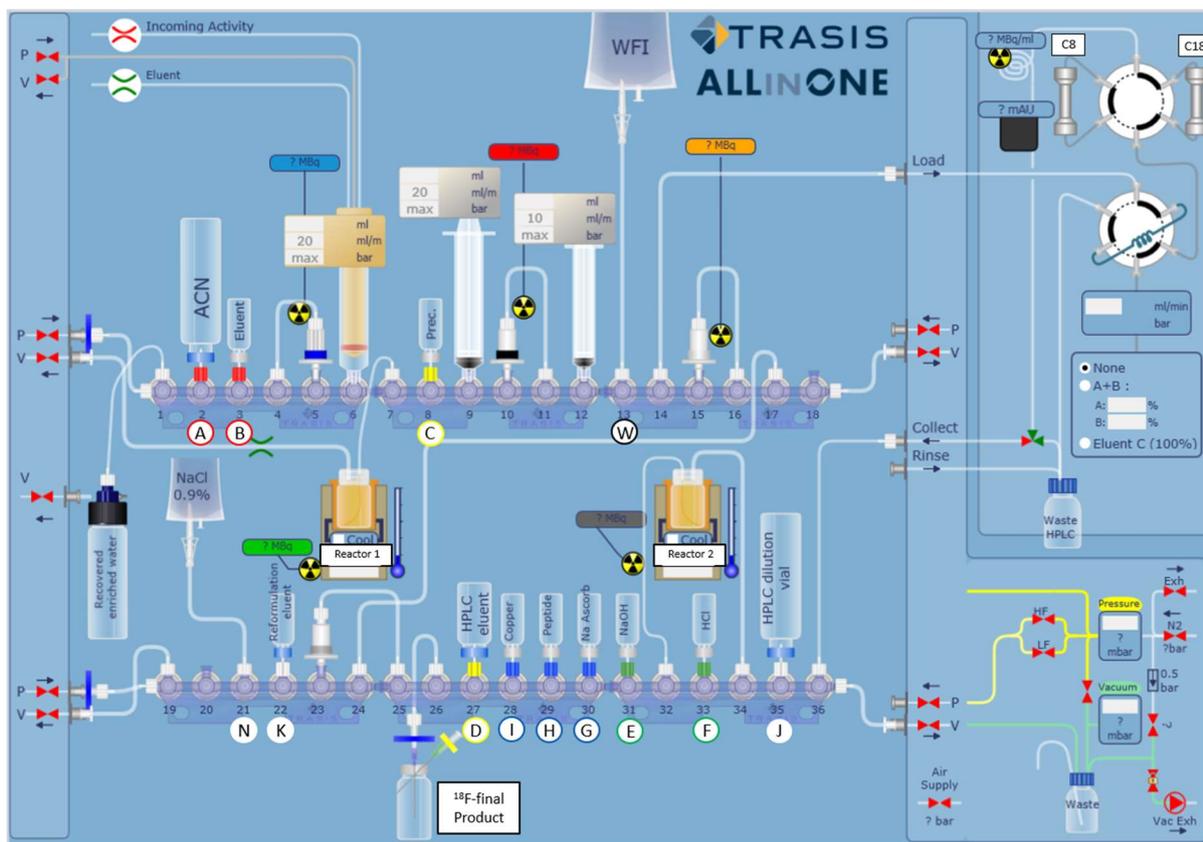


Figure 71 : Représentation schématique du module AIO utilisé pour la préparation de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$; anneaux de couleurs : rouge = préparation du $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$, jaune = radiomarquage, vert = déprotection, bleu = couplage par CuAAC, blanc = reformulation

VIII.3- Préparation de l'automate et de la cassette

Avant la réception de l'activité radioactive, les colonnes et les éluents pour les CLHP semi-préparatives ont été installés : CLHP 1 (colonne Alltima C8, éluant : ACN/H₂O 55/45 v/v), CLHP 2 (colonne Vydac 218TP C18, éluant : ACN/H₂O 17/83 v/v avec 0.1% de TFA). La cassette à usage unique est construite de toute pièce avec deux séries de trois manifolds. Plusieurs composants ont été connectés sur la cassette comme décrit sur la Figure 71 : pics (TPX), cartouches SPE, seringues luer-lock (BD) et les tubes de silicones équipés d'un connecteur mâle ou femelle. Des flacons sertis en verre, de 50 mL (vials A, J et D), de 4 mL (vials B, C et K) et de 1.2 mL (vials E, F, G, H et I) ont été plantés sur les pics. Tous ces matériaux sont à usage unique et sont utilisables pour des applications médicales. La liste des réactifs utilisés pour la procédure automatisée est décrite dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Préparation détaillée pour une radiosynthèse de [¹⁸F]33 sur l'automate AllInOne

Position	Réactifs ou matériel	Quantités
P2	Acétonitrile anhydre (ACN) / Vial A	10 mL
P3	K ₂₂₂ /K ₂ CO ₃ (5.3 mg/1.3 mg) dans ACN/H ₂ O (8/2 v/v) / Vial B	1 mL
P4-P5	Sep-pak® Light QMA-carbonate	1
P6	Plunger (20 mL) / SA2	1
P8	Précurseur 21 / Vial C	5 mg
P9	Seringue de 20 mL / SA3	1
P10-P11	Sep-pak® cartouche silice	1
P12	Seringue de 10 mL / SA4	1
P13	Eau pour injection (Poche) / Bag W	1
P15-P16	Cartouche échangeuse de cation (Chelex®)	1
P21	Poche NaCl 0.9% / Bag N	1
P22	Ethanol/NaCl 0.9% (5/5 v/v) / Vial K	2 mL
P23-P25	Cartouche Oasis HLB	1
P27	ACN/H ₂ O (55/45 v/v) / Vial D	10 mL
P28	Cu(OAc) ₂ dans H ₂ O (11 µmol/mL) / Vial I	0.3 mL
P29	c(RGDfC) propargylé 30 dans H ₂ O (1.6 µmol /mL) / Vial H	0.3 mL
P30	Ascorbate de sodium dans H ₂ O (22 µmol/mL) / Vial G	0.3 mL
P31	NaOH 1M / Vial E	0.3 mL
P33	HCl 1M / Vial F	0.3 mL
P35	Vial de dilution H ₂ O / Vial J	10 mL

Le précurseur 21 (Vial C, P8) a été dilué avec 2 mL de ACN anhydre (Vial A, P2) avant réception de l'activité, le module est maintenant prêt à recevoir l'activité pour la radiosynthèse.

VIII.4- Radiomarquage du composé [¹⁸F]33

Le composé [¹⁸F]33 a été synthétisé à l'aide d'une séquence de réaction originale, que nous avons développé, décrite dans le Tableau 9. Le développement de la radiosynthèse de [¹⁸F]33 requiert une radiosynthèse multi-étapes. Le processus totalement automatisé implique une réaction "two-pot" en trois étapes : le radiomarquage du précurseur 21, la déprotection générant le groupement prosthétique [¹⁸F]25 et le couplage avec c(RGDfC) conduisant alors au [¹⁸F]fluoro-C-glyco-c(RGDfC) [¹⁸F]33 (Schéma 24). Cette stratégie implique deux procédures de purification par CLHP et une étape de reformulation. Les différentes étapes sont symbolisées par différents anneaux de couleurs sur la représentation schématique du module AIO (Figure 71). Les vials avec les anneaux rouges sont utilisés pour la préparation du K[¹⁸F]F-K₂₂₂, les jaunes pour le radiomarquage, les verts pour la déprotection, les bleus pour le couplage par CuAAC et les vials avec des anneaux blancs pour la reformulation.

Tableau 9 : Séquence de réaction pour la radiosynthèse de [¹⁸F]33

Fluoration du précurseur du groupe prosthétique 21
1 - [¹⁸ F]F ⁻ piégeage sur cartouche carbonate QMA
2 - [¹⁸ F]F ⁻ élution avec l'éluant
3 - Evaporation azéotrope à 110°C pendant 10 min pour former le complexe K[¹⁸ F]F-K ₂₂₂
4 - Addition du précurseur 21 dans le réacteur 1
5 - [¹⁸ F]Radiofluoration à 95°C pendant 5 min
6 - Pré-purification sur cartouche SPE de silice
Purification de [¹⁸F]23 sur 1^{ère} CLHP semi-préparative
1 - Injection du produit brut sur CLHP semi-préparative
2 - Collection de [¹⁸ F]23 dans le réacteur 2
Préparation du ¹⁸F-fluoro-C-glycoside comme groupe prosthétique [¹⁸F]25
1 - Evaporation de la phase mobile
2 - Saponification avec NaOH à TA pendant 9 min
3 - Neutralisation avec HCl
Préparation du [¹⁸F]F-C-glyco-c(RGDfC) [¹⁸F]33
1 - Addition de l'ascorbate de sodium
2 - Addition du peptide propargylé 30
3 - Addition de Cu(OAc) ₂
4 - Couplage à 55°C pendant 25 min
Purification du glycopeptide [¹⁸F]33
1 - Injection du produit brut sur la 2 ^{ème} CLHP semi-préparative
2 - Récupération de [¹⁸ F]33 dans le vial de dilution
Formulation de [¹⁸F]33
1 - Piégeage de [¹⁸ F]33 sur cartouche SPE Oasis HLB
2 - Lavage de la cartouche avec de l'eau
3 - Elution avec un mélange éthanol/NaCl 0.9% puis avec NaCl 0.9%
4 - Récupération de [¹⁸ F]33 dans le vial de produit final

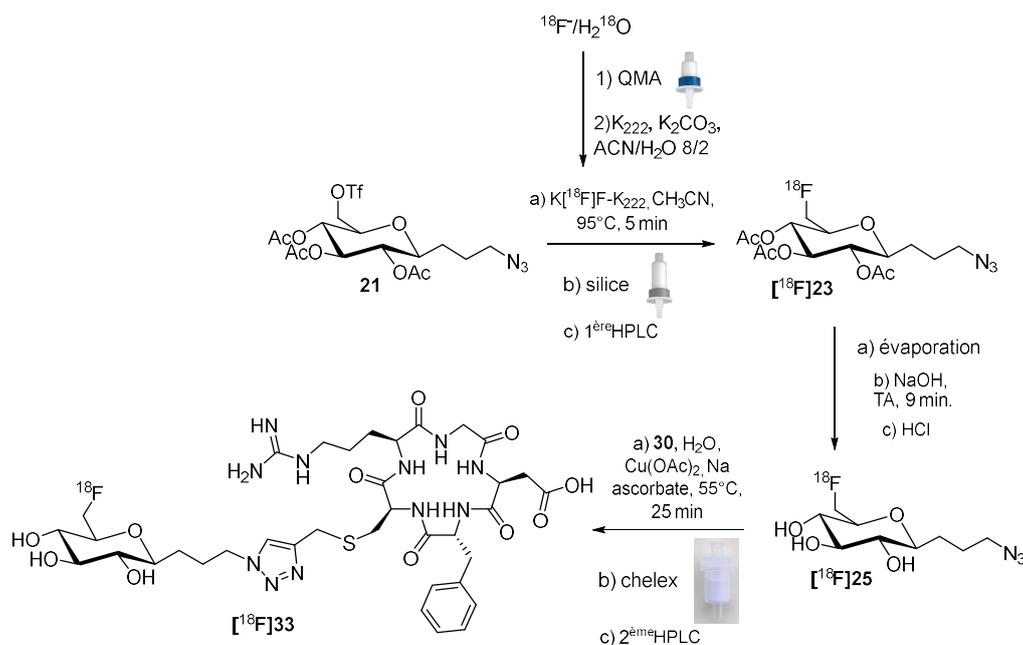


Schéma 24 : Radiosynthèse de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$

La radiosynthèse débute avec la préparation du complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$ nécessaire à la radiofluoruration. Ce complexe est réalisé de façon classique, une solution d'eau enrichie contenant des fluorures-18 est passée sur une cartouche de résine échangeuse d'anions (cartouche QMA). Les fluorures sont accrochés tandis que l'eau enrichie est éluée. Cette cartouche est ensuite éluée avec une solution contenant du K_2CO_3 et du Kryptofix[®] K_{222} , permettant d'échanger les fluorures-18 par des carbonates et de les complexer avec le K_{222} . La solution est récupérée dans le réacteur 1. La première étape est le radiomarquage au fluor-18 du précurseur **21** dans le réacteur 1. En tirant parti des travaux précédents sur les groupements prosthétiques à base de *O*-glycosides^[167] et dans le but d'obtenir un haut rendement de marquage, différents paramètres tels que la quantité de précurseur, le temps de réaction et la température ont été testés. Les conditions suivantes se sont avérées optimales pour la ^{18}F -radiofluoruration : le $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$ est mis à réagir avec 5 mg de précurseur de marquage dans 2 mL d'acétonitrile anhydre, pendant 5 min à 95°C . Avant purification par CLHP, une pré-purification du mélange est réalisée par piégeage du ^{18}F -fluorure n'ayant pas réagi sur une cartouche SPE de silice. La solution éluée est ensuite purifiée par CLHP semi-préparative pour retirer le précurseur et les éventuelles impuretés formées. Les développements réalisés avec les dérivés non radioactifs ont montré une bonne séparation entre le précurseur de marquage **21** ($t_R \sim 16$ min) et le C-glycoside fluoré acétylé **23** ($t_R \sim 7.5$ min) sur une colonne analytique C8 avec un éluant acétonitrile/eau 55/45 v/v avec un débit de 1.0 mL/min. La purification du $[^{18}\text{F}]$ fluoro-C-glycoside $[^{18}\text{F}]\mathbf{23}$ a été réalisée par CLHP semi-préparative avec les mêmes conditions

(solvant isocratique, débit de 4.5 mL/min) (Figure 72). Cette étape de purification CLHP prend du temps mais ne peut pas être évitée. En effet, le précurseur de marquage **21** ne peut pas être séparé du composé radiofluoré [^{18}F]**23** par simple purification sur cartouche SPE.

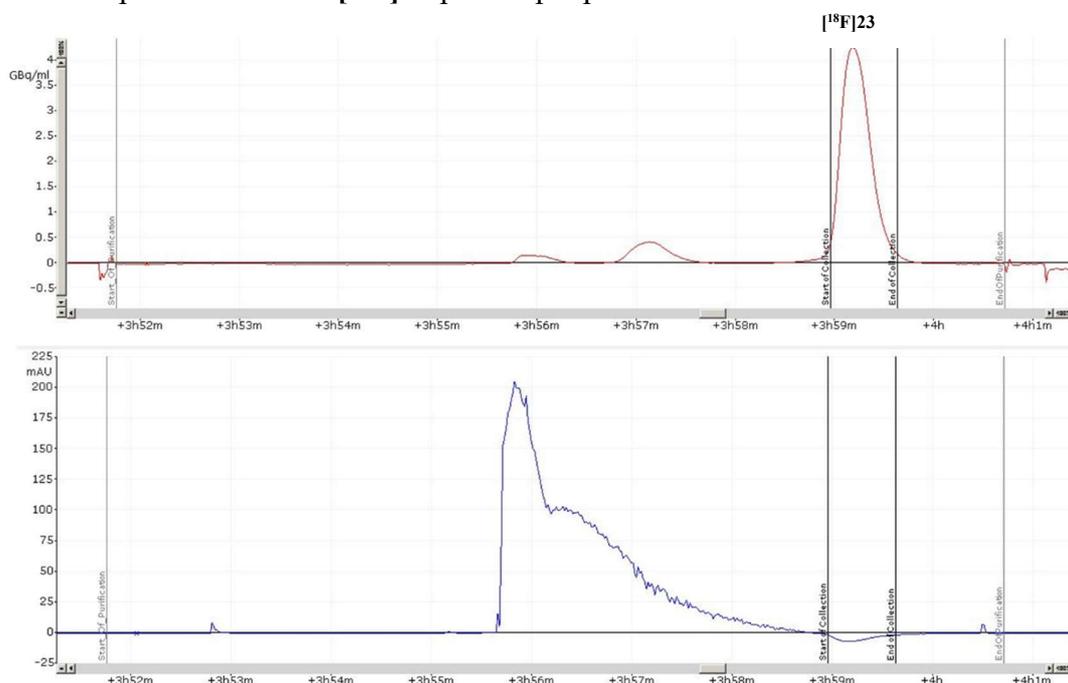


Figure 72 : Purification par CLHP semi-préparative de [^{18}F]**23**. ($t_R \sim 7.5$ min, Alltima C8, ACN/H₂O 55/45 v/v, 4.5 mL/min). Radioactivité (en haut) et UV (254 nm, en bas)

Le chromatogramme CLHP montre un pic majoritaire correspondant à [^{18}F]**23** ($t_R \sim 7.5$ min, identique à la référence non radioactive). Deux autres pics ($t_R \sim 4.2$ min et $t_R \sim 5.4$ min) peuvent aussi être distingués sur le chromatogramme correspondant à une déprotection partielle du dérivé peracétylé. En effet, malgré les optimisations méticuleuses de l'étape de radiomarquage, une saponification partielle due aux conditions basiques ne peut être évitée. [^{18}F]**23** est récupéré dans le réacteur 2 et le solvant CLHP est évaporé.

La seconde étape de la radiosynthèse c'est-à-dire la déprotection par saponification de [^{18}F]**23**, est ensuite mise en œuvre à température ambiante pendant 9 minutes en utilisant une solution aqueuse de NaOH conduisant alors au groupement prosthétique [^{18}F]**25** avec un rendement quantitatif. Une neutralisation avec une solution aqueuse de HCl est nécessaire, la réaction CuAAC ne pouvant pas être faite dans un milieu trop basique.

La troisième étape, mise en œuvre dans le même réacteur, est la réaction CuAAC impliquant le groupement prosthétique radiomarqué [^{18}F]**25** et le c(RGDfC) propargylé **30**. Cette réaction est réalisée en introduisant l'ascorbate de sodium et l'acétate de cuivre(II) dilués dans l'eau. En tirant parti des résultats précédents, les conditions optimales pour cette réaction sont 0.5 μmol

de peptide, 3 μmol de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, et 6 μmol d'ascorbate de sodium dans 1.5 mL d'eau à 55°C pendant 25 minutes. La pré-purification du [^{18}F]fluoro-C-glyco-c(RGDfC) [^{18}F]33 est réalisée par filtration lente sur une cartouche chargée de résine Chelex[®] pour retirer le cuivre. Le développement des conditions optimales CLHP ont été réalisées avec les standards non radioactifs et ont montré une bonne séparation entre le groupe prosthétique **25**, le c(RGDfC) propargylé **30** et C-glyco-c(RGDfC) **33** sur une colonne analytique C18 (éluant acétonitrile/eau 17/83 v/v avec 0.1% de TFA, débit de 1.0 mL/min). La purification et la récupération du composé [^{18}F]33 ($t_R \sim 15.0$ min) sont réalisées par CLHP semi-préparative dans les mêmes conditions avec un débit de 3 mL/min. Comme illustré sur la Figure 73, la présence de groupement prosthétique [^{18}F]25 n'ayant pas réagi ($t_R \sim 7.5$ min) permet d'indiquer un rendement approximatif de 44% pour la réaction de couplage par click.

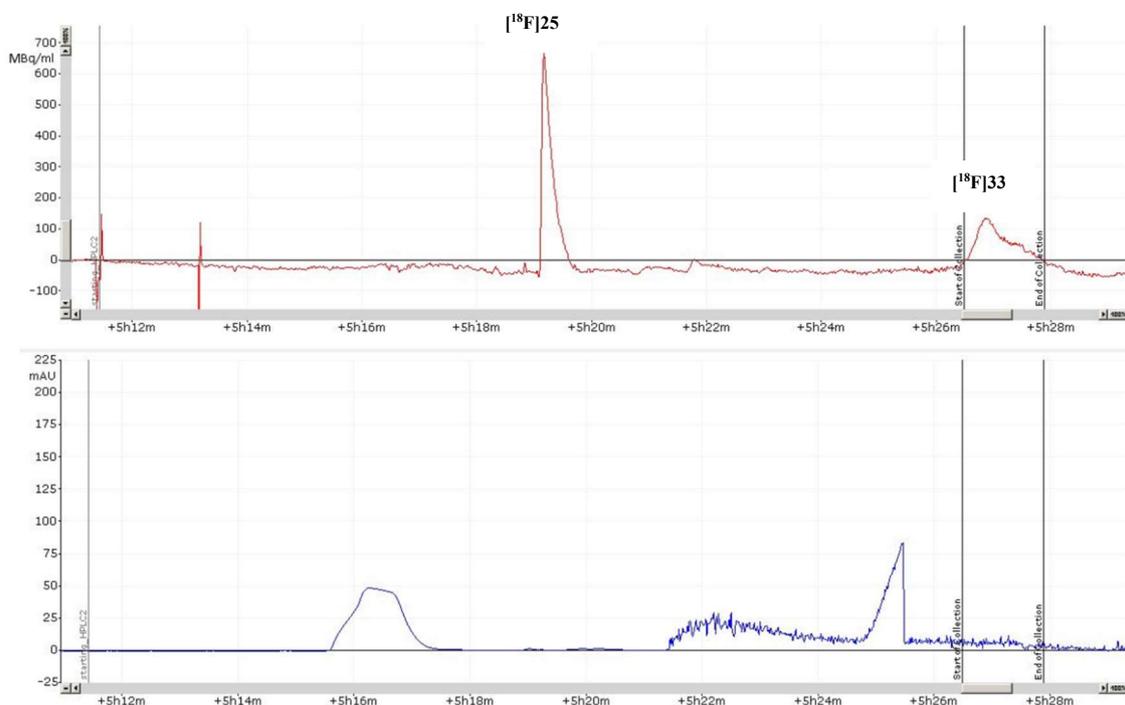


Figure 73 : Purification par CLHP semi-préparative de [^{18}F]33 ($t_R \sim 15.0$ min, Vydac 218TP, C18, ACN/ H_2O 17/83 v/v avec 0.1% TFA, 3 mL/min). Radioactivité (en haut) et UV (254 nm, en bas)

La fraction du produit [^{18}F]33 est collectée dans un vial contenant 10 mL d'eau pour faciliter la fixation du glycopeptide sur la cartouche SPE Oasis HLB. La reformulation du produit est réalisée par passage du mélange sur une cartouche SPE Oasis HLB pour piéger le glycopeptide. La cartouche est ensuite rincée avec de l'eau et séchée avec un flux d'azote. [^{18}F]33 est élué avec 0.7 mL d'une solution éthanol/NaCl 0.9% 50/50 v/v et récupéré dans un vial unidose stérile. L'Oasis HLB est lavée avec 1.8 mL de NaCl 0.9% transféré ensuite dans le même vial unidose stérile.

Pendant la radiosynthèse, la radioactivité est suivie grâce aux différents détecteurs de radioactivité du module AIO (Figure 74). Le piégeage du ^{18}F -fluorure sur la cartouche QMA est visible avec la courbe bleue, l'élution de la cartouche de QMA pour décrocher le ^{18}F -fluorure et réception dans le premier réacteur est montré avec la courbe verte. Au cours du marquage, une baisse de l'activité (courbe verte) est observée. Lors du passage sur la cartouche de silice pour le piégeage du ^{18}F -fluorure n'ayant pas réagi, la courbe verte chute et la courbe rouge augmente, montrant le prélèvement du mélange réactionnel dans le réacteur. Lors de l'élution de la cartouche de silice pour réaliser la première purification par CLHP, la courbe rouge diminue (élution de $[\text{F}^{18}]\text{23}$ tandis que ^{18}F - reste accroché) montrant un bon marquage. Le produit marqué $[\text{F}^{18}]\text{23}$ est collecté dans le second réacteur (courbe noire) c'est dans ce réacteur que sera mise en œuvre la déprotection et la réaction CuAAC. Le milieu réactionnel est ensuite prélevé pour être purifié par une deuxième CLHP entraînant une chute de la courbe noire. La reformulation est réalisée sans suivi d'activité.

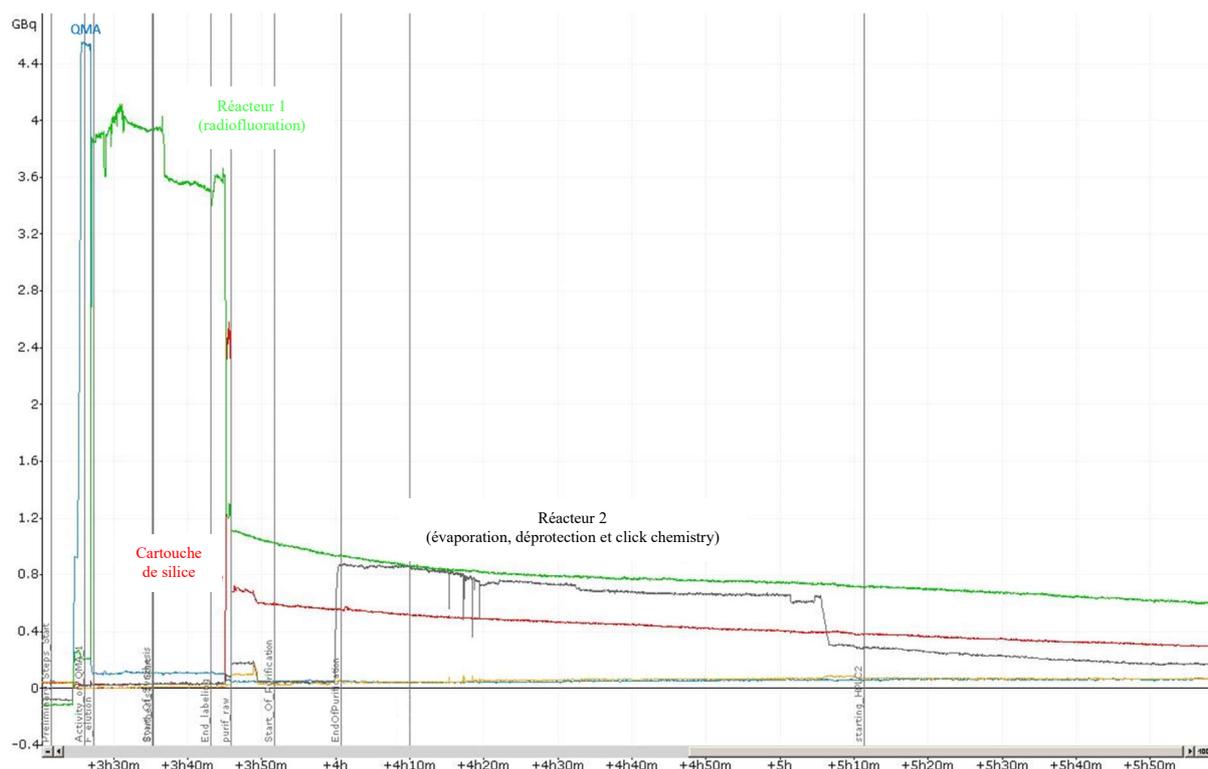


Figure 74 : Suivi de l'activité au cours de la radiosynthèse du composé $[\text{F}^{18}]\text{33}$

La préparation typique d'une radiosynthèse débute avec 5 GigaBecquerel (GBq) et produit en moyenne 73 MégaBecquerel (MBq) dans 1.5 mL de solution de $[\text{F}^{18}]\text{33}$ en environ 140 minutes en partant de la réception de l'activité. Un rendement radiochimique corrigé de la décroissance satisfaisant et reproductible est obtenu avec une moyenne de $3.6 \pm 0.4\%$ ($n=12$). Cette radiosynthèse est la première production entièrement automatisée de peptides

radiomarqués au fluor-18 *via* une approche prosthétique avec une méthode "two pot" en 3 étapes incluant 2 étapes de purification par CLHP. Cette synthèse inclut effectivement 2 étapes de purification par CLHP. Pour certains exemples décrits dans la littérature, cette purification peut être évitée par simple purification sur cartouche. Cette technique fait gagner beaucoup de temps mais n'est pas applicable sur toutes les molécules. Seulement les précurseurs et leurs composés fluorés correspondants ayant des polarités ou des solubilités assez différentes peuvent être séparés par cartouche. Dans notre cas, le groupement prosthétique à base de sucre a été choisi pour ses propriétés hydrophiles en dépit des inconvénients de purification. En effet, le précurseur triflé **21** et la molécule fluorée résultante [¹⁸F]**23** ont des solubilités et des polarités proches expliquant l'obligation d'une purification par CLHP. La fluoration et la déprotection one pot ont d'abord été envisagées, cependant le déprotection des acetates conduit à un mélange inséparable de composés polyhydroxylés (t_R très proche). Pour cette raison, il a été nécessaire de réaliser une première purification par CLHP de [¹⁸F]**23** avant la déprotection des acétates. Par conséquent, les réactions suivantes (déprotection et couplage CuAAC) ont toutes deux été réalisées dans le réacteur 2. Cette synthèse en 3 étapes incluant une étape de déprotection nécessite donc une séquence two-pot avec deux étapes de purifications par CLHP. Cette radiosynthèse complexe assure ainsi une adaptabilité maximale à un grand panel de peptides et de groupements prosthétiques.

VIII.5- Contrôle qualité et données physico-chimiques

Le contrôle qualité de [¹⁸F]**33** est réalisé sur un aliquot du lot final. La solution contenant le radiotracteur est propre et incolore et possède un pH d'environ 7. Les puretés chimique et radiochimique sont déterminées par CLHP analytique avec une colonne C18 en utilisant la détection radioactive et UV (*Figure 75*). Le chromatogramme UV montre l'absence de sous-produits démontrant une bonne pureté chimique. L'identité de [¹⁸F]**33** ($t_R = 7.8$ min) est confirmé par une seconde injection avec le standard non-radioactif. La pureté radiochimique a été déterminée à plus de 98%. L'activité molaire n'a pas pu être déterminée à cause de la faible absorbance UV de **33** (limite de détection : 2 µg/mL), cependant elle a été calculée comme étant supérieure à 20.8 GBq/µmol.

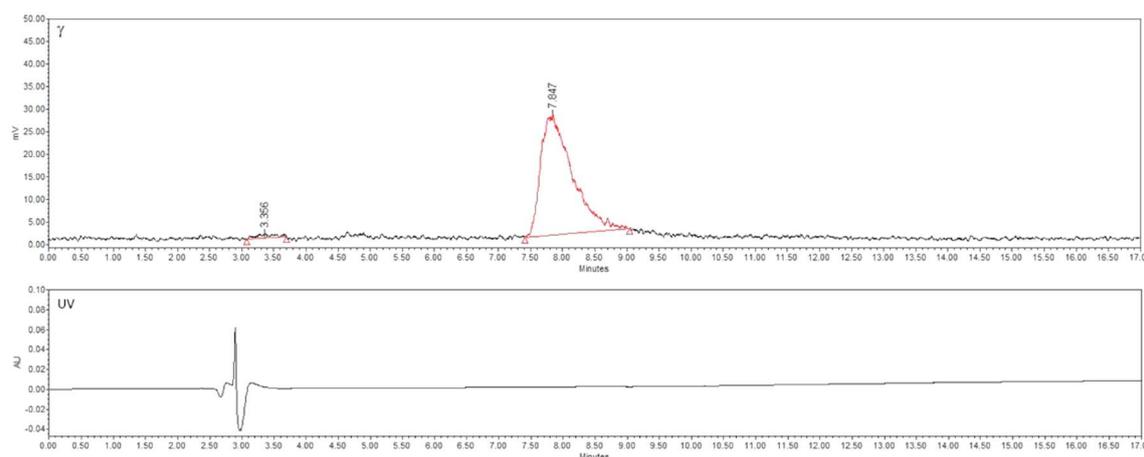


Figure 75 : Chromatogrammes de la CLHP analytique de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$. Temps de rétention de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$: 7.8 min ; pureté radiochimique de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$ est $\geq 98\%$. Conditions : colonne Vydac 218TP C18 éluee avec ACN/H₂O 17/83 (v/v) avec 0.1% TFA dans des conditions isocratiques, avec un débit de 1.0 mL/min. Radioactivité (en haut) et UV (230 nm, en bas).

La stabilité de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$ a été vérifiée sur la préparation entière et aucune dégradation n'a été observée durant une période de 120 min. La stabilité *in vitro* de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$ a aussi été déterminée dans le sérum humain à 37°C par détection CLHP radioactive. Les analyses des extraits de sérum dans l'acétonitrile à différents temps d'incubation (0, 10, 30, 60 et 120 min) démontrent une bonne stabilité de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$.

Le $\log D_{7.4}$ expérimental (coefficient de partition dans n-octanol/solution tampon pH 7.4) de $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$ a été mesurée avec la méthode par agitation en flacon et une valeur -2.62 a été trouvée. Ceci montre une bonne hydrophilie certainement due au groupement prosthétique à base de glycoside. Cette valeur est dans la gamme du ^{18}F -galacto-RGD^[112,233] qui est un radiotraceur standart portant aussi un glycoside.

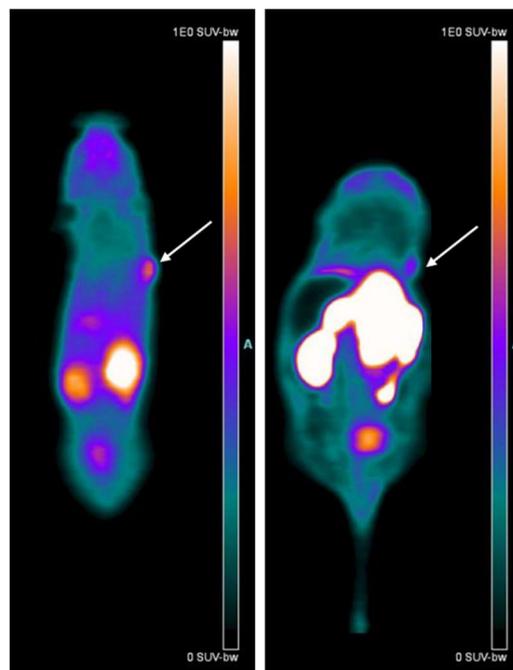


Figure 78 : Images obtenues au microTEP montrant la biodistribution du ^{18}F -C-glyco-c(RGDfC) [^{18}F]33 (à droite) et du ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK) (à gauche) durant deux heures chez une souris NMRI portant un glioblastome humain U87MG (flèches blanches)

Les valeurs moyenne et maximale de la fixation normalisée par rapport au poids et à l'activité injectée (SUVmean et SUVmax) ont été mesurées au niveau de la masse métaboliquement active (MMA) de la tumeur et celle de la région controlatérale, qui a servi de bruit de fond (sham). Durant la deuxième heure, post-injection des traceurs, un rapport de tumeur / bruit de fond (TBR) a été calculé.

La comparaison de ce TBR entre le ^{18}F -C-glyco-c(RGDfC) [^{18}F]33 et le traceur de référence ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK) a montré des valeurs de SUVmean et SUVmax environ deux fois plus important pour le ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK) que pour le [^{18}F]33 (1.74 vs 3.90 pour le SUVmax, et 1.11 vs 2.77 pour le SUVmean, ^{68}Ga -NODAGA-RGD vs [^{18}F]33 respectivement). De même, la valeur maximale de la MMA de la tumeur du [^{18}F]33 par rapport à la captation globale du corps entier est 1.48 fois plus faible que celle du ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK). D'autres injections sur petit animal seront réalisées dans le but de vérifier la répétabilité de ces résultats.

IX- Conclusion

Cette première partie concerne le développement de groupements prosthétiques basés sur des unités saccharidiques de type C-glycosides. Ces dérivés C-glycosides ont été synthétisés de manière efficace par introduction d'un bras fonctionnel sur le carbone pseudo-anomérique. Le couplage avec des peptides dérivés RGD a été réalisé par réaction CuAAC et la position 6 a été fonctionnalisée par un groupement triflate pour les précurseurs de marquage et par un fluor-19 pour les références non-radioactives. Les composés **32** et **33** (Figure 79) ont montré une activité inhibitrice intéressante avec des valeurs respectives de CI_{50} de $65 \pm 7 \mu\text{M}$ en ce qui concerne l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de $4.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ en ce qui concerne l'inhibition de l'adhésion cellulaire des CML (Cellules Musculaires Lisses). D'une manière générale, il a été montré que les glycopeptides linéaires **31** et **32** présentent un profil d'affinité sélectif vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Les glycopeptides cycliques **33** et **34** sont eux sélectifs de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Les études de dynamique moléculaire ont permis de définir la structuration des glycopeptides en solution aqueuse ainsi que l'interaction du composé **33** avec l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Les interactions mises en avant grâce à la dynamique moléculaire expliquent les profils d'affinité distincts des deux séries (linéaire et cyclique). La présence du bras flexible entre le dérivé glycosidique et les dérivés RGD a permis le maintien de l'affinité dans les deux cas. De plus, l'unité glycosidique n'affecte pas de manière négative l'affinité des dérivés RGD par rapport aux intégrines $\alpha_V\beta_3$ et a même permis une amélioration de l'affinité des glycopeptides linéaires vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

La radiosynthèse a été réalisée grâce à un automate versatile permettant des radiosynthèses multi-étapes. L'automatisation totale de cette radiosynthèse "two pot" avec trois étapes est originale et est inédite à ce jour. Cette radiosynthèse a permis l'obtention du composé [^{18}F]**33** avec un rendement corrigé de la décroissance de $3.6 \pm 0.4\%$ avec une pureté radiochimique supérieure à 98%. L'automatisation décrite est modulable et sa mise en œuvre pourrait être facilement adaptée à d'autres groupements prosthétique et/ou peptides pour obtenir un large panel de peptides radiomarqués au fluor-18.

Ces outils diagnostics sont très intéressants car ils sont spécifiques des différents sous types d'intégrines, les glyco-RGD linéaires sont spécifiques de $\alpha_{IIb}\beta_3$ et les glyco-RGD cycliques sont spécifiques des intégrines $\alpha_V\beta_3$, ce qui est pertinent pour des applications en imagerie moléculaire. La première image TEP obtenue avec le composé [^{18}F]**33** a permis la visualisation de la tumeur, il est donc intéressant d'envisager la fonctionnalisation du dérivé glycosidique avec un fluorophore pour se tourner vers une approche théranostique *via* la chirurgie guidée.

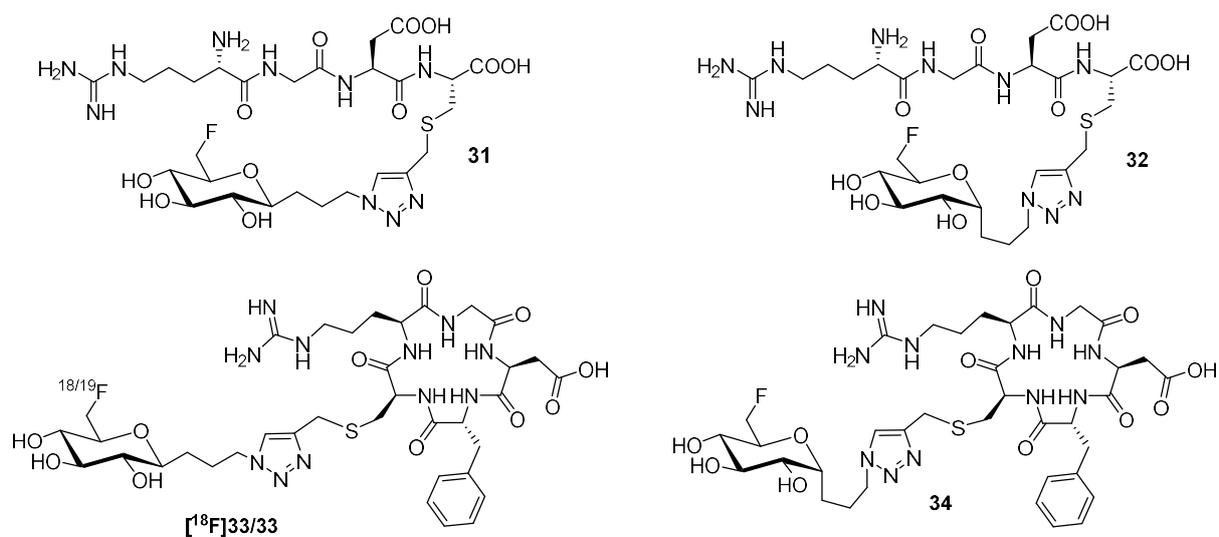


Figure 79 : Structures des composés 31, 32, 33, 34 et ^{18}F 33

CHAPITRE 3

SYNTHESE DE DERIVES DE TYPE C-

GLYCOSIDES RADIOFLUORES ET

FLUORESCENTS POUR DES

APPLICATIONS EN IMAGERIE BIMODALE

TEP/FPIR

I- Introduction et objectifs

Pour les différentes raisons évoquées dans le chapitre bibliographique, l'imagerie bimodale est en plein essor. La conception et la synthèse d'agents d'imagerie monomoléculaires multimodaux (MOMIAs), pour lesquels deux sondes de détection sont présentes sur une même molécule est donc un enjeu d'actualité. Dans ce contexte, le développement de sondes d'imagerie bimodale TEP/FPIR est un véritable centre d'intérêt. La combinaison TEP/FPIR permet une approche théranostique de diverses pathologies. L'imagerie TEP offre un diagnostic précis grâce à sa sensibilité et l'imagerie optique FPIR permet l'aide à la chirurgie guidée grâce à sa bonne résolution spatiale. En tirant parti des résultats du chapitre précédent concernant les dérivés C-glycosides radiofluorés, ces dérivés peuvent évoluer en agent d'imagerie bimodaux TEP/FPIR par introduction d'une sonde fluorescente.

Le dérivé glycosidique **13** a ainsi été fonctionnalisé afin de porter une sonde radioactive (le fluor-18), une sonde fluorescente et un peptide dérivé de la séquence RGD (*Figure 80*) dans le but de devenir un MOMIA.

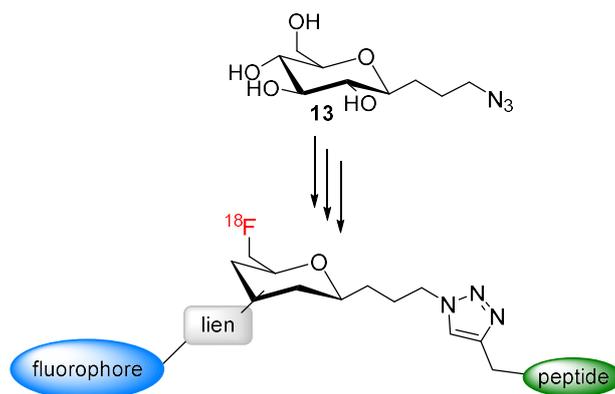


Figure 80 : Structure schématique de l'agent d'imagerie bimodale TEP/FPIR

Pour mener à bien cette synthèse, il est nécessaire de contrôler la fonctionnalisation du dérivé C-glycoside afin d'introduire les deux sondes de détection et le peptide. La fonctionnalisation régiosélective contrôlée de ce dérivé est réalisée en plusieurs étapes en associant une suite de protection et déprotection des groupements hydroxyles.

Ce chapitre est donc articulé en deux parties : la synthèse de la sonde fluorescente (cyanine 5) et la fonctionnalisation contrôlée du dérivé C-glycoside **13**.

II- Synthèse de la cyanine 5

La sonde fluorescente choisie est la cyanine 5 pour sa longueur d'onde d'absorption à 642 nm et sa longueur d'onde d'émission à 662 nm correspondant au domaine du proche IR. Il a été envisagé de la synthétiser au laboratoire du fait de son coût élevé (1000 € les 100 mg). La synthèse de ce composé se déroule en quatre étapes. Les trois premières étapes consistent à synthétiser les deux noyaux indoles (building block A et C) et le bras espaceur (building block B). A partir de ces composés, la cyanine 5 est synthétisée en une étape "one pot" (Schéma 25). Pour réaliser la synthèse de ces composés, trois publications clés^[234-236] ont été reprises et les modes opératoires ont été adaptés. La synthèse de la cyanine 5 est difficile car c'est une cyanine non symétrique.

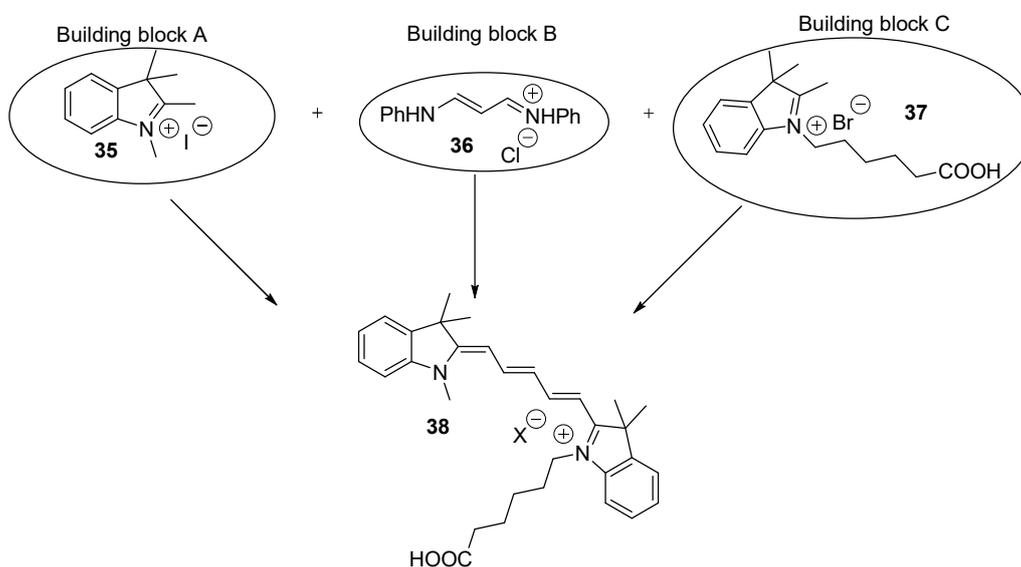


Schéma 25 : Schéma synthétique de la cyanine 5

- Synthèse du building block A (**35**)

Le composé **35** est synthétisé en une étape par alkylation de l'atome d'azote porté par la 2,3,3-triméthylindolénine. La réaction est réalisée dans l'acétonitrile à reflux en présence d'iodure de méthyle pendant 7h (Schéma 26). Un précipité violet, **35**, est obtenu avec un rendement de 60%, inférieur à celui décrit dans la littérature.^[234] Le mode opératoire est adapté en augmentant la température du milieu de 80°C à 90°C, permettant par la suite d'obtenir le composé **35** avec un excellent rendement de 97%.

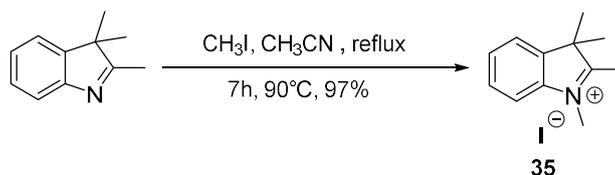


Schéma 26 : Synthèse du composé 35

- Synthèse du building block B (36)

La réaction est réalisée avec le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane en milieu aqueux acide et de l'aniline (1.2 équ) en milieu aqueux acide pendant 5h à 50°C (Schéma 27). Un précipité orange se forme et après lavage à l'eau, le composé 36 est obtenu avec une bonne pureté mais avec un rendement inférieur (10%) à celui décrit dans la littérature.^[234,235] Il a été choisi d'augmenter les équivalents d'aniline de 1.2 à 4 équivalents. Dans ces conditions, le composé 36 est formé avec un rendement de 90% ce qui est très concluant.

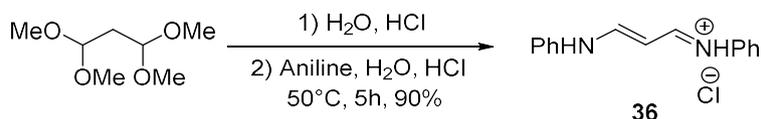


Schéma 27 : Synthèse du 36

- Synthèse du building block C (37)

Le premier mode opératoire essayé consiste à mettre de la 2,3,3-triméthylindolénine en présence de 1.4 équivalent d'acide 6-bromohexanoïque dans le 1,2-dichlorobenzène à 110°C pendant 12 heures.^[234] Après traitement du milieu réactionnel selon les conditions décrites dans la littérature, le composé 37 est obtenu avec un rendement de 18%. Plusieurs conditions opératoires ont été testées (variation du temps de réaction et de la température) mais il n'a pas été possible de reproduire les résultats décrits par Jung *et al.*.

Deux autres modes opératoires ont été réalisés.^[235,236] Le mode opératoire décrit par Gerowska *et al.*,^[235] utilisant de l'acide 6-bromohexanoïque en présence de KI dans l'acétonitrile avec de la 2,3,3-triméthylindolénine, a permis d'obtenir le composé 37 avec un rendement de 40%. Celui de Korbel *et al.*^[236] est réalisé en tube scellé sans solvant à 110°C pendant 12 heures (Schéma 28). Le milieu réactionnel est ensuite repris à l'acétone et passé aux ultrasons pendant deux heures. Le composé 37 est obtenu sous la forme d'un précipité rose après filtration avec un rendement de 62%. Ce mode opératoire donne les meilleurs résultats par rapport à ceux décrits par Jung *et al.* et Gerowska *et al.*.

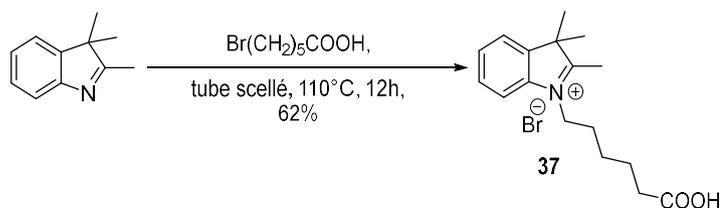


Schéma 28 : Synthèse du composé 37

- Synthèse de la cyanine 5

Le composé **35** est mis présence du composé **36** (1.7 équivalent) dans l'anhydride acétique, le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min. Le composé **36** est activé par l'anhydride acétique pour réagir avec le composé **35**. Le composé **37** (1.7 équivalent), préalablement solubilisé dans la pyridine anhydride, est additionné au mélange réactionnel agité à température ambiante pendant 2h. Le brut réactionnel est ensuite évaporé à sec, puis traité par précipitation dans un mélange chloroforme/cyclohexane. Le précipité est repris dans le chloroforme et lavé avec une solution de HCl (1N), ensuite séché avec MgSO₄ et filtré puis évaporé, dans le but d'éliminer un maximum d'impuretés. Dans le but de simplifier la purification, les équivalents des composés **36** et **37** ont été réduits à 1.2 au lieu des 1.7 équivalents originaux. Des traitements par précipitation ont été essayés avec les solvants suivants : eau, éther diéthylique, acétonitrile, dichlorométhane, acétate d'éthyle, cyclohexane, pentane, acétone et le toluène. Le toluène s'est révélé être le solvant où la cyanine 5 est insoluble, alors que les sous-produits sont solubles. Le produit brut a donc été mis en solution dans le toluène aux ultrasons pendant 1h puis filtré et séché sous vide.

Pour obtenir une pureté maximum, le composé **38** est purifié sur gel de silice dans un mélange CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH. La purification sur gel de silice est difficile, même avec 50% de méthanol, il reste du produit sur le gel de silice. L'utilisation d'un éluant CH₂Cl₂/MeOH/TFA (9/1/0.1%) permet d'obtenir le composé **38** avec une pureté supérieure à 95%. Après purification, un solide bleu foncé est obtenu avec un rendement 64% (Schéma 29).

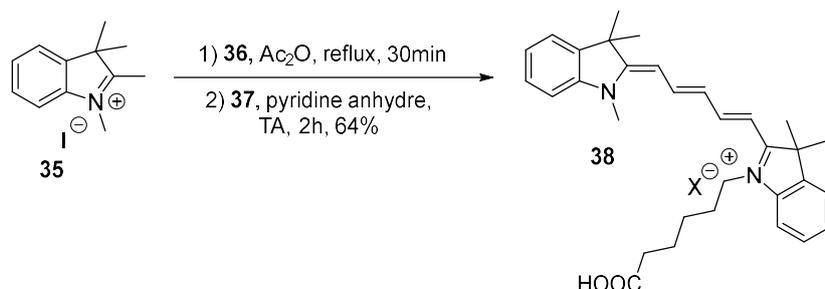


Schéma 29 : Synthèse de la cyanine 5, composé 38

Le mécanisme de la synthèse de la cyanine 5 est décrit dans le Schéma 30. Le composé **36** est activé par l'anhydride acétique libérant de l'acide acétique dans le milieu réactionnel. Le composé **35** va ensuite réagir sous une forme activée avec le composé **36** acétylé. La fonction amine restante est activée par l'anhydride acétique. Ensuite un réarrangement favorisé par la conjugaison entre les doubles liaisons se produit libérant le sous-produit, le *N*-phénylacétamide, AcNHPh. Une forme activée du composé **37** va ensuite réagir avec le composé ayant éliminé AcNHPh pour former un intermédiaire réactionnel. Le composé AcNHPh s'élimine pour former un composé avec des doubles liaisons conjuguées.

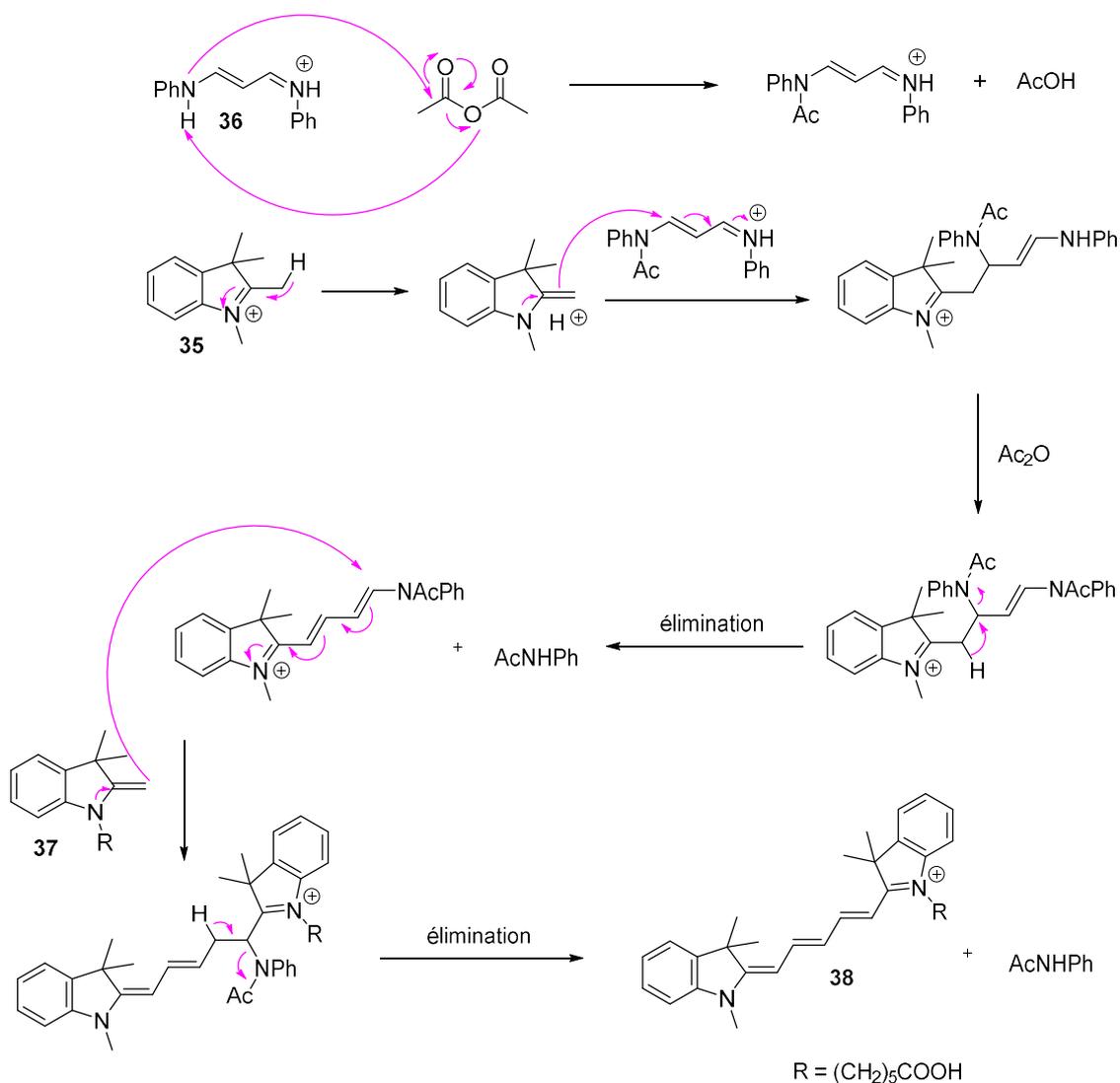


Schéma 30 : Mécanisme réactionnel conduisant à la cyanine 5

III- Fonctionnalisation contrôlée de la plateforme saccharidique

Dans le but de synthétiser le MOMIA envisagé, il est nécessaire d'avoir un dérivé saccharidique trifonctionnel (Schéma 31). Ce dérivé glycosidique doit porter :

- un groupement azoture pour la conjugaison avec le peptide par CuAAC
- un hydroxyle primaire libre pouvant être fluoré (référence froide) ou triflé (précurseur de marquage)
- un bras portant un groupement fonctionnel, par exemple une amine primaire permettant le couplage avec la cyanine 5 par formation d'un lien amide.

Les résultats antérieurs concernant l'incorporation d'un bras portant un groupe azoture et la fluoration efficace de la position 6 sont mis à profit et nous ont conduit à explorer la fonctionnalisation du dérivé C-glycosidique **13**.

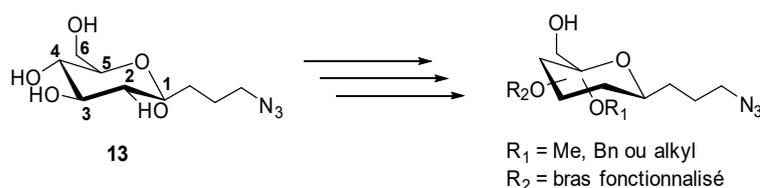


Schéma 31 : Dérivé C-glycosidique trifonctionnel envisagé

Cette fonctionnalisation a été réalisée en plusieurs étapes : tout d'abord la protection de l'hydroxyle primaire en position 6, suivie de l'installation d'un bras fonctionnel sur l'un des hydroxyles secondaires en positions 2, 3 ou 4. Enfin, une protection des hydroxyles secondaires restés libres a été effectuée. L'étude de cette fonctionnalisation nous a conduit à utiliser deux types de groupes protecteurs (trityle et benzylidène) et à explorer diverses réactions d'acylation et alkylation.

III.1- Protection de l'hydroxyle primaire en position 6

Dans un premier temps, il a été choisi de protéger le OH-6 avec un trityle et d'explorer la réactivité du composé possédant trois hydroxyles secondaires. Deux modes opératoires ont été testés.^[219,237] Celui de Gadakh *et al.*,^[237] mettant en réaction du DABCO dans du dichlorométhane, (Schéma 32) a conduit au produit **39** avec un meilleur rendement (72%) que celui utilisant de la pyridine et de la 4-DMAP donnant un rendement de 57%.

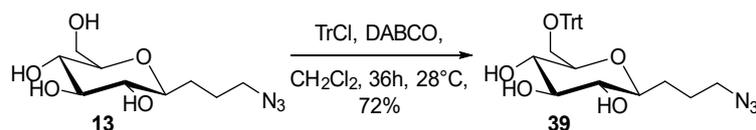


Schéma 32 : Synthèse de la molécule 39

III.2- Acylation régiosélective du composé 39

Dans un premier temps, l'anhydride acétique (Ac_2O) a été choisi comme réactif modèle pour réaliser des acétylations régiosélectives (Tableau 10). Dans un second temps, le réactif choisi est l'acide 3-buténoïque, un acide fonctionnel avec une double liaison pouvant être exploitée pour l'accrochage du fluorophore.

D'après la littérature, la présence d'un groupement encombrant en position 6 d'un méthyl-*O*-glycoside conduit, à une acétylation majoritairement sur la position 3 pour des raisons stériques et électroniques (Schéma 33).^[238,239] En effet, Moitessier *et al.* décrivent que les composés acétylés en positions 2, 3 et 4 sont obtenus avec des proportions respectives de 7, 80 et 13% pour une conversion de 55% en produit de départ.

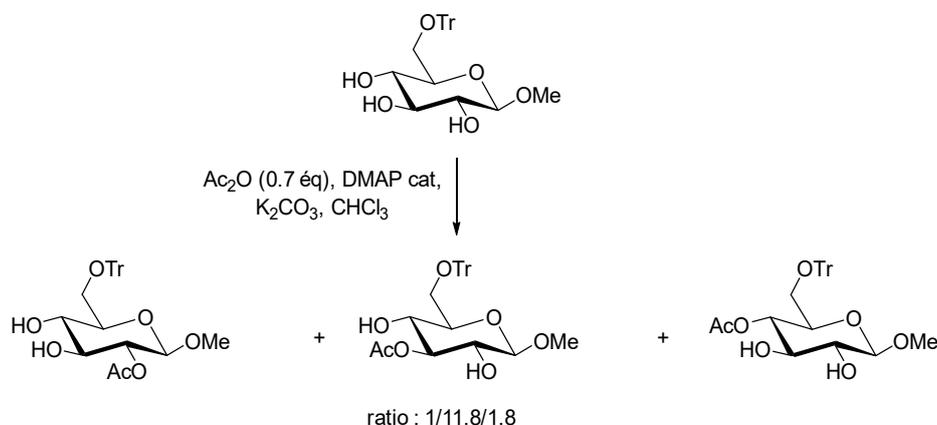


Schéma 33 : Acylation régiosélective décrite par Moitessier *et al.*

Il a été considéré que le même résultat pouvait être obtenu sur le composé 39 protégé également par un trityle. Les acylations peuvent conduire à trois régioisomères. La structure de ces trois régioisomères a été déterminée par RMN ^1H (Schéma 34).

Le premier essai d'acétylation avec Ac_2O a été réalisé selon les conditions opératoires optimales, 0.7 éq d' Ac_2O , décrites par Moitessier *et al.*^[238,239] L'acétylation du composé 39 a été réalisée avec 0.7 éq de Ac_2O (concentration $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), K_2CO_3 et une quantité catalytique de DMAP dans le chloroforme à température ambiante. Une faible conversion a été observée

dûe au défaut en Ac₂O. Comme attendu, le régioisomère 3-OAc **40** est obtenu majoritairement avec un rendement de 16%, **41** et **42** sont aussi obtenus avec de faibles rendements (environ 5%) (Tableau 10, entrée 1). Pour augmenter le taux de conversion, la quantité en Ac₂O a été augmentée à 1.1 éq et une concentration de 5 mg.mL⁻¹. Dans ce cas, une bonne conversion est atteinte et le régioisomère 3-OAc **40** est prédominant avec un rendement de 41%, **41** et **42** sont obtenus avec des rendements respectifs de 14 et 11% (Tableau 10, entrée 2). La régiosélectivité a été augmentée quand la concentration en Ac₂O a été diminuée à 2.5 mg.mL⁻¹ permettant l'accès à **40** avec un rendement de 38% et aux composés **41** et **42** avec de faibles rendements comparés aux autres conditions précédentes (Tableau 10, entrée 3).

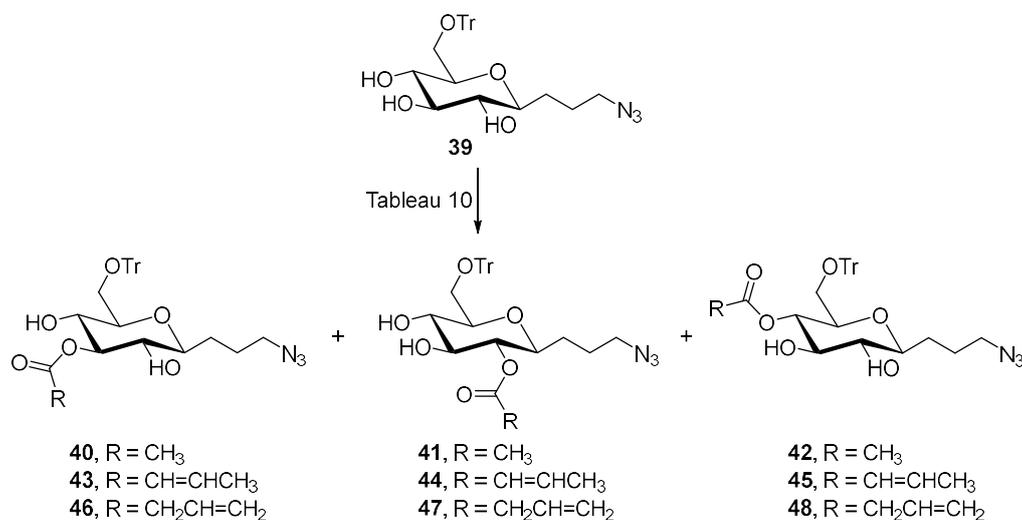


Schéma 34 : Acylation régiosélective du composé **39**

Tableau 10 : Acylation du composé **39**

Entrée	Réactif	Equivalent de réactif	39 récupéré ^e (%)	Composés O-substitués		
				Position 3 ^e	Position 2 ^f	Position 4 ^f
1	Ac ₂ O ^a	0.7	54	40 (16)	41 (<5)	42 (<5)
2	Ac ₂ O ^a	1.1	12	40 (41)	41 (14)	42 (11)
3	Ac ₂ O ^a	1.1	31	40 (38)	41 (8)	42 (<5)
4	acide 3-buténoïque ^b	1.2	37	43 (38)	44 (8)	45 (<5)
5	acide 3-buténoïque ^c	1.2	25	43 (31)	44 (10) ^g	45 (<5)
6	acide 3-buténoïque ^d	1.2	10	46 (25)	47 (8)	48 (<5)

^a K₂CO₃, 4-DMAP cat., Ac₂O, CHCl₃; [Ac₂O] = 1 mg/mL pour entrée 1; [Ac₂O] = 5 mg/mL pour entrée 2; [Ac₂O] = 2.5 mg/mL pour entrée 3. ^b PyBOP, DIEA, acide 3-buténoïque, CH₂Cl₂. ^c IBCF, TEA, 4-DMAP cat., acide 3-buténoïque, CH₂Cl₂. ^d DCC, 4-DMAP cat., acide 3-buténoïque, CH₂Cl₂/ACN. ^e rendement isolé. ^f estimé par RMN ¹H.

Pour étudier le champ d'application des acylations régiosélectives, la réaction avec l'acide 3-buténoïque a ensuite été étudiée. Pour commencer, un protocole utilisant du benzotriazol-1-yl-oxytriprrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) et l'acide 3-buténoïque dans le dichlorométhane a été mis en œuvre (Tableau 10, entrée 4). Le taux de conversion était moyen et des composés inattendus **43**, **44** et **45** ont été obtenus (Schéma 34), résultants de l'isomérisation de la double liaison terminale conduisant à une double liaison substituée plus stable.^[240] Les structures des composés **43**, **44** et **45** ont été confirmées par RMN ¹H grâce à la multiplicité des signaux correspondants à la double liaison (*E*)-disubstituée montrant des doublets déquadruplés vers 5.95 et 7.05 ppm avec une constante de couplage de 15.5 Hz pour la plus grande des constantes de couplage. La réaction réalisée avec l'isobutyle chloroformate (IBCF), la triéthylamine (TEA), une quantité catalytique de DMAP et l'acide 3-buténoïque dans le dichlorométhane donne approximativement les mêmes résultats. Dans les deux cas, il est important de remarquer que le composé **43** substitué en position 3 est obtenu majoritairement avec des rendements respectifs de 38 et 31%, les deux autres régioisomères **44** et **45** ont été obtenus avec de faibles rendements (Tableau 10, entrée 5). Le composé **45** a été identifié en RMN ¹H mais n'a pas été isolé avec une pureté acceptable. Un protocole évitant l'utilisation d'une amine a été réalisé avec la *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), une quantité catalytique de DMAP et de l'acide 3-buténoïque dans le dichlorométhane (Tableau 10, entrée 6). Cette fois-ci, il n'y a pas eu l'isomérisation de la double liaison. Néanmoins la réaction n'a pas été efficace donnant le composé **46** avec un rendement de seulement 25%. La formation des composés **47** et **48** est faible, ces isomères ont été identifiés par RMN ¹H mais n'ont pas pu être isolés. Des sous-produits non-identifiés ont aussi été détectés expliquant les faibles rendements obtenus. Ces réactions d'acylations sont régiosélectives, comme il a été précédemment décrit sur d'autres dérivés saccharidiques portant un groupement encombrant en position 6. Les régioisomères 3-*O*-substitués sont toujours obtenus de manière prédominante.^[238,239] Cependant, dans notre cas, la régiosélectivité n'est pas satisfaisante. De plus, dans le but de développer des outils compatibles avec des applications biologiques, ayant une bonne stabilité *in vivo*, il a été choisi d'explorer d'autres types de lien, comme un lien éther par exemple.

III.3- Protection par un 4,6-*O*-benzylidène

La régiosélectivité des acylations n'étant pas satisfaisantes, la formation d'un lien de type éther a été étudiée. Comme l'attestent quelques publications, les alkylations de dérivés

saccharidiques comportant plus de deux hydroxyles libres donnent des mélanges complexes de différents régioisomères.^[241,242] C'est pourquoi un changement de groupement protecteur sur OH-6 est nécessaire.

La protection de type benzylidène semble adéquate. En effet, elle a l'avantage d'être moins sensible que le trityle et permet la protection de deux hydroxyles, ce qui permet de réduire le nombre de régioisomères susceptibles de se former. Plusieurs modes opératoires ont été testés pour introduire le benzylidène sur les positions 4 et 6 du dérivé glycosidique **13** (Tableau 11) pour obtenir le composé **49** (Schéma 35). En effet, cette réaction menée sur un dérivé C-glycoside possédant un N₃ n'est pas décrite dans la littérature.

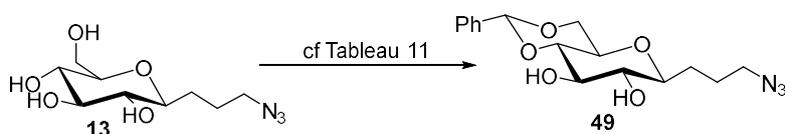


Schéma 35 : Introduction d'un 4,6-O-benzylidène

Les benzylidènes sont classiquement introduits avec du benzaldéhyde et du ZnCl₂ fondu.^[243–245] La réaction a d'abord été réalisée avec du benzaldéhyde non distillé produisant le composé **49** avec un rendement de 40% (Tableau 11, entrée 1). L'utilisation de benzaldéhyde distillé a permis une légère augmentation du rendement, conduisant au composé **49** avec un rendement de 48% (Tableau 11, entrée 2).

Il a été choisi ensuite d'introduire le benzylidène en présence d'APTS.H₂O et de diméthylacétal du benzaldéhyde dans le DMF.^[246] Afin d'évaporer le MeOH formé *in situ*, le milieu réactionnel est placé sur l'évaporateur rotatif et la réaction est ainsi poursuivie. Le produit **49** a été obtenu avec un rendement de 49% (Tableau 11, entrée 3).

Un autre protocole a été testé avec le diméthylacétal du benzaldéhyde en présence de I₂ dans l'acétonitrile dans un tube scellé.^[247] Ces conditions opératoires ont donné le composé **49** avec un rendement de 41% (Tableau 11, entrée 4). Après optimisation de ces conditions, notamment une légère augmentation de la quantité de diméthylacétal du benzaldéhyde et un chauffage à 85°C pendant 12 heures sous pression dans un tube scellé, le composé **49** a été obtenu avec un rendement de 70% (Tableau 11, entrée 5).

Tableau 11 : Introduction d'un 4,6-*O*-benzylidène

Entrée	Réactif (éq)	Catalyseur (éq)	Durée (h)	Température (°C)	Conversion de 13 (%)	Rendement 49 (%)
1	PhCHO (1 éq)	ZnCl ₂ fondu (2)	24	20	50	40
2	PhCHO distillé (1 éq)	ZnCl ₂ fondu (2)	24	20	50	48
3	PhCH(OMe) ₂ (1.65 éq)	APTS.H ₂ O (0.2)	4	65	51	49
4	PhCH(OMe) ₂ (1.1 éq)	I ₂ (0.1)	24	75	59	41
5	PhCH(OMe) ₂ (1.3 éq)	I ₂ (0.1)	12	85	89	70

III.4- Alkylation régiosélective du composé 49

Afin de coupler la sonde fluorescente et le composé 49, il a été choisi d'explorer les alkylations régiosélectives sur les positions 2 et 3 du composé 49.

III.4.1) Aspect bibliographique concernant les alkylations régiosélectives

La régiosélectivité des alkylations en position 3 sur des substrats de type *O*-glycosides est bien connue dans la littérature. La majorité des exemples montre une très bonne régiosélectivité pour les composés comportant un système 1,2-*cis*-diol constitué d'un hydroxyle en position équatoriale et d'un hydroxyle en position axiale. Sur des dérivés saccharidiques présentant un motif 1,2-*trans*-diol, c'est-à-dire deux hydroxyles en position équatoriale (comme dans notre cas), ces réactions de 3-*O*-alkylation sont rarement décrites avec une bonne régiosélectivité.^[248–251] Lonnecker *et al.* ont décrit des alkylations régiosélectives avec du bromure de benzyle, sur des dérivés *trans O*-glycosides, dans des conditions de "transfert de phase", en présence d'une phase aqueuse basique et du TBAHSO₄ dans du dichlorométhane.^[249] Le dérivé 3-*O*-benzylé est obtenu avec un rendement de 57% et le dérivé 2-*O*-benzylé avec un rendement de 40%. Ces conditions opératoires montrent une très bonne conversion du produit de départ mais une faible régiosélectivité. Les exemples décrivant une régiosélectivité totale sur des dérivés *trans O*-glycosides pour ces réactions nécessitent l'emploi de dérivés stannylés de type Bu₂SnO.^[252]

Afin de fonctionnaliser de manière régiosélective le composé 49, plusieurs protocoles inspirés de la littérature ont été testés.

III.4.2) Mise au point avec le bromure de benzyle

Dans un premier temps, le bromure de benzyle BnBr est l'agent alkylant utilisé comme modèle (Schéma 36) (Tableau 12). Au cours de cette réaction deux régioisomères, **50** et **51**, et un produit dialkylé **52** peuvent être formés.

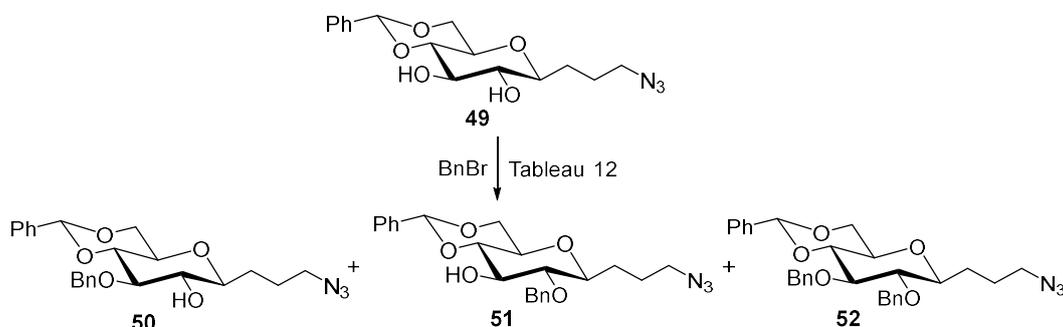


Schéma 36 : Alkylation du composé **49** avec BnBr

Tableau 12 : Essais de régioalkylation avec BnBr

Entrée	Protocole	BnBr (équiv.)	Produit de départ restant (%)	Composés ^a (rendement %)		
				50	51	52
1	A	1.2	9	19	29	29
2	B	4	13	51	14	0
3	C	1.5	51	5	0	0
4	D	1.2	39	33	0	0
5	D	2.5	23	40	0	0
6	D	4	21	38	0	0

^a rendement isolé; Protocole A : Bu₄NHSO₄, BnBr, NaOH, CH₂Cl₂, 60°C ; Protocole B : NaH, THF sec puis CuCl₂, BnBr, reflux; Protocole C : Bu₂SnCl₂, TBABr, K₂CO₃, BnBr, ACN, reflux; Protocole D : Bu₂SnO, toluène, reflux puis DMF, CsF, BnBr, 90°C.

Le premier protocole exploré est une alkylation par transfert de phase. Ce protocole est connu pour avoir une faible régiosélectivité mais est très utilisé et donne un excellent taux de conversion.^[253] Le composé **49** est mis en réaction avec le bromure de benzyle, une quantité catalytique de Bu₄NHSO₄ et une solution aqueuse de NaOH dans le dichlorométhane (protocole A). Sans surprise, une faible régiosélectivité a été observée et des réactions d'alkylation donnant **50**, **51** et **52** avec des rendements respectifs de 19, 29 et 29% (Tableau 12, entrée 1). Un second protocole utilisant NaH et CuCl₂ dans le THF avec 4 éq de BnBr est utilisé.^[250] Les 4,6-*O*-benzylidène glucopyranosides dianioniques chélatés par du cuivre (Schéma 37) sont décrits comme réagissant régiosélectivement avec des agents alkylants et donnant majoritairement une 3-*O*-alkylation avec de bons rendements, même sur un 1,2-*trans*-diol.^[250] Le sucre dianionique

est supposé être désactivé par la formation de sels de cuivre(II), limitant la disubstitution. Dans notre cas, la réaction donne un mélange composé de **49** et de composés mono- et disubstitués, dans lesquels le composé **50** mono-benzylé en position 3 est prépondérant (51%) (Tableau 12, entrée 2).

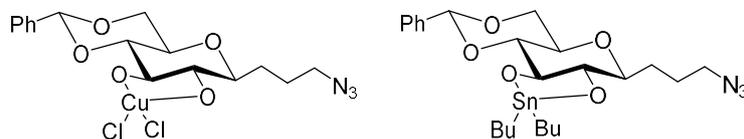


Schéma 37 : Acétale de dichlorure de cuivre(II) et acétale de dibutylstannylène

Une alkylation via la formation d'intermédiaire 2,3-*trans*-stannylidène acétal a ensuite été envisagée. Un protocole récent, original et environnemental a été décrit avec une quantité catalytique de Bu_2SnCl_2 , TBABr et K_2CO_3 dans l'acétonitrile.^[252] Dans notre cas, seulement une modeste conversion du composé **49** a été observée et des plusieurs sous-produits non-identifiés ont aussi été détectés malgré diverses modifications des paramètres de la réaction (temps de réaction, équivalents de BnBr et température). Seul le dérivé 3-*O*-benzyl **50** a été isolé avec un faible rendement de 5% (Tableau 12, entrée 3). La procédure classique "one-pot" utilisant du Bu_2SnO a été réalisée.^[254] L'oxyde de dibutylétain a longtemps été utilisé et le mécanisme formule l'hypothèse d'être contrôlé par des structures complexes de stannylènes (dimère ou polymère) et donne une alkylation régiosélective.^[239,255] Il a été reporté que l'utilisation d'additif tels que les halogénures de tétrabutylammonium ou les sels fluorés augmentent le rendement des alkylations.^[256,257] L'alkylation régiosélective de diols est de nos jours mise en oeuvre avec une quantité catalytique de Bu_2SnO .^[242,252] Cependant, il a été montré par Pei *et al.*^[252] que la benzylation du méthyl 4,6-*O*-benzylidène- α -D-glucopyranose requiert une quantité stœchiométrique de Bu_2SnO pour former majoritairement un régioisomère. Ils ont montré que l'acétal d'étain formé (Schéma 37) avec une quantité catalytique de Bu_2SnO ne peut pas être régénéré avec un *trans*-diol menant à une faible régiosélectivité. Suivant ces observations, nous avons préféré utiliser une quantité non catalytique de Bu_2SnO . Une solution de **49** et de Bu_2SnO (1.2 éq) dans le toluène a été mise à reflux pendant deux heures. La spectrométrie Infra-Rouge montre la disparition de la bande d'absorption des groupements hydroxyles et la formation de l'intermédiaire stannylidène acétal. Le DMF, BnBr (1.2 éq) et CsF (1.5 éq) sont ajoutés et le milieu est chauffé à 90°C pendant 48 heures. Une 3-*O*-benzylation totalement régiosélective de **49** a été observée et le régioisomère **50** a été obtenu avec un rendement de 33% (Tableau 12, entrée 4). Dans ces conditions, le taux de conversion est d'environ 60% et 39% du composé de départ **49** ont été récupérés. Pour augmenter le taux

de conversion, la quantité de BnBr a été augmentée. Avec 2.5 éq de BnBr, le taux de conversion a atteint 80% et le composé **50** a été isolé avec un rendement de 40% (Tableau 12, entrée 5). L'usage de 4 éq de BnBr n'a pas permis d'augmenter la conversion et le rendement de **50**. Les résultats suggèrent que l'usage de 2.5 éq de BnBr est la solution la plus efficace en termes de régiosélectivité et de rendement (Tableau 12, entrée 6).

Les régiosomères **50**, **51** et **52** ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice et leurs structures ont été établies par RMN 1D et 2D. Les structures des régiosomères **50** et **51** ont été déterminées par RMN NOESY (Figure 81). Des corrélations ^1H - ^1H dans l'espace ont permis de déterminer que la structure de l'unique régioisomère **51** obtenu par le protocole D est le composé 3-O-Bn. En effet, une corrélation entre le CH_2Bn et H-3 et H-4 a confirmé la structure du composé 3-O-benzyl **51**. Le spectre NOESY de **52** a montré plusieurs corrélations de CH_2Bn avec H-1, H-2 et H-3 et aussi avec des protons du bras pseudo-anomérique confirmant la structure du composé 2-O-benzyl **52**.

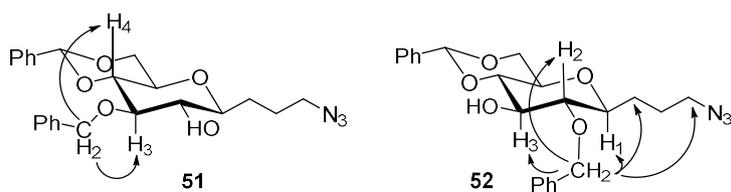


Figure 81 : Corrélations NOESY des composés **51** et **52**

III.4.3) Alkylation

Dans le but de coupler la sonde fluorescente au dérivé saccharidique, plusieurs agents d'alkylations fonctionnels (Figure 82) ont été choisis. Trois types d'électrophiles ont été utilisés :

- Le bromure d'allyle **53**
- Différents bromoacétates d'alkyle **54-57**
- Des alkylamines protégées par un Boc ou un phtalimide **58-59**

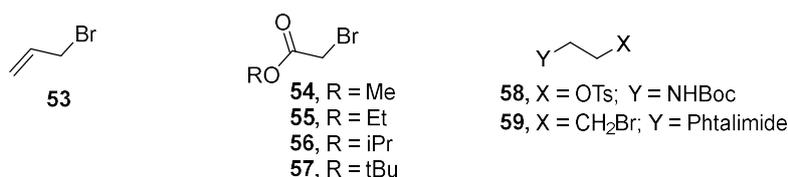


Figure 82 : Structure des différents agents alkylants

Ces divers électrophiles sont mis en réaction avec la méthode qui a donné les meilleurs résultats avec BnBr : la méthode utilisant Bu_2SnO .

L'alkylation avec le bromure d'allyle **53** a été mise en œuvre à 50°C, pour éviter d'être à reflux du bromure d'allyle ($T_{\text{éb}} = 70^\circ\text{C}$), donnant le composé 3-O-allyl, **60**, (Figure 83) avec un bon rendement de 50%. De même que la benzylation, la conversion n'est pas complète et environ 30% du produit de départ sont récupérés même après une optimisation attentionnée (température et temps de réaction). L'alkylation avec cet agent alkylant a aussi été essayée avec le protocole par transfert de phase utilisant Bu_4NHSO_4 et NaOH dans CH_2Cl_2 . Dans ce cas, la conversion est bonne mais la régiosélectivité est faible, le composé disubstitué **61** est formé avec un rendement de 21% et le composé **60** avec un rendement de 50% équivalent à celui du protocole utilisant Bu_2SnO . La RMN ^1H 1D et 2D a confirmé sans ambiguïté la structure du composé **60**.

L'alkylation a été réalisée avec le bromoacétate de méthyle **54** mais le composé attendu n'a pas été obtenu. Le taux de conversion est faible et des produits secondaires non-identifiés ont été formés. L'analyse du milieu réactionnel par spectrométrie de masse a montré la présence du C-glycoside **62** portant un groupe $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 416.1318). Présument que l'ester de méthyle est trop sensible, le bromoacétate d'éthyle **55** et le bromoacétate d'*iso*-propyle **56** ont été utilisés là encore sans succès. Le bromoacétate de *tert*-butyle **57** a finalement été testé et le composé **63** a été obtenu avec un rendement de 32%. Au regard des différents essais, il apparaît que l'ester de *tert*-butyl est plus stable dans les conditions opératoires mises en œuvre.

Finalement, deux alkylamines protégées par un phtalimide ou un Boc **58** et **59** ont été utilisées. La réaction a été menée sans succès avec le dérivé **58**, le produit de départ a été récupéré. Le 3-bromopropyle phtalimide **59** a quant à lui réagit avec succès avec **49** conduisant au composé **64** avec un rendement de 31% sans formation de sous-produits et avec un taux de conversion estimé à 59%.

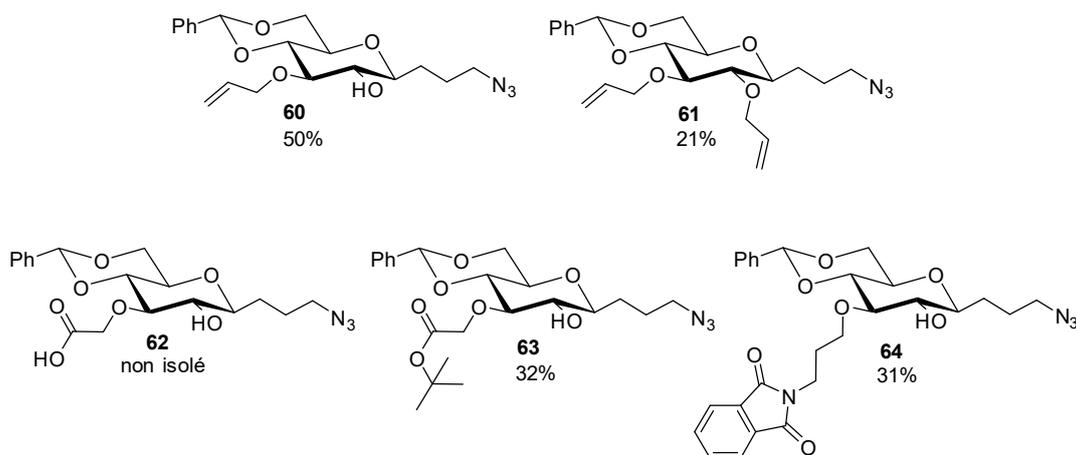


Figure 83 : Structures des composés 60-64

Les alkylations régiosélectives du composé **49** portant un motif 1,2-*trans*-diol ont été soigneusement optimisées avec le bromure de benzyle révélant que le protocole avec le Bu₂SnO est le plus efficace. Cette stratégie a été appliquée à d'autres électrophiles fonctionnels *i.e.* le bromure d'allyle, le 3-bromopropyle phthalimide et le bromoacétate de *tert*-butyle. Les dérivés saccharidiques 3-*O*-substitués correspondants ont été obtenus avec des rendements pouvant paraître modestes mais toutefois satisfaisants compte tenu de la difficulté de cette réaction. Le composé **64** est choisi pour la suite des synthèses. Ce composé porte un bras fonctionnel avec une amine protégée par un phthalimide qui peut être déprotégée pour être engagée dans un couplage avec la cyanine.^[258]

III.5- Méthylation de la position 2

Les radiofluorations menées ultérieurement imposent de ne pas avoir d'hydroxyle libre pouvant complexer le fluor-18. Il a donc été choisi de réaliser une *O*-méthylation de la position 2. Le composé **64** est méthylyé dans le DMF en présence de NaH et du diméthylsulfate sous atmosphère inerte dans les conditions suivantes : NaH (1.1 éq) et Me₂SO₄ (1.2 éq) à température ambiante pendant 24 heures. Le composé **65** a été formé avec un rendement de 19% et le produit de départ est récupéré à 48%. Ce rendement n'étant pas satisfaisant, il a été choisi de changer d'agent méthylyant en prenant le iodométhane (*Schéma 38*). De façon surprenante, cette réaction a été assez délicate et a nécessité une certaine mise au point (*Tableau 13*).

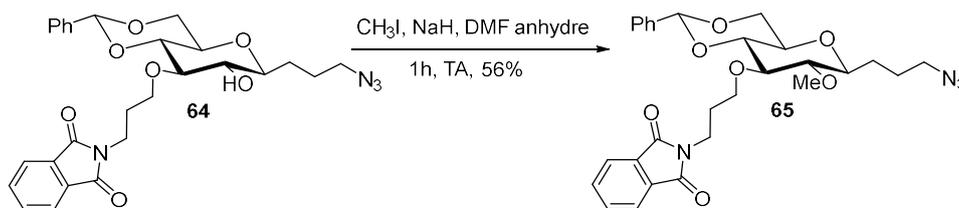


Schéma 38 : Méthylation de la position 2

Toutes les réactions de méthylation ont été réalisées à température ambiante. Les conditions opératoires testées dans un premier temps mettent en jeu autant d'équivalents (2.5 éq.) de CH_3I que de NaH et ont permis l'obtention du composé **65** avec un rendement de 20% (Tableau 13, entrée 1). Dans ces conditions, le produit de départ s'est dégradé quasi intégralement. Nous avons été surpris par ce résultat et la difficulté à réaliser cette simple méthylation peut être due à la réactivité du motif phtalimide que nous n'avions pas suspectée au préalable et qui est assez peu relevée dans la littérature. En effet, deux publications ont relevé la réduction en présence de NaH ^[259] et l'hydrolyse en présence d'eau^[260] du phtalimide.

Dans l'objectif d'utiliser le moins de NaH possible, les équivalents de ce réactif ont été réduits à 1.2 éq. Pour augmenter la consommation du produit de départ **64**, il a été choisi d'augmenter la quantité de CH_3I à 15 équivalents. Dans ces conditions, le produit **65** est obtenu avec un rendement de 20% et le produit de départ non consommé n'est récupéré qu'à hauteur de 22% (Tableau 13, entrée 2). Une forte dégradation du produit de départ est là encore observée. Un temps de réaction de 24 heures, pouvant conduire à une meilleure conversion du produit de départ, est trop long pour cette réaction. Dans le but de consommer tout le produit de départ et d'augmenter le rendement du composé **65**, les quantités de CH_3I et de NaH sont augmentées (30 éq et 1.5 éq respectivement) et le temps de réaction est diminué à six heures. Dans ces conditions le produit **65** est formé à 40% et le produit de départ n'ayant pas réagi est récupéré à 30% (Tableau 13, entrée 3). Un taux de dégradation non négligeable de produit de départ est encore observé. La durée de la réaction a donc été diminuée à une heure dans le but de diminuer cette dégradation. Dans ces conditions, le produit **65** est formé avec un rendement de 38% et le produit de départ est récupéré à hauteur de 28% (Tableau 13, entrée 4). La quantité de NaH a été augmentée à 1.8 éq. Le produit **65** est ainsi formé avec un rendement de 56%, le produit de départ est récupéré à 40% (Tableau 13, entrée 5) montrant qu'il n'y a pas de dégradation dans ces conditions.

Tableau 13 : Réactions de méthylation de la position 2

Entrée	CH ₃ I (éq)	NaH (éq)	Temps (h)	Récupération produit départ 64 (%)	Rendement 65 (%)
1	2.5	2.5	6	0	20
2	15	1.2	24	22	20
3	30	1.5	6	30	40
4	30	1.6	1	28	38
5	30	1.8	1	40	56

A l'issue de cette mise au point, le composé **65** a pu être obtenu avec un rendement de 56%, ce qui peut apparaître modeste, mais ceci est compensé par la récupération du produit de départ non consommé.

III.6- Ouverture régiosélective du 4,6-*O*-benzylidène

Dans l'objectif de synthétiser la référence froide et le précurseur de marquage, il est nécessaire de déprotéger la position 6. Cette position une fois déprotégée sert à l'introduction d'un triflate comme bon groupe partant pour la synthèse du précurseur de marquage ou d'un fluor pour la référence non-radioactive. Il a été choisi de réaliser une déprotection par réduction régiosélective du 4,6-*O*-benzylidène décrite dans la littérature et pouvant conduire à deux produits régioisomères (4-OBn, 6-OH et 4-OH, 6-OBn). Le composé 4-OBn, 6-OH est le composé souhaité, plusieurs méthodes existent pour réaliser cette réaction régiosélective en utilisant des couples hydrure/acide de Lewis.^[261,262]

Plusieurs couples hydrure/acide de Lewis ont donc été testés (*Schéma 39*). Les premières conditions utilisées sont des conditions classiques avec LiAlH₄ (1.5 éq) et AlCl₃ (1.5 éq) dans le dichlorométhane anhydre. Cette réaction n'a pas fonctionné, une mauvaise conversion a été observée, et seul le composé dihydroxylé **67** a été obtenu avec un rendement de 23%. Ce premier résultat est tout à fait surprenant compte tenu de nombreux exemples décrits de la littérature avec cette association de réactifs. Dans ces conditions le produit **66** était attendu, mais n'a pas été formé.

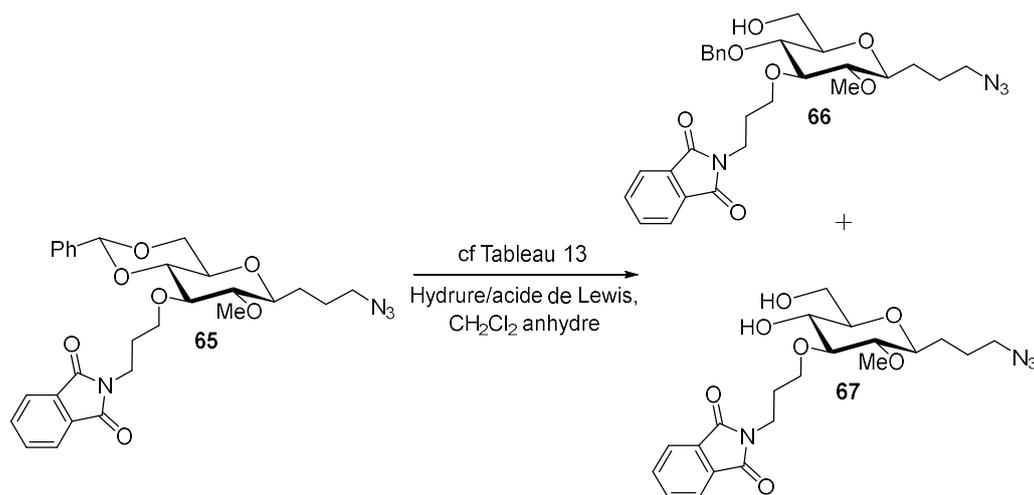


Schéma 39 : Ouverture régiosélective du benzylidène

Il a donc été choisi d'utiliser BH₃.THF comme donneur d'hydrure et trois catalyseurs, Cu(OTf)₂, CoCl₂ et TMSOTf.^[261–264] Ces conditions opératoires sont décrites dans la littérature pour fournir le régioisomère 4-OBn, 6-OH voulu avec un excellent rendement et une excellente régiosélectivité. Les conditions décrites par Shie *et al.*,^[263] utilisant Cu(OTf)₂ (0.15 éq) et BH₃.THF (5 éq) dans le dichlorométhane anhydre n'ont pas permis d'obtenir le composé **66**, seul le composé **67** a été obtenu avec un rendement de 90%. Tani *et al.*^[264] utilise CoCl₂ (3 éq) avec BH₃.THF (5 éq) dans le dichlorométhane anhydre. Dans ces conditions, seul le produit **67** est formé avec un rendement de 95%. Ces deux résultats sont assez surprenants. Le couple BH₃.THF/TMSOTf est ensuite mis en oeuvre pour explorer cette réaction d'ouverture régiosélective.^[261] Tous les essais sont répertoriés dans le Tableau 14. Cette réaction nécessite une verrerie très sèche, du dichlorométhane anhydride et une atmosphère inerte.

Les premières conditions opératoires appliquées sont un temps de réaction de 15 minutes, 5 équivalents de BH₃.THF et 0.15 équivalent de TMSOTf (Tableau 14, entrée 1). Dans ces conditions, la conversion du produit de départ est satisfaisante, cependant le composé **66** n'est formé qu'à 20% et **67** a moins de 5%. Les équivalents de BH₃.THF et de TMSOTf ont ensuite été doublés (Tableau 14, entrée 2). Dans ces conditions les résultats sont les mêmes que précédemment.

Daragics *et al.* décrivent aussi que la réaction donne des rendements équivalents avec une quantité plus faible de BH₃.THF.^[261] Il a donc été choisi de réduire la quantité de BH₃.THF à 1 équivalent en conservant 0.3 équivalent de TMSOTf et en augmentant la durée de la réaction à 20 min. Dans ces conditions, la formation des produits **66** et **67** a augmenté avec des rendements respectifs de 32 et 5% (Tableau 14, entrée 3). La conversion du produit de départ **65** est

équivalente à celle des entrées 1 et 2. La quantité de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ a donc peu d'impact sur la conversion du produit de départ. Il a donc été choisi d'augmenter le temps de réaction pour observer l'influence de ce paramètre sur la conversion du produit de départ.

Les équivalents de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ sont maintenus à 1 équivalent, ceux de TMSOTf sont fixes à 0.3 équivalent et la durée de réaction est augmentée à 1h30. Dans ces conditions, la conversion du produit de départ est améliorée, les composés **66** et **67** sont formés avec des rendements respectifs de 26 et 36% (Tableau 14, entrée 4). L'augmentation de la durée de la réaction permet une meilleure conversion, cependant la formation du composé **67** devient majoritaire par rapport à celle du composé **66**.

Il a été choisi d'augmenter la durée de la réaction à 4 heures et de fixer les équivalents de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ et TMSOTf respectivement à 1 et 0.15 (Tableau 14, entrées 5 et 6). Ces deux entrées ont été réalisées le même jour sur le même lot de produit **65**. Il est observé que dans les mêmes conditions opératoires, cette réaction ne donne pas les mêmes résultats. Sur un lot, les composés **66** et **67** sont formés avec des rendements de 24% (Tableau 14, entrée 6) et sur l'autre lot, leurs rendements respectifs sont de 42 et 40% (Tableau 14, entrée 5). D'une manière générale, le produit de départ a été partiellement récupéré.

Tableau 14 : Réactions d'ouverture régiosélective du benzylidène avec $\text{BH}_3\cdot\text{THF}/\text{TMSOTf}$

Entrée	$\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (éq)	TMSOTf (éq)	Temps	Conversion produit départ 65 (%)	Rendement 66 (%)	Rendement 67 (%)
1	5	0.15	15 min	61	20	5
2	10	0.3	15 min	62	20	5
3	1	0.3	20 min	64	32	5
4	1	0.3	1.5 h	78	26	36
5	1	0.3	4 h	100	42	40
6	1	0.3	4 h	76	24	24

En conclusion, cette réaction est difficile à contrôler quelle que soit la modification des équivalents de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, de TMSOTf et la durée de réaction. De plus, il est difficile d'obtenir sélectivement le composé **66**. Cette réaction est difficilement reproductible, réalisée le même jour dans les mêmes conditions avec la même quantité de substrat, les résultats diffèrent. Ces conditions ne sont pas optimales et sont loin des rendements décrits dans la littérature, la question suivante est posée : la présence du phtalimide a-t-elle un impact sur cette réaction ?

Cette réaction a donc été réalisée sur le composé **49** portant un groupement benzylidène et deux hydroxyles libres. Le mode opératoire avec $\text{BH}_3\cdot\text{THF}/\text{TMSOTf}$ dans les conditions

décrites par Daragics *et al.*^[261,262] : 5 équivalents de BH₃.THF, 0.15 équivalent de TMSOTf, CH₂Cl₂ anhydre comme solvant, atmosphère inerte, température ambiante et une durée de réaction de quatre heures. Les conditions décrites précédemment par Tani *et al.* (CoCl₂ (3 éq) avec BH₃.THF (5 éq) et Shie *et al.* (Cu(OTf)₂ (0.15 éq) et BH₃.THF (5 éq)) sont aussi réalisées sur le composé **49**. Seule la formation du produit totalement déprotégé **13** est observée avec un rendement de 70% pour les conditions de Daragics *et al.* et 90% pour les conditions de Tani *et al.* et Shie *et al.* (Schéma 40).

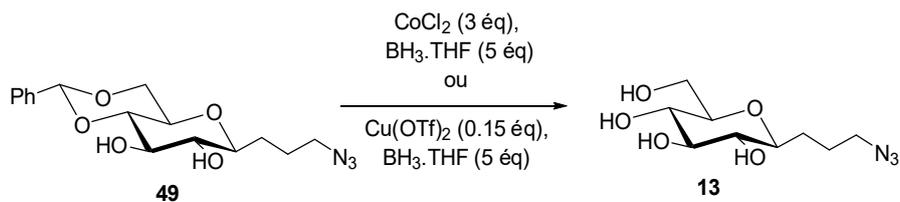


Schéma 40 : Ouverture régiosélective sur le composé **49**

Ces résultats montrent que la présence du phtalimide n'a pas d'impact sur cette réaction d'ouverture régiosélective. Une déprotection totale du benzyldène porté par le composé **65** est observée dans les trois conditions opératoires réalisées. Ces résultats sont assez surprenants au regard des nombreux exemples de déprotection de benzyldène décrits dans la littérature. Le point commun entre les composés **65** et **49** est la présence du motif azoture N₃. Il est possible que ce groupement azoture ait un impact sur cette réaction. Le composé 4-OBn, 6-OH **66** ayant néanmoins été obtenu en quantité suffisante, nous avons poursuivi la synthèse de la référence non-radioactive et du précurseur de marquage.

IV- Synthèse de la référence non-radioactive et du précurseur de marquage

IV.1- Synthèse de la référence non-radioactive

La référence non-radioactive est nécessaire pour effectuer les tests biologiques *in vitro* mais aussi les premiers essais d'imagerie *in vivo* par FPIR. Elle peut être obtenue à ce stade en trois grandes étapes :

- introduction du fluor en position 6
- couplage avec la cyanine
- conjugaison avec le peptide via CuAAC.

IV.1.1) Fluoration de la position 6

La fluoration en position 6 du composé **66** a été réalisée par réaction avec le DAST soit dans le diglyme, soit dans le dichlorométhane.^[27] Dans le diglyme, le rendement du composé **68** est de 46%. La présence de sous-produits non-fluorés et non-identifiés ont été observés à hauteur de 50%. Dans le dichlorométhane, le composé **68** est formé avec un rendement de 30% et le produit de départ non converti est récupéré pour être remis en réaction (*Schéma 41*). La réaction dans le dichlorométhane est préférée car le produit de départ est recyclable, de plus elle est plus facile à mettre en œuvre, le diglyme étant difficile à éliminer totalement.

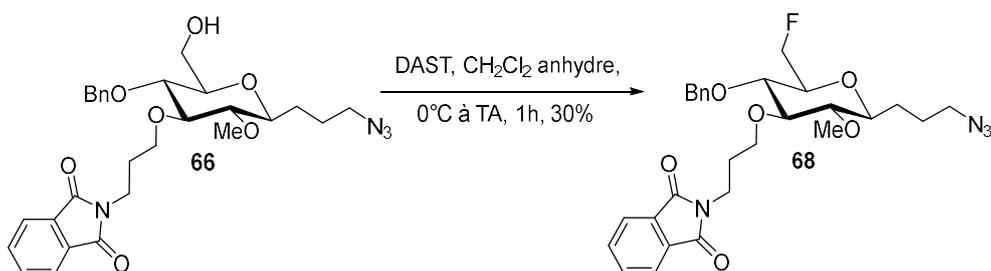


Schéma 41 : Fluoration du composé **66**

IV.1.2) Déprotection du groupement phthalimide

Pour déprotéger l'amine portant le groupement phthalimide, la réaction a été réalisée en s'inspirant de conditions réactionnelles décrites par Heidecke et Lindhorst.^[265] Cette méthode se déroule dans le méthanol en présence d'hydrazine mono-hydrate à 40°C pendant 8h (*Schéma 42*).

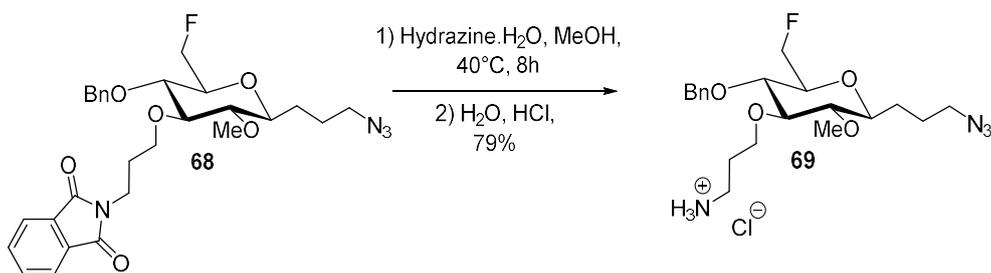


Schéma 42 : Déprotection du phthalimide

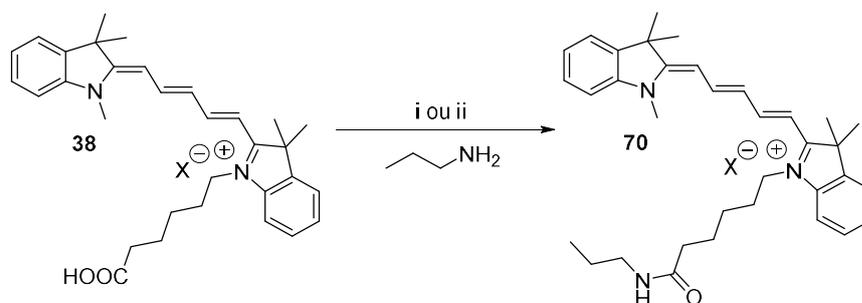
Le composé **69** est obtenu sous forme de chlorhydrate par extraction avec une solution aqueuse d'HCl 1N. Ce traitement a permis d'obtenir sans purification sur gel de silice le composé **69** avec un rendement de 79% après lyophilisation.

IV.1.3) Couplage de la cyanine avec des amines modèles : propylamine, benzylamine et éthanolamine

Le couplage entre l'amine **69** et la cyanine **5** étant une étape clé, plusieurs conditions de couplage ont été explorées dans un premier temps avec des amines moins élaborées que **69** en utilisant divers agents d'activation.

- La propylamine

Dans un premier temps, la propylamine a été utilisée et deux protocoles ont été essayés avec la cyanine **5** **38** : l'un mettant en jeu la diisopropylcarbodiimide (DIC) comme agent de couplage^[266] et l'autre l'isobutyle chloroformiate (IBCF).^[267] Le produit **70** est formé avec un rendement de 44% avec DIC et 48% avec IBCF (*Schéma 43*). L'activation avec DIC conduit également à un sous-produit non identifié rendant les purifications difficiles.



i : DIC (2 éq), $CH_2Cl_2/CHCl_3$, 24h ; ii : IBCF (1.1 éq), Et_3N (3.2 éq), $0^\circ C$, 1h puis **38** (2.3 éq), TA, 24h

Schéma 43 : Couplage de la cyanine avec la propylamine

- La benzylamine

Dans un deuxième temps, la benzylamine (2 éq) a été utilisée et a été mise à réagir avec **38** en présence de DIC (*Schéma 44*). Après purification par chromatographie sur gel de silice, le composé **71** est obtenu avec un rendement satisfaisant de 72%. Le même sous-produit que celui obtenu avec la propylamine est formé lors de cette réaction.

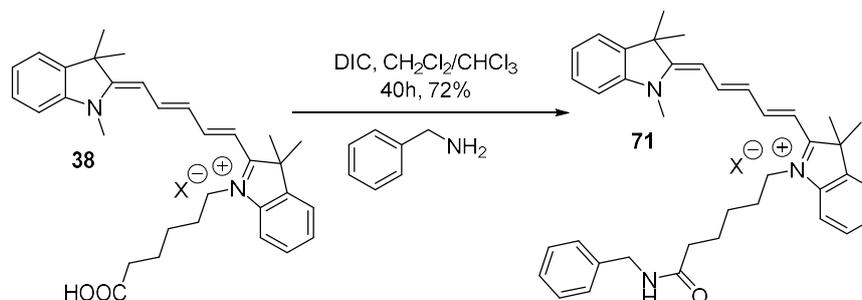


Schéma 44 : Couplage de la cyanine avec la benzylamine

- L'éthanolamine

Dans le but d'étudier la chimiosélectivité vis-à-vis d'un composé portant à la fois une amine primaire et un hydroxyle primaire, l'éthanol amine a été utilisée comme modèle.

Le protocole utilisant l'agent de couplage IBCF avec la cyanine 5 **38** et l'éthanolamine (*Schéma 45*).

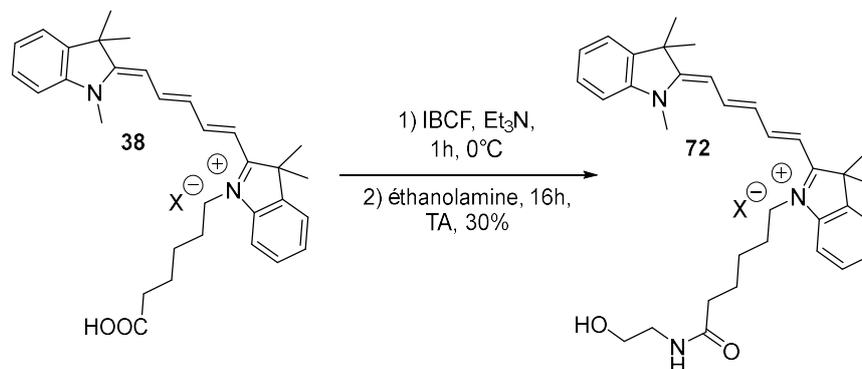


Schéma 45 : Réaction de couplage entre la cyanine 5 et l'éthanolamine

Après purification sur le composé **72** est isolé avec un rendement de 30%. Le composé **72** est contrôlé par spectroscopie IR montrant la présence d'une bande vers 3300 cm⁻¹ confirmant la présence d'un hydroxyle libre. Cette méthode de couplage est donc chimiosélective, le couplage forme uniquement un lien amide, ce qui est le but recherché.

Une méthode de couplage *via* la cyanine 5 préalablement activée avec une hydroxysuccinimide a aussi été tentée. La réaction est réalisée à température ambiante dans le dichlorométhane pendant 12 heures en présence de DCC et de *N*-hydroxysuccinimide (*Schéma 46*).^[234] L'activation de la fonction acide par l'ester de NHS est quantitative.

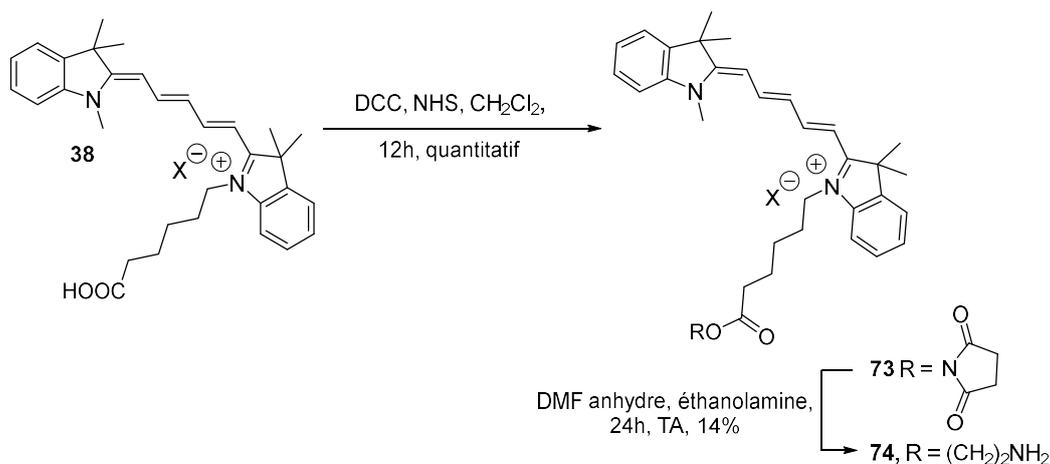


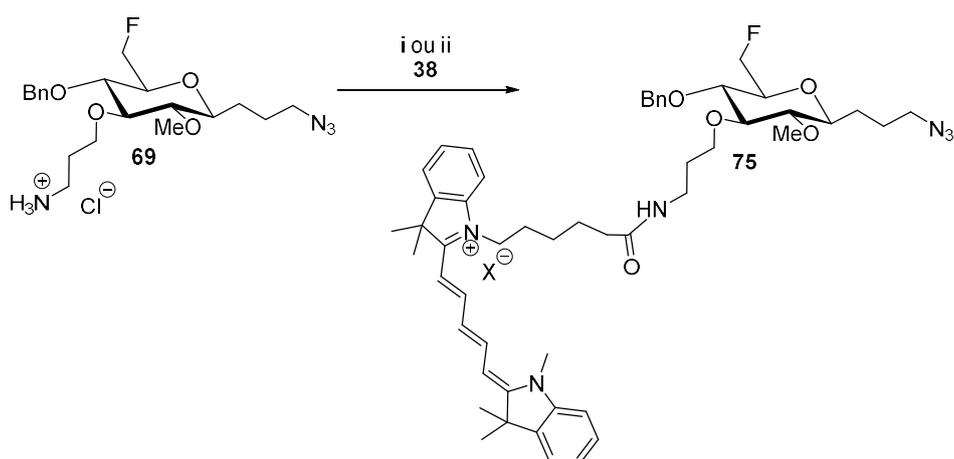
Schéma 46 : Activation de la fonction COOH de la cyanine 5 et réaction avec l'éthanolamine

Cette cyanine activée a ensuite été mise en réaction avec l'éthanolamine dans du DMF^[268] à température ambiante pendant 24h. Après purification et analyse Infra-Rouge, l'absence de bande OH, semble indiquer un couplage par la fonction hydroxyle de l'éthanolamine, donnant le composé **74** avec un rendement de 14%. Cette méthode donne un faible rendement. La chimiosélectivité observée précédemment avec IBCF (formation d'un lien amide) semble différente dans ce cas (formation d'un lien ester).

L'utilisation des agents de couplage DIC et IBCF sont concluantes. Les rendements obtenus sont satisfaisants dans le cadre de réaction avec des amines simples. Cependant, il est à noter la présence de sous-produits difficilement séparables lors des réactions avec DIC.

IV.1.4) Couplage de la cyanine avec le C-glycoside **69**

Au vu des résultats obtenus sur les synthons simples, le couplage entre la molécule cible **69** et la cyanine **5 38** a été réalisé avec DIC et IBCF (*Schéma 47*). Le composé **75** a été obtenu avec un faible rendement inférieur 10% par activation de la cyanine avec DIC. Ce faible rendement peut être expliqué car le produit **69** sous forme ammonium n'a pas été neutralisé dans ce premier essai. De plus, le sous produit observé dans les réactions impliquant DIC a aussi été retrouvé ici et a été encore plus difficile à séparer. En effet, plusieurs purifications sur gel de silice et sur résine LH20[®] (exclusion stérique) ont dues être réalisées pour obtenir le produit **75** avec une pureté convenable. L'activation par IBCF a ensuite été testé. Dans ce cas, le composé **69** est neutralisé *in situ* avec de la triéthylamine et le produit **75** est formé avec un rendement d'environ 20% après purification. D'autres essais ont été réalisés en faisant varier le nombre d'équivalents d'IBCF, de triéthylamine et de **69** mais n'ont cependant pas donné de meilleurs rendements.



i : DIC (2 éq), 38, CH₂Cl₂/CHCl₃, TA, 24h ;
ii : IBCF (1.1 éq), Et₃N (3.2 éq), 38, 0°C, 1h puis 69 (2.3 éq) , TA, 24h

Schéma 47 : Réaction de formation du composé **75**

Malgré le rendement relativement faible qu'il conviendrait d'améliorer, la référence non-radioactive du groupement prosthétique est obtenue en quantité suffisante pour les développements ultérieurs.

IV.1.5) Synthèse de la référence glycopeptidique

Le peptide utilisé est un dérivé de la séquence RGD, le c(RGDfK), dérivé couramment utilisé en imagerie moléculaire et ayant une affinité similaire à celle de c(RDGfC) utilisé précédemment. Dans le contexte d'une conjugaison par CuAAC avec le groupement prosthétique fluoré **75** ce peptide doit être propargylé (*Schéma 48*) et ceci a été réalisé par fonctionnalisation de la chaîne latérale de la lysine. Le c(RGDfK) est mis en présence de Et₃N dans le DMF et le 1-(pent-4-ynoxy)pyrrolidine-2,5-dione est ensuite additionné. Après purification sur colonne d'exclusion stérique (LH20), le composé **76** est obtenu avec un rendement de 82%.^[269]

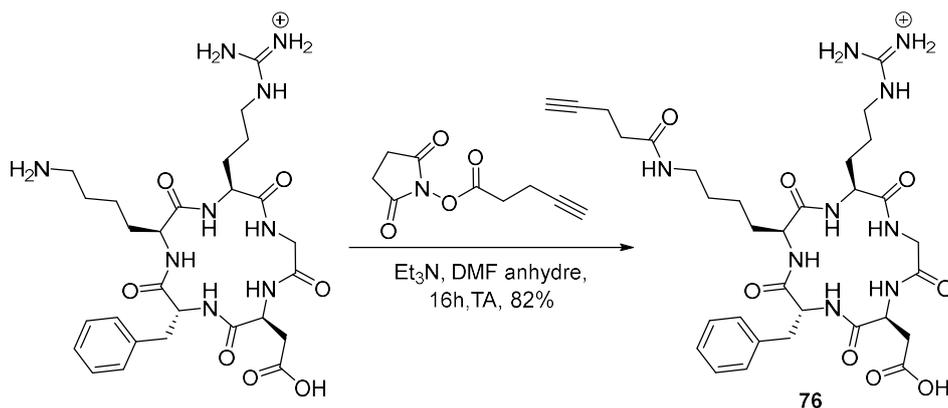


Schéma 48 : Propargylation du c(RGDfK)

La CuAAC est réalisée dans des conditions classiques en présence de Cu(OAc)₂ (0.1 éq), d'ascorbate de sodium (0.2 éq), du peptide propargylé **76** (1 éq) dans un mélange H₂O/tBuOH (5/5) pendant 6h à température ambiante (Schéma 49).

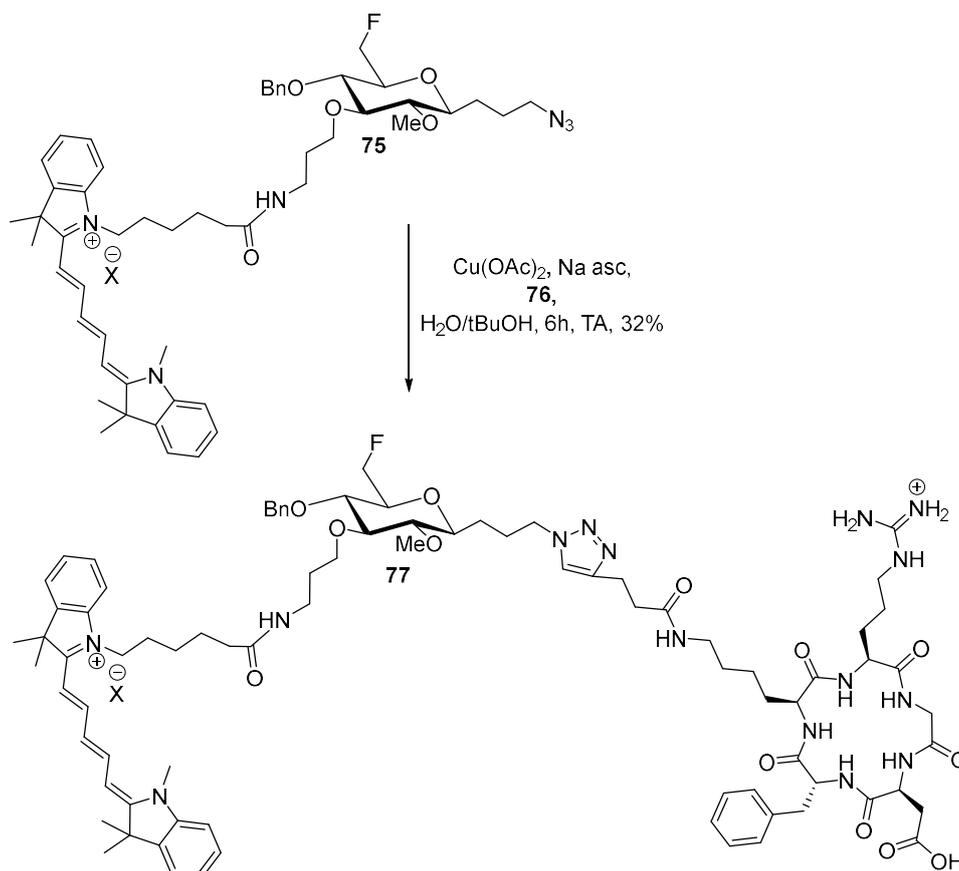


Schéma 49 : Synthèse de la référence glycopeptidique **77**

Le milieu réactionnel est purifié sur résine LH20[®] (exclusion stérique). Le produit **77** est obtenu avec un rendement de 32%. Les deux références non-radioactives **75** (référence de groupement prosthétique) et **77** (référence du glycopeptide) ont ainsi été isolées. Cette dernière

sera utilisée dans le cadre d'évaluations biologiques *in vitro* vis à vis les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et ses propriétés de fluorescence dans le cadre d'une utilisation en imagerie FPIR seront vérifiées.

La synthèse du précurseur de marquage est nécessaire pour le développement ultérieur des radiosynthèses.

IV.2- Synthèse du précurseur de marquage

Le précurseur de marquage doit comporter la cyanine 5 et un bon groupe partant en position 6 pour effectuer la radiofluoration. La synthèse du précurseur de marquage est réalisée en trois étapes à partir du composé **66** :

- La déprotection de l'amine portant le groupement phtalimide
- Le couplage de la cyanine avec le dérivé C-glycoside
- La triflation de la position 6 du dérivé saccharidique

IV.2.1) Déprotection du phtalimide

Le groupement phtalimide est déprotégé dans les mêmes conditions réactionnelles^[265] que celles employées pour le composé **68** (Schéma 50).

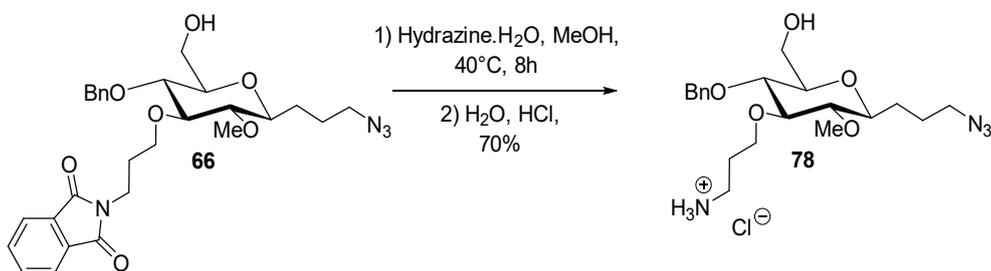


Schéma 50 : Déprotection de l'amine portant le groupement phtalimide

L'obtention de **78** est réalisée avec un rendement satisfaisant de 70%. La pureté est contrôlée par spectrométrie de masse puis le composé est directement engagé dans une réaction de couplage.

IV.2.2) Couplage entre la cyanine 5 et le composé 78

Le couplage entre la cyanine 5 et le composé **78** est réalisé dans les conditions décrites précédemment avec IBCF (Schéma 51). En effet cette méthode avait montré une chimiosélectivité envers la fonction amine lors du couplage modèle avec l'éthanolamine. Après

lavage à l'eau et purification sur colonne de silice, le produit **79** a été obtenu avec un rendement très satisfaisant de 60%.

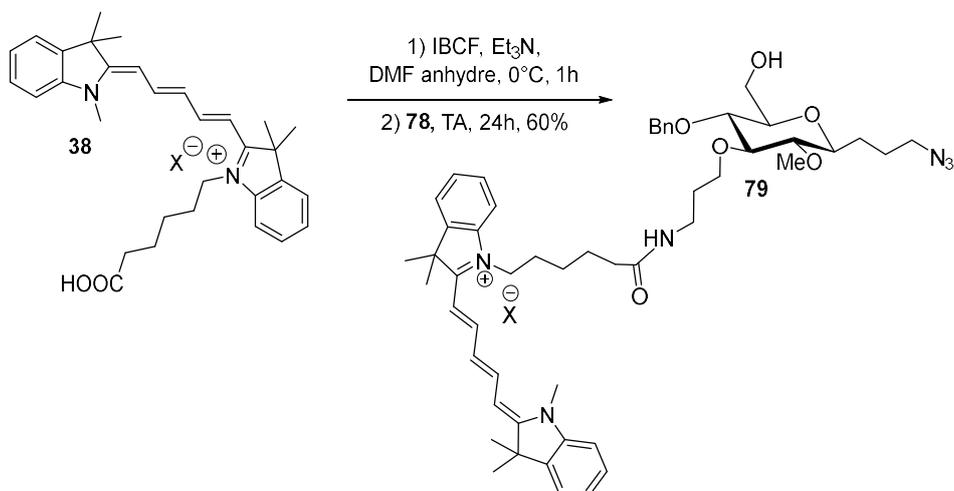


Schéma 51 : Couplage entre la cyanine 5 et le composé **78**

IV.2.3) Triflation de la position 6

La cyanine 5 étant couplée au dérivé C-glycosidique, l'hydroxyle en position 6 triflé, par réaction avec l'anhydride triflique. La triflation est réalisée dans le dichlorométhane anhydre en présence de pyridine à basse température (Schéma 52).^[222]

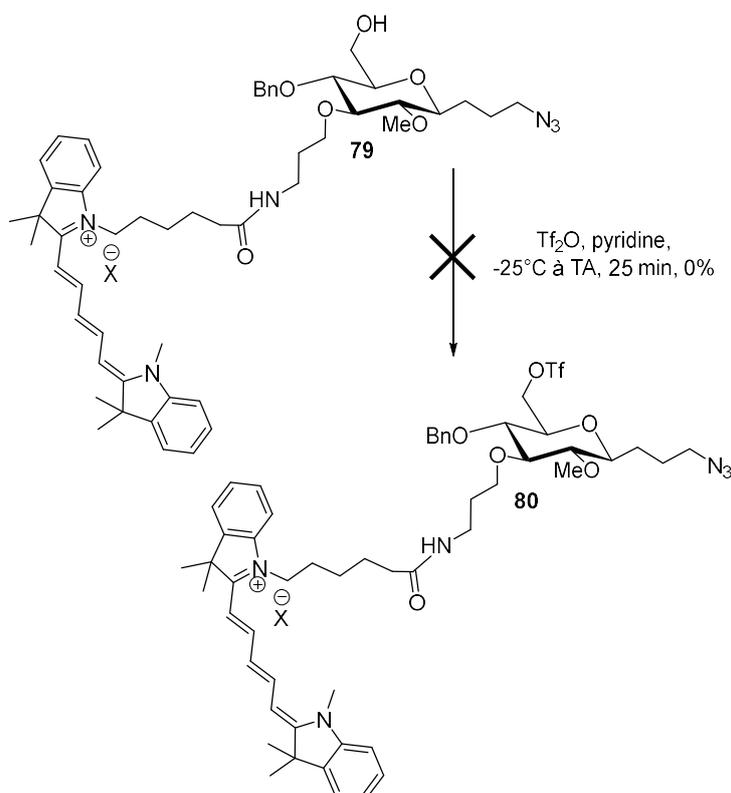


Schéma 52 : Triflation du composé 79

Dans ces conditions, la réaction n'a pas eu lieu. L'anhydride triflique utilisé est probablement en cause car il semblerait que la proportion d'acide triflique présent soit assez importante. D'autres essais sont en cours d'investigation.

V- Conclusion

Le dérivé C-glycosidique **13** (Figure 84) a été protégé en position 6 par un groupement trityle dans le but de réaliser des acylations régiosélectives avec un substrat modèle, l'anhydride acétique, dans un premier temps, et avec de l'acide 3-buténoïque dans un second temps. L'acide 3-buténoïque avait été envisagé pour coupler la cyanine au dérivé saccharidique. Ces réactions ont conduit à des mélanges de trois régioisomères en position 2, 3 et 4 et la position 3 est majoritaire dans tous les cas. Au cours de ces réactions, la régiosélectivité et les rendements n'ont pas été satisfaisants et des réactions secondaires ont eu lieu. Pour ces raisons, un autre groupement protecteur a été préféré.

Le 4,6-benzylidène choisi comme groupement protecteur réduit le nombre d'hydroxyles libres et le nombre de régioisomères possibles. Des alkylations régiosélectives avec le bromure de benzyle comme substrat modèle ont été explorées avec plusieurs protocoles. Le protocole montrant la meilleure régiosélectivité implique l'usage de dérivé stannylé Bu_2SnO en quantité stœchiométrique. La position 3 est la seule position alkylée lors de cette réaction. Ces réactions d'alkylation ont ensuite été développées avec plusieurs électrophiles fonctionnels, notamment le 3-bromopropyle phtalimide, dans le but d'introduire une fonction protégée pour le couplage ultérieur avec la cyanine. L'hydroxyle libre en position 2 a ensuite été protégé par un méthyle dans des conditions classiques de méthylation qui ont néanmoins nécessité quelques optimisations. Afin de mener à bien les synthèses de la référence froide et du précurseur de marquage, l'hydroxyle en position 6 doit être libre afin d'être fluoré ou triflé. La position 4 doit quant à elle être protégée par un groupement inerte. Dans le but de réaliser ce double objectif, une déprotection régiosélective a été mise en œuvre. Bien que cette réaction soit difficilement reproductible et répétable, le composé 4-OBn, 6-OH **66** a pu être obtenu en quantité suffisante pour la poursuite de la synthèse.

A partir de **66**, une fluoration est réalisée puis une déprotection de l'amine portant le groupement phtalimide, afin de réaliser le couplage avec la cyanine 5. La référence non-radioactive **75** a été obtenue et après réaction CuAAC, le composé **77**, référence glycopeptidique, est obtenu de façon satisfaisante.

Le composé **66** est aussi utilisé pour la synthèse du précurseur de marquage. Après déprotection du phtalimide, la cyanine 5 est couplée au composé **78** par activation avec IBCF. Le premier essai de triflation de ce composé n'a pas été concluant, de futurs essais sont envisagés.

La référence non radioactive **77** sera prochainement évaluée *in vitro* afin de déterminer son affinité envers les intégrines $\alpha_v\beta_3$. L'imagerie FPIR *in vivo* sera également mise en œuvre ultérieurement. La radiosynthèse du MOMIA, pourra être entreprise dès que la dernière étape de triflation du précurseur aura été réalisée.

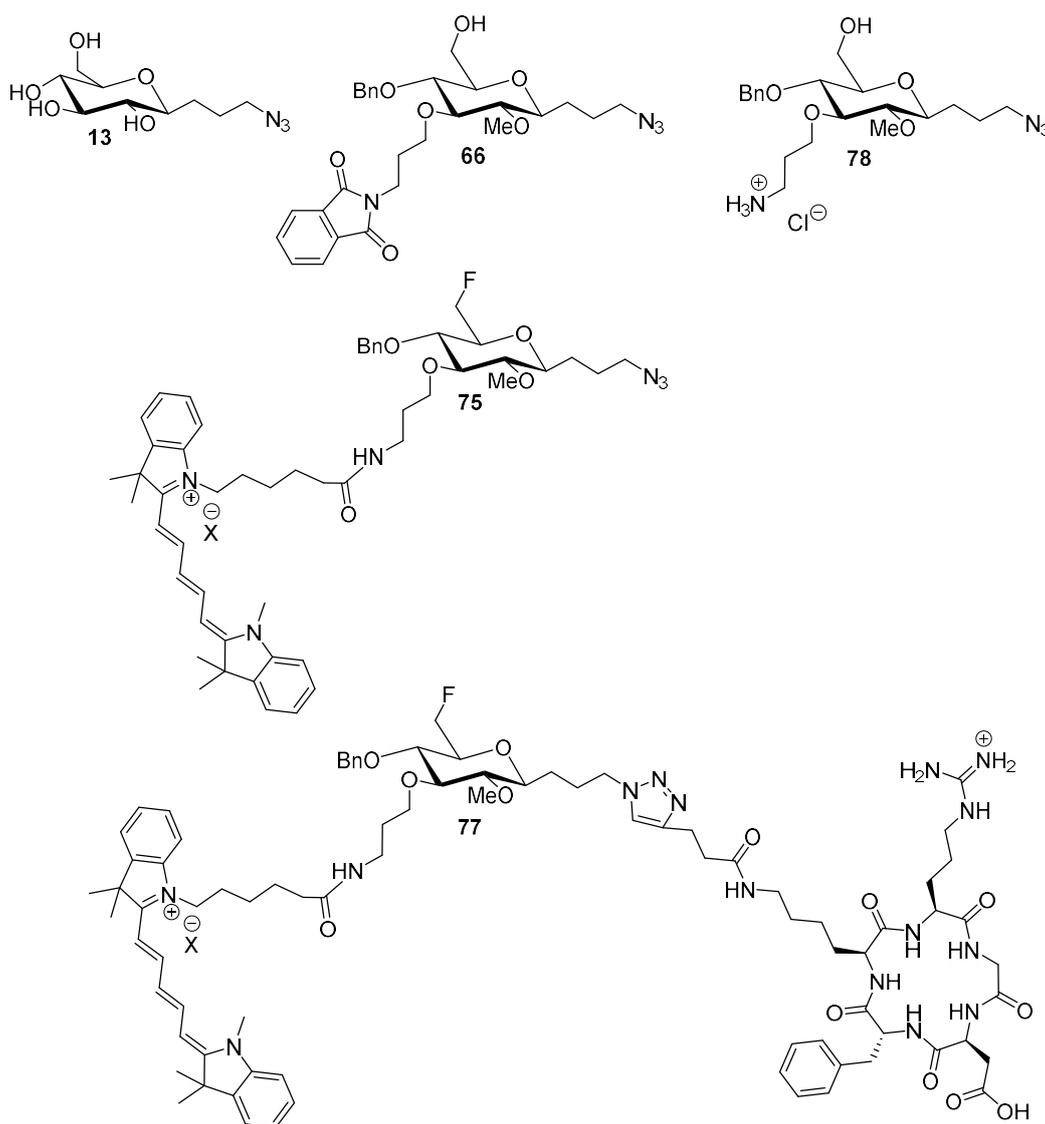


Figure 84 : Structures des composés **13**, **66**, **75**, **77** et **78**

CONCLUSION GENERALE

Ce travail est centré sur la synthèse de dérivés *C*-glycosides diversement fonctionnalisés et conjugués avec des peptides pour des applications en imageries TEP et TEP/FPIR.

Des groupements prosthétiques de types *C*-glycosides fluorés ont été développés de leur synthèse jusqu'aux applications en imagerie TEP, montrant leur potentiel en tant qu'outils diagnostiques. En effet, l'introduction d'un bras fonctionnel sur la position pseudo-anomérique nécessaire au couplage par CuAAC avec des peptides dérivés de la séquence RGD a permis d'obtenir quatre *C*-glyco-RGD. Leur évaluation *in vitro* et modélisation moléculaire a permis de montrer que l'unité saccharidique fluorée (groupe prosthétique) n'affecte pas l'affinité du peptide par rapport à sa cible et est même bénéfique dans certains cas. Les différents *C*-glyco-RDG ont montré un profil d'affinité distinct, les *C*-glyco-RDG linéaires présentant une certaine sélectivité vis à vis des intégrines $\alpha_{II}\beta_3$, cette sélectivité est retrouvée vis à vis des intégrines $\alpha_V\beta_3$ pour les *C*-glyco-RGD cycliques. La radiosynthèse d'un *C*-glyco-RGD cyclique a été totalement automatisée, c'est une synthèse modulable et sa mise en œuvre pourrait être facilement adaptée à d'autres groupements prosthétiques et/ou peptides dans le but d'élargir le panel de peptides radiomarqués au fluor-18.

La seconde partie s'appuie sur ces premiers résultats concernant le développement de groupes prosthétiques *C*-glycosidiques, pour aller plus loin en termes d'outils de diagnostic. L'objectif a été de mettre au point des sondes duales (radio)fluorées pour l'imagerie bimodale TEP/FPIR. Ceci a nécessité une stratégie synthétique élaborée pour introduire un atome de fluor et un fluorophore de type cyanine, tous deux étant les sondes d'imagerie spécifiques TEP et FPIR. L'accrochage d'une biomolécule (peptide RGD) a pu se faire là encore par réaction "Click". La mise en place de ces divers éléments nous a conduit à développer une fonctionnalisation contrôlée d'un dérivé *C*-glycosidique. La mise au point de réactions régiosélectives ainsi qu'une optimisation des étapes de protection/déprotection, de couplage avec la cyanine et le dérivé RGD ont permis l'obtention de l'agent d'imagerie bimodal dans sa version non-radioactive. Les essais menés sur le précurseur de marquage sont en bonne voie, mais doivent être améliorés en vue d'une application en radiochimie. Une perspective à ce travail sera d'évaluer les propriétés biologiques *in vitro* des outils synthétisés et de considérer cet agent dual pour des applications diagnostique et thérapeutique en imagerie TEP/FPIR.

PARTIE EXPERIMENTALE

Table des matières de la partie expérimentale

I- GENERAL INFORMATION	153
II- PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISATION OF COMPOUNDS	154
II.1- Fluorinated C-glycosides synthesis and conjugation with RGD derivatives.....	154
II.1.1) C-glycoside functionalisation.....	154
II.1.2) Preparation of labeling precursors.....	165
II.1.3) Preparation of non-radioactive references.....	167
II.1.4) Preparation of linear and cyclic glycopeptides.....	169
II.2- Synthesis of fluorinated and fluorescent C-glycosides and conjugation with RGD derivatives	174
II.2.1) Preparation of cyanine 5.....	174
II.2.2) Regioselective acylation.....	176
II.2.3) Preparation of fluorinated and fluorescent C-glycosidic compounds.....	183
III- HPLC.....	203
IV- RADIOSYNTHESIS OF [¹⁸ F]33	205
IV.1- AllInOne Synthetizer.....	205
IV.2- Synthesizer and cassette preparation.....	206
IV.3- Radiosynthesis.....	207
IV.4- Quality control.....	209
IV.5- Partition coefficient (logD _{7.4}) measurements	210
IV.6- <i>In vitro</i> stability in serum	210
V- <i>IN VITRO</i> ASSAYS PROTOCOLS.....	210
VI- MOLECULAR MODELING.....	211
VII- PET IMAGING	212

I- General information

The different commercial reagent and solvent (Acros, Alfa Aesar, Bachem, Carlo Erba, Carbosynth, Chem-Impex and Sigma Aldrich) were used without preliminary purification. Dichloromethane was distilled on CaH₂ and some other anhydrous solvents (THF, toluene and MeOH) were collected after a purification on the solvent purifier (MBRAUN, MB-SPS-800).

Thin layer chromatography (TLC) analyses were performed using standard procedures on Kieselgel 60F254 plates (Merck, Kenilworth, NJ, USA).

Compounds were visualized using UV light (254 nm) and a methanolic solution of sulfuric acid, a methanolic solution of ninhydrin and a solution of phosphomolybdic acid.

Melting points were determined with a Tottoli apparatus and are uncorrected. FTIR spectra were recorded on an apparatus Shimadzu IRAffinity-1, ATR PIKE Technologies model GladiAT (cm⁻¹). Optical rotations were measured on an Anton-Paar MCP 300 polarimeter. Mass and high resolution mass spectrometry spectra were recorded on a Bruker microTOFQ apparatus and MALDI spectra on a Bruker Ultraflex apparatus.

Column chromatography was performed on silica gel SI 60 (63–200 μm) (Merck). Purification of deprotected compounds was achieved by gel filtration on LH20 using water or water/methanol mixture as eluent. High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were run on a Waters system (2695eb pump, auto sampler injector, 2998 PDA detector, 2424 ELSD detector, and NaI detector from Berthold [Bad Wildbad, Germany]) controlled by the Empower Software (Orlando, FL, USA). Analyses were performed on a Vydac 218TP C18 (5 μm, 250 × 4.6 mm) from Grace or LiChrospher C8 endcapped (5 μm, 250 × 4mm) from AIT (Khlung Luang, Pathum Thani, Thailand) with ACN/H₂O/TFA mixture (proportions given in brackets) at 1 mL/min. Purification on the AllInOne (AIO) synthesis module were performed by two HPLC : the 1st HPLC (column: LiChrospher C8 endcapped) and the 2nd HPLC (column: Vydac 218TP C18) with ACN/H₂O/TFA mixture (proportions given in brackets) at respectively 4.5 mL/min and 3 mL/min.

The reverse phase purifications were carried out with Lichoprep silica RP-18 (40-63 μm, Merck). Flash chromatography purification were realized with a Combiflash Rf (Teledyne-Isco) system or with a ISMATEC pump associated to a LKB (Helirac, modèle 2212) collector on silica gel SI60 (35-70 μm, Merck) or Chromatotron (Harrison Research), Model 7924 on disk silica gel SI60 (35-70 μm, Merck).

^1H , ^{13}C , and ^{19}F NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer DPX250 (250 MHz, 62.9 MHz and 235 MHz, respectively) or Avance III 400 (400 MHz and 100.6 MHz, respectively). For complete assignment of ^1H and ^{13}C signals, two-dimensional ^1H , ^1H COSY and ^1H , ^{13}C correlation spectra were recorded. Chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to the solvent residual peak. For clarity, NMR signals attributions follow atom numbering showed on the figure below for all carbohydrate compounds (*Figure 1*).

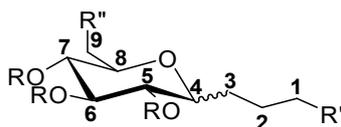


Figure 1: Atom numbering

The following abbreviations are used for multiplicity of NMR signals: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, qt = quintuplet, m = multiplet, b = broad signal and app = apparent multiplicity. The given J values refer to apparent multiplicities and do not represent the true coupling constants.

II- Preparation and physico-chemical characterisation of compounds

When compounds are already described in literature, their structures are simply confirmed by ^1H NMR and ^{13}C in some cases.

II.1- Fluorinated C-glycosides synthesis and conjugation with RGD derivatives

II.1.1) C-glycoside functionalisation

1-acetate-2,3,4,6-tetrakis-O-(phenylmethyl)-D-glucopyranose 2^[211]

Prepared according to literature procedures.^[211]

Yield: quantitative as a colorless oil

$\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_7$

M.W.: 582.69 g/mol

$R_f = 0.54$ (Cycl/EtOAc: 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 2.04 (s, 3H, CH₃), 3.60-3.80 (m, 5H), 3.80-4.00 (m, 2H, H₉), 4.48 (d, 1H, J_{CH_2} = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.52 (d, 1H, J_{CH_2} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.59-4.69 (m, 2H, CH₂Ph), 4.74-4.87 (m, 3H, CH₂Ph), 4.97 (d, 1H, J_{CH_2} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 6.32 (d, 1H, $J_{4,5}$ = 3.3 Hz, H₄), 7.09-7.11 (m, 2H, H_{Ar}), 7.21-7.28 (m, 18H, H_{Ar}).

4,8-anhydro-1,2,3-trideoxy-5,6,7,9-tetrakis-*O*-(phenylmethyl)-*D*-glycero-*D*-gulo-Non-1-enitol **3**^[212,213]

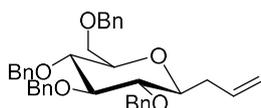
To a solution of **2** (20 g, 34.34 mmol) in anhydrous dichloromethane (225 mL) was added, under argon, TMSI (6 mL, 41.80 mmol, 1.2 eq.), dropwise at 0°C. The solution was stirred at 0°C for 1h30. Dry toluene (8 mL) was added at 0 °C and the solvent was evaporated under *vacuum* under N₂ atmosphere. The temperature of the water-bath did not exceed 25°C. Azeotroping was repeated twice. To the crude yellowish compound, a solution of allyl magnesium bromide (1M in Et₂O, 110 mL, 103.2 mmol, 3 eq.) was added dropwise under argon at 0°C and the reaction was stirred for 3h at room temperature. The mixture was quenched by adding EtOAc, then water and saturated aqueous NH₄Cl solution. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc and the combined organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃ and brine then dried over MgSO₄. After evaporation of the solvent under *vacuum*, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 100/0 to 90/10) to yield compound **3**.

Yield: 65% as a white solid

C₃₇H₄₀O₅

M.W.: 564.72 g/mol

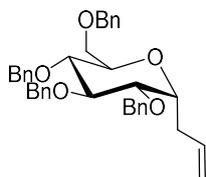
R_f = 0.53 (Cycl/EtOAc: 8/2)



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 2.32-2.39 (m, 1H, H_{3a}), 2.64 (bdd, 1H, $J_{3a,3b}$ = 14 Hz, $J_{3b,4}$ = 6.0 Hz, H_{3b}), 3.36-3.40 (m, 2H, H₄ and H₅), 3.42-3.48 (m, 1H, H₈), 3.64 (app t, 1H, $J_{7,8}$ = $J_{7,6}$ = 9.5 Hz, H₇), 3.70-3.78 (m, 3H, H₆ and H₉), 4.58-4.70 (m, 4H, CH₂Ph), 4.85 (d, 1H, J_{CH_2} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.91-4.96 (m, 3H, CH₂Ph), 5.11 (bd, 1H, $J_{1a,2}$ = 9.5 Hz, H_{1a}), 5.14 (bd, 1H, $J_{1b,2}$ = 17.0 Hz, H_{1b}), 5.97 (m, 1H, H-2), 7.20-7.24 (m, 2H, H_{Ar}), 7.28-7.40 (m, 18H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 36.1 (C₃), 69.2 (C₉), 73.6 (CH₂Ph), 75.1 (CH₂Ph), 75.3 (CH₂Ph), 78.8 (C₇), 78.9 (C₅), 79.2 (C₈), 81.7 (C₄), 87.5 (C₆), 117.1 (C₁), 127.7 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.9 (2 C_{Ar}), 127.9 (3 C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 128.1 (2 C_{Ar}), 128.1 (2 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 135.0 (C₂), 138.3 (C_{qAr}), 138.4 (C_{qAr}), 138.5 (C_{qAr}), 138.8 (C_{qAr}).

2,6-anhydro-7,8,9-trideoxy-1,3,4,5-tetra-*O*-benzyl-D-glycero-L-gulo-non-8-enitol 4^[213,214]

To a solution of **2** (1.06 g, 1.82 mmol) in dry acetonitrile (6.5 mL) were added, under argon dropwise at 0°C, allyltrimethylsilane (560 µL, 3.64 mmol, 2.0 eq) and boron trifluoride etherate (112 µL, 0.91 mmol, 0.5 eq). The solution was stirred for 1h at 0°C and 24h at room temperature. The mixture was then diluted with diethyl ether (Et₂O), washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, a saturated aqueous solution of NH₄Cl and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 100/0 to 92/08) to yield compound **4**.



Yield: 36% as a white solid

C₃₇H₄₀O₅

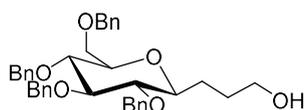
M.W.: 564.72 g/mol

*R*_f = 0.50 (Cycl/EtOAc: 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 2.45-2.60 (m, 2H, H3), 3.60-3.70 (m, 3H, H7, H8 and H9a), 3.75 (dd, 1H, *J*_{9b,9a} = 10.5 Hz, *J*_{9b,8} = 3.5 Hz, H9b), 3.80 (dd, 1H, *J*_{5,6} = 9.5 Hz, *J*_{5,4} = 5.5 Hz, H5), 3.84 (dd, 1H, *J*_{6,7} = 7.5 Hz, H6), 4.10-4.20 (m, 1H, H4), 4.51 (d, 1H, *J*_{CH₂} = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.51 (d, 1H, *J*_{CH₂} = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.67 (bd, 2H, *J*_{CH₂} = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.73 (d, 1H, *J*_{CH₂} = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.85 (d, 1H, *J*_{CH₂} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.86 (d, 1H, *J*_{CH₂} = 10.5 Hz, CH₂Ph), 4.97 (d, 1H, *J*_{CH₂} = 11.5 Hz, CH₂Ph), 5.08-5.20 (m, 2H, H1), 5.80-5.95 (m, 1H, H2), 7.15-7.20 (m, 2H, H_{Ar}), 7.27-7.37 (m, 18H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 29.8 (C3), 68.9 (C9), 71.1 (C8), 73.1 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 73.7 (C4), 75.1 (CH₂Ph), 75.5 (CH₂Ph), 78.1 (C7), 80.1 (C5), 82.4 (C6), 116.9 (C1), 127.6 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.8 (2 C_{Ar}), 127.9 (2 C_{Ar}), 128.0 (2 C_{Ar}), 128.0 (2 C_{Ar}), 128.3 (2 C_{Ar}), 128.4 (4 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 134.8 (C2), 138.1 (C_{qAr}), 138.2 (C_{qAr}), 138.3 (C_{qAr}), 138.8 (C_{qAr}).

4,8-anhydro-2,3-dideoxy-5,6,7,9-tetra-*O*-benzyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 5^[213,215]

To a solution of **3** (4.0 g, 7.1 mmol) in dry THF (16 mL) was added, under argon dropwise at 0°C, a solution of 9-BBN (0.5M in THF, 24 mL, 10.64 mmol, 1.5 eq). At the end of the addition, the mixture was allowed to reach room temperature and then was heated at reflux for 4 h. The solution was then cooled at 0°C and EtOH (6.4 mL), 4M NaOH (4 mL) and a 30% solution of H₂O₂ in water (4 mL) were successively and slowly added. The resulting suspension was vigorously stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with Et₂O and water and solid potassium carbonate K₂CO₃ was added up to saturation. After separation, the aqueous layer was extracted once with Et₂O and the combined organic layer was washed with saturated aqueous solution of NH₄Cl, brine and dried over MgSO₄. After evaporation under *vacuum*, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 100/0 to 60/40) to afford the expected alcohol **5**.



Yield: 97% as a white solid

C₃₇H₄₂O₆

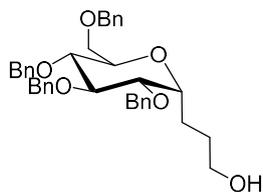
M.W.: 582.74 g/mol

R_f = 0.28 (Cycl/EtOAc: 7/3)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.52-1.61 (m, 1H, H3a), 1.70-1.78 (m, 2H, H2), 1.93-2.05 (m, 2H, H3b and H_{OH}), 3.31-3.34 (m, 2H, H4 and H5), 3.47 (ddd, 1H, *J*_{8,7} = 9.5 Hz, *J*_{8,9a} = 5.0 Hz, *J*_{8,9b} = 2.0 Hz, H8), 3.61 (app t, 1H, *J*_{7,8} = *J*_{7,6} = 9.5 Hz, H7), 3.63-3.74 (m, 5H, H1, H6 and H9), 4.56 (d, 1H, *J*_{CH2} = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.57 (d, 1H, *J*_{CH2} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.62 (d, 1H, *J*_{CH2} = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.68 (d, 1H, *J*_{CH2} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.84 (d, 1H, *J*_{CH2} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.90-4.94 (m, 3H, CH₂Ph), 7.17-7.19 (m, 2H, H_{Ar}), 7.28-7.37 (m, 18H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 28.7 (C3), 29.4 (C2), 63.0 (C1), 69.1 (C9), 73.6 (CH₂Ph), 75.2 (CH₂Ph), 75.5 (CH₂Ph), 75.7 (CH₂Ph), 78.7 (C7), 78.8 (C8), 79.5 (C5), 82.1 (C4), 87.4 (C6), 127.8 (2 C_{Ar}), 127.9 (2 C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.0 (2 C_{Ar}), 128.1 (2 C_{Ar}), 128.1 (2 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 138.1 (C_{qAr}), 138.2 (C_{qAr}), 138.2 (C_{qAr}), 138.7 (C_{qAr}).

2,6-anhydro-7,8-dideoxy-1,3,4,5-tetra-*O*-benzyl-D-glycero-L-gulo-nonitol 6^[213,215]

Prepared from **4** according to procedure described for the synthesis of compound **5**.



Yield: 93% as a white solid

$C_{37}H_{42}O_6$

M.W.: 582.74 g/mol

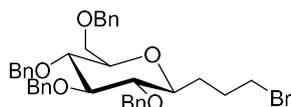
$R_f = 0.26$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.63-1.75$ (m, 3H, H₂ and H_{OH}), 1.78-1.84 (m, 2H, H₃), 3.59 (m, 1H, H₇), 3.63-3.83 (m, 7H, H₁, H₅, H₆, H₈ and H₉), 4.04-4.09 (m, 1H, H₄), 4.49 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.51 (d, 1H, $J_{CH_2} = 12.5$ Hz, CH₂Ph), 4.63 (d, 1H, $J_{CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂Ph), 4.64 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.5$ Hz, CH₂Ph), 4.73 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.5$ Hz, CH₂Ph), 4.82 (d, 1H, $J_{CH_2} = 10.5$ Hz, CH₂Ph), 4.84 (d, 1H, $J_{CH_2} = 10.5$ Hz, CH₂Ph), 4.95 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 7.14-7.16 (m, 2H, H_{Ar}), 7.27-7.37 (m, 18H, H_{Ar}). **^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** $\delta = 20.9$ (C₃), 29.3 (C₂), 62.4 (C₁), 69.1 (C₉), 71.2 (C₈), 73.2 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 74.4 (C₄), 75.1 (CH₂Ph), 75.5 (CH₂Ph), 78.2 (C₇), 80.2 (C₅), 82.4 (C₆), 127.6 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.9 (2 C_{Ar}), 127.9 (6 C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 128.4 (4 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 137.9 (C_{qAr}), 138.1 (C_{qAr}), 138.3 (C_{qAr}), 138.7 (C_{qAr}).

4,8-anhydro-1-bromo-1,2,3-trideoxy-5,6,7,9-tetra-*O*-benzyl-D-glycero-D-gulo-nonitol

7^[213,216]

To a solution of **5** (23.25 g, 39.9 mmol) in CH₂Cl₂ (230 mL) were added, under argon at 0°C, triphenylphosphine (15.7 g, 59.9 mmol, 1.5 eq) and carbon tetrabromide (19.85 g, 59.9 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred one night at room temperature. After dilution with CH₂Cl₂, the organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, brine and dried over MgSO₄. After concentration under *vacuum*, the crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 90/10 to 60/40) to yield the brominated compound **7**.



Yield: 84% as a white solid

$C_{37}H_{41}BrO_5$

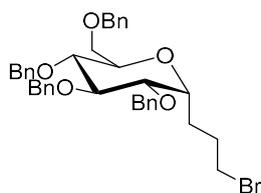
M.W.: 645.63 g/mol

$R_f = 0.31$ (Cycl/EtOAc: 9/1)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.53-1.60 (m, 1H, H3a), 1.90-2.15 (m, 3H, H3b and H2), 3.27 (m, 1H, H4), 3.30 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 3.41 (ddd, 1H, $J_{8,7} = 9.5$ Hz, $J_{8,9a} = 4.0$ Hz, $J_{8,9b} = 2.0$ Hz, H8), 3.45 (t, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, H1), 3.63 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5$ Hz, H7), 3.69 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 11.0$ Hz, H9a), 3.71 (app t, 1H, H6), 3.71 (dd, 1H, H9b), 4.57 (d, 1H, $J_{CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂Ph), 4.59 (d, 1H, $J_{CH_2} = 12.0$ Hz), 4.64 (d, 1H, $J_{CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂Ph), 4.68 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.85 (d, 1H, $J_{CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂Ph), 4.90-4.93 (m, 3H, CH₂Ph), 7.19-7.21 (m, 2H, H_{Ar}), 7.28-7.38 (m, 18H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 29.3 (C3), 30.5 (C2), 34.2 (C1), 69.2 (C9), 73.6 (CH₂Ph), 75.1 (CH₂Ph), 75.5 (CH₂Ph), 75.7 (CH₂Ph), 78.7 (C7), 78.8 (C4), 79.0 (C8), 82.1 (C5), 87.4 (C6), 127.8 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.9 (2 C_{Ar}), 127.9 (3 C_{Ar}), 128.1 (3 C_{Ar}), 128.3 (2 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 138.1 (C_{qAr}), 138.3 (C_{qAr}), 138.3 (C_{qAr}), 138.7 (C_{qAr}).

2,6-anhydro-9-bromo-7,8,9-trideoxy-1,3,4,5-tetra-*O*-benzyl-D-glycero-L-gulo-nonitol
8^[213,216].

Prepared from **6** according to procedure described for the synthesis of compound **7**.



Yield: 90% as a white solid

C₃₇H₄₁BrO₅

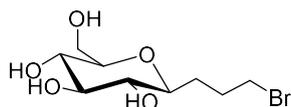
M.W.: 645.63 g/mol

$R_f = 0.30$ (Cycl/EtOAc: 9/1)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.85-1.95 (m, 3H, H3 and H2a), 2.01-2.05 (m, 1H, H2b), 3.45-3.55 (m, 2H, H1), 3.57-3.66 (m, 2H, H8 and H7), 3.67 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 10.5$ Hz, $J_{9a,8} = 2.0$ Hz, H9a), 3.72 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 3.5$ Hz, H9b), 3.77 (dd, 1H, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, $J_{5,4} = 5.5$ Hz, H5), 3.79-3.84 (m, 1H, H6), 4.02-4.07 (m, 1H, H4), 4.50 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.51 (d, 1H, $J_{CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂Ph), 4.65 (d, 2H, $J_{CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂Ph), 4.74 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.5$ Hz, CH₂Ph), 4.83 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.85 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.95 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 7.14-7.17 (m, 2H, H_{Ar}), 7.28-7.39 (m, 18H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = δ 23.1 (C3), 28.8 (C2), 33.8 (C1), 69.0 (C9), 71.2 (C8), 73.3 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 73.5 (C4), 75.1 (CH₂Ph), 75.5 (CH₂Ph), 78.1 (C7), 80.1 (C5), 82.5 (C6), 127.6 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 127.9 (4 C_{Ar}), 128.0 (2 C_{Ar}), 128.0 (2 C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 128.4 (4 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 138.0 (C_{qAr}), 138.2 (C_{qAr}), 138.2 (C_{qAr}), 138.8 (C_{qAr}).

4,8-anhydro-1-bromo-1,2,3-trideoxy-D-glycero-D-gulo-nonitol 9

Compound **7** (5.0 g, 7.76 mmol) and Pd(OH)₂/C (10%) (1 g, 20%w/w) were dissolved in THF/H₂O mixture (5/1 v/v, 110 mL). The reaction mixture was stirred under hydrogen atmosphere at 33 psi for 13 h (Paar apparatus). After completion of the reaction, the mixture was diluted with MeOH and the catalyst was filtered off through a Celite[®] pad. The filtrate was concentrated under *vacuum* to give **9** without further purification.



Yield: 97% as an oil

C₉H₁₇BrO₅

M.W.: 285.13 g/mol

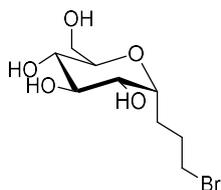
R_f = 0.59 (EtOAc/MeOH: 8/2)

[α]_D = -6.5 (c 0.1; CH₃OH)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ = 1.53-1.65 (m, 1H, H3a), 1.93-2.18 (m, 3H, H3b and H2), 3.24 (app t, 1H, J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5 Hz, H5), 3.33-3.44 (m, 3H, H4, H7 and H8), 3.48 (app t, 1H, J_{6,5} = J_{6,7} = 9.5 Hz, H6), 3.49 (app td, 2H, J_{1,3a} = 7.0 Hz, J_{1,3b} = 1.0 Hz, H1), 3.71 (dd, 1H, J_{9a,8} = 5.5 Hz, J_{9a,9b} = 12.0 Hz, H9a), 3.92 (dd, 1H, J_{9b,8} = 2.0 Hz, H9b). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** δ = 27.6 (C2), 28.6 (C3), 33.8 (C1), 60.1 (C9), 69.2 (C7), 72.5 (C5), 76.5 (C8), 77.6 (C6), 78.7 (C4). **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 307.0152** (calculated for C₉H₁₇BrO₅Na: 307.0157). **IR (cm⁻¹):** ν = 3306, 2924, 2872, 1636, 1406, 1370, 1314, 1258.

2,6-anhydro-9-bromo-7,8,9-trideoxy-D-glycero-L-gulo-nonitol 11

Prepared from **8** according to procedure described for the synthesis of compound **9**.



Yield: 95% as an oil

C₉H₁₇BrO₅

M.W.: 285.13 g/mol

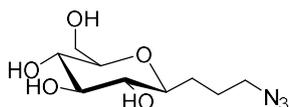
R_f = 0.57 (EtOAc/MeOH: 8/2)

[α]_D = +40.2 (c 0.1; CH₃OH)

¹H NMR (D₂O, 250 MHz): δ = 1.76-2.13 (m, 4H, H2 and H3), 3.39 (dd, 1H, J_{5,6} = 10.0 Hz, J_{5,4} = 8.5 Hz, H5), 3.55-3.66 (m, 2H, H7 and H8), 3.68-3.80 (m, 3H, H1, H6 and H9a), 3.89 (dd, 1H, J_{9b,9a} = 12.0 Hz, J_{9b,8} = 2.5 Hz, H9b), 4.02-4.12 (m, 1H, H4). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** δ = 27.9 (C2), 28.2 (C3), 34.5 (C1), 61.1 (C9), 70.3 (C5), 71.2 (C6), 72.4 (C7), 73.2 (C8), 75.2 (C4). **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 307.0152** (calculated for C₉H₁₇BrO₅Na: 307.0157). **IR (cm⁻¹):** ν = 3331, 2932, 2874, 1751, 1719, 1638, 1437, 1377, 1250.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-D-glycero-D-gulo-nonitol 13

To a solution of **9** (5.0 g, 20.2 mmol) in acetone/water mixture (6/1 v/v, 90 mL), 3.5 g of NaN₃ (2 eq., 40.4 mmol) was added under argon. The mixture was stirred at reflux for 15h. After evaporation under *vacuum*, the crude residue was washed three times with cold EtOH and then was purified by chromatography on silica gel (eluent: CH₂Cl₂/MeOH 90/10) to afford the azidated compound **13**.



Yield: 95% as a colorless oil

C₉H₁₇N₃O₅

M.W.: 247.25 g/mol

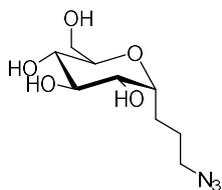
R_f = 0.17 (DCM/MeOH: 9/1)

[α]_D = -19.9 (c 0.07; CH₃OH)

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 1.49-1.59 (m, 1H, H3a), 1.69-1.80 (m, 1H, H2a), 1.86-1.96 (m, 1H, H2b), 1.96-2.05 (m, 1H, H3b), 3.13 (app t, 1H, J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0 Hz, H5), 3.20-3.30 (m, 2H, H4 and H8), 3.34 (app t, 1H, J_{6,7} = J_{6,5} = 9.0 Hz, H7), 3.35-3.40 (m, 1H, H6), 3.41 (t, 2H, J_{1,2} = 7.5 Hz, H1), 3.71 (dd, 1H, J_{9a,9b} = 12.0 Hz, J_{9a,8} = 5.5 Hz, H9a), 3.90 (dd, 1H, J_{9b,8} = 2.5 Hz, H9b). **¹³C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz):** δ = 26.0 (C2), 29.9 (C3), 52.6 (C1), 63.0 (C9), 71.9 (C7), 75.3 (C5), 79.6 (C6), 80.3 (C8), 81.4 (C4). **ESI-HRMS [M+Na]⁺** m/z = 270.1080 (calculated for C₉H₁₇N₃O₅Na: 270.1066). **IR (cm⁻¹):** ν = 3350, 3232, 2086, 1597, 1355.

2,6-anhydro-9-azido-7,8,9-trideoxy-D-glycero-L-gulo-nonitol 14

Prepared from **11** according to procedure described for the synthesis of compound **13**.



Yield: 96% as a colorless oil

C₉H₁₇N₃O₅

M.W.: 247.25 g/mol

R_f = 0.15 (DCM/MeOH: 9/1)

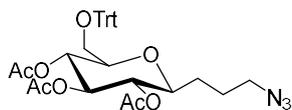
[α]_D = +50.3 (c 0.1; CH₃OH)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ = 1.57-1.67 (m, 1H, H3a), 1.68-1.85 (m, 3H, H2 and H3b), 3.36 (dd, 1H, J_{6,7} = 10.0 Hz, J_{6,5} = 8.5 Hz, H6), 3.42 (t, 2H, J_{1,2} = 6.5 Hz, H1), 3.54 (ddd, 1H, J_{8,7} = 10.0 Hz, J_{8,9a} = 5.5 Hz, J_{8,9b} = 2.5 Hz, H8), 3.66 (app t, 1H, H7), 3.71 (dd, 1H, J_{9a,9b} = 12.5 Hz, H9a), 3.73 (dd, 1H, J_{5,4} = 6.0 Hz, H5), 3.86 (dd, 1H, H9b), 4.03 (ddd, 1H, J_{4,3a} = 10.5 Hz, J_{4,3b} = 3.5 Hz, H4). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** δ = 20.4 (C2), 24.2 (C3), 50.8 (C1), 61.1 (C9), 70.1 (C6), 70.3 (C5), 71.2 (C8), 72.4 (C7), 73.2 (C4). **ESI-HRMS [M+Na]⁺** m/z = 270.1066

(calculated for $C_9H_{17}N_3O_5Na$: 270.1066). **IR** (cm^{-1}): $\nu = 3329, 2922, 2882, 2496, 2093, 1638, 1451, 1406, 1350, 1250$.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-6,7,9-tri-*O*-acetyl-5-*O*-triphenylmethyl-*D*-glycero-*D*-gulo-nonitol **15**

To a solution of compound **13** (617 mg, 2.5 mmol) in pyridine (20 mL), were added under argon trityl chloride (1.33 g, 1.8 eq., 4.5 mmol) and of 4-dimethylaminopyridine (33 mg, 0.1 eq, 0.25 mmol). The solution was stirred at 45°C until completion (TLC monitoring). The solution was cooled at 0°C then 3 mL of Ac_2O (13 eq., 32.5 mmol) was added and the reaction was stirred for 3h at room temperature. Water was added and the mixture was extracted three times with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/ $AcOEt$ 8/2) to afford **15**. The by-product **16** was obtained with 3% yield.



Yield: 62% as a white solid

$C_{34}H_{37}N_3O_8$

M.W.: 615.68 g/mol

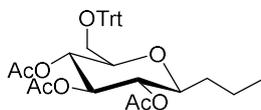
$R_f = 0.32$ (Cycl/ $EtOAc$: 7/3)

$[\alpha]_D = +31.0$ (c 0.9; $CHCl_3$)

Mp = 67-69°C

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.54-1.64$ (m, 1H, H3a), 1.66-1.82 (m, 2H, H2a and H3b), 1.73 (s, 3H, CH_3), 1.88-1.97 (m, 1H, H2b), 1.99 (s, 3H, CH_3), 2.06 (s, 3H, CH_3), 3.04 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 10.5$ Hz, $J_{9a,8} = 5.0$ Hz, H9a), 3.24 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 2.0$ Hz, H9b), 3.31-3.41 (m, 2H, H1), 3.45 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.5$ Hz, $J_{4,3b} = 3.0$ Hz, H4), 3.51 (ddd, 1H, $J_{8,7} = 9.5$ Hz, H8), 4.94 (dd, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.5$ Hz, H5), 5.12 (dd, 1H, $J_{7,8} = J_{7,6} = 9.5$ Hz, H6), 5.16 (dd, 1H, H7), 7.23 (bt, 3H, $J_{Ar} = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.29 (bt, 6H, $J_{Ar} = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.44 (bd, 6H, $J_{Ar} = 7.5$ Hz, H_{Ar}).
 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz): $\delta = 20.6$ (CH_3), 20.9 (CH_3), 20.9 (CH_3), 24.9 (C2), 28.7 (C3), 51.3 (C1), 62.4 (C9), 69.0 (C7), 72.3 (C5), 74.8 (C6), 77.3 (C8), 77.4 (C4), 86.6 (Cq), 127.2 (3 C_{Ar}), 127.9 (6 C_{Ar}), 128.8 (6 C_{Ar}), 143.8 (3 C_{qAr}), 169.2 (C=O), 169.9 (C=O), 170.7 (C=O).
ESI-HRMS $[M+Na]^+$ $m/z = 638.2444$ (calculated for $C_{34}H_{37}N_3O_8Na$: 638.2478). **IR** (cm^{-1}): $\nu = 3057, 2924, 2874, 2347, 2326, 2093, 1479, 1734, 1489, 1449, 1368, 1244, 1211$.

4,8-anhydro-1,2,3-trideoxy-6,7,9-tri-*O*-acetyl-5-*O*-triphenylmethyl-*D*-glycero-*D*-gulo-nonitol 16



Yield: 3% as a yellow oil

$C_{34}H_{38}O_8$

M.W.: 574.67 g/mol

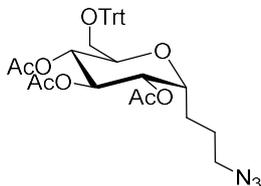
$R_f = 0.34$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

$[\alpha]_D = +31.0$ (c 0.9; $CHCl_3$)

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 0.97$ (t, 3H, $J_{1,2} = 6.7$ Hz, H1), 1.40-1.45 (m, 2H, H3), 1.48-1.64 (m, 2H, H2), 1.70 (s, 3H, CH_3), 1.96 (s, 3H, CH_3), 2.02 (s, 3H, CH_3), 3.00 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 10.5$ Hz, $J_{9a,8} = 4.5$ Hz, H9a), 3.21 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 1.5$ Hz, H9b), 3.30-3.50 (m, 2H, H4 and H8), 4.92 (t, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.0$ Hz, H5), 5.09 (app dd, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.0$ Hz, H7), 5.16 (app dd, 1H, H6), 7.16-7.28 (m, 11H, H_{Ar}), 7.42-7.46 (m, 4H, H_{Ar}). **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 62.9 MHz):** $\delta = 14.0$ (C1), 20.4 (CH_3), 20.8 (CH_3), 20.8 (CH_3), 24.7 (C2), 28.6 (C3), 62.4 (C9), 69.1 (C7), 72.5 (C5), 74.9 (C6), 77.2 (C8), 77.4 (C4), 86.5 (C_q), 127.0 (2 C_{Ar}), 127.1 (C_{Ar}), 127.3 (4 C_{Ar}), 127.8 (4 C_{Ar}), 127.9 (4 C_{Ar}), 143.7 (C_{qAr}), 143.8 (C_{qAr}), 144.4 (C_{qAr}), 169.1 (C=O), 169.8 (C=O), 170.6 (C=O). **ESI-HRMS $[M+Na]^+$ $m/z = 597.2427$** (calculated for $C_{34}H_{37}N_3O_8Na$: 597.2464). **IR (cm^{-1}):** $\nu = 3048, 2923, 2871, 2351, 2322, 2097, 1484, 1736, 1490, 1447, 1365, 1243, 1197$.

2,6-anhydro-9-azido-7,8,9-trideoxy-3,4,5-tri-*O*-acetyl-1-*O*-triphenylmethyl-*D*-glycero-*L*-gulo-nonitol 17

Prepared from compound **14** according to procedure described for the synthesis of compound **15**. The by-product **18** was obtained in too small amount to characterize it.



Yield: 69% as an orange oil

$C_{34}H_{37}N_3O_8$

M.W.: 615.68 g/mol

$R_f = 0.30$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

$[\alpha]_D = +65.6$ (c 1.0; $CHCl_3$)

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.54$ -1.62 (m, 1H, H3a), 1.63-1.72 (m, 1H, H2a), 1.77 (s, 3H, CH_3), 1.81-1.94 (m, 2H, H2b and H3b), 1.98 (s, 3H, CH_3), 2.07 (s, 3H, CH_3), 3.12 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 10.5$ Hz, $J_{9a,8} = 3.0$ Hz, H9a), 3.16 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 5.5$ Hz, H9b), 3.40 (t, 2H, $J_{1,2a} = J_{1,2b} = 6.5$ Hz, H1), 3.76 (ddd, 1H, $J_{8,7} = 9.5$ Hz, H8), 4.19 (ddd, 1H, $J_{4,3b} = 11.5$ Hz, $J_{4,5} = 5.5$ Hz,

$J_{4,3a} = 3.5$ Hz, H4), 4.93 (app t, 1H, $J_{7,6} = 9.0$ Hz, H7), 5.07 (dd, 1H, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 5.25 (app t, 1H, H6), 7.21-7.32 (m, 9H, H_{Ar}), 7.41-7.45 (m, 6H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** $\delta = 20.6$ (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.9 (CH₃), 22.8 (C3), 24.8 (C2), 51.2 (C1), 62.8 (C9), 69.5 (C7), 70.5 (C8), 70.8 (C6), 70.8 (C5), 72.0 (C6), 86.9 (C_{qTr}), 127.2 (3 C_{Ar}), 127.9 (6 C_{Ar}), 128.8 (6 C_{Ar}), 143.8 (3 C_{qAr}), 169.4 (C=O), 169.9 (C=O), 170.3 (C=O). **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 638.2473** (calculated for C₃₄H₃₇N₃O₈Na: 638.2478). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 2938, 2878, 2095, 1746, 1489, 1449, 1366, 1242, 1213$.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-5,6,7-tri-*O*-acetyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 19

To a solution of **15** (500 mg, 0.81 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL), was added dropwise at 0°C a mixture of TFA/dry CH₂Cl₂ (1/5 v/v, 5 mL). The solution was stirred 5 min at 0°C, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added (5 mL) and the mixture was diluted and extracted twice with CH₂Cl₂. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel, cyclohexane/AcOEt 80/20 then 50/50) to give **19**.

Yield: 73% as a white solid

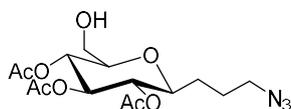
C₁₅H₂₃N₃O₈

M.W.: 373.36 g/mol

$R_f = 0.37$ (Cycl/EtOAc: 5/5)

$[\alpha]_D = -14.1$ (c 1.0; CHCl₃)

Mp = 104-106°C



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.47$ -1.57 (m, 1H, H3a), 1.59-1.70 (m, 2H, H2a and H3b), 1.78-1.88 (m, 1H, H2b), 2.00 (s, 3H, CH₃), 2.04 (s, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H, CH₃), 3.23-3.35 (m, 2H, H1), 3.42-3.48 (m, 2H, H4 and H8), 3.55 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 12.5$ Hz, $J_{9a,8} = 4.5$ Hz, H9a), 3.72 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 2.0$ Hz, H9b), 4.86 (dd, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.5$ Hz, H5), 4.99 (dd, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5$ Hz, H7), 5.22 (dd, 1H, H6). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** $\delta = 20.8$ (CH₃), 20.8 (2 CH₃), 24.7 (C2), 28.6 (C3), 51.3 (C1), 61.6 (C9), 69.1 (C7), 72.1 (C5), 74.2 (C6), 77.3 (C8), 78.1 (C4), 169.9 (C=O), 170.5 (C=O), 170.5 (C=O). **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 396.1374** (calculated for C₁₅H₂₃N₃O₈Na: 396.1383). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 3507, 2955, 2924, 2909, 2866, 2081, 1742, 1732, 1427, 1366, 1215$.

2,6-anhydro-9-azido-7,8,9-trideoxy-3,4,5-tri-*O*-acetyl-D-glycero-L-gulo-nonitol 20

Prepared from **17** according to procedure described for the synthesis of compound **19**.

Yield: 75% as a white solid

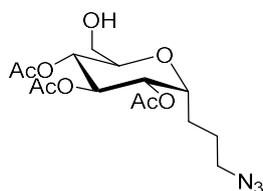
C₁₅H₂₃N₃O₈

M.W.: 373.36 g/mol

R_f = 0.35 (Cycl/EtOAc: 5/5)

[α]_D = +82.6 (c 0.8; CHCl₃)

Mp = 80-82°C

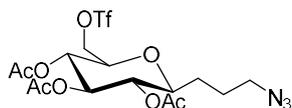


¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.57-1.67 (m, 2H, H2a and H3a), 1.72-1.82 (m, 1H, H2b), 1.85-1.96 (m, 1H, H3b), 2.05 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 6H, CH₃), 3.34-3.44 (m, 2H, H1), 3.59 (dd, 1H, J_{9a,9b} = 12.0 Hz, J_{9a,8} = 4.5 Hz, H9a), 3.61-3.65 (m, 1H, H8), 3.67 (br d, 1H, H9b), 4.22 (ddd, 1H, J_{4,3b} = 12.0 Hz, J_{4,5} = 6.0 Hz, J_{4,3a} = 3.0 Hz, H4), 4.99 (app t, 1H, J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5, H7), 5.09 (dd, 1H, J_{5,6} = 10.0 Hz, H5), 5.39 (app t, 1H, H6). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 20.7 (CH₃), 20.7 (2CH₃), 22.3 (C3), 24.7 (C2), 50.9 (C1), 61.8 (C9), 69.3 (C7), 70.3 (C6), 70.3 (C8), 70.6 (C5), 72.8 (C4), 169.8 (C=O), 170.4 (C=O), 170.4 (C=O). **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z** = 396.1416 (calculated for C₁₅H₂₃N₃O₈Na: 396.1383). **IR (cm⁻¹):** ν = 3391, 2953, 2878, 2116, 2091, 1738, 1460, 1370, 1223.

II.1.2) Preparation of labeling precursors

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-9-*O*-trifluoromethylsulfonate-5,6,7-tri-*O*-acetyl-D-glycero-D-gulo-Nonitol 21

To a solution of **19** (300 mg, 0.80 mmol) diluted in in a mixture of 6 ml of dichloromethane and 0,2 ml of pyridine, was added dropwise at -25 °C under argon 0.2 ml of Tf₂O (2.3 eq, 1,85 mmol). After stirring 10 minutes at -25 °C then 25 minutes at room temperature, the reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ and hydrolyzed with water. The organic layer was isolated and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and with water. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 90/10 to 20/80) to yield **21**.



Yield: 80% as a white solid

$C_{16}H_{22}F_3N_3O_{10}S$

M.W.: 505.42 g/mol

$R_f = 0.35$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

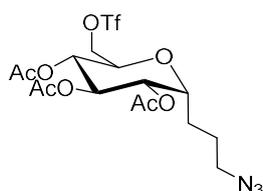
$[\alpha]_D = -4.8$ (c 0.5; $CHCl_3$)

Mp = 84°C

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.49$ -1.56 (m, 1H, H3a), 1.58-1.72 (m, 2H, H2a and H3b), 1.77-1.87 (m, 1H, H2b), 2.01 (s, 3H, CH_3), 2.05 (s, 3H, CH_3), 2.06 (s, 3H, CH_3), 3.24-3.36 (m, 2H, H1), 3.49 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.5$ Hz, $J_{4,3b} = 2.5$ Hz, H4), 3.77 (dt, 1H, $J_{8,7} = 9.5$ Hz, $J_{8,9} = 4.5$ Hz, H8), 4.48 (d, 2H, $J_{9,8} = 4.5$ Hz, H9a and H9b), 4.89 (app t, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.5$ Hz, H5), 4.95 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5$ Hz, H7), 5.20 (app t, 1H, H6). **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz):** $\delta = 20.7$ (CH_3), 20.7 (CH_3), 20.8 (CH_3), 24.4 (C2), 28.5 (C3), 51.2 (C1), 68.7 (C7), 71.5 (C5), 73.9 (C6), 73.9 (C9), 75.2 (C8), 77.4 (C4), 118.7 (q, $J_{C,F} = 320.0$ Hz, C_{Trf}) 169.7 (2 C=O), 170.4 (C=O). **^{19}F NMR ($CDCl_3$, 235 MHz):** $\delta = -74.5$. **ESI-HRMS $[M+Na]^+$ $m/z = 528.0847$** (calculated for $C_{16}H_{22}F_3N_3O_{10}SNa$: 528.0876). **IR (cm^{-1}):** $\nu = 2943, 2099, 1755, 1414, 1371, 1241, 1212$.

2,6-anhydro-9-azido-7,8,9-trideoxy-1-O-trifluoromethylsulfonate-2,3,4-tri-O-acetyl-D-glycero-D-gulo-Nonitol 22

Prepared from **20** according to procedure described for the synthesis of compound **21**.



Yield: 48% as a gum

$C_{16}H_{22}F_3N_3O_{10}S$

M.W.: 505.42 g/mol

$R_f = 0.33$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

$[\alpha]_D = +61.6^\circ$ (c 1.28; $CHCl_3$)

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.55$ -1.66 (m, 2H, H2a and H3a), 1.69-1.79 (m, 1H, H2b), 1.80-1.90 (m, 1H, H3b), 2.03 (s, 3H, CH_3), 2.06 (s, 6H, CH_3), 3.32-3.42 (m, 2H, H1), 3.94 (app dddd, 1H, $J_{8,7} = 9.0$ Hz, $J_{8,9b} = 6.5$ Hz, $J_{8,9a} = 2.5$ Hz, H8), 4.17-4.22 (m, 1H, H4), 4.45 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 11.0$ Hz, H9a), 4.52 (dd, 1H, H9b), 4.89 (app t, 1H, $J_{7,6} = 9.0$ Hz, H7), 5.06 (dd, 1H, $J_{5,6} = 9.0$ Hz, $J_{5,4} = 5.5$ Hz, H5), 5.32 (app t, 1H, H6). **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz):** $\delta = 20.7$ (CH_3), 20.8 (CH_3), 20.8 (CH_3), 22.6 (C3), 24.6 (C2), 50.9 (C1), 68.7 (C8), 68.8 (C7), 69.9 (C6), 70.1 (C5), 72.5 (C4), 74.0 (C9), 118.7 (q, $J_{C,F} = 320$ Hz, C_{OTf}), 169.7 (C=O), 169.7 (C=O),

170.1 (C=O). ^{19}F NMR (CDCl_3 , 235 MHz): $\delta = -74.5$. ESI-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 528.0882$ (calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{10}\text{SNa}$: 528.0870). IR (cm^{-1}): $\nu = 2950, 2880, 2098, 1746, 1414, 1369, 1239, 1201, 1141, 1098, 1066, 1032$.

II.1.3) Preparation of non-radioactive references

4,8-anhydro-1-azido-9-fluoro-1,2,3,9-tetraoxy-5,6,7-tri-*O*-acetyl-D-gulono- nonitol **23**

To a solution of **19** (189 mg, 0.51 mmol) in 1.3 mL of diglyme was added 180 μL of DAST (2.8 eq., 1.47 mmol) at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred 8 min at 110°C. Then the solution was cooled to 0°C and MeOH (0.25 mL) was added. The solution was diluted with CH_2Cl_2 , washed twice with a saturated solution of NaHCO_3 and water. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and the solvent was removed under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel, cyclohexane/AcOEt 90/10 then 70/30) to afford **23**.

Yield: 61% as a white solid

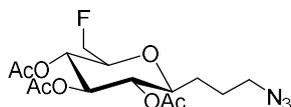
$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_7$

M.W.: 375.35 g/mol

$R_f = 0.50$ (Cycl/EtOAc: 6/4)

$[\alpha]_D = -4.8$ (c 0.75; CHCl_3)

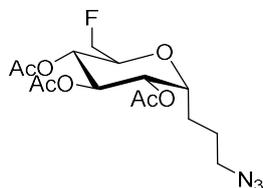
Mp = 95-97°C



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.47$ -1.55 (m, 1H, H3a), 1.59-1.71 (m, 2H, H2a and H3b), 1.79-1.89 (m, 1H, H2b), 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.04 (s, 3H, CH_3), 2.05 (s, 3H, CH_3), 3.24-3.38 (m, 2H, H1), 3.46 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.5$ Hz, $J_{4,3b} = 2.5$ Hz, H4), 3.66 (dddd, 1H, $J_{\text{H}8,\text{F}} = 21.0$ Hz, $J_{8,7} = 9.5$ Hz, $J_{8,9a} = 5.0$ Hz, $J_{8,9b} = 2.5$ Hz, H8), 4.41 (ddd, 1H, $J_{\text{H}9a,\text{F}} = 47.5$ Hz, $J_{9a,9b} = 10.5$ Hz, H9a), 4.45 (ddd, 1H, H9b), 4.88 (app t, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.5$ Hz, H5), 5.01 (app t, 1H, $J_{6,7} = J_{6,5} = 9.5$ Hz, H7), 5.20 (app t, 1H, H6). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 20.8$ (CH_3), 20.8 (CH_3), 20.8 (CH_3), 24.7 (C2), 28.5 (C3), 51.3 (C1), 68.5 (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 7.0$ Hz, C7), 71.8 (C5), 74.3 (C6), 76.5 (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 19$ Hz, C8), 77.4 (C4), 81.8 (d, $J_{\text{F}} = 175.0$ Hz, C9), 169.6 (C=O), 169.8 (C=O), 170.6 (C=O). ^{19}F NMR (CDCl_3 , 235 MHz): $\delta = -231.5$ (dt, $J_{\text{H}9,\text{F}} = 47.0$ Hz, $J_{\text{H}8,\text{F}} = 21.2$ Hz). ESI-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 398.1368$ (calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_7\text{Na}$: 398.1339). IR (cm^{-1}): $\nu = 2957, 2099, 1755, 1375, 1220$.

2,6-anhydro-9-azido-1-fluoro-1,7,8,9-tetra-deoxy-3,4,5-tri-*O*-acetyl-D-glycero-L-gulo-nonitol 24

Prepared from **20** according to procedure described for the synthesis of compound **23**.



Yield: 52% as a yellow oil

$C_{15}H_{22}FN_3O_7$

M.W.: 375.35 g/mol

$R_f = 0.48$ (Cycl/EtOAc: 6/4)

$[\alpha]_D = +83.6$ (c 0.55; $CHCl_3$)

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.56$ -1.66 (m, 2H, H2a and H3a), 1.72-1.80 (m, 1H, H2b), 1.82-1.93 (m, 1H, H3b), 2.03 (s, 3H, CH_3), 2.05 (s, 3H, CH_3), 2.06 (s, 3H, CH_3), 3.32-3.43 (m, 2H, H1), 3.83 (dddd, 1H, $J_{8,F} = 21.0$ Hz, $J_{8,7} = 9.5$ Hz, $J_{8,9a} = 4.0$ Hz, $J_{8,9b} = 3.5$ Hz, H8), 4.19 (ddd, 1H, $J_{4,3b} = 11.5$ Hz, $J_{5,4} = 5.5$ Hz, $J_{4,3a} = 3.0$ Hz, H4), 4.43 (dd, 2H, $J_{H9,F} = 47.0$ Hz, H9), 4.97 (app t, 1H, $J_{7,6} = 9.0$ Hz, H7), 5.07 (dd, 1H, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 5.33 (app t, 1H, H6). **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz):** $\delta = 20.8$ (CH_3), 20.8 (CH_3), 20.9 (CH_3), 22.6 (C3), 24.8 (C2), 51.0 (C1), 68.6 (d, $J_{C,F} = 7.0$ Hz, C7), 69.7 (d, $J_{C,F} = 19.0$ Hz, C8), 70.5 (C5 and C6), 72.5 (C4), 81.8 (d, $J_{C,F} = 175.0$ Hz, C9), 169.7 (C=O), 169.8 (C=O), 170.3 (C=O). **^{19}F NMR ($CDCl_3$, 235 MHz):** $\delta = -231.2$ (td, $J_{H9,F} = 47.0$ Hz, $J_{H8,F} = 21.0$ Hz). **ESI-HRMS $[M+Na]^+$ $m/z = 398.1353$** (calculated for $C_{15}H_{22}FN_3O_7Na$: 398.1339). **IR (cm^{-1}):** $\nu = 2959, 2097, 1744, 1449, 1437, 1368, 1210$.

4,8-anhydro-1-azido-9-fluoro-1,2,3,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-gulo-nonitol 25

To a solution of **23** (1.11 mmol, 420 mg) in 8 mL of anhydrous methanol, was added a catalytic amount of sodium. The reaction was stirred 2h then neutralized by a resin (Amberlite® IR-120). The reaction mixture was filtered of and the solvent was removed under *vacuum* to quantitatively give **25**.

Yield: quantitative as a white solid

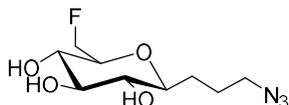
$C_9H_{16}FN_3O_4$

M.W.: 249.24 g/mol

$R_f = 0.21$ (DCM/MeOH: 9/1)

$[\alpha]_D = -7.1$ (c 0.1; H_2O)

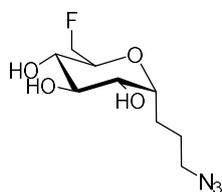
Mp = 43-45°C



¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ = 1.48-1.58 (m, 1H, H3a), 1.68-1.79 (m, 1H, H2a), 1.80-1.90 (m, 1H, H2b), 1.92-2.01 (m, 1H, H3b), 3.24 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0$ Hz, H5), 3.37-3.44 (m, 3H, H1, H4), 3.47-3.62 (m, 3H, H6, H7 and H8), 4.72 (bd, 2H, $J_{H9,F} = 47.0$ Hz, H9). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** δ = 24.2 (C2), 28.0 (C3), 50.9 (C1), 68.7 (d, $J_{C,F} = 7.0$ Hz, C7), 73.4 (C5), 77.2 (C6), 78.1 (d, $J_{C,F} = 18.0$ Hz, C8), 79.2 (C4), 82.3 (d, $J_{C,F} = 168.0$ Hz, C9). **¹⁹F NMR (CDCl₃, 235 MHz):** δ = -234.9. **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 272.1039** (calculated for C₉H₁₆FN₃O₄Na: 272.1023). **IR (cm⁻¹):** ν = 3345, 2953, 2920, 2857, 2091, 1630, 1560, 1451, 1350, 1254.

2,6-anhydro-9-azido-1-fluoro-1,7,8,9-trideoxy-D-glycero-L-gulo-nonitol 26

Prepared from **24** according to procedure described for the synthesis of compound **25**.



Yield: quantitative as a colorless oil

C₉H₁₆FN₃O₄

M.W.: 249.24 g/mol

R_f = 0.19 (DCM/MeOH: 9/1)

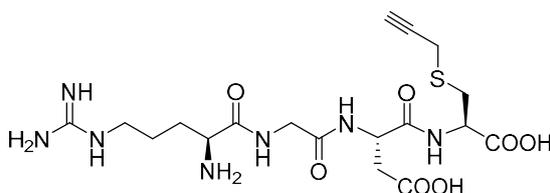
$[\alpha]_D = +20.7$ (c 0.1; MeOH)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ = 1.58-1.67 (m, 1H, H2a), 1.68-1.85 (m, 3H, H2b and H3), 3.41 (t, 2H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H1), 3.47 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5$ Hz, H7), 3.67 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 3.70-3.77 (m, 2H, H8 and H6), 4.03-4.09 (m, 1H, H4), 4.68 (bd, 2H, $J_{H9,F} = 47.0$ Hz, H9). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** δ = 20.8 (C3), 24.2 (C2), 50.7 (C1), 69.0 (d, $J_{C,F} = 7.0$ Hz, C7), 71.0 (C6), 71.1 (d, $J_{C,F} = 19.0$ Hz, C8), 73.0 (C5), 75.8 (C4), 82.4 (d, $J_{C,F} = 168.0$ Hz, C9). **¹⁹F NMR (CDCl₃, 235 MHz):** δ = -235.2. **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 272.1036** (calculated for C₉H₁₆FN₃O₄Na: 272.1023). **IR (cm⁻¹):** ν = 3321, 2955, 2918, 2880, 2459, 2085, 1719, 1647, 1452, 1352, 1304, 1255.

II.1.4) Preparation of linear and cyclic glycopeptides

L-Cysteine, L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-S-2-propyn-1-yl **29**^[117,224]

Prepared from **27** according to literature procedures.^[117,224]



Yield: 85% as a white solid

C₁₈H₂₉N₇O₇S

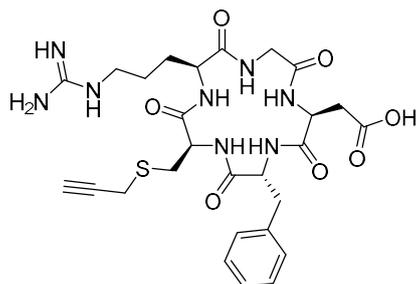
M.W.: 487.53 g/mol

¹H NMR (D₂O, 250 MHz): δ = 1.68 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 2.55 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 8.0 Hz), 2.62–2.64 (m, 1H, H_{alkyne}), 2.70 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 5.0 Hz), 2.99 (dd, 1H, J = 14.0, J = 7.0 Hz, Hz), 3.10–3.35 (m, 5H), 3.75–4.25 (m, 3H), 4.38–4.48 (m, 2H).

Cyclo(L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-D-phenylalanyl-S-2-propyn-1-yl-L-cysteinyI)

30^[117,224]

Prepared from **28** according to literature procedures.^[117,224]



Yield: 82% as a white solid

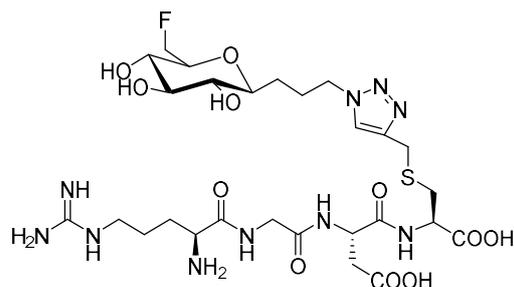
C₂₇H₃₆N₈O₇S

M.W.: 616.69 g/mol

¹H NMR (D₂O, 250 MHz): δ = 1.49–1.77 (m, 3H), 1.84–1.95 (m, 1H), 2.57 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 7.0 Hz), 2.70 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 7.5 Hz), 2.70 (s, 1H, H_{alkyne}), 2.86 (dd, 1H, J = 14.0 Hz, J = 9.0 Hz), 2.98 (dd, 1H, J = 14.5 Hz, J = 5.5 Hz), 3.00–3.06 (m, 1H), 3.08 (dd, 1H, J = 13.5 Hz, J = 7.0 Hz), 3.17 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 3.18 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 3.18–3.24 (m, 2H), 3.51 (d, 1H, J = 15.0 Hz), 4.22 (d, 1H, J = 15.0 Hz), 4.26 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, J = 5.5 Hz), 4.38 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, J = 5.5 Hz), 4.65 (dd, 1H, J = 9.5 Hz, J = 6.5 Hz), 4.70 (app t, 1H, J = 7.0 Hz), 7.28 (bd, 2H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}), 7.32 (bt, 1H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}), 7.39 (bt, 2H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}).

L-Cysteine,L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-S-[[1-[1-(4,8-anhydro-9-fluoro-1,2,3,9-tetradecoxy-D-glycero-D-gulo-nonitol)]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] 31

To a solution of S-propargyl derivative **28** (0.02 mmol) and azido derivative **25** (0.02 mmol) diluted in water (0.4 mL), were added at room temperature sodium ascorbate (0.004 mmol) in water (0.4 mL) and a solution of Cu(OAc)₂ (0.002 mmol) in water (0.045 mL). The solution turned immediately pale green. The reaction was stopped when the intense blue color reappeared (2h of stirring). Chelex® 100 resin (150 mg) was then added to the blue solution and the suspension was stirred until the solution turned colorless. The resin was filtered off and the resulting solution was freeze-dried. Purification was achieved on Sephadex LH20. Elution with water provided pure fluoro C-glycopeptide **31**.



Yield: 74% as a white foam

$C_{27}H_{45}FN_{10}O_{11}S$

M.W.: 736.77 g/mol

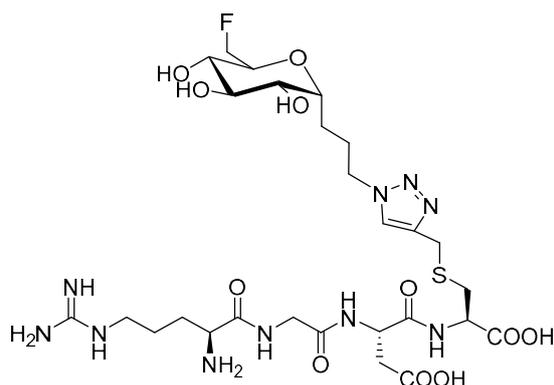
$R_f = 0.41$ (MeOH/H₂O: 8/2)

$[\alpha]_D = +4.9$ (c 0.05; H₂O)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): $\delta = 1.40$ -1.50 (m, 1H, H_{3a}), 1.70-1.88 (m, 3H, H_{2a} and CH₂), 1.96-2.22 (m, 4H, H_{2b}, H_{3b} and CH₂), 2.60-2.75 (m, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.77-3.06 (m, 3H, $\frac{1}{2}$ CH₂, CH₂), 3.15-3.35 (m, 4H, H₄, H₅ and CH₂), 3.44-3.57 (m, 3H, H₆, H₇ and H₈), 3.83-4.20 (m, 4H, 2 CH₂), 4.39 (bs, 1H, CH), 4.45-4.70 (m, 5H, H₁, H₉ and 2 CH), 8.06 (bs, 1H, H_{triazole}). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** $\delta = 23.4$ (CH₂), 25.4 (C₂ and CH₂), 27.7 (C₃), 28.0 (CH₂), 33.3 (CH₂), 40.4 (2 CH₂), 42.5 (CH₂), 50.3 (C₁), 51.6 (CH), 52.8 (CH), 54.3 (CH), 68.6 (d, $J_{C,F} = 7.0$ Hz, C₇), 73.3 (C₅), 77.2 (C₆), 78.0 (d, $J_{C,F} = 17.0$ Hz, C₈), 78.9 (C₄), 82.3 (d, $J_{C,F} = 168.0$ Hz, C₉), 125.2 (CH_{triazole}), 140.8 (C_{triazole}), 156.8 (C=N), 170.1 (C=O), 170.7 (2 C=O), 172.4 (C=O), 176.2 (C=O). **¹⁹F NMR (CDCl₃, 235 MHz):** $\delta = -234.8$. **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 737.3005** (calculated for C₂₆H₄₃FN₁₀O₁₁SH: 737.3052).

L-Cysteine,L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-S-[[1-[9-(2,6-anhydro-1-fluoro-1,7,8,9-tetra-deoxy-D-glycero-L-gulo-nonitol)]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] 32

Prepared from **26** according to procedure described for the synthesis of compound **31**.



Yield: 71% as a white foam

$C_{27}H_{45}FN_{10}O_{11}S$

M.W.: 736.77 g/mol

$R_f = 0.39$ (MeOH/H₂O: 8/2)

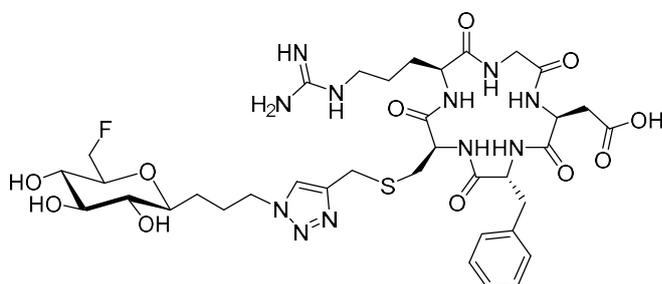
$[\alpha]_D = -7.6$ (c 0.07; H₂O)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): $\delta = 1.53$ -1.74 (m, 4H, H_{3a}, H_{2a} and CH₂), 1.77-1.88 (m, 2H, CH₂), 1.88-1.98 (m, 1H, H_{2b}), 2.00-2.14 (m, 1H, H_{3b}), 2.62 (dd, 1H, $J = 16.0$ Hz, $J = 8.5$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.73 (dd, 1H, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.86 (dd, 1H, $J = 14.0$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.97 (dd, 1H, $J = 14.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.12-3.30 (m, 3H, H₅ and CH₂), 3.34-3.47 (m, 1H, H₈), 3.43 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5$ Hz, H₇), 3.59 (app t, 1H, $J_{6,5} = J_{6,7} = 9.5$ Hz, H₆), 3.71

(dd, 1H, $J = 9.5$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H4), 3.87 (s, 2H, CH₂), 3.96 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.99-4.06 (m, 1H, CH), 4.12 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 4.35 (dd, 1H, $J = 7.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, CH), 4.49 (t, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, H1), 4.65 (bd, 2H, $J_{H9,F} = 47.0$ Hz, H9), 4.67 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 5.0$ Hz, CH), 7.98 (bs, 1H, H_{triazole}). ¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz): $\delta = 20.3$ (CH₂), 23.7 (CH₂), 25.2 (C2), 25.5 (C3), 29.8 (CH₂), 33.2 (CH₂), 38.3 (CH₂), 40.6 (CH₂), 42.4 (CH₂), 49.9 (C1), 51.5 (CH), 52.8 (CH), 54.2 (CH), 68.9 (d, $J_{C,F} = 7.0$ Hz, C7), 70.9 (C5), 71.1 (d, $J_{C,F} = 17.0$ Hz, C8), 72.3 (C6), 75.6 (C4), 82.4 (d, $J_{C,F} = 168.0$ Hz, C9), 124.2 (CH_{triazole}), 138.4 (C_{triazole}), 156.7 (C=N), 170.9 (C=O), 172.5 (2 C=O), 174.6 (C=O), 176.3 (C=O). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235 MHz): $\delta = -234.7$. ESI-HRMS [M+H]⁺ $m/z = 737.3055$ (calculated for C₂₆H₄₃FN₁₀O₁₁SH: 737.3052).

Cyclo[L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-D-phenylalanyl-S-[[1-[1-(4,8-anhydro-9-fluoro-1,2,3,9-tetraoxy-D-glycero-D-gulo-nonitol)]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl]-L-cysteinyl]
33

To a solution of S-propargyl derivative **30** (0.005 mmol) and azido derivative **25** (0.005 mmol) diluted in water (0.1 mL), were added at room temperature sodium ascorbate (0.001 mmol) in water (0.025 mL) and a solution of Cu(OAc)₂ (0.0005 mmol) in water (0.001 mL). The solution turned immediately pale green. The reaction was stopped when the blue color appeared (2h of stirring). Chelex® 100 resin (150 mg) was then added to the blue solution and the suspension was stirred until the solution turned colorless. The resin was filtered off and the resulting solution was freeze-dried. Purification was achieved on Sephadex LH20. Elution with water provided pure fluoro C-glycopeptide **33**.



Yield: 69% as a white foam

C₃₆H₅₂FN₁₁O₁₁S

M.W.: 865.94 g/mol

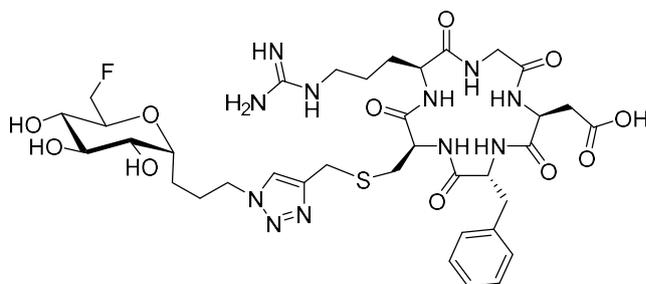
$R_f = 0.34$ (MeOH/H₂O: 8/2)

$[\alpha]_D = +6.3$ (c 0.05; H₂O)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ = 1.42-1.64 (m, 3H, H3a, H2a and $\frac{1}{2}$ CH₂), 1.65-1.77 (m, 1H, H2b), 1.81-1.93 (m, 2H, H3b and $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.00-2.23 (m, 2H, CH₂), 2.55 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 7.0 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.68 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 7.0 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.75 (bd, 1H, J = 7.0 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.00-3.13 (m, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.16-3.26 (m, 3H, H5 and CH₂), 3.33 (app td, 1H, $J_{4,5}$ = 9.5 Hz, $J_{4,3}$ = 3.0 Hz, H4), 3.45-3.56 (m, 4H, H6, H7, H8 and CH), 3.71 (s, 2H, CH₂), 4.19-4.27 (m, 2H, CH₂), 4.41 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, J = 6.0 Hz, CH), 4.48-4.52 (m, 2H, H1), 4.61-4.77 (m, 6H, CH₂Ph, H9 and 2CH), 7.26-7.39 (m, 5H, H_{Ar}), 7.91 (s, 1H, H_{triazole}). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** δ = 24.5 (C₂), 25.2 (CH₂), 25.5 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.7 (C₃), 36.4 (2 CH₂), 40.5 (2 CH₂), 43.7 (CH₂), 50.2 (C₁), 50.8 (CH), 52.7 (CH), 54.3 (CH), 55.2 (CH), 68.6 (d, $J_{C,F}$ = 7.0 Hz, C₇), 73.3 (C₅), 77.2 (C₆), 78.1 (d, $J_{C,F}$ = 17.0 Hz, C₈), 78.9 (C₄), 82.4 (d, $J_{C,F}$ = 168.0 Hz, C₉), 124.0 (CH_{triazole}), 127.1 (C_{Ar}), 128.8 (2 C_{Ar}), 129.2 (2 C_{Ar}), 136.1 (C_{qAr}), 144.6 (C_{triazole}), 156.8 (C=N), 171.2 (2 C=O), 172.3 (C=O), 172.6 (C=O), 173.3 (C=O), 177.9 (C=O). **¹⁹F NMR (CDCl₃, 235 MHz):** δ = -234.6. **ESI-HRMS [M+H]⁺** m/z = 866.3680 (calculated for C₃₆H₅₃FN₁₁O₁₁SH: 866.3631).

Cyclo[L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-D-phenylalanyl-S-[[1-[9-(2,6-anhydro-1-fluoro-1,7,8,9-tetraoxy-D-glycero-L-gulo-nonitol)]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl]-L-cysteinyl]
34

Prepared from **26** according to procedure described for the synthesis of compound **33**.



Yield: 65% as a white foam

C₃₆H₅₂FN₁₁O₁₁S

M.W.: 865.94 g/mol

R_f = 0.32 (MeOH/H₂O: 8/2)

$[\alpha]_D = -9.7$ (c 0.1; H₂O)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ = 1.51-1.80 (m, 6H, H3a, H2a and 2 CH₂), 1.86-1.98 (m, 1H, H2b), 2.03-2.12 (m, 1H, H3b), 2.55 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 7.5 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.68 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 7.0 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.74 (d, 1H, J = 7.0 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.01-3.14 (m, 2H, CH₂), 3.16-3.26 (m, 2H, H5 and $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.42-3.52 (m, 3H, H4, H6 and H7), 3.61-3.77 (m, 4H, H8, CH and CH₂), 3.98-4.11 (m, 2H, 2CH), 4.18-4.26 (m, 2H, CH₂), 4.39 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, J = 5.5 Hz, CH), 4.51 (t, 2H, J = 7.0 Hz, H1), 4.59-4.74 (m, 4H, CH₂Ph and H9), 7.25-7.41 (m, 5H, H_{Ar}), 7.92 (s, 1H, H_{triazole}). **¹³C NMR (D₂O, 100.6 MHz):** δ = 20.5 (CH₂), 23.3 (CH₂), 24.2 (C₂), 25.7 (C₃), 27.1 (CH₂), 36.4 (CH₂), 37.8 (CH₂), 40.5 (2 CH₂), 43.7 (CH₂), 50.7 (C₁), 50.8 (CH), 52.7

(CH), 54.3 (CH), 55.1 (CH), 62.9 (C5), 68.9 (d, $J_{C,F} = 7.0$ Hz, C7), 70.9 (d, $J_{C,F} = 17.0$ Hz, C8), 72.8 (C6), 75.6 (C4), 82.5 (d, $J_{C,F} = 168.0$ Hz, C9), 123.9 (CH_{triazole}), 127.1 (C_{Ar}), 128.8 (2C_{Ar}), 129.2 (2C_{Ar}), 136.1 (C_{qAr}), 144.7 (C_{triazole}), 156.7 (C=N), 171.1 (C=O), 171.2 (C=O), 172.2 (C=O), 172.5 (C=O), 173.3 (C=O), 177.9 (C=O). **¹⁹F NMR (CDCl₃, 235 MHz):** $\delta = -234.6$. **ESI-HRMS [M+Na]⁺** $m/z = 888.3277$ (calculated for C₃₆H₅₃FN₁₁O₁₁SNa: 888.3450).

II.2- Synthesis of fluorinated and fluorescent C-glycosides and conjugation with RGD derivatives

II.2.1) Preparation of cyanine 5

1-(methyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide 35^[235]

Prepared according to literature procedures.^[235]

Yield: 97% as a purple powder

C₁₂H₁₆IN

M.W.: 301.17 g/mol

¹H NMR ((CD₃)₂SO, 250 MHz): $\delta = 1.52$ (s, 6H, 2 CH₃), 2.75 (s, 3H, CH₃), 3.96 (s, 3H, CH₃), 7.60-7.63 (m, 2H, H_{Ar}), 7.80-7.84 (m, 1H, H_{Ar}), 7.88-7.92 (m, 1H, H_{Ar}).

2-(4-Phenylamino-1E,3E-butadien-1-yl)-1,3,3-trimethylindolium chloride 36^[235]

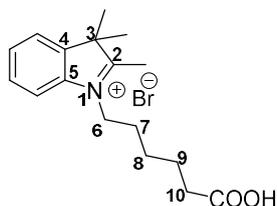
To a solution of distilled water (17.1 mL), HCl (0.85 mL) and malondialdehyde bis(dimethylacetal) (1.05 mL, 6.1 mmol) was added dropwise a solution of distilled water (21 mL), HCl (1.5 mL), and aniline (2.2 mL, 24.4 mmol). The reaction was stirred at 50°C during 5 hours. The precipitate was isolated by filtration to give 36.

Yield: 90% as an orange powder

C₁₅H₁₅ClN₂

M.W.: 258.75 g/mol

¹H NMR ((CD₃)₂SO, 250 MHz): $\delta = 6.25$ (t, 1H, $J_{3,2} = J_{3,4} = 12.5$ Hz, H3), 7.27-7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 7.37-7.40 (m, 4H, H_{Ar}), 7.45-7.51 (m, 4H, H_{Ar}), 8.70 (app t, 2H, H2 and H4).

1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolium bromide 37^[236]Prepared according to literature procedures.^[236]

Yield: 62% as light pink powder

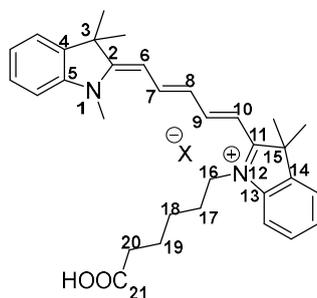
C₁₇H₂₄BrNO₂

M.W.: 354.29 g/mol

¹H NMR ((CD₃)₂SO, 250 MHz): δ = 1.38-1.43 (m, 2H, H₈), 1.52 (s, 6H, 2 CH₃), 1.55-1.60 (m, 2H, H₉), 1.80-1.83 (m, 2H, H₇), 2.21 (t, 2H, J_{10,9} = 6.0 Hz, H₁₀), 2.83 (s, 3H, CH₃), 4.44 (t, 2H, J_{6,7} = 7.5 Hz, H₆), 7.59-7.62 (m, 2H, H_{Ar}), 7.82-7.85 (m, 1H, H_{Ar}), 7.95-7.98 (m, 1H, H_{Ar}).

3H-Indolium, 2-[5-[1-(5-carboxypentyl)-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-2H-indol-2-ylidene]-1,3-pentadien-1-yl]-1,3,3-trimethyl-, inner salt 38

To a solution of compound **35** (400 mg, 1.33 mmol) in Ac₂O (4.4 mL), was added under argon, **36** (414 mg, 1.59 mmol, 1.2 eq). The solution was stirred 30 min at 140°C. The solution was cooled at room temperature then anhydrous pyridine (4.8 mL) and **37** (602 mg, 1.59 mmol, 1.2 eq) were added and the reaction was stirred for 2h at room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum*. The product was solubilized with CHCl₃, and cyclohexane was added to precipitate the product. After mixture filtration, the recovered solid was solubilized in CHCl₃. The organic layer was washed with water and an aqueous solution of HCl (1N). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under *vacuum*. The crude product was precipitate in toluene. After mixture filtration the recovered solid was dried under *vacuum* to afford **38**.



Yield: 65% as a dark blue powder

C₃₂H₃₈N₂O₂⁺

M.W.: 483.29 g/mol

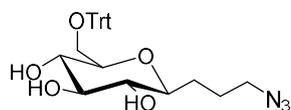
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.55 (bqt, 2H, J_{18,19} = J_{18,17} = 7.0 Hz, H₁₈), 1.71 (s, 6H, 2CH₃), 1.73 (s, 6H, 2CH₃), 1.74-1.77 (m, 2H, H₁₉), 1.82 (bqt, 1H, J_{19,20} = 7.5 Hz, H₁₇), 2.45 (t, 2H, H₂₀), 3.69 (s, 3H, N-CH₃), 4.04 (bt, 2H, J_{16,17} = 7.5 Hz, H₁₆), 6.32 (d, 1H, J_{10,9} = 13.5

Hz, H10), 6.43 (d, 1H, $J_{6,7} = 13.5$ Hz, H6), 6.90 (app t, 1H, $J_{8,9} = J_{8,7} = 13.5$ Hz, H8), 7.09 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{Ar}), 7.11 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{Ar}), 7.19 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, H_{Ar}), 7.20 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, H_{Ar}), 7.31 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.34 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{Ar}), 7.36 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{Ar}), 8.05 (t, 1H, H7), 8.07 (t, 1H, H9). ¹³C NMR ((CD₃)₂SO, 100.6 MHz): $\delta = 24.4$ (C19), 26.4 (C18), 26.9 (C17), 28.2 (2 Me), 28.3 (2 Me), 32.5 (N-Me), 34.4 (C20), 44.4 (C16), 49.4 (C3), 49.5 (C15), 104.0 (C10), 104.6 (C6), 110.6 (C_{Ar}), 110.7 (C_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 122.4 (C_{Ar}), 125.2 (C_{Ar}), 126.9 (C8), 128.8 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 141.0 (C_{qAr}), 141.1 (C_{qAr}), 141.3 (C_{qAr}), 142.1 (C_{qAr}), 142.9 (C_{qAr}), 153.7 (C9), 154.0 (C7), 173.0 (C11), 173.5 (C2), 176.8 (C21). **ESI-HRMS** [M]⁺ $m/z = 483.2950$ (calculated for C₃₂H₃₉N₂O₂: 483.3006). **IR** (cm⁻¹): $\nu = 3111, 2999, 2893, 2608, 2367, 2012, 1829, 1688, 1477, 1454, 1443, 1368, 1331, 1215, 1140, 1059, 1038, 1015$.

II.2.2) Regioselective acylation

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3,9-tetraoxy-9-*O*-triphenylmethyl-*D*-glycero-*D*-gulo-nonitol **39**

To a solution of **13** (1.3g, 5.26 mmol) in dry CH₂Cl₂ (25 mL), were added, under argon trityl chloride (4.4g, 15.78 mmol, 3 eq) and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (1.77g, 15.78 mmol, 3 eq). The solution was stirred for 36 h at 28°C. The solution was diluted with 15 mL CH₂Cl₂, washed with an aqueous solution of HCl (0.5 N), an aqueous saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 60/40 to 0/100) to give **39**.



Yield: 72% as a white solid

C₂₈H₃₁N₃O₅

M.W.: 489.57 g/mol

$R_f = 0.17$ (Cycl/EtOAc: 3/7)

$[\alpha]_D = -15.2$ (c 0.1; MeOH)

Mp = 86°C

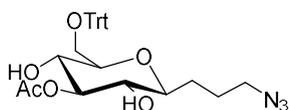
¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 1.53-1.62$ (m, 1H, H3a), 1.76-1.86 (m, 1H, H2a), 1.93-2.10 (m, 2H, H2b and H3b), 3.13 (app t, 1H, H5, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0$ Hz), 3.22-3.28 (m, 2H, H9a, and H4), 3.31-3.37 (m, 2H, H8 and H6), 3.38-3.46 (m, 4H, H1, H9b and H7), 7.23 (bt, 3H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.30 (bt, 6H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.51 (bd, 6H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}). ¹³C NMR (CD₃OD,

100.6 MHz): δ = 26.4 (C2), 30.1 (C3), 52.6 (C1), 65.2 (C9), 72.3 (C8), 75.5 (C5), 80.0 (C6), 80.3 (C4), 80.6 (C7), 87.6 (C_{qTr}), 127.9 (3 C_{Ar}), 128.7 (6 C_{Ar}), 129.9 (6 C_{Ar}), 145.6 (3 C_{qAr}). **ESI-HRMS** [M+Na]⁺ m/z = 512.2194 (calculated for C₂₈H₃₁N₃NaO₅: 512.2161). **IR (cm⁻¹):** ν = 3337, 2988, 2901, 2091, 1489, 1447, 1395, 1250, 1067, 1001.

General acylation procedure with acetic anhydride:

To a solution of **39** (150 mg, 0.31 mmol) in chloroform (100 mL), were added, under argon, K₂CO₃ (410 mg, 3.0 mmol, 9.6 equiv.), Ac₂O (33 μ L, 0.34 mmol, 1.1 equiv.) and 4-DMAP (1.89 mg, 0.016 mmol, 0.05 equiv.). The solution was stirred at room temperature for 13h and was then diluted with water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel previously neutralized with cyclohexane/Et₃N 95/5 (eluent: cyclohexane/EtOAc 90/10 to 50/50) to give **40**, **41** and **42**.

6-acetate-4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-9-*O*-triphenylmethyl-D-glycero-D-gulonitol **40**



Yield: 51% as a colorless oil

C₃₀H₃₃N₃O₆

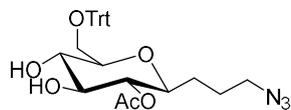
M.W.: 531.61 g/mol

R_f = 0.61 (Cycl/EtOAc: 3/7)

$[\alpha]_D = -13.2$ (c 0.1; MeOH)

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 1.54-1.63 (m, 1H, H3a), 1.80 (s, 3H, CH₃), 1.82-1.86 (m, 1H, H2a), 1.91-2.09 (m, 2H, H3b and H2b), 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.23 (dd, 1H, $J_{9a,9b}$ = 10.0 Hz, $J_{9a,8}$ = 5.5 Hz, H9a), 3.26 (app t, 1H, $J_{5,6}$ = $J_{5,4}$ = 9.5 Hz, H5), 3.33 (ddd, 1H, $J_{4,3a}$ = 7.5 Hz, $J_{4,3b}$ = 2.0 Hz, H4), 3.40 (t, 2H, $J_{1,2}$ = 7.5 Hz, H1), 3.41-3.45 (m, 1H, H9b), 3.47 (ddd, 1H, $J_{8,7}$ = 9.5 Hz, $J_{8,9b}$ = 1.5 Hz, H8), 3.52 (app t, 1H, $J_{7,6}$ = $J_{7,8}$ = 9.5 Hz, H7), 4.90 (app t, 1H, H6), 7.22 (t, 3H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}), 7.28 (t, 6H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}), 7.48-7.50 (m, 6H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz):** δ = 21.2 (CH₃), 26.3 (C2), 30.0 (C3), 52.6 (C1), 64.8 (C9), 70.4 (C8), 73.7 (C5), 80.3 (C4), 80.5 (C7), 81.2 (C6), 87.6 (C_{qTr}), 128.0 (3 C_{Ar}), 128.7 (6 C_{Ar}), 129.9 (6 C_{Ar}), 145.5 (3 C_{qAr}), 172.9 (C=O). **ESI-HRMS** [M+Na]⁺ m/z = 554.2219 (calculated for C₃₀H₃₃N₃NaO₆: 554.2267). **IR (cm⁻¹):** ν = 3370, 2922, 2853, 2091, 1738, 1651, 1595, 1489, 1449, 1371, 1225, 1082, 1059, 1026.

5-acetate-4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-9-*O*-triphenylmethyl-D-glycero-D-gulonitol 41



Yield: 10% as a colorless oil

$C_{30}H_{33}N_3O_6$

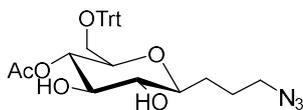
M.W.: 531.61 g/mol

$R_f = 0.54$ (Cycl/EtOAc: 3/7)

$[\alpha]_D = -16.3$ (c 0.06; MeOH)

1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 1.49$ -1.60 (m, 1H, H3a), 1.65-1.74 (m, 1H, H3b), 1.76-1.86 (m, 1H, H2a), 1.90-1.99 (m, 1H, H2b), 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.22 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 10.5$ Hz, $J_{9a,8} = 6.0$ Hz, H9a), 3.37-3.43 (m, 5H, H1, H4, H6 and H8), 3.44 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 2.0$ Hz, H9b), 3.48 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.0$ Hz, H7), 4.67 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 7.23 (bt, 3H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.30 (bt, 6H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.49 (bd, 6H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}). **^{13}C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz):** $\delta = 21.0$ (CH₃), 26.0 (C2), 29.9 (C3), 52.4 (C1), 65.0 (C9), 72.2 (C8), 76.0 (C5), 77.7 (C7), 78.2 (C4), 80.8 (C6), 87.6 (C_{qTrt}), 128.0 (3 C_{Ar}), 128.7 (6 C_{Ar}), 130.0 (6 C_{Ar}), 145.6 (3 C_{qAr}), 172.3 (C=O). **ESI-HRMS [M+Na]⁺** $m/z = 554.2201$ (calculated for C₃₀H₃₃N₃NaO₆: 554.2267). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 3364, 2922, 2853, 2091, 1736, 1655, 1597, 1489, 1449, 1371, 1225, 1082, 1057, 1028$.

7-acetate-4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-9-*O*-triphenylmethyl-D-glycero-D-gulonitol 42



Yield: 15% as a colorless oil

$C_{30}H_{33}N_3O_6$

M.W.: 531.61 g/mol

$R_f = 0.48$ (Cycl/EtOAc: 3/7)

$[\alpha]_D = -14.4$ (c 0.1; MeOH)

1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 1.54$ -1.65 (m, 1H, H3a), 1.77-1.87 (m, 1H, H2a), 1.92-2.00 (m, 1H, H3b), 2.01-2.09 (m, 1H, H2b), 2.98 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 10.5$ Hz, $J_{9a,8} = 5.0$ Hz, H9a), 3.18 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 2.0$ Hz, H9b), 3.21-3.26 (m, 2H, H4 and H5), 3.37-3.51 (m, 3H, H1, H6 and H8), 4.92 (t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 10.0$ Hz, H7), 7.20-7.34 (m, 9H, H_{Ar}), 7.45-7.51 (m, 6H, H_{Ar}). **^{13}C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz):** $\delta = 20.9$ (CH₃), 26.4 (C2), 30.1 (C3), 52.6 (C1), 64.1 (C9), 72.4 (C7), 75.8 (C5), 77.7 (C6), 78.7 (C8), 80.9 (C4), 128.1 (3 C_{Ar}), 128.7 (4 C_{Ar}), 129.9 (5 C_{Ar}), 145.3 (C_{qAr}), 145.6 (C_{qAr}), 145.6 (C_{qAr}) 172.3 (C=O). **ESI-HRMS [M+Na]⁺** $m/z = 554.2256$

(calculated for $C_{30}H_{33}N_3NaO_6$: 554.2267). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 3369, 2920, 2851, 2091, 1736, 1649, 1593, 1488, 1447, 1370, 1225, 1082, 1059, 1026.$

General procedure for acylation with 3-butenic acid:

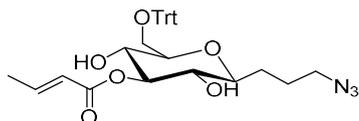
Protocol using PyBOP: To a solution of **39** (100 mg, 0.2 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL), were added, under argon dropwise at room temperature, 3-butenic acid (26 μ L, 0.3 mmol, 1.5 eq) and DIEA (105 μ L, 0.3 mmol, 3 eq). Then the solution was cooled to 0°C and PyBOP (188 mg, 0.36 mmol, 1.8 eq) was added dropwise. The solution was stirred 48h at room temperature, then an aqueous saturated solution of NH_4Cl was added. Then aqueous layer was extracted with EtOAc once. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel previously neutralized with cyclohexane/ Et_3N 95/5 (eluent: cyclohexane/EtOAc 90/10 to 50/50) to give **43, 44** and **45**.

Protocol using IBCF: To a solution of 3-butenic acid (20 μ L, 0.24 mmol, 1.2 equiv.) in CH_2Cl_2 (5 mL) were added dropwise under argon at 0°C, TEA (33 μ L, 0.24 mmol, 1.2 equiv.) and IBCF (27 μ L, 0.24 mmol, 1.2 equiv.). The solution was stirred at 0°C for 1h. A freshly prepared solution of **39** (100 mg, 0.2 mmol) and 4-DMAP (3 mg, 0.024 mmol, 0.12 equiv.) in CH_2Cl_2 (10 mL) was then added dropwise under argon at 0°C. The solution was stirred at room temperature overnight. The organic layer was washed with an aqueous solution of $NaHCO_3$ (5%), an aqueous solution of citric acid (5%) and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel previously neutralized with cyclohexane/ Et_3N 95/5 (eluent: cyclohexane/EtOAc 90/10 to 60/40) to give **43, 44** and **45**.

Protocol using DCC: To a solution of **39** (100 mg, 0.2 mmol) in dichloromethane/acetonitrile mixture (1/1 v/v, 1 mL), were added dropwise under argon at room temperature 3-butenic acid (20 μ L, 0.24 mmol, 1.2 equiv.), 4-DMAP (16 mg, 0.13 mmol, 0.65 equiv.) and DCC (58 mg, 0.28 mmol, 1.4 equiv. in 3mL of CH_2Cl_2). The solution was stirred for 24h at room temperature. The solution was filtered and the organic layer was washed with water, an aqueous solution of HCl (1N) and water. The organic layer was further washed with a saturated aqueous solution of Na_2CO_3 and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel previously

neutralized with cyclohexane/Et₃N 95/5 (eluent: cyclohexane/EtOAc 90/10 to 50/50) to give **46**, **47** and **48**.

4,8-anhydro-1-azido-6-[(2E)-2-butenoate]-1,2,3-trideoxy-9-O-triphenylmethyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 43



Yield: cf Table 10 page 120 as a white solid

C₃₂H₃₅N₃O₆

M.W.: 557.65 g/mol

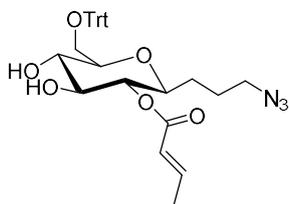
R_f = 0.53 (Cycl/EtOAc: 5/5)

[α]_D = -11.3 (c 0.08; MeOH)

Mp = 70-71°C

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 1.54-1.64 (m, 1H, H3a), 1.79-1.86 (m, 1H, H2a), 1.89 (dd, 3H, J_{12,11} = 7.0 Hz, J_{12,10} = 1.5 Hz, H12), 1.94-2.09 (m, 2H, H3b and H2b), 3.23 (dd, 1H, J_{9a,9b} = 10.0 Hz, J_{9a,8} = 5.5 Hz, H9a), 3.28 (app t, 1H, H5, J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5 Hz), 3.31-3.37 (m, 1H, H4), 3.43 (t, 2H, J_{1,2} = 7.0 Hz, H1), 3.44-3.50 (m, 1H, H8), 3.48 (dd, 1H, J_{9b,8} = 1.5 Hz, H9b), 3.52 (app t, 1H, J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5 Hz, H7), 4.95 (app t, 1H, H6), 5.95 (dq, 1H, J_{10,11} = 15.5 Hz, J_{10,12} = 1.5 Hz, H10), 7.03 (dq, 1H, J_{11,12} = 7.0 Hz, H11), 7.23 (bt, 3H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}), 7.30 (bt, 6H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}), 7.50 (bd, 6H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}). **¹³C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz):** δ = 18.1 (C12), 26.3 (C2), 30.1 (C3), 52.6 (C1), 64.9 (C9), 70.5 (C8), 73.8 (C5), 80.4 (C4), 80.6 (C7), 80.9 (C6), 87.6 (C_{qTr}), 123.8 (C10), 128.0 (3 C_{Ar}), 128.7 (6 C_{Ar}), 130.0 (6 C_{Ar}), 145.5 (3 C_{qAr}), 146.2 (C11), 168.2 (C=O). **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z** = 580.2453 (calculated for C₃₂H₃₅N₃NaO₆: 580.2424). **IR (cm⁻¹):** ν = 3337, 2968, 2924, 2874, 2093, 1701, 1653, 1489, 1447, 1310, 1290, 1184, 1082, 1045, 1003.

4,8-anhydro-1-azido-5-[(2E)-2-butenolate]-1,2,3-trideoxy-9-O-triphenylmethyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 44



Yield: cf Table 10 page 120 as a
white solid

$C_{32}H_{35}N_3O_6$

M.W.: 557.65 g/mol

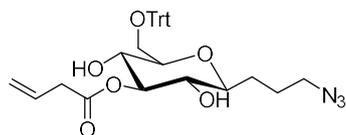
$R_f = 0.49$ (Cycl/EtOAc: 5/5)

$[\alpha]_D = -0.7$ (c 0.1; MeOH)

Mp = 91-92°C

1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 1.48$ -1.56 (m, 1H, H3a), 1.66-1.74 (m, 1H, H3b), 1.80-1.98 (m, 2H, H2), 1.91 (dd, 3H, $J_{12,11} = 7.0$ Hz, $J_{12,10} = 1.5$ Hz, H12), 3.22 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 10.0$ Hz, $J_{9a,8} = 5.5$ Hz, H9a), 3.37 (t, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, H1), 3.39-3.47 (m, 4H, H4, H6, H8 and H9b), 3.49 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.0$ Hz, H7), 4.71 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 5.93 (dq, 1H, $J_{10,11} = 15.5$ Hz, $J_{10,12} = 1.5$ Hz, H10), 7.05 (dq, 1H, $J_{11,12} = 7.0$ Hz, H11), 7.22 (bt, 3H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.29 (bt, 6H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.48 (bd, 6H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}). **^{13}C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz):** $\delta = 18.1$ (C12), 26.0 (C2), 29.9 (C3), 52.4 (C1), 65.0 (C9), 72.3 (C8), 75.8 (C5), 77.7 (C4), 78.3 (C7), 80.8 (C6), 87.6 (C_{qTrt}), 123.4 (C10), 128.0 (3 C_{Ar}), 128.7 (6 C_{Ar}), 130.0 (6 C_{Ar}), 145.6 (3 C_{qAr}), 147.1 (C11), 167.6 (C=O). **ESI-HRMS** [M+Na]⁺ m/z = 580.2447 (calculated for C₃₂H₃₅N₃NaO₆: 580.2424). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 3323, 2924, 2851, 2091, 1715, 1651, 1489, 1447, 1373, 1258, 1180, 1082, 1067, 1001$.

4,8-anhydro-1-azido-6-(3-butenolate)-1,2,3-trideoxy-9-O-triphenylmethyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 46



Yield: cf Table 10 page 120 as a
white solid

$C_{32}H_{35}N_3O_6$

M.W.: 557.65 g/mol

$R_f = 0.57$ (Cycl/EtOAc: 5/5)

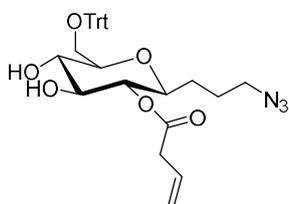
$[\alpha]_D = -7.6$ (c 0.18; MeOH)

Mp = 48°C

1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 1.55$ -1.66 (m, 1H, H3a), 1.70-1.77 (m, 1H, H2a), 1.83-1.92 (m, 1H, H2b), 1.95-2.08 (m, 1H, H3b), 3.21-3.26 (m, 3H, H10 and H9a), 3.27 (app t, 1H,

$J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0$ Hz, H5), 3.31-3.36 (m, 1H, H4), 3.44 (t, 2H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H1), 3.45-3.52 (m, 2H, H9b and H8), 3.52 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5$ Hz, H7), 4.93 (app t, 1H, $J_{6,5} = J_{6,7} = 9.0$ Hz, H6), 5.17 (app dq, 1H, $J_{12a,11} = 10.0$ Hz, $J_{12a,12b} = J_{12a,10} = 1.5$ Hz, H12a), 5.20 (app dq, 1H, $J_{12b,11} = 17.0$ Hz, $J_{12b,12a} = J_{12b,10} = 1.5$ Hz, H12b), 5.94-6.04 (m, 1H, H11), 7.24 (bt, 3H, $J = 7.0$ Hz, H_{Ar}), 7.31 (bt, 6H, $J = 7.0$ Hz, H_{Ar}), 7.51 (bd, 3H, $J = 7.0$ Hz, H_{Ar}). **ESI-HRMS** $[M+Na]^+$ $m/z = 580.2452$ (calculated for $C_{32}H_{35}N_3NaO_6$: 580.2424). **IR** (cm^{-1}): $\nu = 3401, 2970, 2922, 2093, 1699, 1651, 1489, 1447, 1373, 1290, 1242, 1184, 1067, 1003$.

4,8-anhydro-1-azido-5-(3-butenolate)-1,2,3-trideoxy-9-O-triphenylmethyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 47



Yield: cf Table 10 page 120 as a white solid

$C_{32}H_{35}N_3O_6$

M.W.: 557.65 g/mol

$R_f = 0.52$ (Cycl/EtOAc: 5/5)

$[\alpha]_D = -4.8$ (c 0.1; MeOH)

Mp = 94-96°C

1H NMR (CD_3OD , 250 MHz): $\delta = 1.51$ -1.64 (m, 1H, H3a), 1.65-1.76 (m, 1H, H2a), 1.78-1.95 (m, 2H, H3b and H2b), 3.15-3.25 (m, 3H, H10 and H9a), 3.34-3.53 (m, 7H, H4, H6, H1, H9b, H8 and H7), 4.67 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 5.16 (app dq, 1H, $J_{12a,11} = 9.5$ Hz, $J_{12a,12b} = J_{12a,10} = 1.5$ Hz, H12a), 5.20 (app dq, 1H, $J_{12b,11} = 15.0$ Hz, $J_{12b,12a} = J_{12b,10} = 1.5$ Hz, H12b), 5.86-6.06 (m, 1H, H11), 7.18-7.34 (m, 9H, H_{Ar}), 7.47 (bd, 6H, $J = 7.0$ Hz, H_{Ar}). **^{13}C NMR** (CD_3OD , 62.9 MHz): $\delta = 26.0$ (C2), 30.1 (C3), 34.7 (C10), 52.6 (C1), 65.2 (C9), 72.3 (C8), 75.6 (C5), 80.0 (C7), 80.4 (C4), 80.6 (C6), 87.6 (C_{qTr}), 116.1 (C12), 125.4 (C11), 127.9 (3 C_{Ar}), 128.6 (6 C_{Ar}), 129.9 (6 C_{Ar}), 145.6 (3 C_{qAr}), 159.9 (C=O). **ESI-HRMS** $[M+Na]^+$ $m/z = 580.2391$ (calculated for $C_{32}H_{35}N_3NaO_6$: 580.2424). **IR** (cm^{-1}): $\nu = 3323, 2926, 2849, 2091, 1724, 1605, 1489, 1449, 1308, 1242, 1171, 1084, 997$.

II.2.3) Preparation of fluorinated and fluorescent C-glycosidic compounds

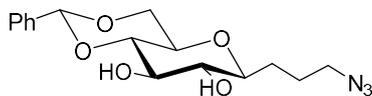
II.2.3.1) Benzylidene protection

General procedures for protection with benzylidene:

Protocol using I₂ and benzaldehyde dimethyl acetal: To a solution of **13** (500 mg, 2.03 mmol) in ACN (4 mL), were added at room temperature, benzaldehyde dimethyl acetal (395 μL, 2.63 mmol, 1.3 eq) and I₂ (50 mg, 0.2 mmol, 0.1 eq) in a sealed tube. The mixture was stirred 13h at 85°C. The solution was cooled to room temperature, and was evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: DCM/MeOH 100/0 to 80/20) to give **49**.

Protocol using APTS and benzaldehyde dimethyl acetal: To a solution of **13** (300 mg, 1.21 mmol), in DMF (4 mL) were added at room temperature benzaldehyde dimethyl acetal (240 μL, 1.60 mmol, 1.3 eq) and APTS (21 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq). The solution was heated at 40°C under reduce pressure during four hours and then the solvent was evaporated under *vacuum*. The mixture was solubilized int EtOAc then washed with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ then with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, then filtrated and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: DCM/MeOH 100/0 to 80/20) to give **49**.

Protocol using ZnCl₂ and distilled benzaldehyde: To a solution of **13** (5 g, 20.3 mmol), in distilled benzaldehyde (15 mL, 148.2 mmol, 7.3 eq) was added ZnCl₂ freshly dehydrated (4.3 g, 30.45 mmol, 1.5 eq). The solution was heated at 30°C under argon atmosphere. After 36 hours, the mixture was diluted with Et₂O then a solution of cyclohexane/cold water was added dropwise with strong stirring. Then the solution was filtered, the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: DCM/MeOH 100/0 to 80/20) to give **49**.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-7,9-O-phenylmethylene-D-glycero-D-gulo-nonitol 49

Yield: cf Table 11 page 123 as

colorless oil

C₁₆H₂₁N₃O₅

M.W.: 335.36 g/mol

R_f = 0.47 (DCM/MeOH: 9/1)[α]_D = -19.5 (c 0.1; CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.36-1.45 (m, 1H, H3a), 1.55-1.66 (m, 1H, H2a), 1.70-1.89 (m, 2H, H3b and H2b), 3.14-3.24 (m, 2H, H4 and H5), 3.26 (t, 2H, *J*_{1,2} = 7.0 Hz, H1), 3.27-3.35 (m, 1H, H8), 3.37 (app t, 1H, *J*_{6,7} = *J*_{6,5} = 9.0 Hz, H7), 3.57-3.66 (m, 3H, H6, H9a and H_{OH}), 4.00 (bs, 1H, H_{OH}), 4.26 (dd, 1H, *J*_{9a,9b} = 10.0 Hz, *J*_{9b,8} = 4.5 Hz, H9b), 5.46 (s, 1H, H10), 7.32-7.43 (m, 3H, H_{Ar}), 7.45-7.53 (m, 2H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 24.9 (C2), 28.9 (C3), 51.5 (C1), 68.9 (C9), 70.2 (C8), 74.4 (C5), 75.1 (C6), 79.5 (C4), 81.1 (C7), 101.9 (C10), 126.4 (2 C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 129.4 (C_{Ar}), 137.2 (C_{qAr}). **ESI-HRMS [M+H]⁺ m/z** = 336.1542 (calculated for C₁₆H₂₂N₃O₅: 336.1554). **IR (cm⁻¹):** ν = 3385, 2920, 2866, 2091, 1452, 1375, 1350, 1261, 1215, 1125, 1094, 1065, 1007.

II.2.3.2) Regioselective alkylation

General procedures for regioselective alkylation

Method A: To a solution of **49** (150 mg, 0.45 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL), were added dropwise, under argon at 0°C, Bu₄NHSO₄ (43 mg, 0.14 mmol, 0.3 equiv.) and alkylating agents (0.54 mmol, 1.2 eq). Then, an aqueous solution of NaOH (80 mg in 0.65 mL of water) was added at room temperature. The solution was stirred for 35h at 60°C. After evaporation under *vacuum*, the crude product was diluted in EtOAc. The organic layer was washed with an aqueous solution of HCl (1N), a saturated aqueous solution of Na₂CO₃ and water. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 95/5 to 50/50).

Method B: To a solution of **49** (150 mg, 0.45 mmol) in anhydrous DMF (2 mL), were added, under argon at 0°C, NaH (18 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq) and alkylating agents (0.54 mmol, 1.2 eq) dropwise. The solution was stirred 7h at room temperature, was then diluted with MeOH and evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in EtOAc and washed three times

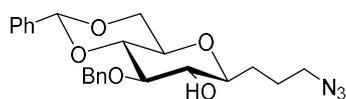
with a saturated solution of Na_2CO_3 and water. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 90/10 to 50/50).

Method C: To a solution of **49** (150 mg, 0.45 mmol) in dry acetonitrile (5 mL), were added under argon, Bu_2SnCl_2 (10 μL , 0.045 mmol, 0.1 equiv.), TBABr (14.5 mg, 0.045 mmol, 0.1 equiv.), K_2CO_3 (93 mg, 0.68 mmol, 1.5 equiv.) and BnBr (65 μL , 0.68 mmol, 1.2 equiv.). The solution was stirred for 72 h at 80 °C in a sealed tube. After evaporation under *vacuum*, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 95/5 to 50/50).

Method D: To a solution of compound **49** (150 mg, 0.45 mmol), in dry toluene (5 mL), was added under argon, dibutyltin oxide (130 mg, 0.68 mmol, 1.5 equiv.). The solution was stirred for 2h at 110°C with a Dean-Stark apparatus. After evaporation under *vacuum*, the product was diluted in 3 mL of dry DMF, then CsF (100 mg, 0.68 mmol, 1.5 equiv.) and alkylating agents (0.9 mmol, 2 eq) were added under argon at room temperature. The solution was then stirred for 48h at 90°C. After evaporation under *vacuum*, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc 95/5 to 50/50).

4,8-anhydro-1-azido-6-*O*-benzyl-1,2,3-trideoxy-7,9-*O*-phenylmethylene-D-glycero-D-gulo-nonitol **50**

Prepared according to the table 12 page 124.



Yield: cf Table 12, page 124 as a white gum

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$

M.W.: 425.49 g/mol

$R_f = 0.55$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

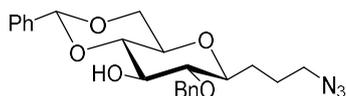
$[\alpha]_D = -19.9$ (c 0.1; CHCl_3)

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.48$ -1.57 (m, 1H, H3a), 1.62-1.73 (m, 1H, H2a), 1.77-1.87 (m, 1H, H2b), 1.91-1.99 (m, 1H, H3b), 3.29 (td, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, $J_{1,3a} = 1.5$ Hz, H1), 3.33-3.37 (m, 2H, H4, H5), 3.45 (ddd, 1H, $J_{8,9a} = 10.0$ Hz, $J_{8,7} = 9.5$ Hz, $J_{8,9b} = 5.0$ Hz, H8), 3.60 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0$ Hz, H6), 3.67 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.5$ Hz, H7), 3.72 (app t, 1H, $J_{9a,9b} = J_{9a,8} = 10.0$ Hz, H9a), 4.33 (dd, 1H, $J_{9b,9a} = 10.0$ Hz, $J_{9b,8} = 5.0$ Hz, H9b), 4.71 (d, 1H, J

= 11.5 Hz, CH₂Ph), 5.04 (d, 1H, J = 11.5 Hz, CH₂Ph), 5.58 (s, 1H, H₁₀), 7.35-7.40 (m, 8H, H_{Ar}), 7.49-7.52 (m, 2H, H_{Ar}). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 25.0 (C₂), 29.2 (C₃), 51.6 (C₁), 69.1 (C₉), 70.6 (C₈), 73.7 (C₅), 74.7 (CH₂Ph), 79.6 (C₄), 82.4 (C₇ or C₆), 82.4 (C₆ or C₇), 101.3 (C₁₀), 126.1 (2 C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.2 (2C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 128.7 (2 C_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 137.5 (C_{qAr}), 138.4 (C_{qAr}). **ESI-HRMS** [M+H]⁺ m/z = 426.2018 (calculated for C₂₃H₂₈N₃O₅: 426.2023). **IR** (cm⁻¹): ν = 3443, 2922, 2868, 2091, 1497, 1452, 1368, 1258, 1209, 1130, 1096, 1067, 1016.

4,8-anhydro-1-azido-5-*O*-benzyl-1,2,3-trideoxy-7,9-*O*-phenylmethylene-D-glycero-D-gulo-nonitol 51

Prepared according to the table 12 page 124.



Yield: cf Table 12, page 124 as a white gum

C₂₃H₂₇N₃O₅

M.W.: 425.49 g/mol

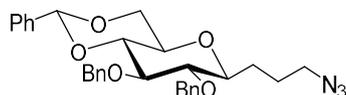
R_f = 0.53 (Cycl/EtOAc: 7/3)

$[\alpha]_D = -35.7$ (c 0.1; CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.45-1.54 (m, 1H, H_{3a}), 1.58-1.70 (m, 1H, H_{2b}), 1.70-1.81 (m, 1H, H_{2b}), 1.89-1.98 (m, 1H, H_{3b}), 3.23-3.30 (m, 3H, H₁ and H₅), 3.35-3.41 (m, 2H, H₈ and H₄), 3.46 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.0$ Hz, H₇), 3.67 (app t, 1H, $J_{9a,9b} = J_{9a,8} = 10.0$ Hz, H_{9a}), 3.93 (app t, 1H, $J_{6,5} = J_{6,7} = 9.0$ Hz, H₆), 4.31 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 5.0$ Hz, H_{9b}), 4.74 (d, 1H, J = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.95 (d, 1H, J = 11.0 Hz, CH₂Ph), 5.52 (s, 1H, H₁₀), 7.29-7.41 (m, 8H, H_{Ar}), 7.47-7.52 (m, 2H, H_{Ar}). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 25.1 (C₂), 29.2 (C₃), 51.6 (C₁), 69.0 (C₉), 70.0 (C₈), 75.2 (CH₂Ph), 76.0 (C₆), 79.1 (C₄), 81.5 (C₇ or C₅), 81.8 (C₇ or C₅), 102.0 (C₁₀), 126.4 (2 C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.3 (2 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 128.7 (2 C_{Ar}), 129.4 (C_{Ar}), 137.3 (C_{qAr}), 138.2 (C_{qAr}). **ESI-HRMS** [M+H]⁺ m/z = 426.2015 (calculated for C₂₃H₂₈N₃O₅: 426.2023). **IR** (cm⁻¹): ν = 3491, 2922, 2859, 2091, 1497, 1452, 1373, 1261, 1211, 1098, 1069, 1026.

4,8-anhydro-1-azido-5,6-di-*O*-benzyl-1,2,3-trideoxy-7,9-*O*-phenylmethylene-*D*-glycero-*D*-gulo-nonitol 52

Prepared according to the table 12 page 124.



Yield: cf Table 12, page 124 as a

white gum

C₃₀H₃₃N₃O₅

M.W.: 515.61 g/mol

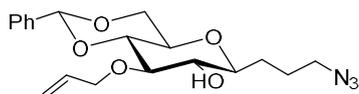
R_f = 0.69 (Cycl/EtOAc: 7/3)

[α]_D = -46.3 (c 0.1; CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.44-1.52 (m, 1H, H3a), 1.58-1.69 (m, 1H, H2b), 1.70-1.80 (m, 1H, H2b), 1.87-1.95 (m, 1H, H3b), 3.25 (t, 2H, J_{1,2} = 7.0 Hz, H1), 3.30 (app t, 1H, J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0 Hz, H5), 3.36-3.45 (m, 2H, H8 and H4), 3.67 (app t, 1H, J_{7,6} = 9.0 Hz, J_{7,8} = 8.5 Hz, H7), 3.70 (app t, 1H, J_{9a,9b} = J_{9a,8} = 10.5 Hz, H9a), 3.84 (dd, 1H, H6), 4.33 (dd, 1H, J_{9b,8} = 5.0 Hz, H9b), 4.65 (d, 1H, J = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.80 (d, 1H, J = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.96 (d, 1H, J = 11.0 Hz, CH₂Ph), 5.01 (d, 1H, J = 11.0 Hz, CH₂Ph), 5.59 (s, 1H, H10), 7.28-7.41 (m, 13H, H_{Ar}), 7.49-7.52 (m, 2H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 25.1 (C2), 29.2 (C3), 51.6 (C1), 69.1 (C9), 70.4 (C8), 75.2 (CH₂Ph), 75.6 (CH₂Ph), 79.5 (C4), 81.5 (C5), 82.7 (C7), 83.4 (C6), 101.3 (C10), 126.1 (2 C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.2 (2 C_{Ar}), 128.3 (2 C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 128.5 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 137.6 (C_{qAr}), 138.2 (C_{qAr}), 138.7 (C_{qAr}). **ESI-HRMS [M+H]⁺ m/z** = 516.2447 (calculated for C₃₀H₃₄N₃O₅: 516.2493). **IR (cm⁻¹):** ν = 2924, 2862, 2091, 1497, 1452, 1373, 1348, 1275, 1211, 1136, 1065, 1026.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-7,9-*O*-phenylmethylene-6-*O*-(2-propen-1-yl)-*D*-glycero-*D*-gulo-nonitol 60

Prepared according to the table 12 page 124.



Yield: 50% as a white solid

C₁₉H₂₅N₃O₅

M.W.: 375.43 g/mol

R_f = 0.50 (Cycl/EtOAc: 7/3)

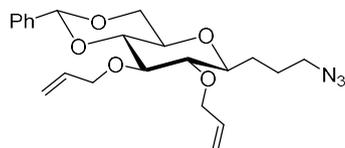
[α]_D = -27.6 (c 0.1; CHCl₃)

Mp = 50-52°C

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.49-1.58 (m, 1H, H3a), 1.64-1.74 (m, 1H, H2b), 1.76-1.90 (m, 1H, H2b), 1.94-2.02 (m, 1H, H3b), 3.25 (td, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, $J_{1,3a} = 1.5$ Hz, H1), 3.33-3.38 (m, 2H, H4 and H5), 3.43 (ddd, 1H, $J_{8,9b} = 5.0$ Hz, $J_{8,7} = 9.0$ Hz, $J_{8,9a} = 10.0$ Hz, H8), 3.52 (app t, 1H, $J_{6,7} = J_{6,5} = 9.0$ Hz, H6), 3.59 (app t, 1H, $J_{7,8} = J_{7,6} = 9.0$ Hz, H7), 3.70 (app t, 1H, $J_{9a,9b} = J_{9a,8} = 10.0$ Hz, H9a), 4.20 (app ddt, 1H, $J_{11a,11b} = 12.5$ Hz, $J_{11a,12} = 6.5$ Hz, $J_{11a,13a} = J_{11a,13b} = 1.5$ Hz, H11a), 4.31 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 5.0$ Hz, H9b), 4.50 (app ddt, 1H, $J_{11b,12} = 5.5$ Hz, $J_{11b,13a} = J_{11b,13b} = 1.5$ Hz, H11b), 5.20 (b dddd, $J_{13a,13b} = 2.5$ Hz, $J_{13a,12} = 10.5$ Hz, H13a), 5.29 (b dddd, $J_{13b,12} = 17.5$ Hz, H13b), 5.54 (s, 1H, H10), 5.90-6.00 (m, 1H, H12), 7.35-7.40 (m, 8H, H_{Ar}), 7.46-7.50 (m, 2H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 24.9 (C2), 29.2 (C3), 51.6 (C1), 69.0 (C9), 70.6 (C8), 73.6 (C11), 73.7 (C5), 79.6 (C4), 82.3 (C7 or C6), 82.3 (C7 or C6), 101.2 (C10), 117.6 (C13), 126.1 (2 C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 134.9 (C12), 137.5 (C_{qAr}). **ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 398.1700** (calculated for C₁₉H₂₅NaN₃O₅: 398.1686). **IR (cm⁻¹):** ν = 3337, 2961, 2914, 2859, 2091, 1726, 1452, 1385, 1360, 1346, 1277, 1254, 1130, 1092, 1058, 1018.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-7,9-*O*-phenylmethylene-5,6-di-*O*-(2-propen-1-yl)-D-glycero-D-gulo-nonitol 61

Prepared according to the table 12 page 124.



Yield: 21% as a white gum

C₂₂H₂₉N₃O₅

M.W.: 415.49 g/mol

$R_f = 0.66$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

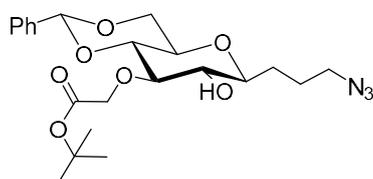
$[\alpha]_D = -41.1$ (c 0.1; CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.43-1.58 (m, 1H, H3a), 1.62-1.72 (m, 1H, H2a), 1.76-1.87 (m, 1H, H2b), 1.88-1.95 (m, 1H, H3b), 3.12 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0$ Hz, H5), 3.30 (t, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, H1), 3.30-3.39 (m, 2H, H4 and H8), 3.53 (app t, 1H, $J_{6,7} = J_{6,5} = 9.0$ Hz, H6), 3.62 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.0$ Hz, H7), 3.66 (app t, 1H, $J_{9a,9b} = 10.0$ Hz, H9a), 4.15 (app ddt, 1H, $J_{11a,11b} = 12.5$ Hz, $J_{11a,12} = 6.0$ Hz, $J_{11a,13a} = J_{11a,13b} = 1.5$ Hz, H11a), 4.23 (app ddt, 1H, $J_{11'a,11'b} = 12.5$ Hz, $J_{11'a,12'} = 6.0$ Hz, $J_{11'a,13'a} = J_{11'a,13'b} = 1.5$ Hz, H11'a), 4.30 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 5.0$ Hz, H9b), 4.38-4.45 (m, 2H, H11b and H11'b), 5.16 (b dddd, 2H, $J_{13a,13b} = 2.0$ Hz, $J_{13a,12} = 10.5$ Hz, H13a), 5.19 (b dddd, 2H, $J_{13'a,13'b} = 2.0$ Hz, $J_{13'a,12'} = 10.5$ Hz, H13a'), 5.28 (b dddd, 2H, $J_{13b,12}$ and $J_{13'b,12'} = 17.5$ Hz, H13b and H13'b), 5.53 (s, 1H H10), 5.83-6.00 (m, 2H, H12 and H12'), 7.34-7.40 (m, 3H, H_{Ar}), 7.46-7.50 (m, 2H, H_{Ar}). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 25.3 (C2),

29.3 (C3), 51.6 (C1), 69.1 (C9), 70.4 (C8), 74.0 (C11), 74.6 (C11'), 79.6 (C4), 81.6 (C5), 82.4 (C6 or C7), 83.0 (C7 or C6), 101.2 (C10), 116.9 (C13), 117.4 (C13'), 126.1 (2 C_{Ar}), 128.4 (2 C_{Ar}), 129.0 (C_{Ar}), 134.9 (C12), 135.3 (C12'), 137.6 (C_{qAr}). **ESI-HRMS** [M+H]⁺ m/z = 416.2170 (calculated for C₂₂H₃₀N₃O₅: 416.2180). **IR** (cm⁻¹): ν = 3075, 2922, 2868, 2091, 1734, 1647, 1452, 1369, 1275, 1258, 1171, 1098, 1074, 1028.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-6-O-[2-(1,1-dimethylethoxy)-2-oxoethyl]-7,9-O-phenylmethylene-D-glycero-D-gulo-Nonitol 63

Preparing according to the table 12 page 124.



Yield: 32% as a colorless oil

C₂₂H₃₁N₃O₇

M.W.: 449.50 g/mol

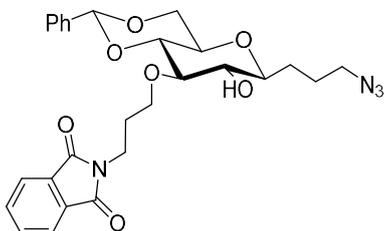
R_f = 0.41 (Cycl/EtOAc: 7/3)

[α]_D = -39.5 (c 0.1; CHCl₃)

¹H NMR ((CD₃)₂CO, 400 MHz): δ 1.43 (s, 9H, CH₃), 1.52-1.65 (m, 1H, H3a), 1.66-1.94 (m, 1H, H2a, H2b and H3b), 2.82 (bs, 1H, H_{OH}), 3.42 (t, 2H, J_{1,2} = 6.5 Hz, H1), 3.53-3.63 (m, 1H, H8), 3.65-3.85 (m, 3H, H4, H7 and H9a), 3.97 (app t, 1H, J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0 Hz, H5), 4.17 (app t, 1H, J_{6,7} = 9.0 Hz, H6), 4.30 (dd, 1H, J_{9b,9a} = 10.0 Hz, J_{9b,8} = 4.5 Hz, H9b), 4.41 (d, 1H, J_{CH2} = 17.5 Hz, H11a), 4.56 (d, 1H, H11b), 5.67 (s, 1H, H10), 7.35-7.41 (m, 3H, H_{Ar}), 7.44-7.52 (m, 2H, H_{Ar}). **¹³C NMR** ((CD₃)₂CO, 400 MHz): δ 25.2 (C2), 28.6 (C3 and 3 CH₃), 51.9 (C1), 66.1 (C11), 69.1 (C9), 71.6 (C8), 75.8 (C5), 77.7 (C4), 79.4 (C7), 79.9 (C6), 82.5 (C_{qtBu}), 102.1 (C10), 127.2 (2 C_{Ar}), 128.9 (2 C_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}), 138.7 (C_{qAr}), 166.4 (C=O). **ESI-HRMS** [M+Na]⁺ m/z = 472.2047 (calculated for C₂₂H₃₁NaN₃O₇: 472.2060). **IR** (cm⁻¹): ν = 3410, 2926, 2870, 2093, 1751, 1452, 1379, 1281, 1231, 1130, 1099, 1063, 1013.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-6-O-[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-7,9-O-phenylmethylene-D-glycero-D-gulo-nonitol 64

Prepared according to the table 12 page 124.



Yield: 31% as white solid

$C_{27}H_{30}N_4O_7$

M.W.: 522.56 g/mol

$R_f = 0.27$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

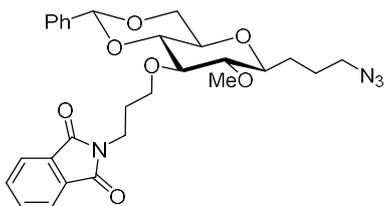
$[\alpha]_D = -58.7$ (c 0.1; $CHCl_3$)

Mp = 50-52°C

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.50-1.60 (m, 1H, H3a), 1.64-1.75 (m, 1H, H2a), 1.77-2.08 (m, 4H, H2b, H12 and H3b), 3.30 (td, 2H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, $J_{1,3a} = 2.5$ Hz, H1), 3.32-3.42 (m, 4H, H5, H8, H4 and H6), 3.47-3.54 (m, 1H, H11a), 3.54 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.0$ Hz, H7), 3.68 (app t, 1H, $J_{9a,9b} = J_{9a,8} = 10.5$ Hz, H9a), 3.74 (dt, 1H, $J_{13a,13b} = 14.0$ Hz, $J_{13a,12} = 5.0$ Hz, H13a), 3.98-4.08 (m, 2H, H11b and H13b), 4.29 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 4.5$ Hz, H9b), 5.52 (s, 1H, H10), 7.29-7.35 (m, 3H, H_{Ar}), 7.40-7.43 (m, 2H, H_{Ar}), 7.67-7.72 (m, 2H, H_{Ar}), 7.80-7.85 (m, 2H, H_{Ar}). **^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 25.0 (C2), 29.1 (C12), 29.2 (C3), 34.6 (C13), 51.6 (C1), 68.7 (C11), 69.0 (C9), 70.5 (C8), 73.6 (C5), 79.9 (C4), 82.4 (C7), 83.0 (C6), 101.1 (C10), 123.4 (2 C_{Ar}), 126.0 (2 C_{Ar}), 128.3 (2 C_{Ar}), 129.0 (C_{Ar}), 132.1 (2 C_{qAr}), 134.2 (2 C_{Ar}), 137.5 (C_{qAr}), 169.0 (2 C=O). **ESI-HRMS** $[M+H]^+$ $m/z = 523.2187$ (calculated for $C_{27}H_{31}N_4O_7$: 523.2187). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 3505, 2924, 2868, 2093, 1769, 1701, 1466, 1439, 1395, 1369, 1265, 1171, 1126, 1099, 1069, 1018$.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-6-O-[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-5-O-methyl-7,9-O-phenylmethylene-D-glycero-D-gulo-nonitol 65

To a solution of **64** (300 mg, 0.576 mmol) in DMF (6 mL), were added dropwise, under argon at 0°C, NaH (60% w/w) (60 mg, 1.04 mmol, 1.8 equiv.) and CH₃I (1.20 mL, 1.728 mmol, 30 equiv.). The solution was stirred for 1h at room temperature, was then diluted with MeOH and evaporated under *vacuum*. The residue was diluted in EtOAc and washed with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ and with water. The solution was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc: 95/5 to 60/40) to give **65**.



Yield: 56% as white gum

$C_{29}H_{32}N_4O_7$

M.W.: 536.59 g/mol

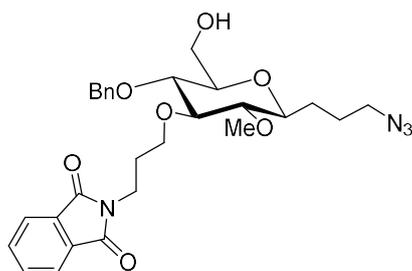
$R_f = 0.35$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

$[\alpha]_D = -45.7$ (c 0.1; $CHCl_3$)

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.44$ -1.51 (m, 1H, H3a), 1.59-1.68 (m, 1H, H2a), 1.73-1.90 (m, 2H, H3b and H2b), 1.94-2.03 (m, 2H, H12), 2.78 (bt, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 3.23 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.5$ Hz, $J_{4,3b} = 2.0$ Hz, H4), 3.29 (t, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, H1), 3.29-3.34 (m, 1H, H8), 3.44-3.50 (m, 2H, H6 and H7), 3.57 (s, 3H, CH_3), 3.65 (app t, 1H, $J_{9a,9b} = J_{9a,8} = 10.0$ Hz, H9a), 3.72 (ddd, 1H, $J_{11a,11b} = 12.0$ Hz, $J_{11a,12a} = 9.5$ Hz, $J_{11a,12b} = 5.5$ Hz, H11a), 3.79-3.86 (m, 2H, H13), 4.02 (ddd, 1H, $J_{11b,12a} = 7.0$ Hz, $J_{11b,12b} = 5.5$ Hz, H11b), 4.28 (dd, 1H, $J_{9b,8} = 4.5$ Hz, H9b), 5.53 (s, 1H, H10), 7.28-7.33 (m, 3H, H_{Ar}), 7.41-7.45 (m, 2H, H_{Ar}), 7.64-7.69 (m, 2H, H_{Ar}), 7.76-7.80 (m, 2H, H_{Ar}). **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz):** δ 25.3 (C2), 29.2 (C3 or C12), 29.4 (C12 or C3), 35.8 (C13), 51.6 (C1), 61.5 (C_{CH_3}), 69.1 (C9), 70.2 (C8), 70.3 (C11), 79.5 (C4), 82.5 (C6 or C7), 83.6 (C5 and C6 or C7), 101.0 (C10), 123.2 (2 C_{Ar}), 126.0 (2 C_{Ar}), 128.3 (2 C_{Ar}), 128.9 (C_{qAr}), 132.4 (2 C_{qAr}), 133.9 (2 C_{Ar}), 137.6 (C_{qAr}), 168.5 (2C=O). **ESI-HRMS** $[M+Na]^+$ $m/z = 559.2215$ (calculated for $C_{28}H_{32}N_4NaO_7$: 559.2169). **IR (cm^{-1}):** $\nu = 2924, 2866, 2093, 1769, 1703, 1466, 1449, 1391, 1368, 1342, 1312, 1260, 1142, 1123, 1103, 1013$.

4,8-anhydro-1-azido-7-O-benzyl-1,2,3-trideoxy-6-O-[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-5-O-methyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 66

To a solution of **65** (50 mg, 0.093 mmol) in dry CH_2Cl_2 (1 mL), were added dropwise, under argon at room temperature, $BH_3 \cdot THF$ (1M) (95 μL , 0.93 mmol, 1 equiv.) and TMSOTf (5 μL , 0.028 mmol, 0.3 equiv.). The solution was stirred for 20 minutes at room temperature, then 0.1 mL of Et_3N was added followed by careful addition of MeOH (1 mL). The solution was concentrated and the crude product was co-evaporated with MeOH. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc: 90/10 to 40/60) to give **66** and **67**.



Yield: 42% as a white gum

$C_{28}H_{34}N_4O_7$

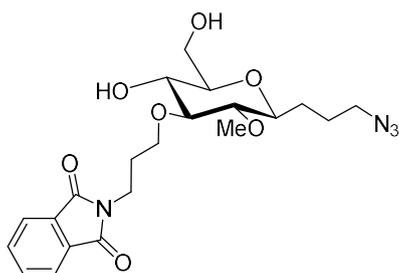
M.W.: 538.60 g/mol

$R_f = 0.51$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

$[\alpha]_D = -9.9$ (c 0.1; $CHCl_3$)

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.42$ -1.52 (m, 1H, H3a), 1.60-1.70 (m, 1H, H2a), 1.76-1.91 (m, 2H, H3b and H2b), 2.01 (app qt, 2H, $J_{12,11} = J_{12,13} = 7.0$ Hz, H12), 2.79 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.5$ Hz, H5), 3.14 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.5$ Hz, $J_{4,3b} = 2.0$ Hz, H4), 3.19-3.24 (m, 1H, H8), 3.30 (t, 2H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H1), 3.33-3.37 (m, 2H, H6 and H7), 3.56 (s, 3H, CH_3), 3.61 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 12.0$ Hz, $J_{9a,8} = 4.5$ Hz, H9a), 3.76-3.83 (m, 3H, H13 and H9b), 3.89 (bt, 2H, H11), 4.61 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH_2Ph), 4.82 (d, 1H, CH_2Ph), 7.23-7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 7.29-7.33 (m, 4H, H_{Ar}), 7.69-7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 7.81-7.86 (m, 2H, H_{Ar}). **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz):** $\delta = 25.3$ (C2), 29.1 (C3), 29.8 (C12), 35.9 (C13), 51.6 (C1), 61.1 (CH_3), 62.4 (C9), 71.1 (C11), 75.0 (CH_2Ph), 78.2 (C6), 78.8 (C4), 79.0 (C8), 84.4 (C5), 87.2 (C7), 123.3 (2 C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.1 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 132.3 (2 C_{qAr}), 134.1 (2 C_{Ar}), 138.2 (C_{qAr}), 168.5 (2 $C=O$). **ESI-HRMS** $[M+Na]^+$ $m/z = 561.2341$ (calculated for $C_{28}H_{34}N_4NaO_7$: 561.2320). **IR (cm^{-1}):** $\nu = 3364, 2914, 2870, 2091, 1767, 1703, 1464, 1449, 1402, 1373, 1261, 1144, 1119, 1069, 1028$.

4,8-anhydro-1-azido-1,2,3-trideoxy-6-*O*-[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2yl)propyl]-5-*O*-methyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 67



Yield: 40% as a colorless oil

$C_{21}H_{28}N_4O_7$

M.W.: 448.48 g/mol

$R_f = 0.22$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

$[\alpha]_D = +2.0$ (c 0.1; $CHCl_3$)

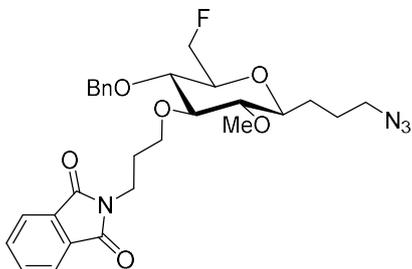
1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.41$ -1.50 (m, 1H, H3a), 1.60-1.70 (m, 1H, H2a), 1.76-1.90 (m, 2H, H2b and H3b), 1.90-2.06 (m, 2H, H11), 2.76 (app t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 9.0$ Hz, H5), 3.16 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.0$ Hz, $J_{4,3b} = 2.5$ Hz, H4), 3.18 (app t, 1H, $J_{6,7} = 9.0$ Hz, H6), 3.25-3.30 (ddd, 1H, $J_{8,7} = 9.0$ Hz, $J_{8,9a} = 5.0$ Hz, $J_{8,9b} = 3.5$ Hz, H8), 3.30 (t, 2H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, H1), 3.44 (app t, 1H, H7), 3.50 (s, 3H, CH_3), 3.64 (app td, 1H, $J_{12a,12b} = J_{12a,11a} = 10.0$ Hz, $J_{12a,11b} = 3.0$ Hz, H12a), 3.71-3.79 (m, 2H, H9a and H12b), 3.87-3.93 (m, 2H, H9b and H10a), 4.04 (ddd,

^1H , $J_{10b,10a} = 13.5$ Hz, $J_{10b,11a} = 9.0$ Hz, $J_{10b,11b} = 4.5$ Hz, H10b), 7.71-7.74 (m, 2H, H_{Ar}), 7.83-7.86 (m, 2H, H_{Ar}). ^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): $\delta = 25.3$ (C2), 28.9 (C3), 29.8 (C11), 35.0 (C10), 51.6 (C1), 60.9 (CH₃), 63.4 (C9), 69.5 (C12), 71.2 (C7), 78.8 (C4), 78.9 (C8), 84.6 (C5), 86.8 (C6), 123.6 (2 C_{Ar}), 132.1 (2 C_{qAr}), 134.3 (2 C_{Ar}), 169.2 (2 C=O). ESI-HRMS [M+Na]⁺ $m/z = 471.1869$ (calculated for C₂₁H₂₈N₄NaO₇: 471.1850). IR (cm⁻¹): $\nu = 3458, 2924, 2870, 2091, 1769, 1701, 1466, 1439, 1395, 1369, 1256, 1188, 1134, 1088, 1040$.

II.2.3.3) Preparation of non-radioactive references

4,8-anhydro-1-azido-9-fluoro-7-*O*-benzyl-1,2,3,9-tetra-deoxy-6-*O*-[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2yl)propyl]-5-*O*-methyl-7,9-*O*-phenylmethylene-*D*-glycero-*D*-gulonitol **68**

To a solution of **66** (100 mg, 0.18 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added DAST (Diethyl-Amino-Sulfur Trifluoride) (34 μL , 0.26 mmol, 1.4 equiv) under argon at 0°C. The mixture was stirred 30 min at 0°C and 1h at rt, the mixture was then diluted with CH₂Cl₂ and hydrolyzed with water. The organic layer was washed with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ and with brine, then dried with MgSO₄ and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/EtOAc: 100/0 to 50/50) to give **68**.



Yield: 30% as a colorless oil

C₂₈H₃₃FN₄O₆

M.W.: 540.59 g/mol

$R_f = 0.41$ (Cycl/EtOAc: 7/3)

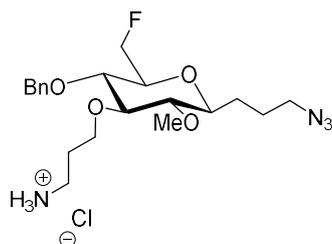
$[\alpha]_D = -19.8$ (c 0.1; CHCl₃)

^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.43$ -1.54 (m, 1H, H3a), 1.60-1.71 (m, 1H, H2a), 1.78-1.91 (m, 2H, H3b and H2b), 2.02 (app qt, 2H, $J_{11,10} = J_{11,12} = 7.0$ Hz, H11), 2.81 (app t, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.0$ Hz, H5), 3.11 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.0$ Hz, $J_{4,3b} = 2.0$ Hz, H4), 3.23-3.35 (m, 4H, H8, H1, H6), 3.36 (app t, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.0$ Hz, H7), 3.56 (s, 3H, CH₃), 3.77-3.85 (m, 2H, H12), 3.89 (t, 2H, H10), 4.50 (ddd, 1H, $J_{H9a,F} = 47.5$ Hz, $J_{9a,9b} = 10.0$ Hz, $J_{9a,8} = 3.5$ Hz, H9a), 4.55 (ddd, 1H, $J_{9b,8} = 1.5$ Hz, H9b), 4.57 (d, 1H, $J_{\text{CH}_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.83 (d, 1H, CH₂Ph), 7.23-7.35 (m, 5H, H_{Ar}), 7.68-7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 7.81-7.86 (m, 2H, H_{Ar}). ^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): $\delta = 25.3$ (C2), 28.9 (C3), 29.8 (C11), 35.8 (C10), 51.6 (C1), 61.2 (CH₃), 71.2 (C12), 75.1 (CH₂Ph), 77.3 (C7, $J_{C,F} = 6$ Hz), 77.9 (C8, $J_{C,F} = 18$ Hz), 79.1 (C4), 82.2 (C9, $J_{C,F} = 173.0$ Hz), 84.3 (C5), 87.3 (C6), 123.3 (2 C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.0 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 132.3

(2 C_{qAr}), 134.1 (2 C_{Ar}), 138.0 (C_{qAr}), 168.5 (C=O). **HRMS** [M+Na]⁺ m/z = 563.2269 (calculated for C₂₈H₃₃FN₄O₆: 563.2282). **IR** (cm⁻¹): ν = 2924, 2855, 2093, 1771, 1709, 1466, 1447, 1395, 1369, 1260.

4,8-anhydro-1-azido-9-fluoro-7-O-benzyl-1,2,3-tetraoxy-6-O-[3-amino-propyl]-5-O-methyl-D-glycero-D-gulo-nonitol 69

To a solution of **68** (80 mg, 0.15 mmol) in dry methanol (1.5 mL), was added dropwise under argon at room temperature hydrazine monohydrate (23 μL, 0.75 mmol, 5 eq). The mixture was stirred at 40°C for 8h, then the solution was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in methanol and evaporated under *vacuum* the process was repeated twice. Then the crude product was solubilized in dichloromethane, the organic layer was washed with an aqueous solution of HCl 1N (pH = 3) two times to form an ammonium salt. The combined aqueous layer after extraction with dichloromethane, was freeze-dried. The compound **69** was obtained without further purification.



Yield: quantitative as a yellow gum

C₂₀H₃₂ClFN₄O₄

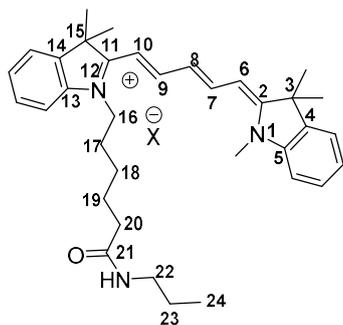
M.W.: 446.95 g/mol

R_f = 0.28 (DCM/MeOH: 85/15)

ESI-HRMS [M+Na]⁺ m/z = 411.2444 (calculated for C₂₀H₃₂FN₄O₄: 411.2402).

3H-Indolium, 2-[5-(1,3-dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)-1,3-pentadien-1-yl]-3,3-dimethyl-1-[6-oxo-6-(propylamino)hexyl]-inner salt 70

To a solution of **38** (100 mg 0.16 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) were added dropwise under argon at 0°C, TEA (67 μL, 0.48 mmol, 3.0 equiv.) and IBCF (22 μL, 0.17 mmol, 1.1 equiv.). The solution was stirred at 0°C for 1h. Ethanolamine (22 μL, 0.37 mmol, 2.3 equiv) was then added dropwise under argon at 0°C. The solution was stirred at room temperature overnight. The crude product was evaporated under *vacuum* and purified on on flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 80/20) to give **70**.



Yield: 30% as a dark blue powder

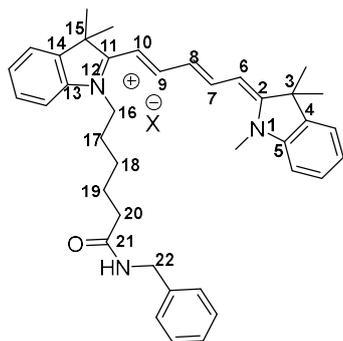
$C_{35}H_{46}N_3O^+$

M.W.: 524.77 g/mol

1H NMR ($(CD_3)_2SO$, 400 MHz) : δ = 0.89 (t, 3H, $J_{24,23}$ = 7.5 Hz, H24), 1.50-1.62 (m, 4H, H18 and H23), 1.71 (s, 6H, 2 CH₃), 1.72 (s, 6H, 2 CH₃), 1.72-1.79 (m, 2H, H19), 1.85 (bqt, 2H, $J_{17,18}$ = $J_{17,16}$ = 7.0 Hz, H17), 2.36 (t, 2H, $J_{20,19}$ = 7.0 Hz, H20), 3.18 (app q, 2H, $J_{22,23}$ = $J_{22,NH}$ = 6.0 Hz, H22), 3.65 (s, 3H, N-CH₃), 4.05-4.15 (m, 2H, H16), 6.40 (d, 1H, J = 13.5 Hz, H10 or H6), 6.51 (d, 1H, J = 13.5 Hz, H10 or H6), 6.74 (app bt, NH), 6.88 (app bt, 1H, $J_{8,9}$ = $J_{8,7}$ = 13.0 Hz, H8), 7.05-7.13 (m, 2H, H_{Ar}), 7.17-7.25 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30-7.40 (m, 4H, H_{Ar}), 7.92 (app t, 1H, H7 or H9), 7.94 (app t, 1H, H9 or H7). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz): δ = 11.5 (C24), 22.7 (C23), 25.3 (C19), 26.5 (C18), 27.1 (C17), 28.0 (2 CH₃), 28.0 (2 CH₃), 31.3 (N-CH₃), 36.2 (C20), 41.2 (C22), 44.4 (C16), 49.2 (C3 or C15), 49.4 (C15 or C3), 103.7 (C6 or C10), 104.2 (C10 or C6), 110.3 (C_{Ar}), 110.8 (C_{Ar}), 122.1 (C_{Ar}), 122.2 (C_{Ar}), 125.0 (C_{Ar}), 125.4 (C_{Ar}), 126.7 (C8), 128.7 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 140.8 (C_{qAr}), 140.9 (C_{qAr}), 141.9 (C_{qAr}), 142.8 (C_{qAr}), 152.9 (C9 or C7), 153.4 (C7 or C9), 172.9 (C11), 173.2 (C2), 173.4 (C21). ESI-HRMS [M]⁺ m/z = 524.3708 (calculated for $C_{35}H_{46}N_3O^+$: 524.3635). IR (cm^{-1}): ν = 2923, 2851, 2117, 1644, 1478, 1445, 1364, 1334, 1218, 1172, 1138, 1071, 1035, 1006.

3H-Indolium, 2-[5-(1,3-dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)-1,3-pentadien-1-yl]-3,3-dimethyl-1-[6-oxo-6-(benzylamino)hexyl]-inner salt, 71

To a solution of **38** (100 mg, 0.18 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added diisopropylcarbodiimide (DIC, 41 μ L, 0.26 mmol, 1.5 eq) and was stirred for 5 min. A solution of benzylamine (38 μ L, 0.36 mmol, 2 eq) in chloroform (1.5 mL) was then added. The solution was stirred for 16 hours. Then the mixture was evaporated under *vacuum*. The crude product was purified on flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 80/20) to give **71**.



Yield: 72% as a dark blue powder

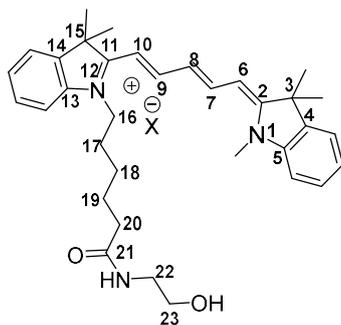
$C_{39}H_{46}N_3O^+$

M.W.: 572.82 g/mol

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.51 (bqt, 2H, $J_{18,17} = J_{18,19} = 7.0$ Hz, H18), 1.68 (s, 6H, 2 CH₃), 1.69 (s, 6H, 2 CH₃), 1.70-1.84 (m, 4H, H19 and H17), 2.32 (t, 2H, $J_{20,19} = 7.5$ Hz, H20), 3.56 (s, 3H, N-CH₃), 3.97 (t, 2H, $J_{16,17} = 7.5$ Hz, H16), 4.40 (d, 2H, $J_{CH_2,NH} = 6.0$ Hz, H22), 6.22 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H6 or H10), 6.27 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H10 or H6), 6.78 (app t, 1H, $J_{8,7} = J_{8,9} = 13.0$ Hz, H8), 7.05-7.11 (m, 2H, H_{Ar}), 7.16-7.39 (m, 11H, H_{Ar}), 7.87 (app t, 1H, $J = 13.0$ Hz, H7 or H9), 7.87 (app t, 1H, $J = 13.0$ Hz, H7 or H9). **^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ 25.3 (C19), 26.6 (C18), 27.2 (C17), 28.1 (2 CH₃), 28.2 (2 CH₃), 31.4 (N-CH₃), 36.2 (C20), 43.4 (C22), 44.5 (C16), 49.2 (C3 or C15), 49.5 (C3 or C15), 103.9 (C6 or C10), 104.3 (C10 or C6), 110.4 (C_{Ar}), 110.9 (C_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 125.2 (C_{Ar}), 125.5 (C_{Ar}), 127.1 (C8), 128.0 (2C_{Ar}), 128.5 (2C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 129.0 (C_{Ar}), 139.2 (C_{qAr}), 140.9 (C_{qAr}), 141.2 (C_{qAr}), 142.1 (C_{qAr}), 142.9 (C_{qAr}), 153.1 (C7 or C9), 153.5 (C9 or C7), 173.1 (C11), 173.2 (C2), 173.4 (C21). **ESI-HRMS [M]⁺ m/z** = 572.3644 (calculated for C₃₉H₄₆N₃O₁: 572.3635). **IR (cm⁻¹):** ν = 3312, 2921, 2854, 2108, 1649, 1474, 1446, 1361, 1333, 1212.

3H-Indolium, 2-[5-(1,3-dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)-1,3-pentadien-1-yl]-3,3-dimethyl-1-[6-oxo-6-((2-hydroxyethyl)amino)hexyl]-inner salt 72

To a solution of **38** (100 mg 0.16 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) were added dropwise under argon at 0°C, TEA (67 μ L, 0.48 mmol, 3.0 equiv.) and IBCF (22 μ L, 0.17 mmol, 1.1 equiv.). The solution was stirred at 0°C for 1h. Ethanamine (22 μ L, 0.37 mmol, 2.3 equiv) was then added dropwise under argon at 0°C. The solution was stirred at room temperature overnight. The crude product was evaporated under *vacuum* and purified on Chromatotron (eluent DCM/MeOH: 100/0 to 97/3) to give **72**.



Yield: 29% as a dark blue powder

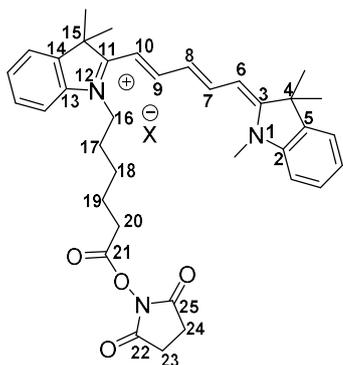
$C_{34}H_{44}N_3O_2^+$

M.W.: 526.74 g/mol

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.55 (bqt, 2H, $J_{18,17} = J_{18,19} = 7.0$ Hz, H18), 1.70 (s, 6H, 2 CH₃), 1.70 (s, 6H, 2 CH₃), 1.78 (bqt, 2H, $J_{19,18} = J_{19,20} = 7.0$ Hz, H19), 1.85 (bqt, 2H, $J_{17,18} = J_{17,16} = 7.0$ Hz, H17), 2.40 (t, 2H, H20), 3.37-3.43 (app q, 2H, $J_{22,23} = J_{22,NH} = 5.0$ Hz, H22), 3.62 (s, 3H, N-CH₃), 3.72 (t, 2H, H23), 4.07 (t, 2H, H16), 6.36 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H6 or H10), 6.43 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H10 or H6), 7.00 (app bt, 1H, $J_{8,9} = J_{8,7} = 13.0$ Hz, H8), 7.08 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{Ar}), 7.12 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{Ar}), 7.18-7.25 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33-7.40 (m, 4H, H_{Ar}), 7.56 (bt, 1H, $J = 5.0$ Hz, NH), 7.85 (app t, 1H, H7 or H9), 7.86 (app t, 1H, H9 or H7). **^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 25.2 (C19), 26.3 (C18), 27.1 (C17), 28.1 (2 CH₃), 28.1 (2 CH₃), 31.7 (N-CH₃), 36.1 (C20), 42.9 (C22), 44.5 (C16), 49.0 (C3), 49.4 (C15), 62.1 (C23), 103.9 (C6 or C10), 104.5 (C10 or C6), 110.3 (C_{Ar}), 110.9 (C_{Ar}), 122.1 (C_{Ar}), 122.2 (C_{Ar}), 125.0 (C_{Ar}), 125.4 (C_{Ar}), 126.7 (C8), 128.7 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 140.7 (C_{qAr}), 141.1 (C_{qAr}), 141.9 (C_{qAr}), 142.8 (C_{qAr}), 152.6 (C9 or C7), 153.2 (C7 or C9), 172.7 (C11), 173.1 (C2), 174.7 (C21). **ESI-HRMS [M]⁺** $m/z = 526.3439$ (calculated for $C_{34}H_{44}N_3O_2^+$: 526.3428). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 3316, 2926, 2859, 2112, 1647, 1477, 1445, 1366, 1329, 1215, 1169, 1140, 1069, 1036, 1005$.

3H-Indolium, 2-[5-(1,3-dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)-1,3-pentadien-1-yl]-1-[6-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyloxy]-6-oxohexyl]-3,3-dimethyl-inner salt 73

To a solution of compound **38** (150 mg, 0.27 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (50 mL), were added under argon, DCC (62 mg, 0.3 mmol, 1.1 eq) and NHS (33 mg, 0.3 mmol, 1.1 eq). The solution was stirred 13h at room temperature. The solution was washed with ACN and filtrated to remove DCU. The filtrate was evaporated under *vacuum* to give a precipitate. Then the precipitate was washed ACN (2 x 25 mL) and evaporated under *vacuum*. The product was dried under *vacuum* to afford **73**.



Yield: quantitative as a dark blue solid

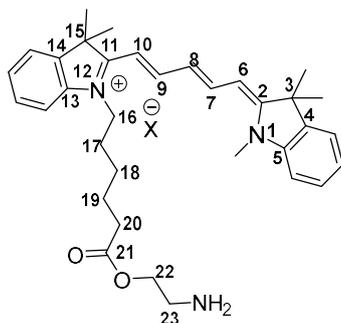
$C_{36}H_{42}N_3O_4^+$

M.W.: 580.75 g/mol

1H NMR ($(CD_3)_2SO$, 400 MHz): δ = 1.45-1.63 (m, 2H, H18), 1.61-1.84 (m, 16H, 4 CH_3 , H19 and H17), 2.68 (t, 2H, $J_{20,19} = 7.0$ Hz, H20), 2.82 (s, 4H, H23 and H24), 3.61 (s, 3H, N-Me), 4.09 (t, 2H, $J_{16,17} = 7.0$ Hz, H16), 6.27 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, H6 or H10), 6.30 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, H6 or H10), 6.58 (app t, 1H, $J_{8,9} = J_{8,7} = 12.5$ Hz, H8), 7.21-7.27 (m, 2H, H_{Ar}), 7.35-7.42 (m, 4H, H_{Ar}), 7.61 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 8.34 (app t, 2H, H7 and H9). **^{13}C NMR** ($(CD_3)_2SO$, 100.6 MHz): δ = 24.9 (C19), 25.1 (C18), 25.4 (C23 and C24), 26.4 (C17), 27.0 (2 CH_3), 27.1 (2 CH_3), 30.0 (C20), 31.1 (N- CH_3), 43.2 (C3), 47.5 (C13), 48.8 (C16), 103.0 (C6 or C10), 103.3 (C6 or C10), 111.0 (C_{Ar}), 111.0 (C_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 122.4 (C_{Ar}), 124.6 (C_{Ar}), 124.7 (C_{Ar}), 125.4 (C8), 128.3 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 141.0 (C_{qAr}), 141.1 (C_{qAr}), 142.0 (C_{qAr}), 142.7 (C_{qAr}), 154.0 (C9 and C7), 168.8 (C21), 170.0 (C22 or C25), 170.7 (C22 or C25), 172.5 (C11), 173.3 (C2). **ESI-HRMS** $[M]^+$ $m/z = 580.3155$ (calculated for $C_{36}H_{42}N_3O_4$: 580.3170). **IR** (cm^{-1}): $\nu = 3659, 2988, 2901, 2118, 1809, 1778, 1732, 1495, 1479, 1454, 1435, 1368, 1331, 1211, 1144, 1067, 1038, 1015$.

3H-Indolium, 2-[5-(1,3-dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)-1,3-pentadien-1-yl]-3,3-dimethyl-1-[6-oxo-6-(2-aminohexylether)hexyl]-inner salt 74

To a solution of compound **73** (100 mg, 0.15 mmol) in anhydrous DMF (2 mL), was added under argon, ethanolamine (10 μL , 0.17 mmol, 1.1 eq). The solution was stirred 13h at room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: DCM/MeOH 95/05 to 90/10) to give **74**.



Yield: 14% as a dark blue powder

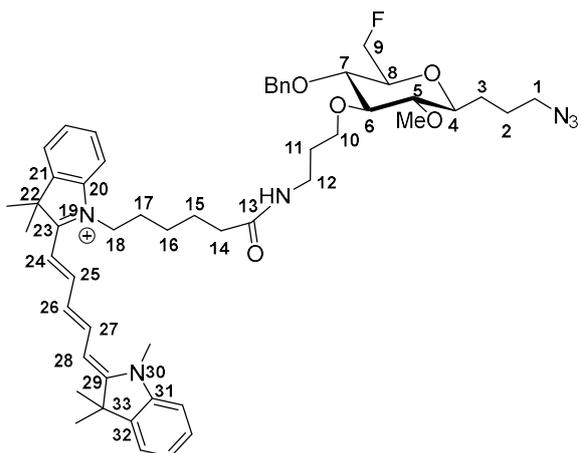
$C_{34}H_{44}N_3O_2^+$

M.W.: 526.74 g/mol

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.55 (bqt, 2H, $J_{18,17} = J_{18,19} = 7.0$ Hz, H18), 1.69 (s, 6H, 2 CH₃), 1.69 (s, 6H, 2 CH₃), 1.81 (bqt, 2H, $J_{19,18} = J_{19,20} = 7.0$ Hz, H19), 1.81-1.91 (m, 2H, H17), 2.41 (t, 2H, H20), 3.38-3.44 (m, 2H, H22), 3.60 (s, 3H, N-CH₃), 3.72-3.77 (m, 2H, H23), 4.11 (bt, 2H, $J_{16,17} = 6.5$ Hz, H16), 6.36 (d, 1H, $J = 13.5$ Hz, H10 or H6), 6.58 (d, 1H, $J = 13.5$ Hz, H10 or H6), 7.00 (app bt, 1H, $J_{8,9} = J_{8,7} = 12.5$ Hz, H8), 7.07 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.13 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.18-7.26 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30-7.42 (m, 4H, H_{Ar}), 7.81 (app t, 1H, H7 ou H9), 7.84 (app t, 1H, H7 or H9). **^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** δ = 25.2 (C19), 26.3 (C18), 27.1 (C17), 28.2 (4 CH₃), 31.6 (N-Me), 36.2 (C20), 43.3 (C22), 44.7 (C16), 49.0 (C3), 49.5 (C15), 61.9 (C23), 104.0 (C6 or C10), 105.1 (C6 or C10), 110.3 (C_{Ar}), 111.2 (C_{Ar}), 122.2 (C_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 125.0 (C_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 127.0 (C8), 128.8 (C_{Ar}), 129.0 (C_{Ar}), 140.8 (C_{qAr}), 141.2 (C_{qAr}), 142.0 (C_{qAr}), 143.0 (C_{qAr}), 152.6 (C9 or C7), 153.4 (C9 or C7), 172.6 (C11), 173.4 (C2), 174.6 (C21). **ESI-HRMS** [M]⁺ m/z = 526.3439 (calculated for C₃₄H₄₄N₃O₂: 526.3428). **IR (cm⁻¹):** ν = 3684, 2970, 2901, 1942, 1734, 1717, 1645, 1477, 1452, 1406, 1395, 1379, 1331, 1250, 1229, 1167, 1138, 1057.

Compound 75

To a solution of **38** (48 mg, 0.12 mmol) solubilized in CH₂Cl₂ (4 mL) was added diisopropylcarbodiimide (DIC, 28 μ L, 0.18 mmol, 1.5 eq). The solution was stirred for 5 min at rt, then a solution of **69** (74 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in chloroform (1.5 mL) was added. The mixture was stirred for 16 hours at rt. The solution was evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/01 to 97/03) twice then by LH20 (eluant) to give **75**.



Yield: 21% as a blue solid

$C_{52}H_{68}FN_6O_5^+$

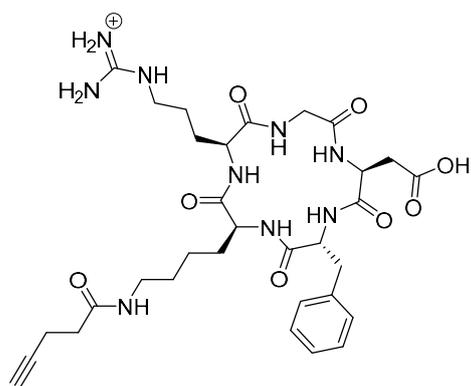
M.W.: 875.53 g/mol

$R_f = 0.44$ (DCM/MeOH: 97/3)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.46$ -1.57 (m, 3H, H16 and H3a), 1.60-1.72 (m, 1H, H2a), 1.69 (s, 6H, 2 CH₃), 1.70 (s, 6H, 2 CH₃), 1.70-1.74 (m, 3H, H15 and H3b), 1.77-1.89 (m, 5H, H17, H11 and H2b), 2.37 (t, 2H, $J_{20,19} = 7.0$ Hz, H14), 2.84 (app t, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.0$ Hz, H5), 3.11 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.0$ Hz, $J_{4,3b} = 2.0$ Hz, H4), 3.26-3.43 (m, 5H, H8, H1, H6 and H7), 3.55 (s, 3H, CH₃), 3.58 (s, 3H, N-CH₃), 3.63-3.65 (m, 2H, H12), 3.81-3.88 (m, 2H, H10), 3.95-4.05 (m, 2H, H18), 4.46 (ddd, 1H, $J_{H9a,F} = 47.5$ Hz, $J_{9a,9b} = 10.0$ Hz, $J_{9a,8} = 4.0$ Hz, H9a), 4.56 (ddd, 1H, $J_{9b,8} = 2.0$ Hz, H9b), 4.59 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.84 (d, 1H, CH₂Ph), 6.24 (bd, 1H, $J = 14.5$ Hz, H24 or H28), 6.31 (bd, 1H, $J = 14.5$ Hz, H24 or H28), 6.72 (app bt, NH), 6.84 (app bt, 1H, $J_{8,9} = J_{8,7} = 13.0$ Hz, H26), 7.04-7.12 (m, 2H, H_{Ar}), 7.20-7.28 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30-7.39 (m, 9H, H_{Ar}), 7.86 (app t, 1H, H27 or H25), 7.99 (app t, 1H, H27 or H25). **¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz):** $\delta = 25.4$ (C2 or C15), 25.4 (C2 or C15), 26.6 (C16), 28.0 (C17), 28.1 (2 CH₃), 28.1 (2 CH₃), 29.0 (C3), 29.8 (C11), 31.4 (N-Me), 33.0 (C12), 36.3 (C14), 44.6 (C18), 49.2 (C22 or C33), 49.4 (C22 or C33), 51.6 (C1), 61.1 (CH₃), 71.6 (C10), 75.1 (CH₂Ph), 77.3 (C7, $J_{C,F} = 6$ Hz), 78.0 (C8, $J_{C,F} = 18$ Hz), 79.0 (C4), 83.2 (C9, $J_{C,F} = 173.0$ Hz), 84.3 (C5), 87.0 (C6), 103.9 (C28 or C24), 104.5 (C28 or C24), 110.4 (C_{Ar}), 110.7 (C_{Ar}), 122.2 (C_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 125.1 (C_{Ar}), 125.2 (C_{Ar}), 127.0 (C26), 128.0 (C_{Ar}), 128.1 (2 C_{Ar}), 128.7 (2 C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 138.1 (C_{qAr}), 140.9 (C_{qAr}), 141.1 (C_{qAr}), 142.1 (C_{qAr}), 142.9 (C_{qAr}), 153.0 (C27 or C25), 153.5 (C27 or C25), 173.0 (C23 or C29), 173.1 (C23 or C29), 173.5 (C13). **ESI-HRMS** [M+Na]⁺ $m/z = 875.5241$ (calculated for C₅₂H₆₈FN₆O₅: 875.5230). **IR (cm⁻¹):** $\nu = 2998$, 2922, 2894, 2847, 2604, 2366, 2090, 2010, 1830, 1771, 1688, 1468, 1447, 1368, 1329, 1258, 1217, 1138, 1061, 1039.

Cyclo[L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-D-phenylalanyl-N⁶-(1-oxo-4-pentyn-1-yl)-L-lysyl] 76

To a solution of peptide **c(RGDfK)** (1 equiv, 165 μ mol, 100 mg) and NEt₃ (2.5 equiv, 497 μ mol, 67 μ L) in DMF (3 mL) was added 1-(pent-4-ynoyloxy)pyrrolidine-2,5-dione (1.2 equiv, 199 mmol, 38.8 mg). The reaction was stirred for 16 hr at rt. The solution was evaporated under *vacuum* and the crude product was solubilized in water. The solution was freeze-dried to give **76**.



Yield: 78% as a white foam

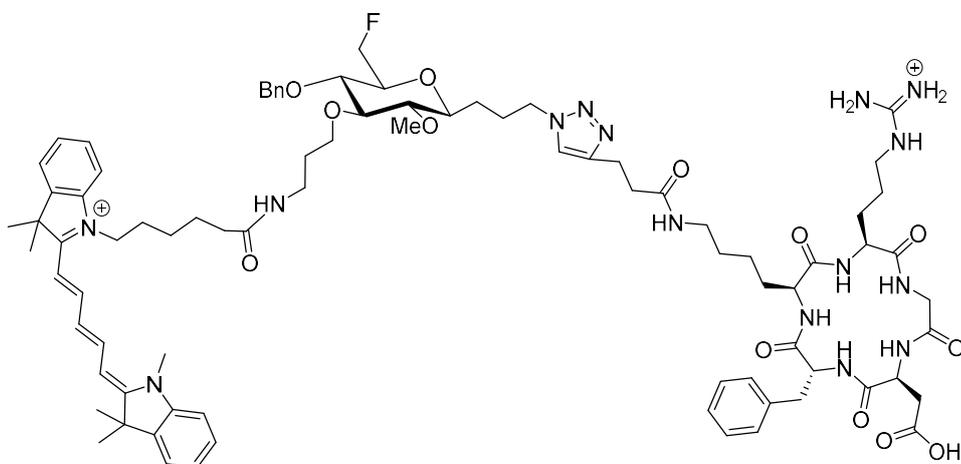
C₃₂H₄₆N₉O₈⁺

M.W.: 684.77 g/mol

ESI-HRMS [M]⁺ m/z = 684.3475 (calculated for C₃₂H₄₆N₉O₈⁺: 684.3464).

Compound 77

To a solution of **75** (5 mg, 4.9 μ mol) and N-pentynoique derivative **c(RGDfK)** **76** (5 mg, 6.3 μ mol, 1.0 equiv) diluted in tBuOH (0.17 mL), were added at room temperature an aqueous solution of sodium ascorbate (20 μ L, 1.2 μ mol, 0.2 equiv) and an aqueous solution of Cu(OAc)₂ (150 μ L, 0.42 μ mol, 0.1 equiv). The mixture was stirred during 6h. Chelex® 100 resin (150 mg) was then added to the blue solution and the suspension was stirred until the solution turned colorless. The resin was filtered off and the resulting solution was freeze-dried. Purification was achieved on Sephadex LH20. Elution with MeOH provided pure fluoro C-glycopeptide **77**.



Yield: 32% as a blue gum

C₈₄H₁₁₄FN₁₅O₁₃²⁺

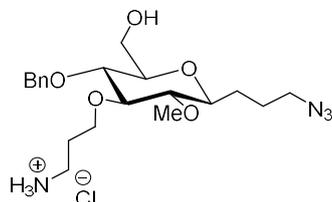
M.W.: 779.94 g/mol

ESI-HRMS [M]²⁺ m/z = 779.9325 (calculated for C₈₄H₁₁₄FN₁₅O₁₃: 779.9347).

II.2.3.4) Preparation of labeling precursor

4,8-anhydro-1-azido-7-*O*-benzyl-1,2,3-trideoxy-6-*O*-[3-amino-propyl]-5-*O*-methyl-D-glycero-D-gulo-nonitol **78**

Prepared from **66** following the procedure to synthesize **69**.



Yield: 70% as a white gum

$C_{20}H_{33}ClN_4O_5$

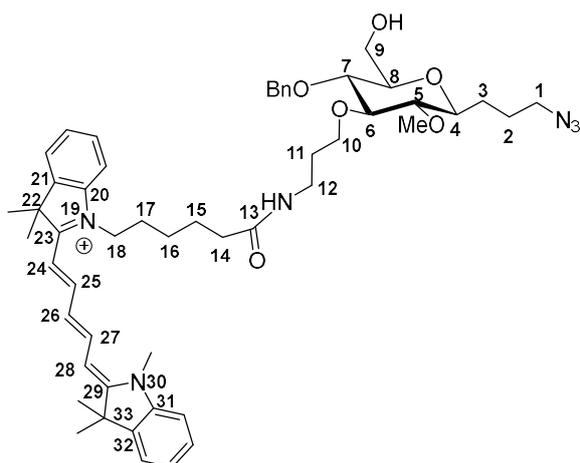
M.W.: 444.96 g/mol

$R_f = 0.24$ (DCM/MeOH: 85/15)

ESI-HRMS $[M+Na]^+$ $m/z = 409.2487$ (calculated for $C_{20}H_{33}N_4O_5$: 409.2445).

Compound 79

To a solution of cyanine 5 (6 mg, 0.012 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (0.5 mL) were added dropwise under argon at 0°C, TEA (4.5 μ L, 0.036 mmol, 3.0 equiv.) and IBCF (1.5 μ L, 0.0132 mmol, 1.2 equiv.). The solution was stirred at 0°C for 1h. A freshly prepared solution of **78** (11 mg, 0.027 mmol, 2.3 equiv) in DMF (0.5 mL) was then added dropwise under argon at 0°C. The solution was stirred at room temperature during 24h. The organic layer was evaporated under *vacuum* then was solubilized in CH_2Cl_2 and was washed twice with water. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: $CH_2Cl_2/MeOH$ 99/01 to 80/20) to give **79**.



Yield: 60% as a blue gum

$C_{52}H_{69}N_6O_6^+$

M.W.: 873.5273 g/mol

$R_f = 0.47$ (DCM/MeOH: 90/10)

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.42$ -1.59 (m, 3H, H16 and H3a), 1.60-1.69 (m, 1H, H2a), 1.69 (s, 6H, 2 CH₃), 1.69 (s, 6H, 2 CH₃), 1.71-1.76 (m, 2H, H15), 1.76-1.86 (m, 4H, H17, H2b and H3b), 1.90 (app qt, 2H, $J_{11,12} = J_{11,10} = 6.5$ Hz, H11), 2.29 (t, 2H, $J_{14,15} = 7.0$ Hz, H14), 2.83 (app t, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 9.0$ Hz, H5), 3.12 (app td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 9.0$ Hz, $J_{4,3b} = 1.5$ Hz, H4),

3.19-3.24 (m, 1H, H8), 3.28 (t, 2H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H1), 3.33-3.43 (m, 2H, H12 and H6), 3.40 (app t, 1H, $J_{7,6} = J_{7,8} = 9.0$ Hz, H7), 3.54 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 3H, N-CH₃), 3.61-3.65 (m, 1H, H9a), 3.78 (dd, 1H, $J_{9a,9b} = 12.0$ Hz, $J_{9a,8} = 2.0$ Hz, H9b), 3.86 (bt, 2H, H10), 4.07 (bt, 2H, $J_{18,17} = 7.5$ Hz, H18), 4.63 (d, 1H, $J_{CH_2} = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.82 (d, 1H, CH₂Ph), 6.34 (bd, 1H, $J = 13.5$ Hz, H24 or H28), 6.54 (bd, 1H, $J = 13.5$ Hz, H24 or H28), 6.84 (app bt, 1H, $J_{26,25} = J_{26,27} = 12.5$ Hz, H26), 7.06 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.10 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.18-7.25 (m, 3H, H_{Ar}), 7.29-7.41 (m, 8H, H_{Ar}), 7.89 (app t, 1H, H27 or H25), 7.91 (app t, 1H, H27 or H25). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): $\delta = 25.3$ (C2 and C15), 26.6 (C16), 27.2 (C17), 28.2 (4 CH₃), 29.0 (C3), 30.5 (C11), 31.6 (N-CH₃), 36.4 (C14), 37.4 (C12), 44.7 (C18), 49.1 (C22 or C33), 49.4 (C22 or C33), 51.6 (C1), 61.1 (CH₃), 62.3 (C9), 71.7 (C10), 74.9 (CH₂Ph), 78.1 (C7), 78.7 (C4), 79.0 (C8), 84.4 (C5), 86.9 (C6), 104.0 (C28 or C24), 104.9 (C28 or C24), 110.3 (C_{Ar}), 111.0 (C_{Ar}), 122.2 (C_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 125.0 (C_{Ar}), 125.5 (C_{Ar}), 127.1 (C26), 128.0 (C_{Ar}), 128.3 (2 C_{Ar}), 128.6 (2 C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 138.3 (C_{qAr}), 140.8 (C_{qAr}), 141.3 (C_{qAr}), 142.1 (C_{qAr}), 143.0 (C_{qAr}), 152.9 (C27 or C25), 153.8 (C27 or C25), 172.7 (C23 or C29), 173.1 (C23 or C29), 173.6 (C13). HRMS [M]⁺ $m/z = 873.5302$ (calculated for C₅₂H₆₉N₆O₆: 873.5273). IR (cm⁻¹): $\nu = 3002, 2920, 2891, 2842, 2601, 2368, 2087, 2012, 1832, 1773, 1685, 1454, 1441, 1361, 1322, 1272, 1204, 1131, 1054, 1028$.

III- HPLC

HPLC analyses were carried out on analytical HPLC with UV, radioactive and ELSD series detectors arranged in the mentioned order. Retention times were based on UV chromatograms for non-radioactive compounds and on radioactive chromatograms for radioactive compounds

Analytical HPLC of 21

($t_R = 15.7$ min, Alltima C8, 5 μ m, 150x4.6 mm, 55/45 ACN/H₂O in isocratic condition, 1.0 mL/min)

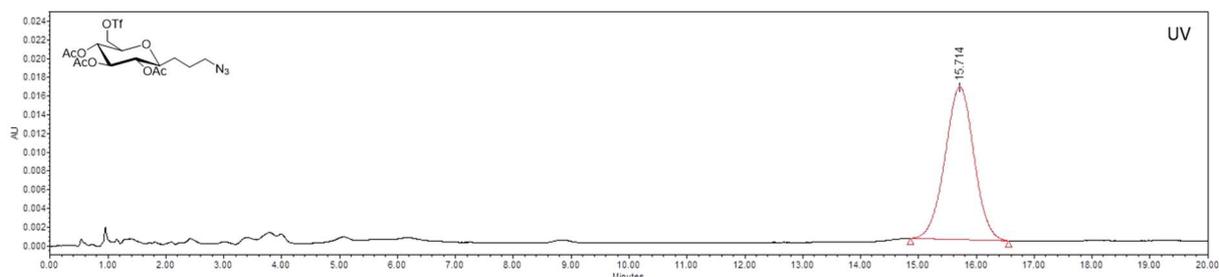


Figure 2. UV chromatogram of 21 (230 nm)

Analytical HPLC of **23**

($t_R = 7.5$ min, Alltima C8, 5 μ m, 150x4.6 mm, 55/45 ACN/H₂O in isocratic condition, 1.0 mL/min)

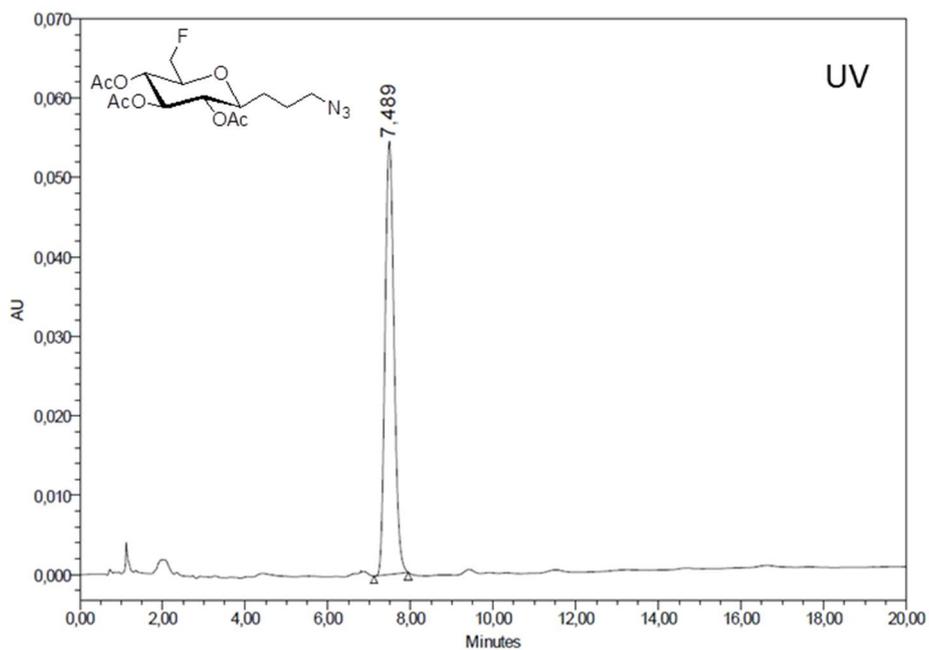


Figure 3. UV chromatogram of **23** (230 nm)

Analytical HPLC of **25**

($t_R = 4.7$ min, Vydac 218TP C18, 5 μ m, 250x4.6mm, ACN/H₂O 17/83 (v/v) with 0.1% of TFA in isocratic condition, 1.0 mL/min)

Given that **25** do not contain any chromophore groups no signal was observed with UV detection, only ELSD chromatogram is presented.

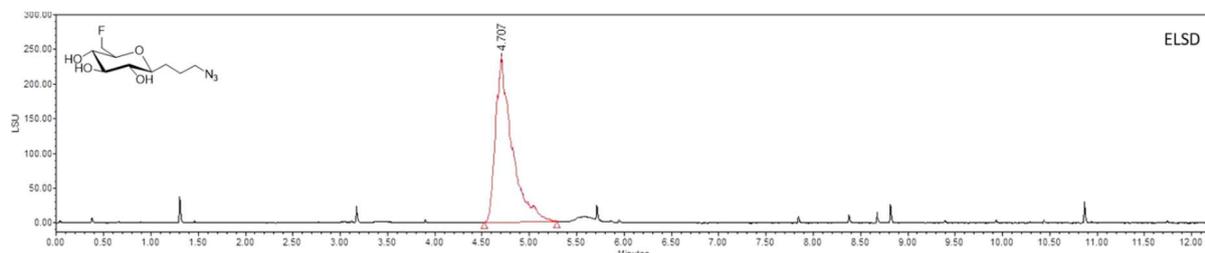


Figure 4. ELSD chromatogram of **25** (T°C nebulisation: cooling, T°C drift tub: 50°C, 50 psi)

Analytical HPLC of **30**

($t_R = 13.2$ min, Vydac 218TP C18, 5 μ m, 250x4.6mm, ACN/H₂O 17/83 (v/v) with 0.1% of TFA in isocratic condition, 1.0 mL/min)

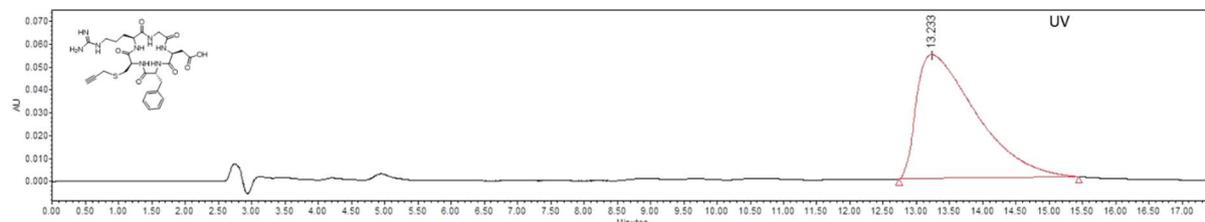


Figure 5. UV chromatogram of **30** (230 nm)

Analytical HPLC of **33**

($t_R = 7.3$ min, Vydac 218TP C18, 5 μ m, 250x4.6mm, ACN/H₂O 17/83 (v/v) with 0.1% of TFA in isocratic condition, 1.0 mL/min)

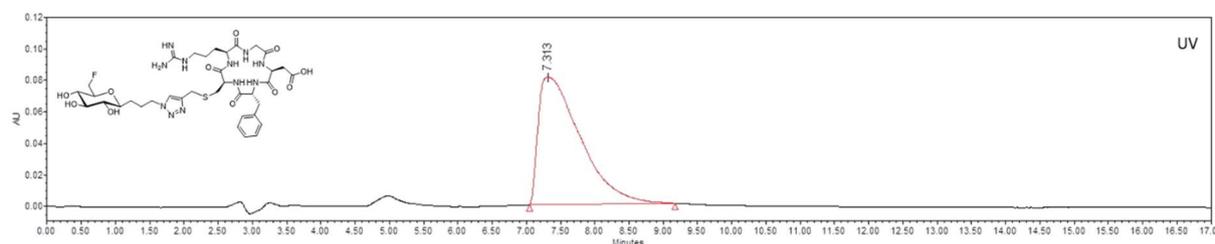


Figure 6. UV chromatogram of **33** (230 nm)

IV- Radiosynthesis of [¹⁸F]**33**

IV.1- AllInOne Synthetizer

The AllInOne synthesis module is a very versatile synthesizer equipped with two arrays of eighteen rotary actuators having multiple positions, two heaters and seven radiation detectors. A built-in HPLC system with two HPLC column positions is integrated with UV detector and radioactivity detector. AIO operate with single use cassettes (structured with three-way valve manifolds) and reagent sets, facilitating GMP compliance and prevents cross-contamination. The parts available in bulk allow the assembly of these cassettes for research purpose on which various components can be plugged: spikes (for reagent vials), SPE cartridges, syringes or tubes. All these materials are compatible with acids, bases and solvent and are suitable for medical devices. The user-friendly software reproduces the picture of the cassette layout (Figure 88) and shows in real time all the movements of the machine during the radiotracer production.

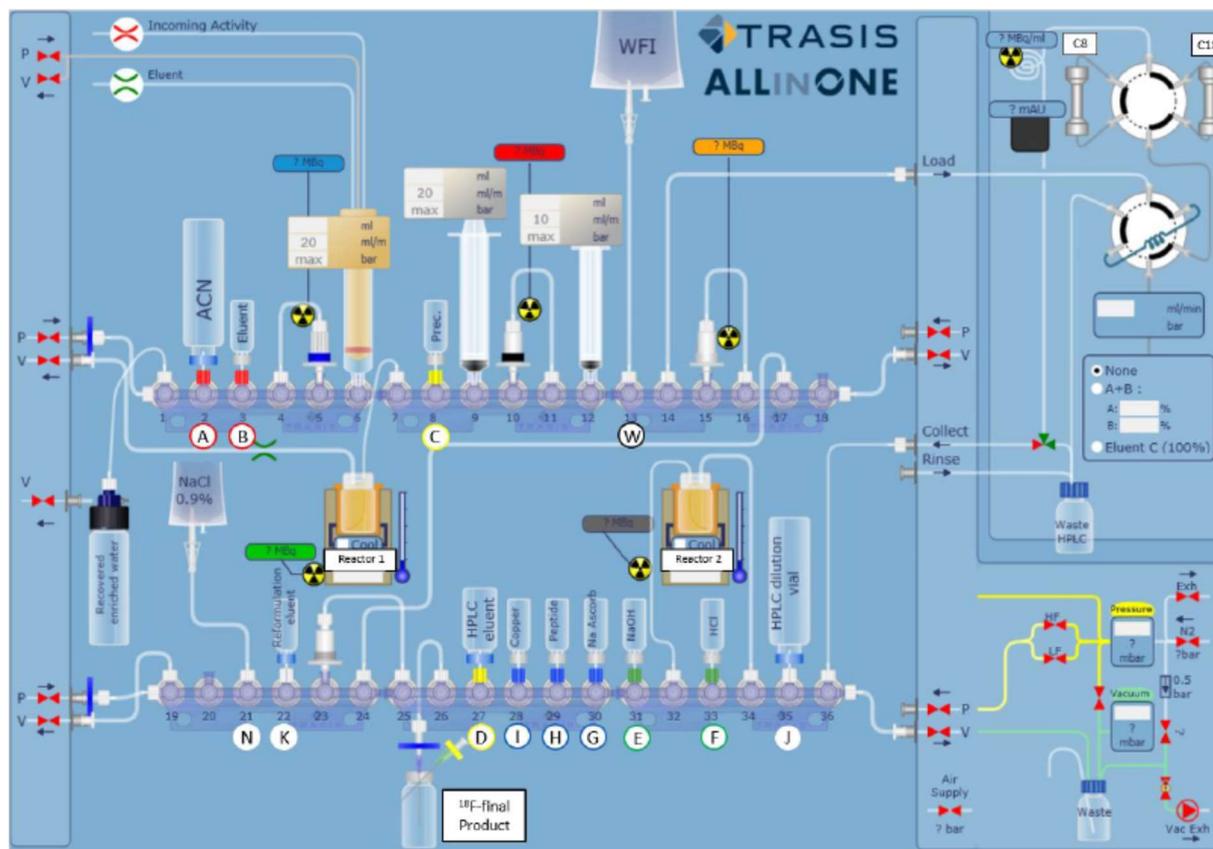


Figure 7 Schematic representation of the AIO module used for the preparation of $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$

IV.2- Synthesizer and cassette preparation

Before the activity reception, the module performed automatically the internal and the cassette tests. Columns and eluents for the semi-preparative HPLC were installed, for the 1st HPLC (column: LiChrospher C8 endcapped, eluent: ACN/H₂O 55/45 v/v) and for the 2nd HPLC (column: Vydac 218TP C18, eluent: ACN/H₂O 17/83 v/v with 0.1% of TFA). The list of reagents used for the automated procedure are described in Table 15.

Table 15: Preparation details for the radiosynthesis of [¹⁸F]33 on the AIO synthesizer

Position	Reagents or material	Quantities
P2	Dry acetonitrile (ACN) / Vial A	10 mL
P3	K ₂₂₂ /K ₂ CO ₃ (5.3 mg/1.3 mg) in ACN/H ₂ O (8/2 v/v) / Vial B	1 mL
P4-P5	Sep-pak® Light QMA-carbonate	1
P6	Plunger (20 mL) / SA2	1
P8	Precursor 21 / Vial C	5 mg
P9	Syringe of 20 mL / SA3	1
P10-P11	Sep-pak® silica cartridge	1
P12	Syringe of 10 mL / SA4	1
P13	WFI (Water for injection) Bag / Bag W	1
P15-P16	Cation exchange (Chelex®) cartridge	1
P21	0.9% Sodium chloride bag / Bag N	1
P22	Ethanol/NaCl 0.9% (5/5 v/v) / Vial K	2 mL
P23-P25	Oasis HLB cartridge	1
P27	ACN/H ₂ O (55/45 v/v) / Vial D	10 mL
P28	Cu(OAc) ₂ in H ₂ O (11 μmol/mL) / Vial I	0.3 mL
P29	Propargylated c(RGDfC) 30 in H ₂ O (1.6 μmol/mL) / Vial H	0.3 mL
P30	Sodium ascorbate in H ₂ O (22 μmol/mL) / Vial G	0.3 mL
P31	NaOH 1M / Vial E	0.3 mL
P33	HCl 1M / Vial F	0.3 mL
P35	H ₂ O Dilution Vial / Vial J	10 mL

The precursor **21** (vial C, P8) was diluted with 2 mL of dry ACN (vial A, P2) before activity reception, the module is now ready to receive activity for radiosynthesis.

IV.3- Radiosynthesis

[¹⁸F]33 was synthesized using an original in-house reaction sequence described in Table 15.

Preparation of K[¹⁸F]-K₂₂₂ complex

¹⁸F-fluoride (~ 5 GBq) in [¹⁸O]water was recovered in the AIO synthesiser *via* the plunger (SA2, P6, *vacuum* -200 mbar) and passed through a Sep-Pak® light QMA-carbonate cartridge (P5-P4), where [¹⁸F]fluoride was trapped and [¹⁸O]water was collected for recycling (P1). The QMA-carbonate cartridge was then flushed with nitrogen gas flow during 40 seconds (pressure 400 mbar; *vacuum* -300 mbar). The trapped ¹⁸F-fluoride was eluted from the QMA-carbonate cartridge into reaction vessel (reactor 1, P7) with the K₂₂₂/K₂CO₃ solution (vial B, P3, *vacuum*

-350 mbar) previously pressurized (pressure 500 mbar). Solvent was removed under a stream of nitrogen gas flow (pressure 15 to 500 mbar; *vacuum* -850 mbar) at 110°C during 10 minutes to give the dried K[¹⁸F]F-K₂₂₂ complex. The reactor was then cooled at 75°C to perform the ¹⁸F-radiolabeling.

¹⁸F-radiolabeling of the labeling precursor 21

The triflated precursor **21** (Vial C, P8) was pressurized (pressure 500 mbar) and was added into the reaction vessel (reactor 1, P7, *vacuum* -800 mbar) containing the dried K[¹⁸F]F-K₂₂₂ complex. Labeling was performed at 95°C for 5 min in a closed reactor thanks to pinch valves. After cooling at 30°C, the reaction mixture was recovered into syringe 4 (SA4, P12) containing 1.5 mL of WFI (Bag W), the reactor was pressurized (pressure 500 mbar) before passing through a Sep-pak[®] plus silica 690 mg cartridge (P10-P11) to remove unreacted ¹⁸F-fluoride (*vacuum* -200 mbar). The reactor 1 and silica cartridge were rinsed with 1 mL of dry acetonitrile (Vial A, P2) taken with syringe 3 (SA3, P9). The eluted solution was recovered into syringe 4 (SA4, P12). HPLC loop was preconditioned with 8 mL of HPLC eluent (pressure 500 mbar, *vacuum* -200 mbar) (vial D, P27) via syringe 3 (SA3, P9). Crude product in SA4 was transferred into the injection loop of the semipreparative HPLC and was purified with the first HPLC column (LiChrospher C8 endcapped, solvent: ACN/H₂O 55/45, 4.5 mL/min). [¹⁸F]**23** was collected (*t_R* ~ 7.5 min) during around 40 seconds and recovered into the second reaction vessel (reactor 2, P32-P34).

Preparation of ¹⁸F-fluoro-C-glycoside based prosthetic group [¹⁸F]25

HPLC solvent (~3 mL, reactor 2) was evaporated by heating at 80°C (*vacuum* -300 to -1000 mbar) 15 min, and then under nitrogen gas flow during 1 minute (pressure 250 mbar; *vacuum* -500 mbar). After complete evaporation and cooling at 30°C, saponification of the ¹⁸F-glycoside [¹⁸F]**23** was performed for 9 min at 30°C with an aqueous NaOH 1M solution (vial E, P31) added (*vacuum* -500 mbar) after pressurization of the vial (pressure 500 mbar). Aqueous HCl 1M solution (vial F, P33) was then added (pressure 500 mbar, *vacuum* -500 mbar) by the same way to neutralize the solution containing [¹⁸F]fluoro-C-glycoside based prosthetic group [¹⁸F]**25**.

Preparation of the [¹⁸F]F-C-glyco-c(RGDfC) [¹⁸F]33

To [¹⁸F]fluoro prosthetic group [¹⁸F]25 (~850 MBq) were added (*vacuum* -500 mbar) after pressurization of each vial (pressure 500 mbar), sodium ascorbate (vial G, P30), propargylated peptide **30** (vial H, P29) and Cu(OAc)₂ (vial I, P28). The solution was heated at 55°C during 25 min under nitrogen gas flow (pressure 150 to 250 mbar; *vacuum* -500 to -800 mbar). The elution lines and SA4 were washed with WFI (10 mL, Bag W). The reaction mixture was then diluted with 3 mL of WFI (Bag W, taken with SA4), the reactor was pressurized during 5 secondes (pressure 500 mbar, *vacuum* -300 mbar) the solution was passed through a cartridge pre-charged with Chelex[®] 100 resin (V15-V16) to remove copper, and was recovered in syringe 4 (P12). Crude product in SA4 was transferred into the injection loop of the semipreparative HPLC and was purified with the 2nd HPLC column (Vydac 218TP C18, solvent: ACN/H₂O 17/83 v/v with 0.1% of TFA, 3 mL/min). The collected peak of [¹⁸F]33 (*t_R* ~ 15.0 min) was recovered into the dilution vial containing 10 mL of WFI (vial J, P35). To reformulate [¹⁸F]33, the pressurized mixture (pressure 500 mbar) was trapped on an Oasis HLB cartridge (P25-P23, *vacuum* -100 mbar), flushed with nitrogen gas flow during 10 s (pressure 500 mbar; *vacuum* -300 mbar) and then washed with 7.5 mL of WFI (Bag W, taken with SA4). The product was eluted from the Oasis HLB with 0.7 mL of ethanol/NaCl 0.9% 50/50 v/v solution (vial K, P22) taken by SA4 (P12) and recovered into final product vial (P26). The Oasis HLB cartridge was rinsed with 1,8 mL of NaCl 0.9% (Bag N, taken with SA4) pushed into final product vial (P26), and then flushed by nitrogen gas flow during 10 seconds. [¹⁸F]33 was produced with a decay corrected (d.c.) radiochemical yield of 3.6 ± 0.4% (n = 12).

IV.4- Quality control

An aliquot of final product [¹⁸F]fluoro-C-glyco-c(RGDfC) [¹⁸F]33 was injected on analytical HPLC (20 µL) for chemical and radiochemical purities determination. A second injection with the corresponding reference compound **33** confirmed the identity of [¹⁸F]33. A Vydac 218TP C18 column was used in isocratic condition; eluent: ACN/H₂O 17/83 v/v with 0.1% of TFA, flow: 1.0 mL/min and UV detection (230 nm). Standard curve relating mass to UV absorbance was performed on analytical HPLC to check molar activity. Radiochemical stabilities of the entire preparation of [¹⁸F]33 were tested by HPLC at regular intervals during 120 min. The pH of the solution was determined by applying a drop onto a pH indicator strip and comparing the result with the provided scale.

IV.5- Partition coefficient ($\log D_{7.4}$) measurements

Approximately 5.6 MBq of [^{18}F]33 was diluted in 2 mL of phosphate-buffered saline (pH 7.4, PBS). Five aliquots from this sample (50 μL) were distributed into five separate Eppendorf tubes containing 500 μL of octanol and 450 μL of phosphate buffer. Samples were vortexed for 1 min at room temperature and then centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm. From each sample, 100 μL samples of both the organic and the PBS layer were transferred into plastic tubes, and the samples were counted with a gamma counter (2470 WIZARD[®], PerkinElmer).

IV.6- *In vitro* stability in serum

An aliquot of [^{18}F]33 (5.5 MBq each) was added to human serum (200 μL , 5 samples) and incubated at 37°C. Samples were collected at various interval times (0, 10, 30, 60 and 120 min) and precipitated using acetonitrile (200 μL). The samples were centrifuged at 4000 rpm for 5 min, and the supernatant layer was then analyzed by radio-HPLC (column: Vydac 218TP C18 eluted with ACN/H₂O 17/83 v/v with 0.1% of TFA at 1.0 mL/min). The experiments were performed in triplicate (*Figure 8*).

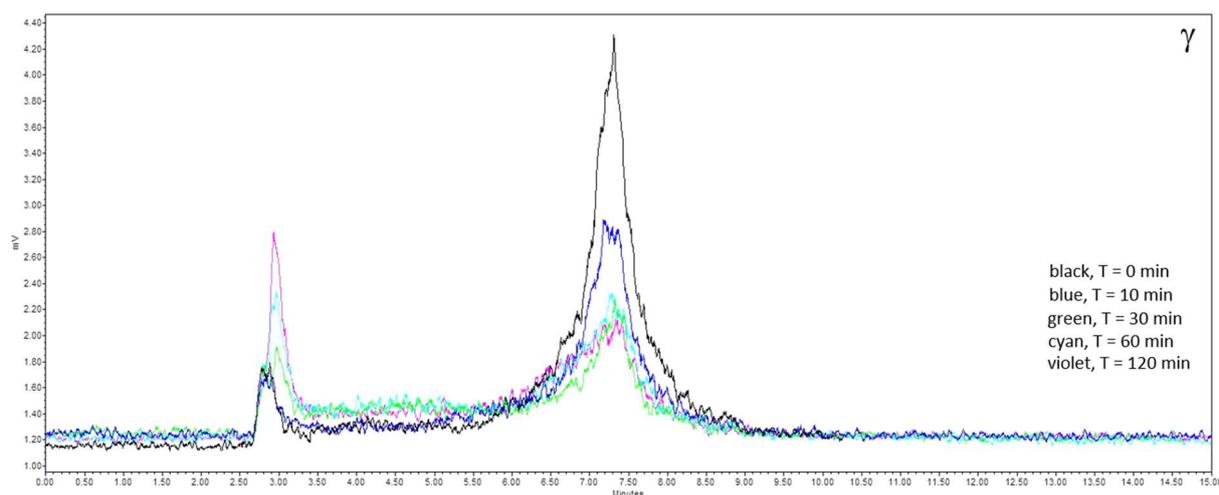


Figure 8: HPLC Chromatograms *in vitro* stability in serum

V- *In vitro* assays protocols

Platelet aggregation assay

Venous blood was withdrawn from healthy volunteers who had not taken anti-platelet or non-steroidal anti-inflammatory drugs during the previous 10 days. Blood was collected in S-

Monovette[®] tubes containing 0.106 M Trisodium citrate solution (Sarstedt). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 190g for 10 min at 20°C. The remaining blood was again centrifuged at 1750g for 10 min at 20°C to obtain platelet-poor plasma (PPP). PRP was adjusted to 300×10^9 platelets/L by addition of autologous PPP. Platelet reactivity was measured by light transmission aggregometry (SD Innovation Aggregometer, Frouard, France). A 300 μ L aliquot of PRP was preincubated with C-glyco"RGD" or reference RGDC or c(RGDfC) peptides (Bachem, Bubendorf, Switzerland) at various concentrations for 10 min at 37°C. The mixture was then stirred at 1100 rpm and stimulated by 2.5 μ M ADP. Inhibition of platelet aggregation was measured at the maximal aggregation response estimated quantitatively by measuring the maximum curve height above baseline. IC₅₀ values were determined from concentration-response curves fitted with a hyperbolic equation.

Cell adhesion assay

Clonetics[®] human aortic smooth muscle cells (VSMCs) grown to subconfluence in Clonetics[®] SmGM[®]-2 Smooth Muscle Growth Medium-2 (Lonza Sales) were used at passage 3-6. Adhesion of VSMCs to vitronectin was measured as previously described (Stawowy *et al.*, 2004) using commercially available human vitronectin coated 96-well microplates (R&D Systems). Briefly, VSMCs were adjusted to 6.10^5 cells/mL in DMEM/F12 and incubated for 5 min at room temperature with C-glyco"RGD" or reference RGDC or c(RGDfC) peptides at concentrations ranging from 1 to 2000 μ M. Cells were then allowed to adhere to vitronectin coated plates for 2 hours at 37°C. After washing 2 times with PBS, adherent cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, stained for 15 min with 0.5% toluidine blue (Toluidine blue O Certistain[®]) for 15 min and lysed with 1% SDS. Absorbance was measured at 593 nm.

VI- Molecular modeling

Standard amino acids, ions and the sugar moiety were described by means of the CHARMMM36^[270,271] force field whereas triazole^[272] and linker were described with the CHARMM General Force Field (CGENFF).^[272] Water was represented by the TIP3P model.^[273] In order to use standard force-field parameters, the fluorine atom beard by the sugar moiety was systematically replaced by a hydroxyl group. The latter substitution in similar compounds was shown to preserve the global behaviour of RGD-based peptides towards integrins.^[117] Molecular-dynamics simulations were performed with the NAMD package.^[274]

Equation of motions were integrated by means of a multiple time-step algorithm^[275] using a time step of 2 and 4 fs for short- and long-range interactions, respectively. Covalent bonds involving hydrogen atoms were constrained to their equilibrium values by means of the Rattle algorithm.^[276] All trajectories were carried out in the isobaric-isothermal ensemble, at 300 K under 1 atm using, respectively, Langevin dynamics^[277] (damping coefficient 1 ps^{-1}) and the Langevin piston method.^[278] Long-range electrostatic interactions were taken into account by means of the Particle Mesh Ewald (PME) algorithm.^[279] Water was first thermalized during 5 ns while restraining harmonically the heavy atoms of the complexes to their initial positions. Eventually, MD trajectories of 500 ns were generated without any restraints and analyzed using VMD.

VII- PET imaging

Experimental model

Des souris femelles immunodéprimées de souche NMRI, âgées d'environ 6 semaines (ENVIGO, FRANCE) ont été utilisées dans cette étude.

Le projet a été soumis à l'expertise du Comité Ethique Lorrain CELMEA N°66 et a obtenu une autorisation du ministère de la recherche (APAFIS N°2456-2015102609499994).

U87MG tumor cell culture

L'ensemble des manipulations sur les cellules tumorales ont été réalisées au centre de recherche en automatique de Nancy (CRAN), sous la direction du Dr Cédric Bourra.

Le choix du modèle tumoral s'est porté sur les cellules U87MG composant majoritairement les glioblastomes humains.

Les cellules U87MG ont été mises en culture 2D sous incubateur, dans des milieux de culture usuels type Gibco® DMEM, enrichis en antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) afin de prévenir les potentielles contaminations bactériennes. Environ une période d'une semaine a été nécessaire pour obtenir un tapis cellulaire entièrement confluent, avant d'ensemencer les cellules à concentration définie de $2 \cdot 10^4$ cellules/mL.

Sous hotte à flux laminaire, et après avoir retiré le milieu de culture de la flasque, une étape de trypsination, qui consistait à rompre les protéines d'adhésion inter-cellulaire et à "détacher" les cellules tumorales du support et entre elle, a été réalisée. Un milieu de culture riche en calcium (3-4x le volume de trypsine) a été ensuite ajouté, afin d'inhiber l'effet de la trypsine

par compétition. Après centrifugation (10min; 300g ; 20°C) Les cellules tumorales du culot ont été récupérées, un test de viabilité au bleu trypan a été réalisé, et les cellules tumorales ont été comptées à l'aide de cellules de comptage.

U87MG tumor cell xenograft

En condition d'aseptise, et après anesthésie générale par inhalation d'un mélange isoflurane-air (3% - b 1,5v/v), un volume de 150µL, contenant une concentration de 2.10^6 cellules/mL, a été injecté en sous-cutané au niveau du creux inguinal de la souris femelle immunodéprimée de souche NMRI, âgées d'environ 6 semaines.

La croissance tumorale a été évaluée en mesurant le volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse électronique. Le volume tumoral (VT) a été estimé en mm^3 en utilisant la formule $(d^2 \times D) / 2$ (d=petit diamètre tumoral et D=grand diamètre tumoral). Pour cette étude, le volume cible était d'environ 200 à 300 mm^3 .

***In vivo* biodistribution analysis ^{68}Ga -NODAGA-RGD**

Le ^{68}Ga - NODAGA-c(RGDyK) a été utilisé comme référence afin d'évaluer la captation et la biodistribution du ^{18}F -RGD. Les 2 examens pour chaque animal ont été réalisés à 48h d'intervalles.

Après anesthésie générale par inhalation d'un mélange isoflurane-air (2% - 1,5v/v), un volume de 0,12 mL contenant 5 MBq du ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK) ou 5 MBq du ^{18}F -RGD, a été injecté par voie intraveineuse (veine caudale). L'animal - chauffé et maintenu sous anesthésie générale – a été placé en décubitus ventral afin de réduire l'amplitude des mouvements respiratoires et donc de diminuer le flou cinétique des images. Les examens ont été réalisés avec un enregistrement en mode continu sur deux heures et qui a débuté immédiatement après injection des radiotraceurs. Trente acquisitions consécutives de 240 secondes ont ainsi pu être analysées pour chaque examen.

A la fin de chaque enregistrement, une acquisition de transmission d'une durée de 10 min a été effectuée à l'aide de deux sources de cobalt 57 incluses dans l'appareil du TEP. La reconstruction des images avec correction d'atténuation a été obtenue par méthode itérative (OSEM 3D, 4 itérations, 16 subsets). Les images ont été enregistrées avec des épaisseurs de coupes de 0,8 mm (correspondant à l'épaisseur des cristaux de détection de la caméra TEP) et

des voxels cubiques de 0,8 X 0,8 X 0,8 mm. Dans ces conditions, la résolution spatiale est proche de 1 mm.

Les activités ont été mesurées en coups totaux détectés et corrigés pour l'atténuation. La masse métaboliquement active (MMA) de la tumeur a été déterminée à l'aide d'une région d'intérêt (ROI) dessinée autour de la tumeur, suivi d'un contourage de la zone présentant une augmentation d'activité par rapport au bruit de fond et avec un seuillage automatique de 50% pour la tumeur. Les ROI ont été ensuite reproduites à l'identique entre les 2 examens ⁶⁸Ga-NODAGA-c(RGDyK) et le ¹⁸F-RGD.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. Adumeau, K. E. Carnazza, C. Brand, S. D. Carlin, T. Reiner, B. J. Agnew, J. S. Lewis, B. M. Zeglis, *Theranostics* **2016**, *6*, 2267.
- [2] A. M. Wu, T. Olafsen, *Cancer J.* **2008**, *14*, 191.
- [3] E. A. te Velde, Th. Veerman, V. Subramaniam, Th. Ruers, *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **2010**, *36*, 6.
- [4] Z.-Y. Chen, Y.-X. Wang, Y. Lin, J.-S. Zhang, F. Yang, Q.-L. Zhou, Y.-Y. Liao, *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1.
- [5] G. Singh, M. D. Gott, H.-J. Pietzsch, H. Stephan, *Nukl. Nucl. Med.* **2016**, *55*, 41.
- [6] M. L. James, S. S. Gambhir, *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897.
- [7] T. Vaidya, A. Agrawal, S. Mahajan, M. H. Thakur, A. Mahajan, *Mol. Diagn. Ther.* **2019**, *23*, 27.
- [8] L. Cunha, I. Horvath, S. Ferreira, J. Lemos, P. Costa, D. Vieira, D. S. Veres, K. Szigeti, T. Summavielle, D. Máthé, et al., *Mol. Diagn. Ther.* **2014**, *18*, 153.
- [9] K. J. Niermann, A. C. Fleischer, J. Huamani, T. E. Yankeelov, D. W. Kim, W. D. Wilson, D. E. Hallahan, *J. Ultrasound Med.* **2007**, *26*, 749.
- [10] S. Sripathi, A. Mahajan, *J. Ultrasound Med.* **2013**, *32*, 1539.
- [11] L. Zhu, L. Wang, Y. Liu, D. Xu, K. Fang, Y. Guo, *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *Volume 13*, 6481.
- [12] Q. Zhou, Y. Zeng, Q. Xiong, S. Zhong, P. Li, H. Ran, Y. Yin, C. Reutelingsperger, F. W. Prinze, Z. Ling, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 23006.
- [13] J. Wischhusen, K. E. Wilson, J.-G. Delcros, R. Molina-Peña, B. Gibert, S. Jiang, J. Ngo, D. Goldschneider, P. Mehlen, J. K. Willmann, et al., *Theranostics* **2018**, *8*, 5126.
- [14] E. Berg, S. R. Cherry, *Semin. Nucl. Med.* **2018**, *48*, 311.
- [15] I. Apostolova, F. Wedel, W. Brenner, in *Metab. Cancer* (Eds: T. Cramer, C. A. Schmitt), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 177–205.
- [16] S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1501.
- [17] S. L. Pimlott, A. Sutherland, *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 149.
- [18] C. S. Levin, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32*, S325.
- [19] D. Delacroix, J. P. Guerre, P. Leblanc, *Guide Pratique Radionucléides et Radioprotection 2ème Édition*, **2006**.
- [20] S. Kaneko, K. Ishiwata, S.-I. Ishii, H. Omura, M. Senda, *Appl. Radiat. Isot.* **1999**, *51*, 285.
- [21] S. Richter, F. Wuest, *Molecules* **2014**, *19*, 20536.
- [22] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stocklin, *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 235.
- [23] I. Veliky, *Contrast Media Mol. Imaging* **2018**, *2018*, 1.
- [24] C. Testa, D. D'Addona, M. Scrima, A. M. Tedeschi, A. M. D'Ursi, C. Bernhard, F. Denat, C. Bello, P. Rovero, M. Chorev, et al., *Pept. Sci.* **2018**, *110*, e24071.
- [25] L. E. Chilug, R. A. Leonte, M. E. B. Patrascu, A. C. Ion, C. S. Tuta, A. Raicu, G. Manda, D. Niculae, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2017**, *311*, 1485.
- [26] C. Xiong, D. Yin, J. Li, Q. Huang, M. K. Ravoori, V. Kundra, H. Zhu, Z. Yang, Y. Lu, C. Li, *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 808.
- [27] P. Kovac, *Carbohydr. Res.* **1986**, *153*, 168.
- [28] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein, *J. Gen. Physiol.* **1927**, *8*, 519.
- [29] M. Reivich, D. Kuhl, A. Wolf, J. Greenberg, M. Phelps, T. Ido, V. Casella, J. Fowler, E. Hoffman, A. Alavi, et al., *Circ. Res.* **1979**, *44*, 127.
- [30] O. Humbert, V. Bourg, L. Mondot, J. Gal, P.-Y. Bondiau, D. Fontaine, E. Saada-Bouzd, M. Paquet, D. Chardin, F. Almairac, et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46*, 558.
- [31] M. Beheshti, A. Rezaee, H. Geinitz, W. Loidl, C. Pirich, W. Langsteger, *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 55S.

- [32] J. B. Lilleker, R. Hodgson, M. Roberts, K. Herholz, J. Howard, R. Hinz, H. Chinoy, *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78*, 657.
- [33] A. K. Kirjavainen, S. Forsback, F. R. López-Picón, P. Marjamäki, J. Takkinen, M. Haaparanta-Solin, D. Peters, O. Solin, *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *56*, 39.
- [34] J. Bergman, O. Solin, *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 677.
- [35] J. Castillo Meleán, J. Ermert, H. H. Coenen, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2015**, *58*, 133.
- [36] O. Jacobson, D. O. Kiesewetter, X. Chen, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1.
- [37] B. Kuhnast, F. Dollé, *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3*, 174.
- [38] V. V. Orlovskaya, O. S. Fedorova, R. N. Krasikova, *Russ. Chem. Bull.* **2015**, *64*, 1518.
- [39] S. Jana, M. H. Al-huniti, B. Y. Yang, S. Lu, V. W. Pike, S. D. Lepore, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2329.
- [40] S. Chalon, J. Vercouillie, P. Payoux, J.-B. Deloye, C. Malherbe, F. Le Jeune, N. Arlicot, A.-S. Salabert, D. Guilloteau, P. Emond, et al., *Front. Med.* **2019**, *6*, 90.
- [41] A. Varrone, V. Stepanov, R. Nakao, M. Toth, B. Gulyas, P. Emond, J. B. Deloye, J. Vercouillie, M. G. Stabin, C. Jonsson, et al., *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1313.
- [42] P. Emond, L. Garreau, S. Chalon, M. Boazi, M. Caillet, J. Bricard, Y. Frangin, L. Mauclair, J.-C. Besnard, D. Guilloteau, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1366.
- [43] P. Emond, D. Guilloteau, S. Chalon, *CNS Drug Rev.* **2008**, *14*, 47.
- [44] F. Dollé, J. Helfenbein, F. Hinnen, S. Mavel, Z. Mincheva, W. Saba, M.-A. Schöllhorn-Peyronneau, H. Valette, L. Garreau, S. Chalon, et al., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, *50*, 716.
- [45] S. Sérrière, C. Tauber, J. Vercouillie, D. Guilloteau, J.-B. Deloye, L. Garreau, L. Galineau, S. Chalon, *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41*, 106.
- [46] F. Dollé, D. Roeda, B. Kuhnast, M. Lasne, in *Fluor. Health*, Elsevier, **2008**, pp. 3–65.
- [47] C. Perrio, S. Schmitt, D. Pla, F. P. Gabbai, K. Chansaenpak, B. Mestre-Voegtle, E. Gras, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 340.
- [48] J. Becaud, L. Mu, M. Karamkam, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, K. Graham, T. Stellfeld, L. Lehmann, S. Borkowski, D. Berndorff, et al., *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 2254.
- [49] S. V. Selivanova, L. Mu, J. Ungersboeck, T. Stellfeld, S. M. Ametamey, R. Schibli, W. Wadsak, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3871.
- [50] J. Marik, J. L. Sutcliffe, *Appl. Radiat. Isot.* **2007**, *65*, 199.
- [51] A. Maisonial-Besset, A. Serre, A. Ouadi, S. Schmitt, D. Canitrot, F. Léal, E. Miot-Noirault, D. Brasse, P. Marchand, J.-M. Chezal, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 7058.
- [52] B. Kuhnast, B. de Bruin, F. Hinnen, B. Tavitian, F. Dollé, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 617.
- [53] B. Kuhnast, A. El Hadri, R. Boisgard, F. Hinnen, S. Richard, A. Caravano, V. Nancy-Portebois, M. Petitou, B. Tavitian, F. Dollé, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 1915.
- [54] C. L. Denholt, B. Kuhnast, F. Dollé, F. Hinnen, P. R. Hansen, N. Gillings, A. Kjaer, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 774.
- [55] B. de Bruin, B. Kuhnast, F. Hinnen, L. Yaouancq, M. Amessou, L. Johannes, A. Samson, R. Boisgard, B. Tavitian, F. Dollé, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 406.
- [56] R. B. Thompson, S. Scarlata, in *Rev. Fluoresc. 2016* (Ed: C. D. Geddes), Springer International Publishing, Cham, **2017**, pp. 1–8.
- [57] Y. Nakaseko, T. Ishizawa, A. Saiura, *J. Surg. Oncol.* **2018**, *118*, 324.
- [58] J. S. Verdaasdonk, J. Lawrimore, K. Bloom, in *Methods Cell Biol.*, Elsevier, **2014**, pp. 347.
- [59] A. Chevalier, K. Renault, F. Boschetti, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 152.

- [60] N. S. van den Berg, T. Buckle, G. H. KleinJan, H. G. van der Poel, F. W. B. van Leeuwen, *Eur. Urol.* **2017**, *72*, 110.
- [61] K. S. Hettie, J. L. Klockow, T. E. Glass, F. T. Chin, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 3110.
- [62] B. E. Grüter, D. Täschler, J. Rey, F. Strange, E. Nevzati, J. Fandino, S. Marbacher, D. Coluccia, *Oper. Neurosurg.* **2019**, *17*, 432.
- [63] Z. Xue, L. Kong, C. Pan, Z. Wu, J. Zhang, L. Zhang, *J. Neurol. Surg. Part B Skull Base* **2018**, *79*, S340.
- [64] S. C. Ghosh, P. Ghosh, N. Wilganowski, H. Robinson, M. A. Hall, G. Dickinson, K. L. Pinkston, B. R. Harvey, E. M. Sevick-Muraca, A. Azhdarinia, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 406.
- [65] Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, W. Piao, M. Kusakabe, N. Saito, T. Terai, T. Okabe, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5029.
- [66] H. Yuan, H. Cho, H. H. Chen, M. Panagia, D. E. Sosnovik, L. Josephson, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10361.
- [67] S. B. L. Vollrath, D. Fürniss, U. Schepers, S. Bräse, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8197.
- [68] A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 8330.
- [69] F. A. Jaffer, C.-H. Tung, J. J. Wykrzykowska, N.-H. Ho, A. K. Houg, G. L. Reed, R. Weissleder, *Circulation* **2004**, *110*, 170.
- [70] L. E. Kelderhouse, V. Chelvam, C. Wayua, S. Mahalingam, S. Poh, S. A. Kularatne, P. S. Low, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1075.
- [71] K. N. Bobba, G. Saranya, P. T. Sujai, M. M. Joseph, N. Velusamy, A. Podder, K. K. Maiti, S. Bhuniya, *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 1322.
- [72] K. Tiensomjit, R. Noorat, S. Chomngam, K. Wechakorn, S. Prabpai, P. Kanjanasirirat, Y. Pewkliang, S. Borwornpinyo, P. Kongsaree, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *195*, 136.
- [73] Y. Zhang, L. Ma, C. Tang, S. Pan, D. Shi, S. Wang, M. Li, Y. Guo, *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 725.
- [74] G. Hong, A. L. Antaris, H. Dai, *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*, 0010.
- [75] H. Tong, K. Lou, W. Wang, *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 25.
- [76] J. Pliquet, A. Dubois, C. Racœur, N. Mabrouk, S. Amor, R. Lescure, A. Bettaïeb, B. Collin, C. Bernhard, F. Denat, et al., *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 1061.
- [77] C. Shi, J. B. Wu, D. Pan, *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 050901.
- [78] T. Skotland, *Contrast Media Mol. Imaging* **2012**, *7*, 1.
- [79] U. Seibold, B. Wängler, R. Schirrmacher, C. Wängler, *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1.
- [80] F.-F. An, M. Chan, H. Kommidi, R. Ting, *Am. J. Roentgenol.* **2016**, *207*, 266.
- [81] Y. Li, D. Li, K. Jian, X. Mei, G. Wang, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2019**, *15*, 85.
- [82] H. Wang, H. Wu, H. Shen, S. Geng, B. Wang, Y. Wang, X. Ma, G. Li, M. Tan, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 8832.
- [83] J. Domey, C. Bergemann, S. Bremer-Streck, I. Krumbein, J. R. Reichenbach, U. Teichgräber, I. Hilger, *Nanotoxicology* **2015**, *1*.
- [84] H. Hu, Y. Zhang, S. Shukla, Y. Gu, X. Yu, N. F. Steinmetz, *ACS Nano* **2017**, *11*, 9249.
- [85] Q. Wang, H. Yan, Y. Jin, Z. Wang, W. Huang, J. Qiu, F. Kang, K. Wang, X. Zhao, J. Tian, *Biomaterials* **2018**, *183*, 173.
- [86] G. Thomas, J. Boudon, L. Maurizi, M. Moreau, P. Walker, I. Severin, A. Oudot, C. Goze, S. Poty, J.-M. Vrigneaud, et al., *ACS Omega* **2019**, *4*, 2637.
- [87] H. Deng, H. Wang, M. Wang, Z. Li, Z. Wu, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3054.
- [88] O. Morris, M. Fairclough, J. Grigg, C. Prenant, A. McMahon, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2019**, *62*, 4.

- [89] M. Nieberler, U. Reuning, H. Kessler, F. Reichart, G. Weirich, K.-D. Wolff, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2018**, *56*, 972.
- [90] O. Morris, M. A. Elsayy, M. Fairclough, K. J. Williams, A. McMahon, J. Grigg, D. Forster, A. F. Miller, A. Saiani, C. Prenant, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2017**, *60*, 481.
- [91] N. Maindron, M. Ipuay, C. Bernhard, D. Lhenry, M. Moreau, S. Carne, A. Oudot, B. Collin, J.-M. Vrigneaud, P. Provent, et al., *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 12670.
- [92] A. Paulus, P. Desai, B. Carney, G. Carlucci, T. Reiner, C. Brand, W. A. Weber, *EJNMMI Res.* **2015**, *5*, DOI 10.1186/s13550-015-0120-4.
- [93] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136.
- [94] J. Rafferty, H. Nagaraj, A. P. McCloskey, R. Huwaitat, S. Porter, A. Albadr, G. Laverty, *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 4231.
- [95] K. Fosgerau, T. Hoffmann, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 122.
- [96] C. L. Charron, A. L. Farnsworth, P. D. Roselt, R. J. Hicks, C. A. Hutton, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4119.
- [97] M. Fani, H. R. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 11.
- [98] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30.
- [99] R. J. D. Hatley, S. J. F. Macdonald, R. J. Slack, J. Le, S. B. Ludbrook, P. T. Lukey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3298.
- [100] A. Duro-Castano, E. Gallon, C. Decker, M. J. Vicent, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *119*, 101.
- [101] F. C. Gaertner, H. Kessler, H.-J. Wester, M. Schwaiger, A. J. Beer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 126.
- [102] D. B. Pike, H. Ghandehari, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 167.
- [103] S. Fu, X. Xu, Y. Ma, S. Zhang, S. Zhang, *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 1.
- [104] Q. Fu, Y. Zhao, Z. Yang, Q. Yue, W. Xiao, Y. Chen, Y. Yang, L. Guo, Y. Wu, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2019**, *352*, 1800219.
- [105] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785.
- [106] S. Goswami, *Adv. Biol. Chem.* **2013**, *03*, 224.
- [107] Y. Cao, J. Arbiser, R. J. D'Amato, P. A. D'Amore, D. E. Ingber, R. Kerbel, M. Klagsbrun, S. Lim, M. A. Moses, B. Zetter, et al., *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 114rv3.
- [108] T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Zarka, U. Reuning, J. Notni, H.-J. Wester, C. Mas-Moruno, et al., *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39805.
- [109] S. Raab-Westphal, J. Marshall, S. Goodman, *Cancers* **2017**, *9*, 110.
- [110] F. Demircioglu, K. Hodivala-Dilke, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2016**, *42*, 121.
- [111] M. Nieberler, U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H.-J. Wester, M. Schwaiger, M. Weinmüller, A. Räder, K. Steiger, H. Kessler, *Cancers* **2017**, *9*, 116.
- [112] R. Haubner, B. Kuhnast, C. Mang, W. A. Weber, H. Kessler, H.-J. Wester, M. Schwaiger, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 61.
- [113] C. Vala, F. Chrétien, E. Balentova, S. Lamandé-Langle, Y. Chapleur, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 17.
- [114] T. N. Durrant, M. T. van den Bosch, I. Hers, *Blood* **2017**, blood.
- [115] K. P. Fong, H. Zhu, L. M. Span, D. T. Moore, K. Yoon, R. Tamura, H. Yin, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 11706.
- [116] H. Deckmyn, S. F. De Meyer, K. Broos, K. Vanhoorelbeke, in *Antiplatelet Agents* (Eds: P. Gresele, G. V. R. Born, C. Patrono, C. P. Page), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**, pp. 311–337.

- [117] S. Lamandé-Langle, C. Collet, R. Hensienne, C. Vala, F. Chrétien, Y. Chapleur, A. Mohamadi, P. Lacolley, V. Regnault, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6672.
- [118] Y. Zhou, S. Chakraborty, S. Liu, *Theranostics* **2011**, *1*, 58.
- [119] H. Chen, G. Niu, H. Wu, X. Chen, *Theranostics* **2016**, *6*, 78.
- [120] J. Seemann, B. Waldron, D. Parker, F. Roesch, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2017**, *1*, 4.
- [121] L. Allott, C. Barnes, D. Brickute, E. O. Aboagye, *React. Chem. Eng.* **2019**, *4*, 569.
- [122] N. Oshima, H. Akizawa, H. Kitaura, H. Kawashima, S. Zhao, Y. Zhao, K. Nishijima, Y. Kitamura, Y. Arano, Y. Kuge, et al., *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *54*, 18.
- [123] N. Oshima, H. Akizawa, H. Kawashima, S. Zhao, Y. Zhao, K.-I. Nishijima, Y. Kitamura, Y. Arano, Y. Kuge, K. Ohkura, *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *48*, 16.
- [124] L. Jönsson, A. Stenvall, E. Mattsson, E. Larsson, A. Sundlöv, T. Ohlsson, C. Hindorf, *EJNMMI Phys.* **2018**, *5*, 5.
- [125] M. Tesson, R. Vasan, A. Hock, C. Nixon, C. Rae, M. Gaze, R. Mairs, *Oncotarget* **2018**, *9*, 29082.
- [126] N. Mansour, M. Paquette, S. Ait-Mohand, V. Dumulon-Perreault, B. Guérin, *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *56*, 31.
- [127] L. Baratto, H. Jadvar, A. Iagaru, *Mol. Imaging Biol.* **2018**, *20*, 501.
- [128] S. Richter, M. Wuest, C. N. Bergman, S. Krieger, B. E. Rogers, F. Wuest, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1347.
- [129] S. Cheng, L. Lang, Z. Wang, O. Jacobson, B. Yung, G. Zhu, D. Gu, Y. Ma, X. Zhu, G. Niu, et al., *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 410.
- [130] M. Hajiramezanali, F. Atyabi, M. Mosayebnia, M. Akhlaghi, P. Geramifar, A. R. Jalilian, S. M. Mazidi, H. Yousefnia, S. Shahhosseini, D. Beiki, *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *Volume 14*, 2591.
- [131] G. Treglia, S. Annunziata, D. A. Pizzuto, L. Giovanella, J. O. Prior, L. Ceriani, *Cancers* **2019**, *11*, 710.
- [132] F. C. Maier, A.-M. Wild, N. Kirchen, F. Holm, K. Fuchs, J. Schwenck, A. Maurer, S. Wiehr, *Appl. Radiat. Isot.* **2019**, *143*, 149.
- [133] F. Ceci, P. Castellucci, T. Graziani, A. Farolfi, C. Fonti, F. Lodi, S. Fanti, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46*, 31.
- [134] R. Pereira Mestre, G. Treglia, M. Ferrari, M. Pascale, C. Mazzara, N. C. Azinwi, A. Llado', A. Stathis, L. Giovanella, E. Roggero, *Eur. J. Clin. Invest.* **2019**, *49*, e13063.
- [135] F. Bertagna, D. Albano, L. Giovanella, M. Bonacina, R. Durmo, R. Giubbini, G. Treglia, *Hormones* **2019**, *18*, 145.
- [136] C. Bluemel, M. Krebs, B. Polat, F. Linke, M. Eiber, S. Samnick, C. Lapa, M. Lassmann, H. Riedmiller, J. Czernin, et al., *Clin. Nucl. Med.* **2016**, *41*, 515.
- [137] P. A. Knetsch, M. Petrik, C. Rangger, G. Seidel, H.-J. Pietzsch, I. Virgolini, C. Decristoforo, R. Haubner, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 65.
- [138] Y. -i. Kim, J. H. Phi, J. C. Paeng, H. Choi, S.-K. Kim, Y.-S. Lee, K. W. Kang, J. Y. Lee, J. M. Jeong, J.-K. Chung, et al., *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 1467.
- [139] R. Haubner, A. Finkenstedt, A. Stegmayr, C. Rangger, C. Decristoforo, H. Zoller, I. J. Virgolini, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 2005.
- [140] D. Satpati, R. Sharma, C. Kumar, H. D. Sarma, A. Dash, *MedChemComm* **2017**, *8*, 673.
- [141] C. Provost, A. Prignon, L. Rozenblum-Beddok, Q. Bruyer, S. Dumont, F. Merabtene, V. Nataf, C. Bouteiller, J.-N. Talbot, *Oncotarget* **2018**, *9*, 19307.
- [142] C. Zhai, G. M. Franssen, M. Petrik, P. Laverman, D. Summer, C. Rangger, R. Haubner, H. Haas, C. Decristoforo, *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18*, 758.
- [143] S. Chakraborty, J. Shi, Y.-S. Kim, Y. Zhou, B. Jia, F. Wang, S. Liu, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 969.

- [144] S. Chakraborty, R. Chakravarty, R. Vatsa, P. Bhusari, H. D. Sarma, J. Shukla, B. R. Mittal, A. Dash, *Nucl. Med. Biol.* **2016**, *43*, 116.
- [145] S. Sarkar, N. Bhatt, Y. S. Ha, P. T. Huynh, N. Soni, W. Lee, Y. J. Lee, J. Y. Kim, D. N. Pandya, G. I. An, et al., *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 385.
- [146] D. N. Pandya, N. Bhatt, G. I. An, Y. S. Ha, N. Soni, H. Lee, Y. J. Lee, J. Y. Kim, W. Lee, H. Ahn, et al., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7234.
- [147] E. Lucente, H. Liu, Y. Liu, X. Hu, E. Lacivita, M. Leopoldo, Z. Cheng, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1595.
- [148] J.-A. Park, Y. J. Lee, J. W. Lee, K. C. Lee, G. il An, K. M. Kim, B. il Kim, T.-J. Kim, J. Y. Kim, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 979.
- [149] D. T. T. Yapp, C. L. Ferreira, R. K. Gill, E. Boros, M. Q. Wong, D. Mandel, P. Jurek, G. E. Kiefer, *Mol. Imaging* **2013**, *12*, 7290.2012.00044.
- [150] K. Durkan, Z. Jiang, T. L. Rold, G. L. Sieckman, T. J. Hoffman, R. P. Bandari, A. F. Szczodroski, L. Liu, Y. Miao, T. S. Reynolds, et al., *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41*, 133.
- [151] A. B. Jackson, P. K. Nanda, T. L. Rold, G. L. Sieckman, A. F. Szczodroski, T. J. Hoffman, X. Chen, C. J. Smith, *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39*, 377.
- [152] O. Jacobson, L. Zhu, G. Niu, I. D. Weiss, L. P. Szajek, Y. Ma, X. Sun, Y. Yan, D. O. Kiesewetter, S. Liu, et al., *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **2011**, *13*, 1224.
- [153] S. Okarvi, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 929.
- [154] R. Schirmacher, C. Wangler, E. Schirmacher, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2007**, *4*, 317.
- [155] V. Bernard-Gauthier, M. L. Lepage, B. Waengler, J. J. Bailey, S. H. Liang, D. M. Perrin, N. Vasdev, R. Schirmacher, *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 568.
- [156] E. Schirmacher, B. Wängler, M. Cypryk, G. Bradtmöller, M. Schäfer, M. Eisenhut, K. Jurkschat, R. Schirmacher, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 2085.
- [157] P. Johnström, J. C. Clark, J. D. Pickard, A. P. Davenport, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 725.
- [158] E. Hedberg, B. Langström, *Acta Chem. Scand.* **1998**, 1034.
- [159] O. Morris, J. Gregory, M. Kadirvel, F. Henderson, A. Blykers, A. McMahon, M. Taylor, D. Allsop, S. Allan, J. Grigg, et al., *Appl. Radiat. Isot.* **2016**, *116*, 120.
- [160] T. Poethko, M. Schottelius, G. Thumshirn, M. Herz, R. Haubner, G. Henriksen, H. Kessler, M. Schwaiger, H.-J. Wester, *Radiochim. Acta* **2004**, *92*, 317.
- [161] Y.-S. Lee, J. M. Jeong, H. W. Kim, Y. S. Chang, Y. J. Kim, M. K. Hong, G. B. Rai, D. Y. Chi, W. J. Kang, J. H. Kang, et al., *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33*, 677.
- [162] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523.
- [163] W. Cai, X. Zhang, Y. Wu, X. Chen, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1172.
- [164] J. Langenhan, J. Thorson, *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59.
- [165] F. Chen, E. B. Ehlerding, W. Cai, *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 1919.
- [166] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457.
- [167] C. Collet, F. Maskali, A. Clément, F. Chrétien, S. Poussier, G. Karcher, P.-Y. Marie, Y. Chapleur, S. Lamandé-Langle, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2016**, *59*, 54.
- [168] H. L. Kim, K. Sachin, H. J. Jeong, W. Choi, H. S. Lee, D. W. Kim, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 402.
- [169] E. J. Kelihher, J. A. Klubnick, T. Reiner, R. Mazitschek, R. Weissleder, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1368.
- [170] M. M. Fowkes, T. Lalonde, L. Yu, S. Dhanvantari, M. S. Kovacs, L. G. Luyt, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 1500.
- [171] V. Bouvet, M. Wuest, J. J. Bailey, C. Bergman, N. Janzen, J. F. Valliant, F. Wuest, *Mol. Imaging Biol.* **2017**, *19*, 923.

- [172] T. E. Jeppesen, L. K. Kristensen, C. H. Nielsen, L. C. Petersen, J. B. Kristensen, C. Behrens, J. Madsen, A. Kjaer, *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 775.
- [173] A. Perreault, J. C. Knight, M. Wang, J. Way, F. Wuest, *Amino Acids* **2016**, *48*, 65.
- [174] M. Roche, S. Specklin, M. Richard, F. Hinnen, K. Génarmont, B. Kuhnast, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2019**, *62*, 95.
- [175] B. M. Dunn, Ed., *Peptide Chemistry and Drug Design*, Wiley, Hoboken, New Jersey, **2015**.
- [176] S. V. Moradi, W. M. Hussein, P. Varamini, P. Simerska, I. Toth, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2492.
- [177] R. Haubner, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, **2001**, 6.
- [178] O. Prante, J. Einsiedel, R. Haubner, P. Gmeiner, H.-J. Wester, T. Kuwert, S. Maschauer, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 254.
- [179] S. Maschauer, O. Prante, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 753.
- [180] S. Maschauer, J. Einsiedel, R. Haubner, C. Hocke, M. Ocker, H. Hübner, T. Kuwert, P. Gmeiner, O. Prante, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 976.
- [181] S. Maschauer, R. Haubner, T. Kuwert, O. Prante, *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 505.
- [182] J. Toms, V. Reshetnikov, S. Maschauer, A. Mokhir, O. Prante, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2018**, *61*, 1081.
- [183] Y. Chapleur, S. Lamandé-Langle, C. Collet, F. Chrétien, **2014**.
- [184] L. Zhu, N. Guo, Q. Li, Y. Ma, O. Jacobson, S. Lee, H. S. Choi, J. R. Mansfield, G. Niu, X. Chen, *Theranostics* **2012**, *2*, 746.
- [185] C. Brand, D. Abdel-Atti, Y. Zhang, S. Carlin, S. M. Clardy, E. J. Keliher, W. A. Weber, J. S. Lewis, T. Reiner, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1323.
- [186] R. Ting, T. A. Aguilera, J. L. Crisp, D. J. Hall, W. C. Eckelman, D. R. Vera, R. Y. Tsien, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1811.
- [187] S. Niu, C. Massif, G. Ulrich, P.-Y. Renard, A. Romieu, R. Ziessel, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 7229.
- [188] G. Carlucci, B. Carney, C. Brand, S. Kossatz, C. P. Irwin, S. D. Carlin, E. J. Keliher, W. Weber, T. Reiner, *Mol. Imaging Biol.* **2015**, *17*, 848.
- [189] F.-F. An, H. Kommidi, N. Chen, R. Ting, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1214.
- [190] A. Damont, R. Boisgard, F. Dollé, M. Hollocou, B. Kuhnast, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 2524.
- [191] E. A. Rodriguez, Y. Wang, J. L. Crisp, D. R. Vera, R. Y. Tsien, R. Ting, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 1390.
- [192] T. Priem, C. Bouteiller, D. Camporese, X. Brune, J. Hardouin, A. Romieu, P.-Y. Renard, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 469.
- [193] T. Vucko, N. Pétry, F. Dehez, A. Lambert, A. Monari, C. Lakomy, P. Lacolley, V. Regnault, C. Collet, G. Karcher, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 4101.
- [194] A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4395.
- [195] D. Koester, A. Holkenbrink, D. Werz, *Synthesis* **2010**, *2010*, 3217.
- [196] E. Leclerc, X. Pannecoucke, M. Ethève-Quellejeu, M. Sollogoub, *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 4270.
- [197] Y. Yang, B. Yu, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12281.
- [198] D. E. Levy, P. Fügedi, *Strategies towards C-Glycosides*, **2006**.
- [199] H. Liao, J. Ma, H. Yao, X.-W. Liu, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1791.
- [200] M. D. Lewis, J. K. Cha, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4976.
- [201] K. Misawa, Y. Takahashi, S. Sato, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2013**, *61*, 776.
- [202] C. Wiebe, S. Fusté de la Sotilla, T. Opatz, *Synthesis* **2012**, 1385.
- [203] H. Ishida, T. Wakimoto, Y. Kitao, S. Tanaka, T. Miyase, H. Nukaya, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6779.

- [204] Y. Koyama, R. Yamaguchi, K. Suzuki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1084.
- [205] G. Li, D.-C. Xiong, X.-S. Ye, *Synlett* **2011**, 2410.
- [206] F. W. Lichtenthaler, M. Lergenmüller, S. Schwidetzky, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 3094.
- [207] J. Hartung, B. J. D. Wright, S. J. Danishefsky, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 8731.
- [208] H. Gong, R. Sinisi, M. R. Gagné, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1908.
- [209] Z. Juhász, K. Micskei, E. Gál, L. Somsák, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7351.
- [210] N. Pellegrini-Moïse, M. Richard, Y. Chapleur, in *Carbohydr. Chem.* (Eds: A. Pilar Rauter, T. Lindhorst, Y. Queneau), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2014**, pp. 99–117.
- [211] Z. Han, M. C. Achilonu, P. S. Kendrekar, E. Joubert, D. Ferreira, S. L. Bonnet, J. H. van der Westhuizen, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 583.
- [212] V. N. Thota, J. Gervay-Hague, S. S. Kulkarni, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8132.
- [213] N. Petry, T. Vucko, C. Collet, S. Lamandé-Langle, N. Pellegrini-Moïse, F. Chrétien, *Carbohydr. Res.* **2017**, *445*, 61.
- [214] E. Brenna, C. Fuganti, P. Grasselli, S. Serra, S. Zambotti, *Chem Eur J* **2002**, *8*, 1872 ± 1878.
- [215] C. Bertozzi, M. Bednarski, *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 243.
- [216] T. Kamada, G. Qing, M. Abe, A. Oku, *J Chem Soc Perkin Trans I* **1995**, 413.
- [217] A. M. Horneman, I. Lundt, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 1.
- [218] J. Zhang, J. C. Garrison, L. Y. Poluektova, T. K. Bronich, N. A. Osa, *Biomaterials* **2015**, *70*, 37.
- [219] T. Eguchi, S. Sasaki, Z. Huang, K. Kakinuma, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3979.
- [220] M. Bessodes, D. Komiotis, K. Antonakis, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 579.
- [221] A. Miyagawa, R. Tomita, K. Kurimoto, H. Yamamura, *Synth. Commun.* **2016**, *46*, 556.
- [222] G. Lowe, F. McPhee, *J. Chem. Soc. Perkin I* **1991**, 1249.
- [223] G. Zemplén, E. Pacsu, *Verseifung Acetylierter Zucker* **1929**, 1613.
- [224] M. Lo Conte, S. Pacifico, A. Chambery, A. Marra, A. Dondoni, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4644.
- [225] H. H. Versteeg, J. W. M. Heemskerk, M. Levi, P. H. Reitsma, *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 327.
- [226] P. Lacolley, V. Regnault, P. Segers, S. Laurent, *Physiol. Rev.* **2017**, *97*, 1555.
- [227] E. Moiseeva, *Cardiovasc. Res.* **2001**, *52*, 372.
- [228] J.-P. Xiong, *Science* **2002**, *296*, 151.
- [229] M. B. Haskali, P. D. Roselt, R. J. Hicks, C. A. Hutton, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2018**, *61*, 61.
- [230] A. C. Valdivia, M. Estrada, T. Hadizad, D. J. Stewart, R. S. Beanlands, J. N. DaSilva, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2012**, *55*, 57.
- [231] R. A. Davis, C. Drake, R. C. Ippisch, M. Moore, J. L. Sutcliffe, *RSC Adv.* **2019**, *9*, 8638.
- [232] D. Thonon, D. Goblet, E. Goukens, G. Kaisin, J. Paris, J. Aerts, S. Lignon, X. Franci, R. Hustinx, A. Luxen, *Mol. Imaging Biol.* **2011**, *13*, 1088.
- [233] K. Pohle, J. Notni, J. Bussemer, H. Kessler, M. Schwaiger, A. J. Beer, *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39*, 777.
- [234] M. E. Jung, W.-J. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 92.
- [235] M. Gerowska, L. Hall, J. Richardson, M. Shelbourne, T. Brown, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 857.
- [236] G. A. Korbel, G. Lalic, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 361.
- [237] B. K. Gadakh, P. R. Patil, S. Malik, K. P. R. Kartha, *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 2430.
- [238] N. Moitessier, P. Englebienne, Y. Chapleur, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6839.

- [239] J. Lawandi, S. Rocheleau, N. Moitessier, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 6283.
- [240] D. B. Bigley, M. J. Clarke, **1982**.
- [241] Y. Zhou, J. Li, Y. Zhan, Z. Pei, H. Dong, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2693.
- [242] M. Giordano, A. Iadonisi, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 213.
- [243] J. G. Buchanan, R. M. Saunders, **1964**.
- [244] E. S. H. El Ashry, Y. El Kilany, A. Moussad, **1988**.
- [245] H. B. J. Wood, H. W. Diehl, G. F. J. Hewitt, **1986**.
- [246] N. Goyal, S. Cheuk, G. Wang, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5962.
- [247] R. Panchadhayee, A. Kumar Misra, *J. Carbohydr. Chem.* **2008**, *27*, 148.
- [248] R. Eby, K. T. Webster, C. Schuerch, *Carbohydr. Res.* **1984**, *129*, 111.
- [249] A. T. Lonnecker, Y. H. Lim, S. E. Felder, C. J. Besset, K. L. Wooley, *Macromolecules* **2016**, *49*, 7857.
- [250] H. M. I. Osborn, V. A. Brome, L. M. Harwood, W. G. Suthers, *Carbohydr. Res.* **2001**, *10*.
- [251] W. Hakamata, T. Nishio, R. Sato, T. Mochizuki, K. Tsuchiya, M. Yasuda, T. Oku, *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 359.
- [252] H. Xu, Y. Zhang, H. Dong, Y. Lu, Y. Pei, Z. Pei, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 4039.
- [253] D. Wang, X. Li, Y. Bao, J. Liu, X. Zhang, X. Yao, X.-L. Sun, J.-S. Tang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3359.
- [254] S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 643.
- [255] T. Bruce Grindley, in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Elsevier, **1998**, pp. 17–142.
- [256] N. Nagashima, M. Ohno, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1991**, *39*, 1972.
- [257] Samuel. Danishefsky, Randall. Hungate, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2486.
- [258] T. Vucko, N. Pellegrini Moïse, S. Lamandé-Langle, *Carbohydr. Res.* **2019**, *477*, 1.
- [259] X.-B. Meng, H. Li, Q.-H. Lou, M.-S. Cai, Z.-J. Li, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1497.
- [260] L. Bai, X. Zhang, N. Ma, *Chin. J. Chem.* **2014**, *32*, 871.
- [261] K. Daragics, P. Fügedi, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2914.
- [262] K. Daragics, P. Szabó, P. Fügedi, *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1633.
- [263] C.-R. Shie, Z.-H. Tzeng, S. S. Kulkarni, B.-J. Uang, C.-Y. Hsu, S.-C. Hung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1665.
- [264] S. Tani, S. Sawadi, M. Kojima, S. Akai, K. Sato, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3103.
- [265] C. D. Heidecke, T. K. Lindhorst, *Synthesis* **2006**, *2006*, 161.
- [266] W. J. Smith, N. P. Oien, R. M. Hughes, C. M. Marvin, Z. L. Rodgers, J. Lee, D. S. Lawrence, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10945.
- [267] S. Salamone, C. Colin, I. Grillier-Vuissoz, S. Kuntz, S. Mazerbourg, S. Flament, H. Martin, L. Richert, Y. Chapleur, M. Boisbrun, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 206.
- [268] Y. Guan, Y. Zhang, L. Xiao, J. Li, J. Wang, M. D. Chordia, Z.-Q. Liu, L. W. K. Chung, W. Yue, D. Pan, *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 1.
- [269] S. Passemard, D. Staedler, L. Učňová, G. S. Schneiter, P. Kong, L. Bonacina, L. Juillerat-Jeanerret, S. Gerber-Lemaire, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5006.
- [270] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, et al., *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586.
- [271] A. D. MacKerell, M. Feig, C. L. Brooks, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 698.
- [272] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, et al., *J. Comput. Chem.* **2009**, NA.
- [273] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- [274] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781.
- [275] M. Tuckerman, B. J. Berne, G. J. Martyna, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 1990.

- [276] H. C. Andersen, *J. Comput. Phys.* **1983**, 52, 24.
- [277] G. J. Martyna, D. J. Tobias, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1994**, 101, 4177.
- [278] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor, B. R. Brooks, *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, 4613.
- [279] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 10089.

ABSTRACT

The work developed in this thesis is based on saccharidic derivatives especially C-glycosides for which new synthetic methodologies and applications in the field of PET and PET/NIRF imaging have been developed. Some peptides play a major role in therapy and diagnosis of various pathologies and their conjugation with a saccharidic derivative significantly improves their biodistribution.

The first part of this work concerns the synthesis of fluorinated (^{19}F) and radiofluorinated (^{18}F) C-glycosides functionalized in anomeric position by an arm bearing an azide function. These compounds were coupled by 1,3-dipolar cycloaddition to peptides derived from RGD, allowing the labeling of these peptides by an indirect method namely prosthetic strategy. The radiosynthesis of one radiotracer was fully automated. The *in vitro* biological evaluation on two types of integrins and *in vivo* by PET imaging showed the interest of these radiotracers in the field of oncology.

The second part is closely linked to these first results. To go further in terms of diagnostic tools, dual (radio)fluorinated probes for bimodal PET/NIRF imaging were developed. This required an elaborated synthetic strategy to introduce a fluorine atom and a cyanine dye, both being PET and NIRF specific imaging probes. The coupling of a biomolecule (RGD peptide) was also performed by "Click" reaction. Regiocontrolled functionalization methods enabled the introduction of these various moieties. The perspective is to evaluate the *in vitro* biological properties of the synthesized tools and to consider this dual probe for diagnostic and theranostic applications in PET/NIRF imaging.

Keywords: C-glycosides, glycopeptides, fluorine-18, cyanine, PET and PET/NIRF imaging

RESUME

Les travaux développés dans cette thèse s'articulent autour de dérivés saccharidiques de type C-glycosides pour lesquels de nouvelles méthodologies synthétiques ainsi que des applications dans le domaine de l'imagerie TEP et TEP/FPIR ont été développées. Certains peptides possèdent un rôle majeur dans la thérapie et le diagnostic de diverses pathologies et le fait de les conjuguer à un dérivé saccharidique permet d'améliorer significativement leur biodistribution.

La première partie de ce travail concerne la synthèse de C-glycosides fluorés (^{19}F) et radiofluorés (^{18}F) fonctionnalisés en position anomérique par un bras portant une fonction azoture. Par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, ces composés ont été couplés à des peptides dérivés de RGD, permettant ainsi le marquage de ces peptides par une méthode indirecte appelée stratégie prosthétique. La radiosynthèse d'un des radiotraceurs a été menée de manière complètement automatisée et l'évaluation biologique *in vitro* sur deux types d'intégrines et *in vivo* par imagerie TEP a pu mettre en évidence l'intérêt de ces radiotraceurs dans le domaine de l'oncologie.

La seconde partie s'appuie sur ces premiers résultats concernant le développement de groupes prosthétiques saccharidiques pour aller plus loin en termes d'outils de diagnostic. L'objectif a été de mettre au point des sondes duales (radio)fluorées pour l'imagerie bimodale TEP/FPIR. Ceci a nécessité une stratégie synthétique élaborée pour introduire un atome de fluor et un fluorophore de type cyanine, tous deux étant les sondes d'imagerie spécifiques TEP et FPIR. L'accrochage d'une biomolécule (peptide RGD) a pu se faire là encore par réaction "Click". Des méthodes de fonctionnalisation régiosélectives ont permis la mise en place de ces divers éléments. Une perspective à ce travail sera d'évaluer les propriétés biologiques *in vitro* des outils synthétisés et de considérer cette sonde duale pour des applications diagnostique et théranostique en imagerie TEP/FPIR.

Mots-clefs : C-glycosides, glycopeptides, fluor-18, cyanine, imageries TEP et TEP/FPIR