

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
UMR 7200

THÈSE présentée par :
Lucie ESTEOULLE

soutenue le : **05 octobre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/S spécialité : Chimie Thérapeutique

**Développement de conjugués
peptidiques fluorocarbonés pour
augmenter la stabilité plasmatique de
peptides visant des récepteurs couplés
aux protéines G**

THÈSE dirigée par :

M. BONNET Dominique

Docteur, CNRS/Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme AMBLARD Muriel

Docteur, CNRS/Université de Montpellier

M. BOTURYN Didier

Docteur, CNRS/Université de Grenoble

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. KICHLER Antoine

Docteur, CNRS/Université de Strasbourg

Table des matières

Remerciements	9
Liste des abréviations	13
Introduction Générale	15
Contexte et objectifs	15
Contexte	17
1. Les peptides thérapeutiques	17
1.1. Intérêts thérapeutiques des peptides	17
1.2. Limitations de leur utilisation	20
2. Stabilisation des peptides	20
2.1. Stratégies existantes	20
2.2. Renforcement de la stabilité des extrémités du peptide	21
2.3. Substitution des acides amines	21
2.4. Modification de la stéréochimie	22
2.5. Modification du squelette peptidique : pseudopeptides.....	22
2.6. Renforcement de la structure secondaire	24
2.7. Introduction d'une chaîne polymérique sur le peptide.....	25
2.8. Glycosylation.....	27
2.9. Introduction de motifs capables de se lier à l'albumine	28
3. Limitation des techniques de stabilisation existantes	31
Objectifs des travaux de la thèse	33
Chapitre 1	
Développement d'une nouvelle méthode pour augmenter la stabilité plasmatique et l'activité biologique des peptides en utilisant des chaînes fluorocarbonées : Preuve de concept sur l'apeline-17	35
1. Contexte de l'étude	37
1.1. Les chaînes fluorocarbonées.....	37
1.2. Les RCPG, une famille de choix pour le développement de nouveaux médicaments.....	38
1.3. L'apeline-17	39
2. Conception et synthèse de composés fluorocarbonés et hydrocarbonés dérivés de l'apeline-17	42
3. Stabilités plasmatiques des différents dérivés fluoro- et lipoapelines	45

4. Evaluation pharmacologique	47
4.1. Mesure de l'affinité pour le récepteur de l'apeline.....	47
4.2. Evaluation de l'activité fonctionnelle	48
5. Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité pro-inflammatoire.....	49
5.1. Evaluation de la viabilité cellulaire	50
5.2. Evaluation de l'activité pro-inflammatoire.....	51
5.3. Evaluation de l'activité hémolytique	52
6. Evaluation de l'activité biologique <i>in vivo</i>	53
7. Conclusion et perspectives.....	54

Chapitre 2

Conception de sondes fluorescentes pour l'étude des interactions ligand/récepteur et du trafic cellulaire des fluoropeptides	57
1. Introduction à la fluorescence : un outil pour suivre les interactions cellulaires	59
2. Conception, synthèse et évaluation de sondes fluorescentes DY647 dérivées de l'apeline, de la fluoroapeline et de la lipoapeline	60
2.1. Conception et synthèse.....	60
2.2. Evaluation pharmacologique	65
2.3. Caractérisation spectrale des sondes.....	66
2.4. Evaluation <i>in cellulo</i>	67
3. Conclusion et perspectives.....	71

Chapitre 3

Compréhension du mécanisme de stabilisation plasmatique des fluoropeptides.....	73
1. Compréhension du mécanisme de stabilisation des fluoropeptides.....	75
2. Evaluation de l'organisation physico-chimique de la fluoroapeline	75
3. Evaluation de la liaison de la fluoroapeline aux protéines plasmatiques	80
3.1. Affinité de liaison à l'albumine en milieu aqueux	81
3.2. Affinité de la fluoroapeline pour les protéines plasmatiques.....	83
3.3. Impact de la longueur de la F-chaîne sur l'affinité de liaison à l'albumine.....	84
4. Conclusion et perspectives.....	86

Chapitre 4

Extension du concept à d'autres peptides ciblant des RCPG	89
1. Contexte de l'étude	91
2. Extension du concept à l'apeline-13	91
2.1. Conception et synthèse des fluoropeptides.....	93
2.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique.....	95

3. Extension du concept à l'angiotensine II	96
3.1. Conception et synthèse des fluoropeptides.....	98
3.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique.....	99
4. Extension du concept à l'ocytocine	100
4.1. Conception et synthèse des fluoropeptides.....	102
4.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique.....	103
5. Extension du concept à la spexine	104
5.1. Conception et synthèse des fluoropeptides.....	106
5.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique.....	109
5.3. Evaluation des propriétés physico-chimiques	112
5.4. Evaluation de l'activité biologique <i>in vivo</i>	114
6. Conclusion et perspectives	116

Chapitre 5

Conception, synthèse et évaluation de nouvelles sondes fluorescentes « turn-on » pour l'étude *in vivo* des fluoropeptides : preuve de concept sur le récepteur de l'ocytocine

1. Contexte de l'étude	119
1.1. Sondes fluorogènes	119
1.2. Sondes fluorescentes dimériques « turn-on »	120
1.3. Sondes « turn-on » pour l'imagerie <i>in vivo</i> des récepteurs de l'ocytocine	121
2. Conception et synthèse des sondes « turn-on »	121
2.1. Stratégie de synthèse.....	121
2.2. Synthèse et caractérisation de la carbétocine-N ₃	124
2.3. Synthèse et caractérisation des chaînes dimère et monomère.....	125
2.4. Synthèse et caractérisation des sondes fluorogènes visant OTR.....	126
3. Evaluation spectroscopique des propriétés fluorogènes de la pince "turn on"	127
3.1. Etude des propriétés spectrales d'absorption et d'excitation du dimère-Cy5.5 dans l'eau	128
3.2. Etude des spectres d'absorption du monomère et du dimère-Cy5.5 dans différents solvants	129
3.3. Mesure des spectres de fluorescence du monomère et du dimère-Cy5.5 dans différents solvants	131
3.4. Détermination des rendements quantiques et évaluation de l'effet "turn-on"	132
3.5. Evaluation spectroscopique des propriétés fluorogènes de la sonde CBT-dimère-Cy5.5	134
4. Evaluation des propriétés pharmacologiques des sondes dimères et monomères	136
5. Evaluation biologique <i>in cellulo</i> des sondes dimères et monomères par microscopie confocale	138
5.1. Evaluation de la spécificité des sondes pour le récepteur OT	138
5.2. Evaluation de la capacité de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 à faire internaliser le récepteur OT	140
5.3. Evaluation de l'effet « turn-on » <i>in cellulo</i>	141
6. Evaluation biologique <i>in vivo</i> des sondes dimères et monomères	143
7. Conclusion et perspectives	145

Conclusion Générale	149
Experimental Part.....	157
General methods	159
1. Chemical characterization	159
2. General methods for peptides synthesis.....	159
2.1. Reagents.....	159
2.2. General method for automated solid-phase peptide synthesis	160
2.3. General method for peptide elongation with amino acids.....	160
2.4. General method for the acylation of peptides with alkyl or perfluoroalkyl chains.....	161
2.5. General method for peptide acetylation	161
2.6. General method for the monitoring of solid-phase peptide reactions.....	162
2.7. General method for peptide cleavage and deprotection.....	162
2.8. General method for peptide purification	163
Chapter I: Development of a novel method to increase peptides plasma stability and biological activity using fluorocarbon chains: proof of concept on model peptide apelin-17	164
1. Chemical synthesis.....	164
2. Solubility evaluation	167
3. Pharmacological characterization	167
3.1. Membrane preparations and radioligand binding experiments	167
3.2. cAMP assay	168
3.3. Plasmatic stability assay	168
4. Toxicological evaluation	169
4.1. Cell culture	169
4.2. Cell viability assays	169
4.3. Assessment of TNF- α production.....	170
4.4. Hemolysis experiments.....	170
5. <i>In vivo</i> evaluation	171
5.1. Animals.....	171
5.2. Blood pressure recording in alert rats.....	171
Chapter II: Synthesis of fluorescent probes for the study of ligand/receptor interaction and intracellular trafficking of fluoropeptides	172
1. Chemical synthesis.....	172
2. Pharmacological characterization: Radioligand binding experiments	178
3. Fluorescence spectroscopy and microscopy.....	179
3.1. Absorbance and fluorescence spectroscopy studies	179
3.2. Fluorescence experiments	179

3.3. Flow cytometry assay.....	180
Chapter III: Understand the mechanism of plasma stability of fluoropeptides.....	181
1. Chemical synthesis.....	181
2. Physico-chemical characterization	182
2.1. Evaluation of the Critical Aggregation Concentration (CAC).....	182
2.2. Dynamic Light Scattering measurement.....	183
3. Fluorescence polarization albumin binding assay	183
Chapter IV: Extension of the concept to other peptides targeting GPCRs	185
1. Chemical synthesis.....	185
2. Solubility evaluation	195
3. Pharmacological characterization	196
3.1. Agonist activity of fluoroapelin-13 compounds	196
3.2. Agonist activity of fluoroangiotensin II	197
3.3. Agonist activity of fluoroxytocin.....	197
3.4. Agonist activity of fluorospexin compounds.....	198
4. Plasmatic stability assay	198
4.1. Human plasma stability of fluoroapelin-13 compounds, fluoroangiotensin and fluoroxytocin.....	198
4.2. Mouse serum stability of fluorospexin compounds.....	199
5. Physico-chemical characterization	199
5.1. Evaluation of the Critical Aggregation Concentration (CAC).....	199
5.2. Dynamic Light Scattering measurements.....	200
6. <i>In vivo</i> evaluation of fluorospexin compounds	200
6.1. Animals.....	200
6.2. Tail immersion test	201
Chapter V: Design, synthesis and evaluation of novel “turn-on” fluorescent probes for the <i>in vivo</i> studies of fluoropeptides: proof of concept on oxytocin receptor	202
1. Chemical synthesis.....	202
2. Pharmacological characterization	209
3. Fluorescence spectroscopy and microscopy.....	210
3.1. Absorption and fluorescence spectroscopy studies	210
3.2. Fluorescence confocal microscopy experiments.....	210
4. <i>In vivo</i> evaluation	211
4.1. Animals.....	211
4.2. <i>In vivo</i> fluorescence biodistribution	211
Bibliographie	213

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200) dans l'équipe de Chimie et Biologie Intégrative sous la direction du Dr. Dominique Bonnet et financés par une allocation du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. Je tiens à remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ce travail de thèse et qui ont rendu la vie au laboratoire si agréable.

Au terme de ce travail de thèse, je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr. Dominique Bonnet, pour m'avoir confié un sujet si riche et pluridisciplinaire ainsi que pour son précieux encadrement et la confiance qu'il m'a accordés tout au long de mes travaux de thèse.

Je remercie également vivement les membres du jury. Je suis très reconnaissante envers le Dr. Muriel Amblard, Directeur de Recherches au CNRS (Université de Montpellier), et envers le Dr Didier Boturyn, Directeur de Recherches au CNRS (Université Grenoble Alpes), d'avoir accepté le rôle de rapporteur et d'avoir accordé un temps précieux à ce manuscrit. Je tiens également à remercier le Dr. Antoine Kichler, Directeur de Recherche (Université de Strasbourg), pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de juger ce travail.

Je remercie bien évidemment du fond du cœur tous les membres de mon équipe. Vous avez été ma plus grande source de motivation au quotidien. Merci pour tous vos conseils, votre disponibilité, votre gentillesse et tous ces petits moments de complicité que nous avons partagés. Vous êtes vraiment une équipe en or. Merci Stéphanie, Claire, Sridévi, Fabien, Iuliia et Hanna. Je compte également parmi l'équipe les anciens qui ont tellement contribué à mon bonheur et sont devenus des amis précieux : merci FloFlo, Pimousse, Damien et Pedrino.

Je tiens à faire un immense remerciement tout particulier pour ma Stephou. Ma Steph, tu le sais, tu as été au cours de ces trois années de thèse ma deuxième maman, celle qui m'a accompagné chaque jour, dans les moindres instants. C'est toi qui m'as tout appris ! Tu as vraiment été mon modèle dans la manière de travailler au quotidien et mon petit rayon de soleil avec toute la bonne humeur que tu dégages. Merci infiniment d'avoir débordé de

gentillesse, de soutien et de joie envers moi. Tu n'imagines pas à quel point tu vas terriblement me manquer...

Sri, ma co-thésarde, ma Tac, ma sœur de cœur... Que dire à part : ton arrivée au laboratoire a changé ma vie ! Tu as été bien plus qu'une partenaire au cours de cette année. Tu as été d'un soutien inébranlable, d'une tendresse infinie, ma bouffée de bonheur au quotidien. Je te remercie du fond du cœur d'avoir choisi ce laboratoire car tu fus ma « plus belle rencontre de l'année ». Heureusement que je sais que notre aventure continuera longtemps, avec tous plein de projets (Tic and Tac peptides notamment...). Merci ma Tac, ce fut une année exceptionnellement hors du commun à tes côtés, elle restera pour toujours gravée dans mon cœur.

Je remercie bien évidemment mes trois acolytes de thèse qui ont été présents du début à la fin : Laure, Laura et Nico. Vous avez rempli ces trois années de thèse de moments tellement forts. Weekends, vacances, soirées, soutiens, rires, pleures. On en aura traversé des épreuves tous ensemble. Merci infiniment pour tous ces moments et souvenirs inoubliables qui ont su être un échappatoire indispensable à mon équilibre lors de cette thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Marcel Hibert pour son soutien inestimable, sa bonne humeur contagieuse et sa grande disponibilité. Je garderai précieusement le collier que tu m'as confectionné comme source de motivation immense de toute la créativité que tu dégages.

Je tiens également à effectuer un immense merci au Dr. Andrey Klymchenko pour son précieux soutien au cours de ces trois années. Merci pour tout ce que tu m'as transmis, que ce soit aussi bien au niveau des connaissances et compétences scientifiques que pour tous les moments de rires ou d'encouragements.

Un énorme merci à tous les membres de la plateforme PCBIS avec qui j'ai eu l'immense plaisir de travailler. Merci Patrick, Sarah, Romain, Sophie, Christel et Pascal. Les expériences chez vous étaient de purs moments de bonheur. Merci pour votre aide si précieuse dans l'avancée de mes travaux et pour avoir toujours témoigné une si grande gentillesse envers moi. Vous être une plateforme en or.

Je remercie également l'ensemble de mes collaborateurs biologiques du Collège de France (Paris), notamment le Dr. Catherine Llorens Cortès, pour avoir travaillé à nos côtés sur le projet et effectué l'ensemble des tests biologiques sur l'apeline-17. Vous avez tous réalisé un travail remarquable et permis au projet de prendre une dimension thérapeutique très importante. Merci énormément à Catherine, Adrien, Xavier, Rodrigo et Cynthia.

Je souhaite aussi exprimer toute ma reconnaissance à l'équipe du laboratoire CAMB (Strasbourg). Merci à Cendrine, Sylvie, Béatrice, Benoît et Alexandre. J'ai pu, grâce à vous, me former à toute la partie biologique de ma thèse. Vous m'avez énormément appris. Merci énormément pour votre aide et l'ensemble de tous vos précieux conseils.

Je tiens à remercier également chaleureusement les collaborateurs biologiques sur le projet spexine, à l'ESBS (Strasbourg), notamment le Dr. Frédérique Simonin. Cette collaboration aura permis d'obtenir des résultats thérapeutiques très prometteurs dans le domaine du traitement de la douleur. Un immense merci à Glenn et Valérie d'avoir réalisé l'ensemble des tests biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Je n'oublie pas bien évidemment toutes les personnes extraordinaires que j'ai eu la chance de côtoyer au sein de ces trois années de thèse, notamment l'ensemble de l'aquarium avec qui j'ai pu manger le midi et échanger de précieux moments de bonheur : merci Séverine, Patrick, David, Malik, Yann, Qian, Momo, Marie, Philippe et tous les autres. Merci également à tous ceux que je croisais au quotidien et avec qui j'ai pu lier de si belles amitiés, vous avez vraiment rendus l'ensemble de ces années tellement plus belles. Merci Doriane, Laurie, Mickael, Juline, Kate et Boris.

J'ai également une très belle pensée pour toute mon équipe de foot, Fabien, Guilhem, Mickael, Momo, Nicolas, Laure et Laurie, vous avez été une équipe inoubliable, j'attendais chaque mercredi soir avec tellement d'impatience. Merci pour tous nos fous-rires et entraînements qui m'ont fait un bien immense.

Je souhaite aussi exprimer mes profonds remerciements à toute l'équipe pédagogique de toxicologie. Merci du fond du cœur Anne, Françoise et Carole pour m'avoir transmis votre passion de l'enseignement et pour toute la confiance que vous m'avez témoignée au cours des séances. J'ai découvert, grâce à vous, une passion que j'ignorais. Merci pour ce cadeau inestimable.

Pour finir, je souhaite bien évidemment remercier infiniment ma famille, pour m'avoir soutenue au cours de l'ensemble de ces huit ans d'études. Vous avez été ma force au quotidien, c'est vous qui avez rendu tout cela possible. Merci pour votre confiance, pour votre soutien, pour votre réconfort et pour tout l'amour que vous m'avez témoigné. Vous m'avez rendu tellement plus grande et plus forte. Merci Maman. Merci Papa. Merci Thomas. Merci Théo. Merci Piou. Merci Papy. Merci Mamie. Merci Séverine. Merci Paul. Merci Mimi. Merci Sébastien.

Liste des abréviations

ACE – angiotensin-converting enzyme	GALR1, 2 et 3 – récepteurs de la galanine 1, 2 et 3
AMPC – adénosine monophosphate cyclique	GFP – green fluorescent protein
Ang – angiotensine	HATU – <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium
APJ / ApelinR – récepteur de l'apéline	HBTU – <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium hexafluorophosphate
AT1 et 2 – récepteurs de l'angiotensine 1 et 2	HEK – human embryonic kidney
Boc – <i>tert</i> -butyloxycarbonyl	HOBt – 1-hydroxybenzotriazole hydrate
BSA – bovine serum albumin	HPLC – high-performance liquid chromatography
CAC – concentration d'agrégation critique	HRMS – high-resolution mass spectroscopy
cAMP – cyclic adenosine monophosphate	HSA – human serum albumin
CBT – carbétocine	K17F – apeline-17
CE ₅₀ – concentration effectrice médiane	K _d – constante de dissociation / dissociation constant
CHO – chinese hamster ovary	K _i – constante d'inhibition / inhibition constant
CI ₅₀ – concentration d'inhibition médiane	MeCN – acetonitrile
CLHP – chromatographie liquide à haute performance	MeOH - methanol
CMC – concentration micellaire critique	Mmt – 4-monomethoxytrityl
DCM – dichloromethane	mp – melting point
DIC – <i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide	MS – mass spectroscopy
DIEA – <i>N,N</i> -diisopropylethylamine	Mtt – 4-monomethyltrityl
DLS – dynamic light scattering	NHS – N-hydroxysuccinimide
DMF – <i>N,N</i> -dimethylformamide	NMR – nuclear magnetic resonance
DMSO – dimethylsulfoxyde	OT – oxytocine
EC ₅₀ – half maximal effective concentration	OTR – oxytocine receptor
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay	Pbf – 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl chloride
equiv. – equivalent	PBS – phosphate buffered saline
EtOH – ethanol	PDI – polydispersity index
ESI – electrospray ionization	pE13F - forme pyroglutamyl de lapeline-13
FDA – Food and Drug Administration	
Fmoc – fluorenylmethylmethyloxycarbonyl	
FRET – Förster resonance energy transfer	

PEG – polyethylene glycol

PyBOP – benzotriazol-1-yl-
oxytripyrrolidinophosphonium
hexafluorophosphate

QY – quantum yield

RCPG – récepteur couplé aux protéines G

RSA – Relation structure activité

SMBR - spectroscopie de masse à basse
résolution

SMHR – spectroscopie de masse à haute
résolution

SPPS – solid-phase peptide synthesis

TBTA – Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-
yl)methyl]amine

tBu – *tert*-butyl

TFA – trifluoroacetic acid

TIS - triethylsilane

TNBS – 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid

TNF – tumor necrosis factor

TR-FRET – time-resolved FRET

Trt - trityl

UV – ultraviolet

wt – wild-type

Introduction Générale

Contexte et objectifs

Contexte

1. Les peptides thérapeutiques

1.1. Intérêts thérapeutiques des peptides

Les peptides sont des molécules de la famille des protéines, constituées d'un assemblage d'acides aminés, de taille généralement inférieure à 5000 Da et souvent dépourvues de structure tertiaire.¹ A l'heure actuelle, plus de 7000 peptides endogènes ont été identifiés et sont connus pour leurs rôles physiologiques primordiaux. Ils peuvent notamment agir comme hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance, ligands de canaux ioniques, ou anti-infectieux.² En général, les peptides sont des molécules de signalisation sélectives et efficaces qui se lient à des récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). En modulant ces divers processus physiologiques, les peptides peuvent être impliqués dans la régulation de nombreuses maladies. Le développement de peptides thérapeutiques représente donc un enjeu prometteur pour la conception de nouvelles molécules capables d'agir de manière spécifique sur un site d'action donné.

L'augmentation considérable du coût et du temps passé à développer un nouveau médicament a conduit les chercheurs et les industries pharmaceutiques à se tourner vers la conception de nouvelles molécules thérapeutiques.^{3, 4} La plupart des médicaments actuels reposent sur le développement de petites molécules de taille inférieure à 500 Da ou de molécules biologiques beaucoup plus grosses, telles que les protéines ou les anticorps, de taille supérieure à 5000 Da (Figure 1). Les petites molécules représentent de bons candidats médicaments en raison de leur synthèse facilitée, de leur faible coût, de leur importante stabilité métabolique ainsi que de leur biodisponibilité par voie orale. Cependant, ces petites molécules ont souvent une faible spécificité pour le récepteur cible, ainsi qu'une stabilité métabolique qui peut conduire à leur accumulation dans de nombreux organes tels que les reins ou le foie, conduisant potentiellement à des effets secondaires. Pour pallier ces limitations, l'industrie pharmaceutique s'est donc tournée vers le développement de molécules présentant un poids moléculaire élevé, dérivées de protéines ou d'anticorps. Ces molécules à poids

moléculaire élevé sont très sélectives et actives. Elles présentent donc d'excellentes interactions ligand-récepteur, minimisant ainsi considérablement les effets secondaires. Cependant, leur synthèse peut être complexe et extrêmement coûteuse. L'industrie pharmaceutique s'intéresse donc désormais au développement de nouveaux agents thérapeutiques peptidiques qui présentent une taille intermédiaire et regroupent les avantages des deux anciennes stratégies.^{3, 4, 5} En comparaison aux molécules à poids moléculaire élevé, les peptides sont plus facilement synthétisables et à moindre coût. Leur plus petite taille leur permet de pénétrer plus facilement dans les tissus pour remplir leur fonction biologique. Par comparaison aux petites molécules, les peptides disposent d'une très grande activité, spécificité et affinité pour leur récepteur, minimisant ainsi leurs effets secondaires.

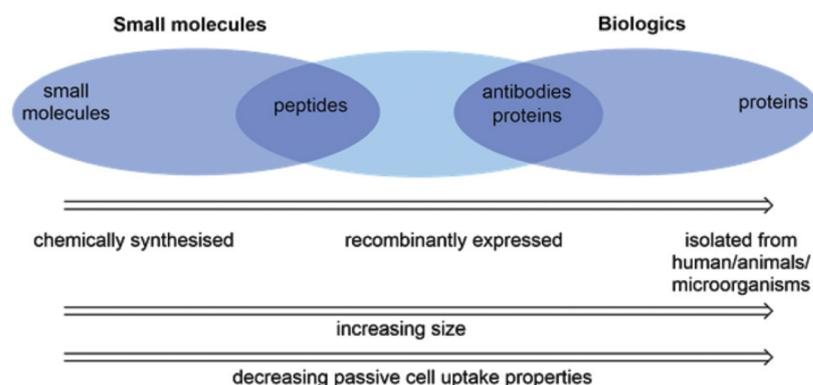


Figure 1. Caractéristiques des différentes classes de molécules thérapeutiques.⁵

Le développement de ces peptides thérapeutiques a été initié en 1953, lorsque duVigneaud a réussi à synthétiser en solution le premier peptide à visée thérapeutique : l'ocytocine.⁶ Suite à ça, Merrifield a développé, dans les années 1960, la synthèse peptidique sur support solide, facilitant considérablement le développement de nouveaux peptides médicaments.⁷ L'optimisation des techniques de synthèse, telles que l'introduction des groupements protecteurs dans les années 1980⁸ ou la fonctionnalisation des peptides par ligation chimique native développée par Kent en 1994⁹ ont permis d'obtenir très rapidement de nombreux nouveaux composés peptidiques. Durant les dix dernières années, le développement de peptides thérapeutiques pour diverses applications médicales a alors pris son plein essor. Les

peptides représentaient, en 2010, 8% des médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA), soit un total de 60 peptides thérapeutiques disponibles sur le marché (Figure 2).¹⁰ Depuis, plus de 20 peptides supplémentaires ont été approuvés par la FDA, 140 sont en phase d'essais cliniques et 600 sont en développement préclinique.¹¹ ² Leur utilisation en tant que médicament est déjà reconnue pour le traitement de nombreuses maladies telles que le diabète, les cancers, les maladies gastroentérologiques ou cardiovasculaires, l'ostéoporose ou l'obésité, par exemple.¹² 75% des peptides thérapeutiques sont administrés aujourd'hui par voie intraveineuse mais de nouvelles alternatives d'administration sont également en cours de développement ou d'optimisation incluant la voie orale, intranasale, et transdermique, afin de faciliter leur utilisation auprès des patients.^{2, 13} Au vu des 7000 peptides endogènes connus à ce jour, le développement de nouveaux peptides thérapeutiques représente encore aujourd'hui un potentiel prometteur et sous-exploité.

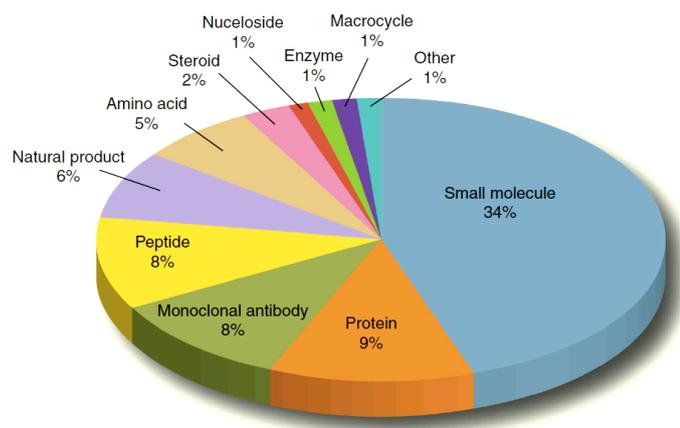


Figure 2. Graphique représentant en 2010 la distribution des médicaments approuvés pas la FDA en fonction de l'espèce chimique.¹⁰

1.2. Limitations de leur utilisation

Bien que les peptides soient des candidats thérapeutiques prometteurs, ils ne sont généralement pas directement utilisables en tant que médicament. En effet, la plupart du temps, ils présentent de faibles stabilités chimique et métabolique mais également une clairance rénale importante.⁴

Leur instabilité chimique résulte de leur exposition à de nombreuses réactions chimiques telles que l'hydrolyse, l'oxydation, la racémisation, l'isomérisation, la déamidation, les échanges de disulfures ou la β -élimination. Cette instabilité chimique conduit souvent à la formation de nouvelles entités moléculaires dénuées de l'activité thérapeutique attendue. Par ailleurs, l'instabilité physique des peptides s'explique par une dénaturation de leur structure secondaire entraînant leur adsorption sur des surfaces, leur agrégation et/ou leur précipitation. De plus, les peptides sont extrêmement sensibles aux dégradations enzymatiques. Ils présentent généralement une stabilité métabolique relativement courte, allant de la minute à quelques heures. Cette instabilité est attribuable aux enzymes du système digestif et sanguin, telles que les estérases, exopeptidases et endopeptidases, ou protéases. Enfin, la taille relativement faible des peptides (< 5000 Da) les rend facilement éliminables par filtration rénale.

2. Stabilisation des peptides

2.1. Stratégies existantes

Une amélioration de l'intégrité physique, chimique et métabolique des peptides doit donc être réalisée afin de pouvoir faciliter leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques. Différentes stratégies ont alors été développées en vue d'augmenter leur durée de demi-vie plasmatique telles que la substitution des sites de coupure enzymatique ou la modification de la structure secondaire du peptide (Figure 3). D'autres stratégies plus récentes ont également été proposées et reposent sur la polymérisation du peptide ou sur sa liaison à l'albumine circulante permettant d'empêcher à la fois sa reconnaissance enzymatique mais aussi de limiter sa filtration rénale (Figure 3).

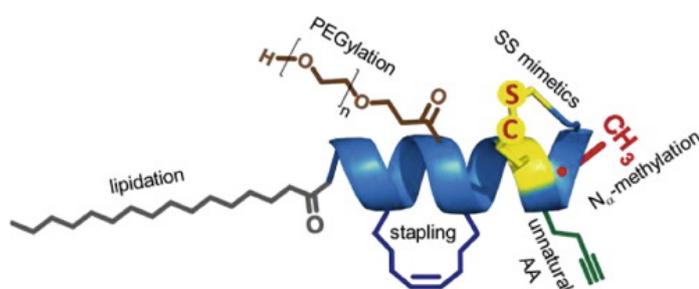


Figure 3. Différentes stratégies existantes pour augmenter la stabilité métabolique des peptides.¹¹

2.2. Renforcement de la stabilité des extrémités du peptide

L'instabilité des peptides attribuable aux exopeptidases est l'une des causes principales de dégradation enzymatique. Les exopeptidases sont des enzymes capables de couper l'acide aminé se situant sur les parties N- ou C-terminale des peptides. Cette métabolisation du peptide peut induire une perte conséquente de l'activité biologique. Ce type de dégradation peut être limité efficacement par la fonctionnalisation des extrémités du peptide, empêchant ainsi l'exopeptidase de reconnaître son substrat.^{14, 15} Dans ce but, différentes fonctionnalisations ont été développées telles que l'acétylation, l'estérification ou l'introduction d'un pyroglutamate en partie N-terminale ainsi que l'amidation de l'acide carboxylique en partie C-terminale.

2.3. Substitution des acides aminés

Afin de limiter la dégradation enzymatique résultante de l'action des endopeptidases, une des techniques couramment utilisée consiste à identifier les sites de reconnaissance enzymatique et à substituer les acides aminés sensibles.^{14, 15, 16} La première étape consiste donc à déterminer les sites de coupure. Pour cela, les peptides sont incubés dans du plasma et les différents métabolites de dégradation enzymatique sont ensuite caractérisés. Des études des relations structure-activité (RSA) sont ensuite nécessaires afin d'identifier les acides aminés qui ne sont pas impliqués dans l'interaction ligand-récepteur et qu'il est donc possible de substituer. La stratégie de stabilisation repose ensuite sur la substitution des acides aminés sensibles aux coupures enzymatiques par des acides aminés non-naturels : acides aminés β , méthylation de

l'azote impliqué dans la liaison peptidique ou des chaînes latérales. Pour finir, il est important de contrôler l'activité biologique du peptide résultant ainsi que sa toxicité. En effet, ces modifications non-naturelles peuvent impacter la fonction biologique et augmenter la toxicité du peptide qui ne sera plus reconnu par le système enzymatique et pourrait donc présenter une bioaccumulation à long terme.

2.4. Modification de la stéréochimie

L'orientation stéréochimique est primordiale pour la reconnaissance enzymatique d'un substrat. En changeant la configuration L des acides aminés du peptide par leurs homologues de configuration D, la molécule ne sera plus reconnue par les enzymes, augmentant ainsi sa stabilité plasmatique.^{14, 16} Cependant, si la conformation du peptide est importante pour son interaction avec le récepteur, la modification de sa stéréochimie peut entraîner une perte d'affinité. Dans le but de limiter cet effet, un processus de rétro-inversion est parfois appliqué. Cette technique consiste à inverser la séquence peptidique en introduisant les isomères-D de la partie N- à la partie C-terminale. Structurellement, le peptide-D rétro-inversé est plus proche du peptide natif que le simple analogue D, permettant ainsi de conserver l'affinité de liaison au récepteur tout en augmentant la durée de demi-vie du peptide *in vivo*.

2.5. Modification du squelette peptidique : pseudo-peptides

La modification du squelette peptidique est également une stratégie utilisée pour augmenter la stabilité plasmatique des peptides.^{14, 15, 16} En effet, même si les chaînes latérales des acides aminés sont les premières structures reconnues par les enzymes, les liaisons peptidiques sont finalement le véritable substrat pour la réaction d'hydrolyse enzymatique, notamment par le biais des endopeptidases. Ainsi, en modifiant le squelette peptidique, le pseudo-peptide résultant sera protégé des dégradations enzymatiques. La modification du squelette peptidique peut s'effectuer soit au niveau de la liaison peptidique (groupement carbonyle ou azote), soit sur le carbone en α . Différentes modifications ont alors été développées telles que la réduction du groupement carbonyle en remplaçant la fonction CONH par CH₂NH.¹⁴ Une autre

modification classiquement utilisée consiste à déplacer d'une position la chaîne latérale qui se situe normalement sur le carbone en α pour se retrouver sur l'atome d'azote du squelette peptidique (Schéma 1).^{17, 18} Ces pseudo-peptides, nommés peptoïdes, ont été développés par Simon, en 1992, pour aider à la découverte de nouveaux agents thérapeutiques.¹⁹ Cette structure originale confère une stabilité enzymatique à la molécule car le lien amide N-substitué n'est pas reconnu par le site de clivage des enzymes naturelles. En plus de l'augmentation de la stabilité métabolique, cette nouvelle liaison amide offre également une plus grande flexibilité par rapport au peptide natif ainsi qu'une meilleure perméabilité cellulaire.

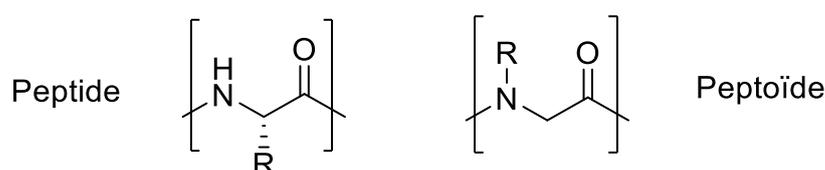


Schéma 1. Représentation chimique d'un peptide et d'un peptoïde.

Une modification également employée consiste à remplacer un ou plusieurs atomes de carbone en α par un atome d'azote, on parle alors d'azapeptides (Schéma 2).¹⁴ Cette aza-substitution entraîne une restriction conformationnelle du squelette qui résulte en une augmentation de la demi-vie plasmatique de l'azapeptide ainsi qu'en une amélioration de sa sélectivité et de son activité fonctionnelle. Ces azapeptides sont souvent utilisés en tant qu'inhibiteur d'enzyme.²⁰

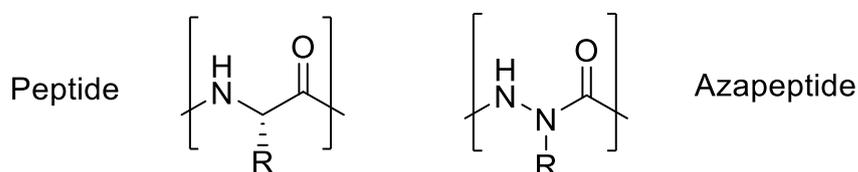


Schéma 2. Représentation chimique d'un peptide et d'un azapeptide.

2.6. Renforcement de la structure secondaire

Afin de limiter l'accès des enzymes aux sites de clivage, une autre possibilité est de renforcer la structure secondaire du peptide soit en rendant sa structure plus contrainte par une technique de cyclisation soit en confinant le peptide dans une structure secondaire stabilisée en hélice- α .²¹ Ces deux techniques permettent de structurer le peptide dans une forme qui ne sera plus reconnue par l'enzyme, renforçant ainsi sa stabilité métabolique.

a) Cyclisation du peptide

En fonction des groupements fonctionnels se trouvant dans la séquence peptidique, les peptides peuvent être cyclisés soit au niveau de leurs extrémités entre la partie N-terminale et C-terminale, soit entre deux chaînes latérales.^{14, 15, 16} La cyclisation entre deux chaînes latérales d'acides aminés naturels s'effectue généralement par formation d'un pont disulfure entre deux cystéines ou par formation d'un pont lactame (lien amide) entre une lysine et un acide aspartique ou glutamique. Il est également possible d'insérer, au sein de la séquence peptidique, des acides aminés dont la chaîne latérale est modifiée pour cycliser le peptide par des réactions de click ou de métathèse.^{22, 23, 24} La formation d'une architecture cyclique est une stratégie efficace pour réduire la flexibilité conformationnelle du peptide linéaire et ainsi limiter sa dégradation physico-chimique ou enzymatique. De plus, cette contrainte conformationnelle conduit à une diminution des liaisons hydrogène et par conséquent à une augmentation de la perméabilité membranaire.

b) Structuration en hélice- α

Différentes stratégies ont été développées pour structurer les peptides en hélice- α notamment l'insertion d'acides aminés inducteurs de liaisons hydrogène en partie N-terminale ainsi que la cyclisation du peptide en introduisant un especeur dérivé de chaînes de polyéthylènes glycol (PEG).^{25, 26} Par ailleurs, des études structurales portant sur l'étude de la structuration en hélices- α des peptides ont permis de mettre en avant l'importance des liaisons hydrogène entre les chaînes latérales des résidus $i, i+3$; $i, i+4$ ou $i, i+7$.²⁷ Il est ainsi possible de structurer le peptide en hélice- α en mimant ces liaisons

hydrogène. Pour cela, la stratégie proposée repose sur la création d'une liaison covalente entre les résidus i , $i+3$; i , $i+4$ ou i , $i+7$. Ces liaisons covalentes sont généralement formées par des ponts disulfures, des ponts lactames, des liens biphényles ou, plus classiquement, par des liaisons carbone-carbone.²⁸ Cette dernière technique repose sur l'utilisation d'acides aminés portant un alcène sur la chaîne latérale permettant de former des oléfines par une réaction de métathèse (Figure 4). Cette formation d'un lien hydrocarboné permet également d'améliorer l'affinité de certains peptides pour leur récepteur et d'augmenter leur perméabilité membranaire.

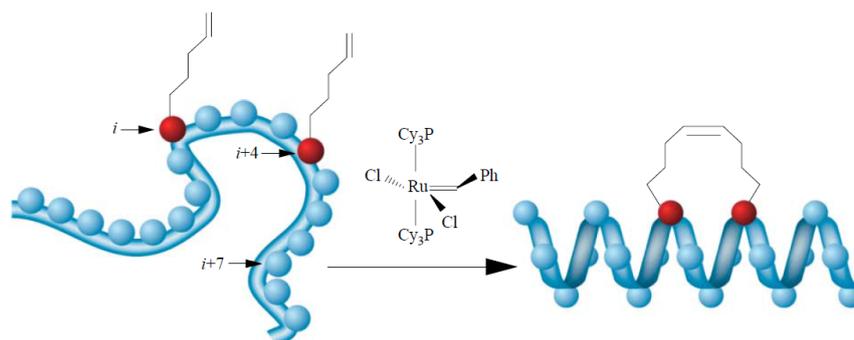


Figure 4. Induction d'une hélice- α par réaction de métathèse d'oléfines positionnées sur les résidus i et $i+4$.²⁹

2.7. Introduction d'une chaîne polymérique sur le peptide

La modification de la surface du peptide par des chaînes polymères est une méthode également classiquement utilisée pour améliorer la résistance enzymatique et augmenter la durée de circulation plasmatique des peptides.³⁰ L'organisation polymérique permet de masquer la surface du peptide, rendant ainsi ce dernier invisible au système enzymatique et limitant sa filtration rénale. La polymérisation est une technique qui permet également d'améliorer la stabilité physique et thermique du peptide ainsi que sa solubilité.

a) PEGylation

La PEGylation est un concept introduit en 1970 par Davis.³¹ Les chaînes PEG sont classiquement utilisées pour polymériser les peptides et aujourd'hui plusieurs peptides PEGylés sont disponibles sur le marché (pegaspargase, peginterferon- α 2b, peginesatide).^{11, 5, 30} Ces chaînes sont généralement conjuguées directement sur la séquence du peptide en partie N-terminale ou en utilisant les groupements nucléophiles des chaînes latérales tels que la fonction amine en position ϵ de la lysine ou sur la fonction thiol d'une cystéine. Afin de conserver l'entière activité thérapeutique du peptide, le site d'introduction des chaînes PEG sur le peptide et leur caractéristiques (longueur, structure chimique, embranchement) doivent être précisément étudiés (Figure 5). Le caractère hautement hydrophile des chaînes PEG conduit à la formation d'un important réseau d'hydratation par interaction avec les molécules d'eau, entraînant ainsi une augmentation conséquente du volume hydrodynamique du peptide. Cette propriété permet au peptide d'être considérablement moins sensible à la filtration rénale et/ou à la dégradation protéolytique.

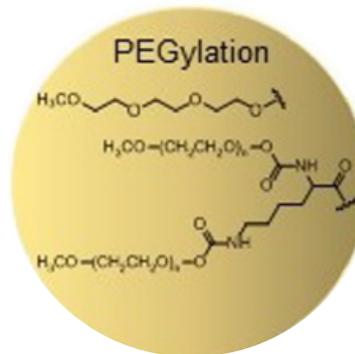


Figure 5. Chaînes-PEG classiquement utilisées pour la PEGylation des peptides.³⁰

b) Introduction d'une chaîne de polysaccharide

Une alternative à la PEGylation a été proposée dans les années 1970 et repose sur la conjugaison d'une chaîne de polysaccharide.³⁰ Cette stratégie de polymérisation peut être effectuée en introduisant différents polysaccharides tels que le dextran, l'amidon d'hydroxyéthyle ou les acides polysialique ou hyaluronique (Figure 6). De manière similaire à la PEGylation, l'introduction d'une chaîne de polysaccharides permet d'accroître la durée de demi-vie plasmatique du peptide grâce à l'augmentation de son

rayon hydrodynamique, ce qui lui confère également une faible clairance rénale. Par ailleurs, la majorité de ces dérivés de polysaccharides sont entièrement biocompatibles et métabolisés *in vivo* par des enzymes naturelles.

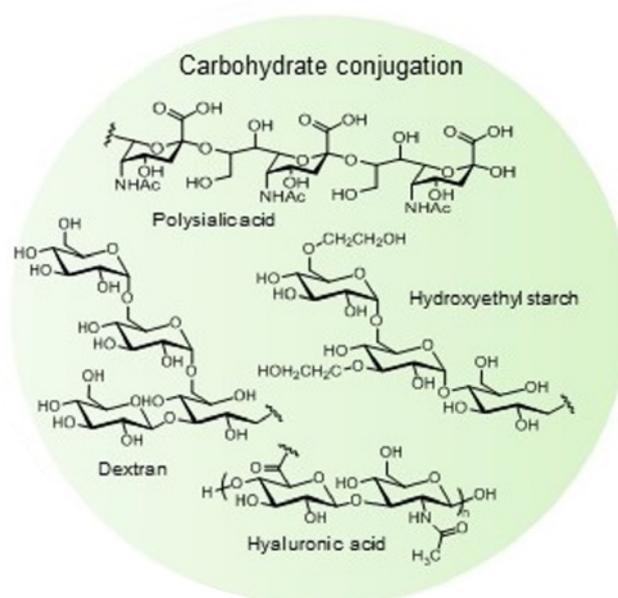


Figure 6. Polysaccharides classiquement utilisés pour la polymérisation des peptides.³⁰

2.8. Glycosylation

La glycosylation des peptides est une stratégie de stabilisation qui a été développée en se basant sur l'étude des modifications post-traductionnelles des protéines. En effet, environ 50% des protéines sont glycosylées *in vivo* afin d'augmenter leur solubilité aqueuse ainsi que leur stabilité physico-chimique, conformationnelle et métabolique. En se basant sur ce constat, il est paru intéressant de glycosiler des peptides afin de renforcer leur stabilité *in vivo*. La glycosylation repose donc sur l'introduction d'un glycane soit sur une chaîne latérale d'un acide aminé soit sur les extrémités du peptide.^{15, 30} Il a ainsi été reporté dans la littérature que les glycopeptides présentent une stabilité plasmatique améliorée, une faible clairance rénale ainsi qu'un passage potentiel de la barrière hémato-encéphalique.³²

2.9. Introduction de motifs capables de se lier à l'albumine

La dernière stratégie couramment utilisée pour stabiliser les peptides consiste à les modifier afin qu'ils présentent une bonne affinité pour l'albumine, une protéine plasmatique de masse moléculaire d'environ 66 kDa (Figure 7).³³ L'albumine est la protéine la plus abondante dans le sang puisqu'elle représente 50% des protéines plasmatiques. Sa durée de demi-vie plasmatique est de l'ordre de 19 jours chez l'Homme. L'albumine est impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que le maintien du pH et de la pression sanguine colloïdale, ou encore dans le transport de différents métabolites ou d'acides gras.³⁴ Son importante taille moléculaire, ses nombreux sites de liaison, son abondance plasmatique et sa lente élimination de la circulation sanguine font de cette protéine une cible de choix pour véhiculer des agents thérapeutiques qui présentent une faible stabilité plasmatique. Ainsi, plusieurs stratégies de liaison des peptides à l'albumine ont été développées en se basant soit sur une liaison covalente du peptide à la protéine, soit sur une liaison physique réversible qui s'effectue *in vivo*.^{35, 36}

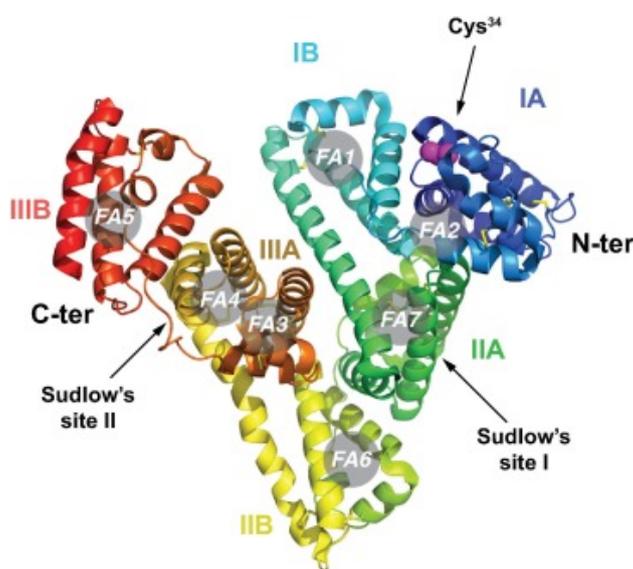


Figure 7. Représentation tridimensionnelle de l'albumine humaine et mise en évidence des différents sous-domaines présents dans sa structure.³⁷

a) Liaison covalente peptide-albumine

Afin de former un complexe entre un peptide et l'albumine humaine (HSA), une des stratégies consiste à créer une liaison covalente entre ces deux entités. Pour ce faire, l'introduction du peptide s'effectue généralement sur l'unique résidu cystéine de l'albumine humaine (Cys³⁴) par addition de Michael entre le peptide qui présente une fonction maléimide et le groupement thiol du résidu cystéine.^{30, 33, 38} En raison de la masse conséquente de l'albumine, la liaison confère au peptide une protection contre les dégradations enzymatiques par gêne stérique ainsi qu'une faible clairance rénale. Différents composés ont fait leurs preuves en tant qu'agents thérapeutiques tels que le complexe PC-1505³⁹ (Figure 8) développé en phase préclinique en tant qu'inhibiteur de l'entrée du virus VIH dans les cellules ainsi que le composé CJC-1134-PC⁴⁰, un dérivé stable du GLP-1, impliqué dans le traitement du diabète de type 2 et actuellement en phase clinique I. Il a ainsi été reporté que ces complexes peptide-HSA présentent une amélioration conséquente de l'activité biologique et du profil pharmacocinétique du peptide *in vivo*.

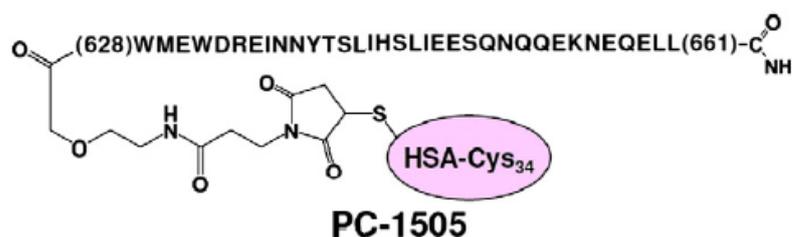


Figure 8. Structure chimique du composé PC-1505, inhibiteur de l'entrée du virus VIH dans les cellules.³³

b) Introduction d'une petite molécule chimique

L'introduction sur le peptide d'un vecteur chimique présentant une affinité pour l'albumine est une autre stratégie proposée. En conjuguant une petite molécule aromatique sur la partie N-terminale du peptide, il a pu être reporté une augmentation de sa stabilité plasmatique.⁴¹ L'affinité de ces molécules pour l'albumine permet de lier le peptide-vecteur de manière réversible, ce qui présente moins de risque d'immunogénicité qu'une liaison covalente.

c) Introduction d'une chaîne lipidique

La lipodation des protéines et des peptides *in vivo* est une modification post-traductionnelle classique qui permet d'augmenter leur hydrophobie et d'améliorer le passage des membranes biologiques. De même, il est connu que l'albumine humaine présente 9 sites de liaison pour les acides gras.³⁴ En se basant sur ces deux constats, un nouveau concept de stabilisation peptidique a été développé et repose sur l'introduction d'une chaîne lipidique pour permettre une liaison réversible du peptide à l'albumine.^{30, 42} Différentes chaînes lipidiques ont alors été évaluées, notamment pour améliorer la stabilité de l'insuline (insuline degludec) ou du GLP-1 (liraglutide, Figure 9), deux lipopeptides utilisés aujourd'hui en clinique pour le traitement du diabète de type 2.^{43, 44} Ces chaînes sont généralement introduites soit en partie N-terminale, soit sur la chaîne latérale d'un acide aminé. Les chaînes palmitiques, comportant 16 atomes hydrocarbonés, ont démontré leur grande efficacité à augmenter la stabilité métabolique de peptides comme c'est le cas pour le liraglutide⁴⁴, l'angiotensine-II⁴⁵ ou l'apeline-13⁴⁶. Par exemple, en introduisant la chaîne palmitique, la durée de demi-vie du GLP-1 est augmentée de 1 h à 13 h après administration chez l'homme, permettant aux patients de recevoir une seule injection par jour.⁴⁷

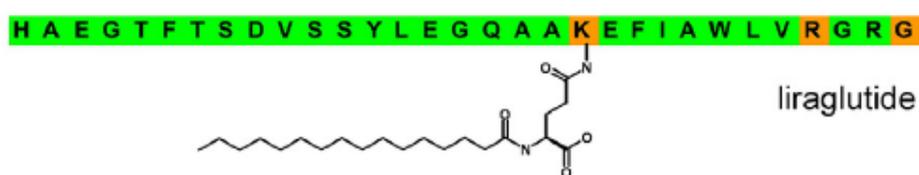


Figure 9. Structure du liraglutide, le dérivé lipidique stable du peptide GLP-1 impliqué dans le traitement du diabète de type-2.⁴⁴

Les 9 sites de liaison potentiels pour des chaînes lipidiques (dont 7 principaux) confèrent à l'albumine la capacité de lier plusieurs lipopeptides (Figure 10). Ces derniers vont ainsi pouvoir être véhiculés dans le sang sans être reconnus par le système enzymatique ou éliminés par filtration rénale avant d'être libérés progressivement afin de remplir leur fonction biologique. Cette stratégie présente l'avantage d'utiliser un vecteur lipidique qui est naturel, contrairement aux petites molécules chimiques, donc potentiellement moins toxique et capable de se lier sur de nombreux sites d'affinité pour l'albumine.

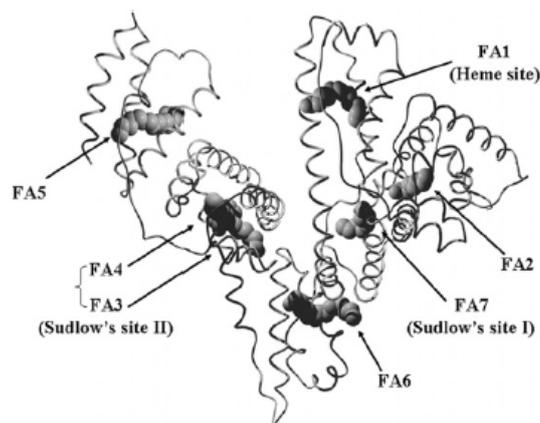


Figure 10. Représentation tridimensionnelle de l'albumine humaine et mise en évidence de ses 7 principaux sites de liaison pour les acides gras (FA).³⁴

3. Limitation des techniques de stabilisation existantes

Bien que de nombreuses techniques de stabilisation peptidique aient été développées au cours de ces dernières années, la plupart d'entre elles nécessitent d'effectuer de longues et coûteuses études des relations structure-activité afin de déterminer les acides aminés potentiellement modifiables sans altérer l'activité biologique du peptide (Figure 11). Ces études nécessitent d'identifier tout d'abord les acides aminés impliqués dans l'interaction ligand/récepteur en remplaçant successivement les acides aminés de la séquence par une alanine (Ala-scan). Il est important, ensuite, d'identifier et de substituer les résidus sensibles à une dégradation chimique tout en vérifiant l'activité fonctionnelle du peptide modifié par des études de relation structure-activité. De même, il est nécessaire de déterminer les sites de coupure enzymatique et de renforcer la stabilité de ces sites : substitution avec des acides aminés non naturels, cyclisation, ou formation d'un pseudopeptide. Cependant, ces modifications de la structure primaire ou secondaire conduisent souvent à une diminution de l'affinité du peptide pour son récepteur (CI_{50}) entraînant alors une perte de l'efficacité biologique (CE_{50}). Il est donc important de contrôler, une fois de plus, l'activité fonctionnelle du peptide résultant.

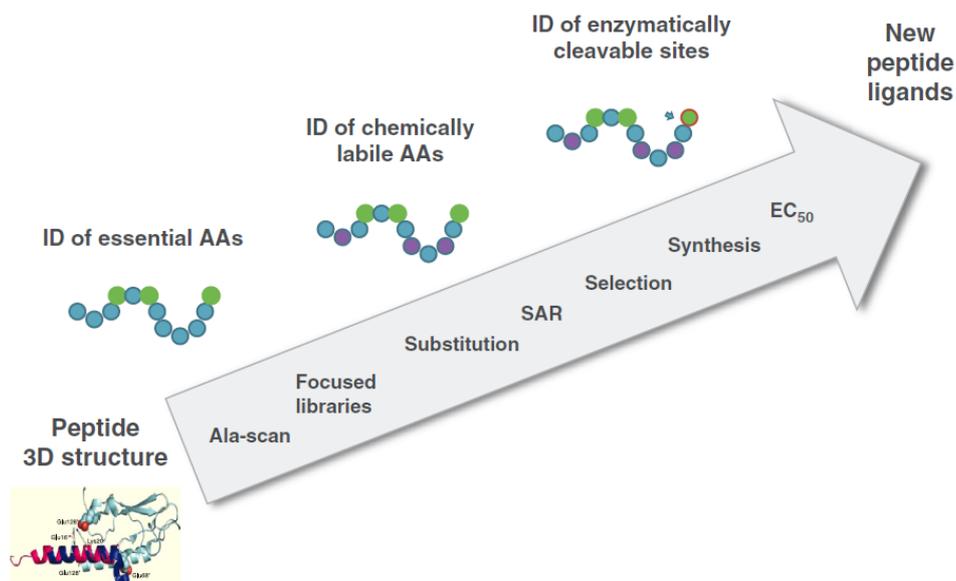


Figure 11. Stratégie de développement classique pour la conception de peptides thérapeutiques.²

Au contraire, l'introduction d'une chaîne polymérique (PEGylation) ou lipidique (lipidation) sont des stratégies qui permettent d'augmenter considérablement la stabilité des peptides sans modifier leur séquence peptidique. Ces techniques peuvent donc s'effectuer sans études poussées de relation structure-activité et permettent généralement de conserver entièrement l'affinité du peptide pour son récepteur ainsi que son efficacité. Cependant, des problèmes de toxicité ont été reportés. La PEGylation peut être associée à des problèmes de tolérance et d'immunogénicité chez l'Homme avec formation d'anticorps anti-PEG.⁴⁸ La lipidation entraîne une augmentation de l'hydrophobie du peptide ce qui peut induire de fortes interactions avec les membranes cellulaires. Le lipopeptide peut donc présenter une forte cytotoxicité ainsi qu'une importante activité hémolytique comme il l'a été démontré pour les lipopeptides antimicrobiens.⁹

Objectifs des travaux de la thèse

L'objectif général de ma thèse a été de développer une stratégie alternative de stabilisation plasmatique des peptides afin de permettre leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques. Pour cela, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux peptides visant les RCPG. Afin d'améliorer la stabilité plasmatique des peptides, la stratégie proposée est basée sur la modification d'un peptide par une chaîne fluorocarbonée (F-chaîne). Ainsi, le fluoropeptide obtenu doit conduire, en solution aqueuse, à la formation de structures supramoléculaires permettant une protection du peptide vis-à-vis de la protéolyse. Afin de vérifier l'efficacité de cette approche, nous avons choisi de travailler sur un peptide modèle, l'apeline-17, impliqué dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et qui présente un potentiel thérapeutique prometteur pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Le premier objectif a été de concevoir, de synthétiser et de participer à l'évaluation physico-chimique et biologique de nouveaux fluoropeptides dérivés de l'apeline-17.

Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'augmentation de la stabilité plasmatique de ces dérivés et d'étudier également leur comportement *in cellulo*, le deuxième objectif a été de concevoir et de synthétiser des sondes fluorescentes originales dérivées des fluoroapelines.

Le troisième objectif a été d'étendre le concept à d'autres peptides d'intérêt thérapeutique visant un RCPG tels que l'apeline-13, l'angiotensine-II, l'ocytocine et la spexine.

Enfin, le dernier objectif a été de développer des sondes fluorescentes fluorogènes dites « turn-on » dans le but de suivre *in vivo* la biodistribution de nos fluoropeptides. Ces sondes présentent la propriété d'être « éteintes » dans le sang et de « s'éclairer » une fois liées à leur cible moléculaire. Cette stratégie innovante doit permettre d'améliorer considérablement le rapport signal/bruit et ainsi offrir une excellente sensibilité pour la détection des sondes chez l'animal.

Chapitre 1

**Développement d'une nouvelle
méthode pour augmenter la stabilité
plasmatique et l'activité biologique des
peptides en utilisant des chaînes
fluorocarbonées : Preuve de concept
sur l'apeline-17**

1. Contexte de l'étude

1.1. Les chaînes fluorocarbonées

Le Fluor est l'atome le plus électronégatif décrit parmi les 118 éléments chimiques du tableau périodique. Sa forte densité électronique le rend faiblement polarisable lui conférant ainsi des propriétés uniques. Les chaînes fluorocarbonées (F-chaînes) sont des chaînes hydrocarbonées (H-chaînes) sur lesquelles les atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de fluor sur toute une partie de la chaîne. Ces F-chaînes présentent de très solides liaisons intramoléculaires avec très peu d'interactions intermoléculaires.⁴⁹ De plus, la faible polarisabilité des atomes de fluor permet aux F-chaînes d'avoir de faibles interactions de Van der Waals avec le milieu dans lequel elles se trouvent. Ces faibles interactions confèrent aux F-chaînes de nombreuses propriétés physico-chimiques telles qu'une bonne fluidité, une forte compressibilité ainsi qu'une excellente capacité à dissoudre les gaz. Les F-chaînes possèdent ainsi des caractéristiques très différentes des H-chaînes : elles sont à la fois plus stables, plus hydrophobes, et présentent une importante oléophobie. Ces propriétés expliquent leur utilisation dans le développement de tensioactifs perfluorocarbonés qui sont capables de s'auto-organiser efficacement en micelles, en solution aqueuse.^{50, 51, 52} En effet, ces tensioactifs présentent de plus faibles concentrations micellaires critiques (CMC) que leurs dérivés hydrocarbonés ainsi qu'une plus faible toxicité *in vitro*.⁵³

La capacité de ces tensioactifs fluorocarbonés à s'auto-organiser en émulsions et à dissoudre efficacement les gaz (tels que l'oxygène, le dioxyde de carbone, ou l'azote) a conduit au développement de nouvelles applications médicales. Les F-chaînes sont ainsi utilisées en tant que transporteurs d'oxygène (appelés également substituts sanguins).^{54, 55, 56, 57} Ces émulsions, constituées de dérivés perfluorocarbonés, ont déjà été injectées chez l'Homme (évaluation clinique en phase III) démontrant leur absence de toxicité.⁵⁸ Il a également été mis en évidence qu'après injection et circulation dans le sang, les F-chaînes sont prises en charge par le système réticulo-endothélial avant d'être excrétées par voie pulmonaire.^{59, 60, 61, 62} Plus récemment, ces chaînes fluorocarbonées ont aussi été utilisées pour la formulation de vaccins synthétiques, mettant de nouveau en avant la biocompatibilité des F-chaînes chez l'Homme (évaluation clinique en phase II).^{63, 64}

En s'appuyant sur ces propriétés uniques, notre stratégie de départ a donc consisté à introduire une F-chaîne sur un peptide d'intérêt pour forcer son auto-organisation en micelles, en solution aqueuse (Figure 12). Cette organisation physico-chimique réversible pourrait offrir au peptide une protection contre les dégradations enzymatiques tout en lui permettant de remplir sa fonction biologique en se liant, par la suite, à son récepteur. Afin de vérifier l'efficacité de notre approche, nous avons choisi de travailler sur des peptides ciblant les récepteurs couplés aux protéines G.



Figure 12. Nouvelle stratégie de stabilisation des peptides : introduction d'une F-chaîne pour forcer le peptide à s'auto-organiser en micelle de manière réversible.

1.2. Les RCPG, une famille de choix pour le développement de nouveaux médicaments

Les RCPG correspondent à la classe des récepteurs membranaires la plus vaste et la plus étudiée. La famille des RCPG est composée de 800 à 1000 récepteurs, constituant ainsi la plus grande famille de récepteurs identifiée chez l'homme.^{65, 66} Les RCPG sont composés de sept domaines transmembranaires et se situent à la surface des membranes cellulaires où ils détectent un signal qui va activer une cascade de signalisation interne, conduisant à la réponse cellulaire.⁶⁷ Le signal perçu par les RCPG peut être de type lumineux, olfactif, gustatif, ionique, petites molécules, peptides et hormones. Ces divers signaux sont impliqués dans de nombreuses actions physiologiques liées à la vision, au goût, à l'odorat mais également au contrôle de l'humeur et du comportement et à la régulation du système immunitaire, nerveux et homéostatique.⁶⁸ Un dysfonctionnement du système de signalisation lié aux RCPG résulte souvent en l'apparition de troubles pathologiques. De ce fait, de nombreux médicaments ciblant les RCPG ont été développés et représentent aujourd'hui environ 33% des médicaments sur le marché.^{69, 70, 71} Malgré ce fort attrait pour ce type de

récepteurs, seuls 15% des RCPG non-sensoriels possèdent aujourd'hui un ligand non-peptidique, 60% possèdent un ligand endogène connu (peptides, protéines) et 25% n'ont ni ligand, ni fonction (récepteurs dits orphelins). Ainsi, cette classe de protéines offre encore un potentiel important pour le développement de nouveaux médicaments.⁷² Comme vu précédemment, les peptides sont des molécules prometteuses pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Ils ciblent très souvent un RCPG de manière hautement spécifique et active. Cependant, leur développement pharmaceutique est souvent limité par leur très faible stabilité plasmatique. Ainsi, afin de valider notre stratégie, nous avons sélectionné un peptide modèle ciblant les RCPG : l'apeline-17. Ce peptide présente un intérêt thérapeutique prometteur pour le traitement des maladies cardiovasculaires mais son développement est limité en raison de sa faible stabilité plasmatique (temps de demi-vie < 5 min).

1.3. L'apeline-17

Le récepteur de l'apeline (APJ) est constitué de 377 acides aminés et appartient à la famille des RCPG.⁷³ Ce récepteur est resté orphelin jusqu'en 1998 lorsque Tatemoto a découvert son ligand endogène qu'il a choisi d'appeler apeline. Ce ligand est un peptide bioactif isolé d'extraits d'estomac bovin et composé de 36 acides aminés (apeline-36) qui est produit à partir d'un plus grand précurseur de 77 acides aminés, appelé préproapeline.⁷⁴ La comparaison des séquences peptidiques des préproapelines de différents mammifères a permis de mettre en évidence la conservation exacte des 17 acides aminés de la partie C-terminale entre plusieurs espèces.⁷⁵ Cette séquence est connue sous le nom d'apeline-17 ou K17F. Plusieurs formes moléculaires de l'apeline ont été identifiées : apeline-36, K17F et la forme pyroglutamylée de l'apeline-13 (pE13F).⁷⁶ K17F et pE13F sont tous deux naturellement présents dans le cerveau et le plasma de rats et sont capables d'inhiber la production d'AMP cyclique (AMPC) induite par la forskoline sur des cellules qui expriment le récepteur de l'apeline.^{77, 75, 78, 79} Ces peptides permettent, d'une part, la phosphorylation des enzymes ERKs, Akt et de la kinase p70S6 et, d'autre part, l'internalisation du récepteur de l'apeline *via* la mobilisation de la β -arrestine.^{80, 81}

L'apeline et son récepteur sont tous deux présents dans des parties du cerveau impliquées dans le contrôle neuroendocrinien, dans la régulation de la prise de nourriture et dans le maintien de l'homéostasie (Figure 13).^{82, 83, 84} Ils colocalisent avec l'arginine-vasopressine (AVP) dans les neurones magnocellulaires.⁸⁵ L'AVP est libérée dans le sang par ces neurones et active au niveau du rein les récepteurs de l'AVP de type 2 pour induire un effet antidiurétique. L'injection centrale de K17F chez des rates allaitantes inhibe cet effet antidiurétique en diminuant la sécrétion d'AVP dans le système sanguin.⁷⁷ De plus, l'injection systémique de K17F chez des rates allaitantes augmente la diurèse en inhibant l'effet de production d'AMPc induit par l'AVP.⁸⁶ L'apeline, en agissant au niveau central et périphérique, pourrait donc être un inhibiteur naturel de l'effet antidiurétique de l'AVP.⁸⁷ Il a également été montré, chez des rats privés d'eau, que les niveaux endogènes d'AVP et d'apeline sont régulés de manière opposée afin d'optimiser la libération d'AVP systémique pour empêcher des pertes d'eau supplémentaires dans les reins.⁸⁶ Ainsi, une balance anormale d'apeline/AVP pourrait contribuer à des problèmes de rétention d'eau chez des patients hyponatrémiques avec le syndrome de l'hormone antidiurétique inappropriée et des problèmes d'insuffisance cardiaque chronique.⁸⁸

L'apeline et son récepteur sont également présents dans le système cardiovasculaire, le cœur, les reins et les vaisseaux sanguins (Figure 13).^{82, 89} Il a été montré que l'injection systémique d'apeline chez le rat et chez l'Homme induit une diminution de la pression artérielle *via* la production d'oxydes nitriques.^{90, 91} De plus, des souris déficientes en récepteurs de l'apeline présentent une augmentation de pression artérielle en réponse à l'angiotensine II (Ang II) systémique, suggérant un effet de contre-régulation de l'apeline sur l'Ang II.⁹² L'injection intraveineuse d'apeline augmente la contractilité cardiaque et diminue le remplissage cardiaque chez les rongeurs.⁹³ Enfin, il a été montré que des souris déficientes en apeline faisaient des infarctus du myocarde et de l'ischémie-reperfusion.⁹⁴ La sous-régulation d'apeline est donc accompagnée d'un déclin des performances cardiaques. L'ensemble de ces constats mettent en évidence le rôle clé de l'apeline dans le maintien des équilibres hydriques et de la fonction cardiovasculaire.

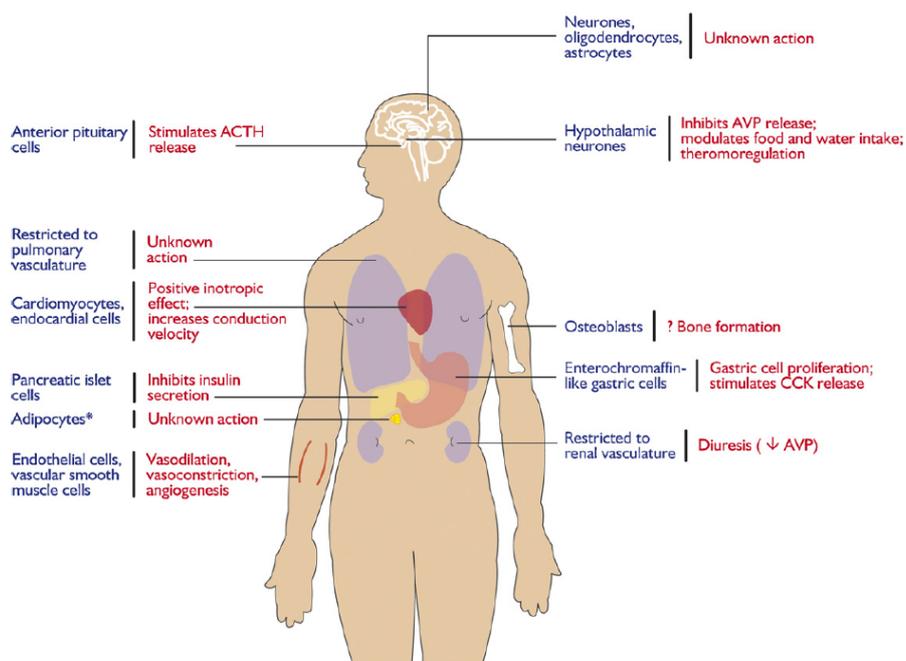


Figure 13. Schéma représentant l'expression et les fonctions physiologiques du système apeline-APJ.⁸⁹

Le récepteur de l'apeline représente donc une cible thérapeutique prometteuse pour la recherche médicale et le développement de nouveaux médicaments. Bien que l'apeline se lie à son récepteur avec une haute affinité et induit de nombreux effets biologiques, son application thérapeutique est limitée par sa faible stabilité plasmatique. En effet, l'apeline présente une demi-vie plasmatique de l'ordre de la minute. L'enzyme carboxypeptidase (ACE II) est l'enzyme principalement responsable de sa dégradation enzymatique, en clivant K17F entre les acides aminés Pro¹⁶ et Phe¹⁷.^{95, 96} Le développement de nouveaux agonistes stables du récepteur de l'apeline serait donc particulièrement intéressant pour le traitement de l'insuffisance cardiaque, des problèmes de rétention d'eau et/ou de l'hyponatrémie. Dans ce but, plusieurs agonistes stables de l'apeline ont déjà été développés par des stratégies de cyclisation^{97, 98}, de PEGylation⁹⁹, d'introduction de chaînes lipidiques^{100, 46} et de substitution par des acides aminés non naturels^{101, 102, 103}. Un agoniste non-peptidique de taille supérieure à 1000 Da a également été développé au laboratoire : E339-3D6. Cette molécule correspond au premier agoniste non-peptidique synthétisé pour le récepteur APJ mais présente un effet agoniste seulement partiel sur l'inhibition d'AMPC induite par la forskoline.^{78, 104} Suite à ça, de plus petites molécules non-peptidiques ont également été découvertes telles que l'agoniste ML233 ainsi que des dérivées de structure triazole ou de

benzimidazole qui sont brevetés par Sanofi Aventis ou Sanford-Bumham Medical Research Institute.¹⁰⁵ Cependant, ces petites molécules présentent des affinités de liaison et des propriétés pharmacologiques encore éloignées de l'apeline native.

Par conséquent, en considérant l'intérêt thérapeutique de l'apeline-17 et le fait qu'aucun dérivé peptidique stable présentant à la fois une affinité et une activité fonctionnelle élevée n'ait été découverts, nous avons choisi de travailler sur ce peptide modèle afin d'évaluer notre nouvelle stratégie de stabilisation.

2. Conception et synthèse de composés fluorocarbonés et hydrocarbonés dérivés de l'apeline-17

Le premier objectif de ma thèse a été de concevoir les dérivés fluorocarbonés de l'apeline-17 en introduisant une F-chaîne sur ce peptide. En vue d'étudier l'impact de la longueur de la F-chaîne sur la stabilité plasmatique du peptide résultant et d'identifier la longueur de chaîne optimale permettant d'obtenir la meilleure stabilité, des F-chaînes de différentes longueurs ont été introduites sur l'apeline-17 : $C_4F_9-(CH_2)_2COOH$, $C_6F_{13}-(CH_2)_2COOH$ et $C_8F_{17}-(CH_2)_2COOH$ (Schéma 3). Nous avons choisi d'introduire les F-chaînes en partie N-terminale de l'apeline-17 en nous basant sur les études des relations structure-activité et de modélisation moléculaire réalisées précédemment sur ce peptide et son récepteur (figure 14. A et B).^{106, 107, 108} Ces études mettent notamment en évidence que l'acide aminé Phe¹⁷ interagit avec le fond de la cavité du récepteur par des interactions de type π - π et que l'Arg⁶, l'Arg⁸ et la Lys¹² interagissent à l'entrée du site de liaison par interactions électrostatiques. Il est donc primordial de ne pas modifier cette partie de la séquence du peptide qui est impliquée dans l'interaction ligand-récepteur. En revanche, les quatre acides aminés supplémentaires présents sur l'apeline-17 par rapport à l'apeline-13 (pE13F) améliorent que très peu l'affinité du peptide pour son récepteur ($K_i = 0.060 \pm 0.010$ nM pour K17F et $K_i = 0.56 \pm 0.010$ nM pour pE13F).¹⁰⁹ Ces acides aminés ne doivent donc pas jouer de rôle critique dans l'interaction ligand-récepteur. De ce fait, il nous a paru plus judicieux d'introduire les F-chaînes à la suite de ces acides aminés, en partie N-terminale du peptide.

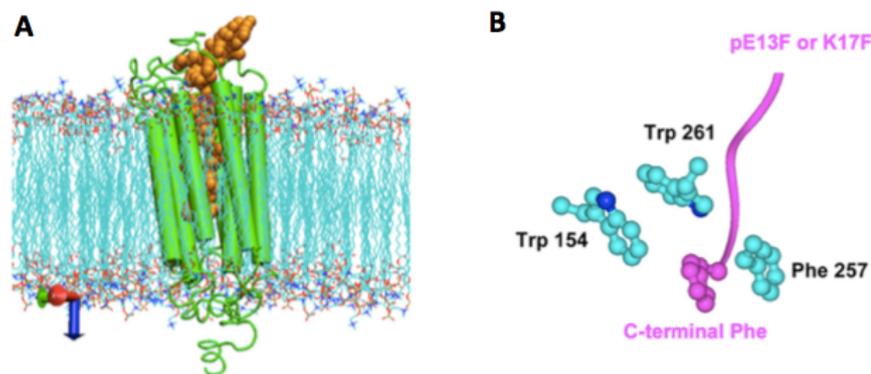
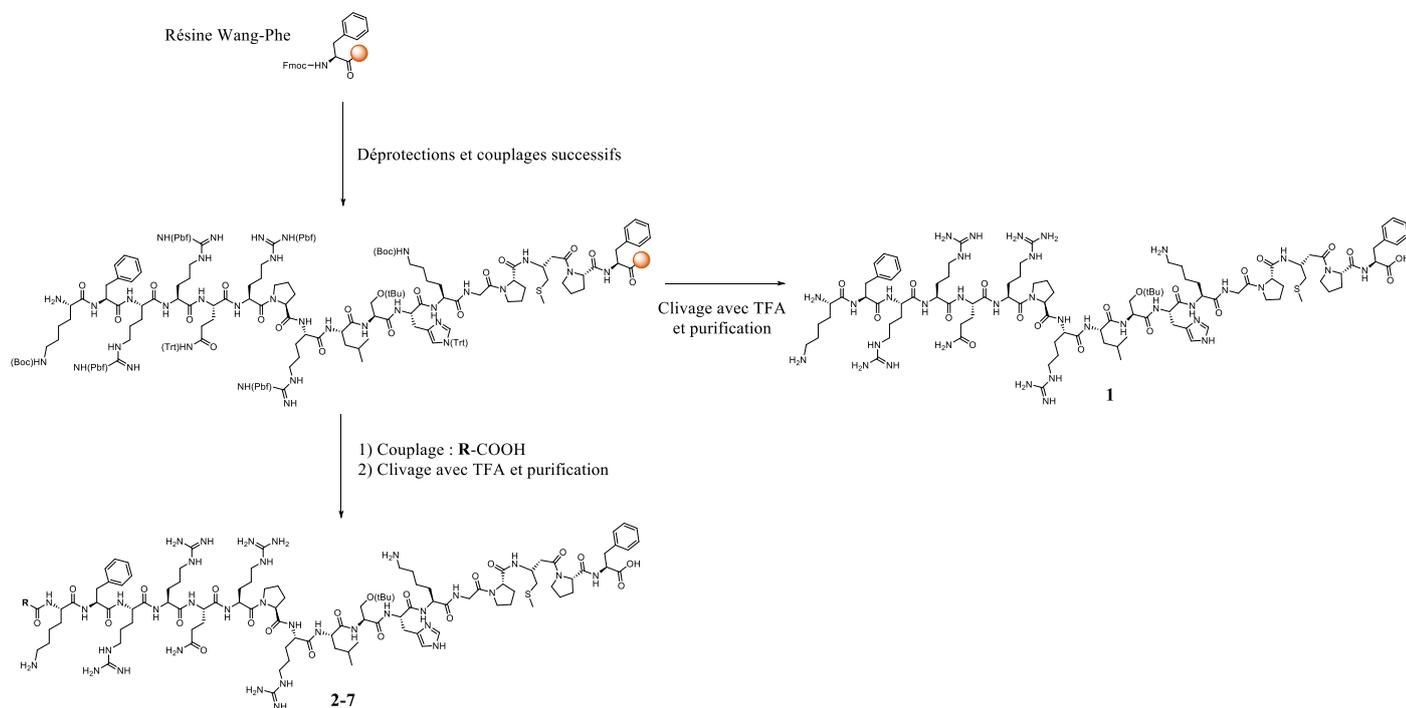


Figure 14. A) Modélisation du récepteur de l'apeline humaine complexé avec K17F ou pE13F. B) Vue détaillée de la cavité aromatique dans laquelle se situe l'acide aminé Phe en position C-terminale.¹⁰⁶

Par ailleurs, comme vu précédemment, une des stratégies classiquement utilisée pour stabiliser les peptides consiste à introduire une chaîne hydrocarbonée (H-chaîne) sur le peptide natif, comme c'est le cas pour certains dérivés de l'insuline ou pour le liraglutide utilisés tous deux en thérapie pour le traitement du diabète de type 2.^{43, 110, 44} Afin de mettre en évidence l'efficacité de notre nouvelle stratégie, nous avons choisi d'introduire cette H-chaîne palmitique $C_{15}H_{33}-COOH$ sur l'apeline-17, dans le but d'utiliser ce lipopeptide comme référence pour la suite de notre étude (Schéma 3). Une H-chaîne présentant la même longueur que la F-chaîne la plus longue a également été introduite : $C_{10}H_{21}-COOH$ (Schéma 3).

Les composés fluoroapelines ont été synthétisés sur support solide en suivant une approche Fmoc/tBu. L'apeline-17 a d'abord été synthétisée sur une résine de Wang en utilisant un synthétiseur automatique. Le peptide, monté sur résine, a ensuite été déprotégé et différentes F-chaînes ont été introduites manuellement sur support solide *via* une acylation par leur acide carboxylique activé sous forme d'ester en utilisant comme agents de couplage HBTU, HOBt et DIEA dans DMF (Schéma 3). Les peptides ont été déprotégés et coupés de leur résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler chaque fluoropeptide avec des rendements allant de 17 à 43% (37 étapes) ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). En tant que contrôle, l'apeline-17 native, l'apeline-17 acétylée et les deux

lipoapelines ont été obtenues en suivant la même approche. L'identité des peptides a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 1).



Composé	Groupement R	Structure
2	CH ₃ -	
3	CF ₃ (CF ₂) ₃ (CH ₂) ₂ -	
4	CF ₃ (CF ₂) ₅ (CH ₂) ₂ -	
5	CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ -	
6	CH ₃ (CH ₂) ₉ -	
7	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ -	

Schéma 3. Synthèse des peptides 1-7 dérivés de l'apeline-17.

Tableau 1. Caractérisation chimique de l'apeline **1** et de ses dérivés **2-7**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t_R (min)	Rendement (%)
1	2137.1956	2137.1978	6.68	43
2	2179.2062	2179.2024	6.85	23
3	2411.1996	2411.1941	8.37	24
4	2511.1932	2511.1910	9.18	17
5	2611.1868	2611.1867	10.35	28
6	2305.3470	2305.3521	9.35	28
7	2375.4253	2375.4292	10.88	26

3. Stabilités plasmatiques des différents dérivés fluoro- et lipoapelines

Afin de sélectionner le composé le plus stable dans le plasma, la demi-vie *in vitro* ($t_{1/2}$) des peptides **1** à **7** a été mesurée dans du plasma de souris à 37 °C. Comme le montre le Tableau 2, l'introduction d'une F-chaîne permet d'augmenter considérablement la stabilité plasmatique du peptide natif. Cette stabilité plasmatique s'élève même à plus de 24 h avec la F-chaîne la plus longue (C₈F₁₇, peptide **5**). Le lipopeptide **6**, composé d'une chaîne de même longueur que le fluoropeptide **5**, présente une stabilité plasmatique très inférieure ($t_{1/2} > 24$ h vs 144 min). Il faut utiliser une H-chaîne bien plus longue pour atteindre une stabilité plasmatique équivalente (peptide **7**). En effet, l'introduction d'une H-chaîne palmitique permet d'atteindre les 24 h de stabilité mais celle-ci comporte 5 atomes de carbone supplémentaires, augmentant les risques d'interactions non-spécifiques avec les membranes. Par ailleurs, en diminuant la longueur de la F-chaîne, la demi-vie plasmatique passe de plus de 24 h à 342 min avec la F-chaîne C₆F₁₃ (peptide **4**) puis à 65 min avec la F-chaîne C₄F₉ (peptide **3**), une stabilité comparable à celle obtenue pour le peptide acétylé (peptide **2**). De façon intéressante, en modulant la longueur de la F-chaîne, il est possible de moduler de manière fine la stabilité plasmatique du peptide résultant.

Tableau 2. Stabilité plasmatique des composés **1-7** mesurée dans du plasma de souris à 37 °C.

Composé	Groupement en partie	Demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$, min)
	N-terminale	
1	H-	4.6 ± 0.6
2	CH ₃ CO-	54 ± 6
3	CF ₃ (CF ₂) ₃ (CH ₂) ₂ CO-	65 ± 2
4	CF ₃ (CF ₂) ₅ (CH ₂) ₂ CO-	342 ± 12
5	CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ CO-	> 1440
6	CH ₃ (CH ₂) ₉ CO-	144 ± 6
7	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO-	> 1440

Afin d'étendre la stratégie à différentes espèces, la stabilité des peptides a été évaluée dans du plasma de rat et humain. Comme le montre la Figure 15, des stabilités comparables à celles obtenues dans le plasma de souris ont été obtenues pour la fluoroapeline **5** et la lipoapeline **7** ($t_{1/2} > 24$ h), alors que le peptide natif **1** est dégradé en quelques minutes ($t_{1/2} = 9$ min dans le plasma de rat et 12 min dans le plasma humain). Ces résultats confirment l'application possible de la stratégie de stabilisation à différentes espèces, dont l'Homme, ce qui est très encourageant pour le développement d'un peptide thérapeutique pour le traitement de maladies cardiovasculaires.

Après avoir identifié le peptide **5** comme étant le fluoropeptide le plus stable, nous avons décidé d'évaluer ses propriétés pharmacologiques telles que son affinité pour le récepteur APJ, son activité fonctionnelle et son activité biologique *in vivo*. Afin de mettre en évidence les avantages de notre approche, tous les résultats ont été comparés avec ceux obtenus pour le peptide natif **1** et pour le lipopeptide **7**, utilisé respectivement comme contrôle et comme référence.

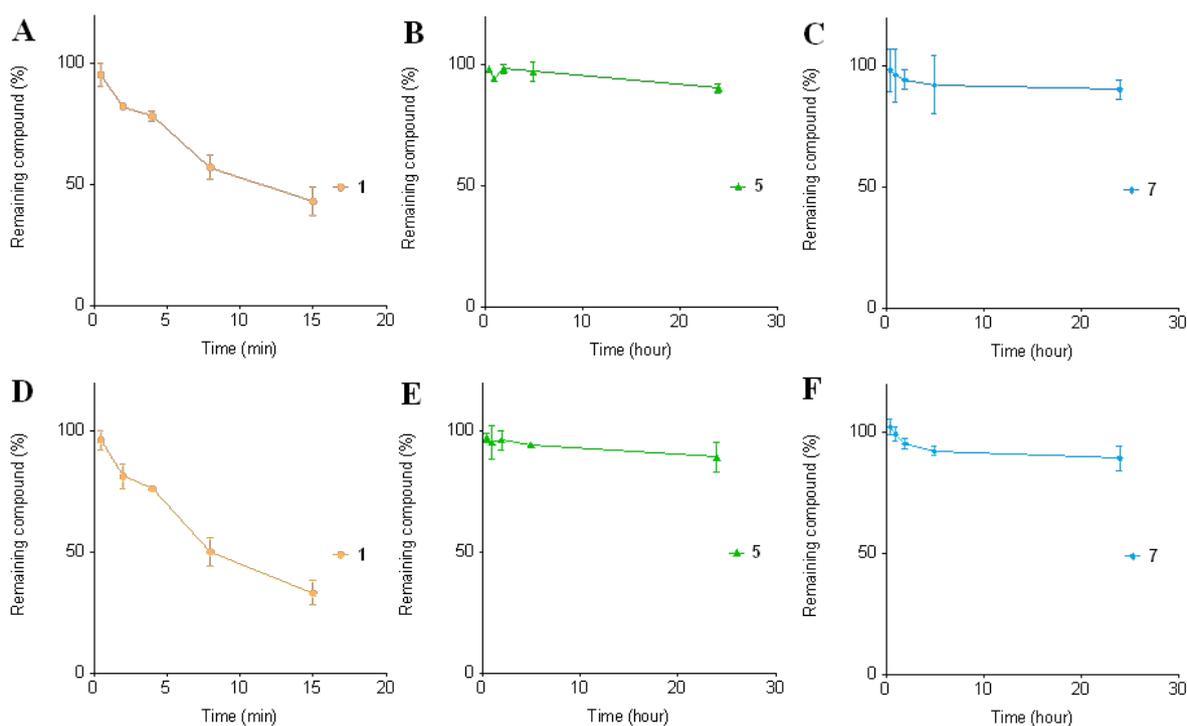


Figure 15. Evaluation de la stabilité plasmatique des composés **1**, **5** et **7** dans du plasma humain (A, B et C) et dans du plasma de rat (D, E et F).

4. Evaluation pharmacologique

4.1. Mesure de l'affinité pour le récepteur de l'apeline

Afin d'évaluer l'impact de la F-chaîne sur les propriétés pharmacologiques du peptide, une première étude de mesure de l'affinité du fluoropeptide pour le récepteur de l'apeline a été réalisée. Cette expérience, effectuée par Xavier Iturrioz (Collège de France), repose sur un test de compétition de liaison sur des membranes de cellules CHO qui expriment le récepteur humain de l'apeline, utilisant [¹²⁵I]-apeline-13 comme radioligand. Ainsi, comme le montre la Figure 16 et le Tableau 3, nous avons pu mettre en évidence que l'introduction d'une F-chaîne a peu d'impact sur l'affinité du peptide pour son récepteur puisqu'on conserve une affinité *sub*-nanomolaire ($K_i = 0.21 \pm 0.03$ nM), similaire à celle obtenue pour l'apeline native **1** ($K_i = 0.06 \pm 0.01$ nM) et pour la lipoapeline **7** ($K_i = 0.76 \pm 0.13$ nM).

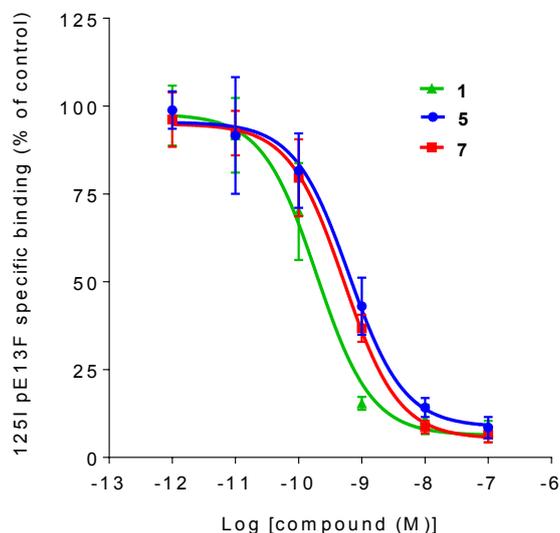


Figure 16. Evaluation de l'affinité des composés **1**, **5** et **7** pour le récepteur de l'apeline.

Tableau 3. Affinité des composés **1**, **5** et **7** pour le récepteur de l'apeline.

Composé	Groupement en partie N-terminale	Affinité pour le récepteur de l'apeline, K_i (nM)
1	H-	0.06 ± 0.01
5	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$	0.21 ± 0.03
7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$	0.76 ± 0.13

4.2. Evaluation de l'activité fonctionnelle

Nous avons également étudié l'impact de l'introduction de la F-chaîne sur l'activité fonctionnelle du peptide, comme notamment sa capacité à inhiber la production d'AMPC induite par la forskoline. Pour cela, Xavier Iturrioz (Collège de France), a incubé des cellules CHO exprimant le récepteur de l'apeline chez le rat en présence de 5 μM de forskoline. Après ajout de concentrations croissantes de **1**, **5** et **7** (10 nM à 100 μM), des valeurs d' CI_{50} ont pu être déterminées (Figure 17 et Tableau 4). Il a ainsi été montré que l'incorporation d'une F-chaîne a un impact limité sur la capacité du fluoropeptide à inhiber la production d'AMPC induite par la forskoline puisque l'inhibition s'effectue dans les mêmes concentrations avec une CI_{50} de 1.71 ± 0.28 nM pour le fluoropeptide **5**, similaire à celle du peptide natif **1** (0.30 ± 0.10 nM), et du lipopeptide **7** (3.90 ± 1.50 nM).

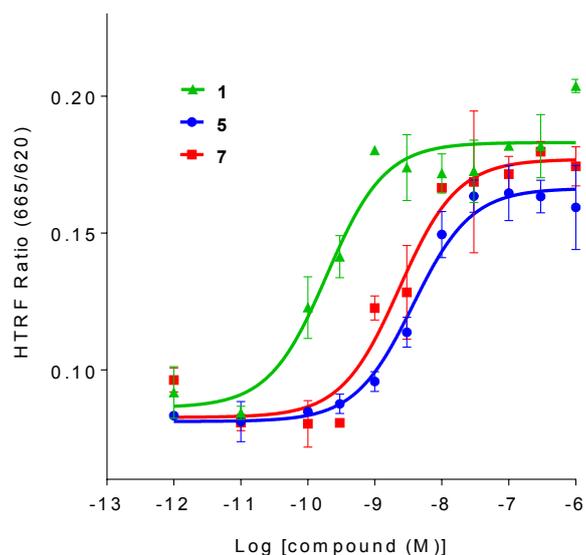


Figure 17. Evaluation de l'activité fonctionnelle des composés **1**, **5** et **7** sur le récepteur de l'apeline.

Tableau 4. Activité fonctionnelle des composés **1**, **5** et **7** en mesurant leur capacité à inhiber l'AMP cyclique induite par la forskoline.

Composé	Groupement en partie N-terminale	Inhibition AMPc, CI_{50} (nM)
1	H-	0.30 ± 0.10
5	$CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-$	1.71 ± 0.28
7	$CH_3(CH_2)_{14}CO-$	3.90 ± 1.50

Nous pouvons alors conclure que l'introduction de la F-chaîne ou de la H-chaîne a peu d'impact sur l'affinité du peptide natif pour son récepteur et sur son activité fonctionnelle alors qu'elles permettent d'augmenter considérablement sa stabilité plasmatique de 4.6 min à plus de 24 h.

5. Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité pro-inflammatoire

Dans le but d'étudier la biocompatibilité de la F-chaîne, nous avons également évalué la cytotoxicité de la fluoroapeline **5** sur des globules rouges et des macrophages.

5.1. Evaluation de la viabilité cellulaire

Tout d'abord, un test de mesure de la viabilité cellulaire a été réalisé sur des cellules macrophages de souris (RAW 264.7) incubées pendant 24 h en présence de différentes concentrations en apeline native **1**, fluoroapeline **5**, et lipoapeline **7**. L'activité métabolique des cellules a ensuite été mesurée en les incubant 1 h en présence d'un sel de tétrazolium. Si les cellules sont métaboliquement actives, les enzymes déshydrogénases présentes dans les mitochondries vont convertir le sel de tétrazolium en cristaux de formazan dosables par spectroscopie UV-visible. Ainsi, la mesure de l'absorbance des cristaux de formazan à 490 nm est directement proportionnelle aux cellules métaboliquement actives et donc vivantes.

Les résultats de cette étude (Figure 18) mettent en évidence que la fluoroapeline **5**, tout comme l'apeline native **1**, n'induisent pas de perte de viabilité cellulaire en dessous de 30 μM (concentration maximale évaluée). En revanche, la lipoapeline **7** est hautement toxique pour les cellules puisque ces dernières deviennent métaboliquement inactives à partir de 7 μM . Ainsi, comparé à la lipoapeline, la fluoroapeline ne présente pas de toxicité cellulaire jusqu'à 30 μM .

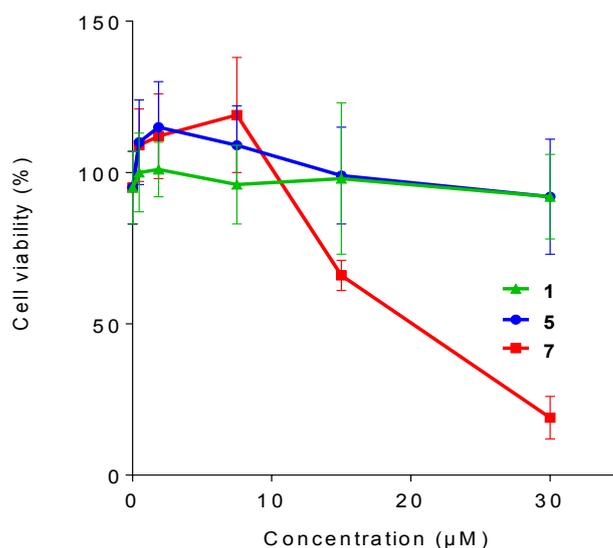


Figure 18. Viabilité cellulaire après 24 h d'incubation des peptides **1**, **5** et **7** sur des cellules RAW 264.7.

5.2. Evaluation de l'activité pro-inflammatoire

Afin d'évaluer l'activité pro-inflammatoire des trois composés, les surnageants des mêmes cellules RAW 264.7 (incubées pendant 24 h en présence de différentes concentrations en apeline native **1**, fluoroapeline **5**, et lipoapeline **7**) ont également été caractérisés. En effet, en réponse à un agent pro-inflammatoire, les macrophages induisent la production de TNF-alpha dans le surnageant. En mesurant la concentration en TNF-alpha par un test ELISA, il est donc possible de comparer l'activité pro-inflammatoire des trois composés.

Comme le montre la Figure 19, les cellules incubées en présence de 15 μM d'apeline native **1** ou de fluoroapeline **5** n'ont pas induit la production de TNF-alpha, mettant en évidence l'absence d'effet pro-inflammatoire à 15 μM . Au contraire, le lipopeptide **7** présente une activité pro-inflammatoire puisque, à cette concentration, il induit une petite production de TNF-alpha.

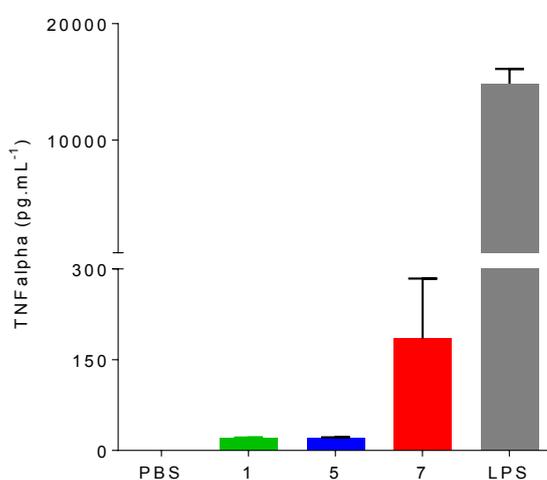


Figure 19. Production de TNF-alpha après 24 h d'incubation des peptides **1**, **5** et **7** (15 μM) sur des cellules RAW 264.7.

5.3. Evaluation de l'activité hémolytique

Dans le but de mesurer l'activité hémolytique de l'apeline native **1**, de la fluoroapeline **5** et de la lipoapeline **7**, différentes concentrations en peptide ont été déposées sur des globules rouges de mouton et laissées 30 min à incuber. Les cellules ont ensuite été centrifugées afin de doser l'hémoglobine libérée dans le surnageant lors de la lyse des cellules provoquée par un détergent, le TritonX-100. Une analyse de l'absorbance de l'hémoglobine à 550 nm nous a permis de déterminer le pourcentage d'hémolyse en comparant les résultats avec des cellules complètement lysées par le TritonX-100.

Comme le montre la Figure 20, la fluoroapeline **5** présente une activité hémolytique très faible, même à 30 μM , proche de celle mesurée pour l'apeline native **1**. Au contraire, la lipoapeline **7** commence à induire la lyse des globules rouges à partir de 7 μM jusqu'à entraîner une lyse complète des cellules à 30 μM .

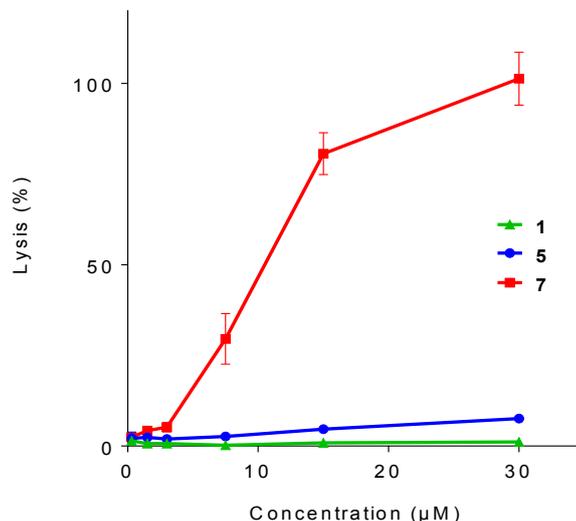


Figure 20. Activité hémolytique après 30 min d'incubation des peptides **1**, **5** et **7** sur des cellules globules rouges.

L'ensemble de ces résultats met en évidence une bien meilleure biocompatibilité de la fluoroapeline **5** en comparaison avec la lipoapeline **7**. En effet, en dessous de 30 μM , la fluoroapeline n'entraîne pas de perte de viabilité cellulaire et ne présente pratiquement pas d'activité hémolytique. De même, à 15 μM , elle n'induit pas non plus d'inflammation. L'introduction d'une H-chaîne est au contraire fortement cytotoxique. Elle entraîne la perte de viabilité cellulaire, la lyse des membranes des globules rouges, ainsi qu'une activité pro-inflammatoire. Par conséquent, afin de minimiser les effets toxiques lors du développement d'un nouveau médicament, l'utilisation d'une F-chaîne pour stabiliser un peptide thérapeutique semble plus prometteuse que la stratégie de stabilisation existante avec les H-chaînes. Après avoir étudié l'ensemble des propriétés pharmacologiques et toxicologiques *in vitro* de la fluoroapeline et démontré l'efficacité de notre approche à augmenter la stabilité plasmatique sans induire de toxicité ou de perte de l'activité fonctionnelle du peptide, il est important de vérifier également l'activité biologique *in vivo* de ce fluoropeptide.

6. Evaluation de l'activité biologique *in vivo*

Pour finir, l'activité biologique des peptides **1**, **5** et **7** a donc été évaluée *in vivo*. Comme vu précédemment, l'apeline native est connue pour agir sur la fonction cardiovasculaire en diminuant la pression artérielle. La capacité des peptides **1**, **5** et **7** à moduler la pression artérielle a donc été évaluée dans un modèle de rats alertes et normo-tendus. L'expérience a été réalisée par Adrien Flahault (Collège de France) en insérant un cathéter dans la veine droite fémorale pour injecter les composés et un autre cathéter dans l'artère droite fémorale pour enregistrer la pression artérielle moyenne.

La Figure 21 représente directement la diminution de pression artérielle moyenne en comparaison avec le niveau basal mesuré pour des rats normo-tendus non traités. Comme montré sur la Figure 21, l'injection intraveineuse d'apeline native **1**, à une dose de 15 nmol/kg, n'induit pas de diminution de pression artérielle. Il faut augmenter la dose à 400 nmol/kg pour observer un effet sur la diminution de pression. Au contraire, l'injection intraveineuse de la fluoroapeline **5** et de la lipoapeline **7** à la dose de 15 nmol/kg diminue considérablement la pression artérielle de 59 ± 3 et de 38

± 2 mmHg respectivement. L'effet hypotensif est maximal 10 min après l'injection pour la fluoroapeline et 7.5 min après l'injection pour la lipoapeline. En calculant l'aire sous les courbes de réponse obtenues sur la Figure 21 entre 0 et 30 minutes (pour **1** : 1.2 ± 0.4 , pour **5** : 18.6 ± 2 et pour **7** : 10.4 ± 2 mmHg.min) nous pouvons conclure que la fluoroapeline **5** présente un effet biologique 16 fois plus important que l'apeline native **1** et environ 2 fois plus important que la lipoapeline **7**.

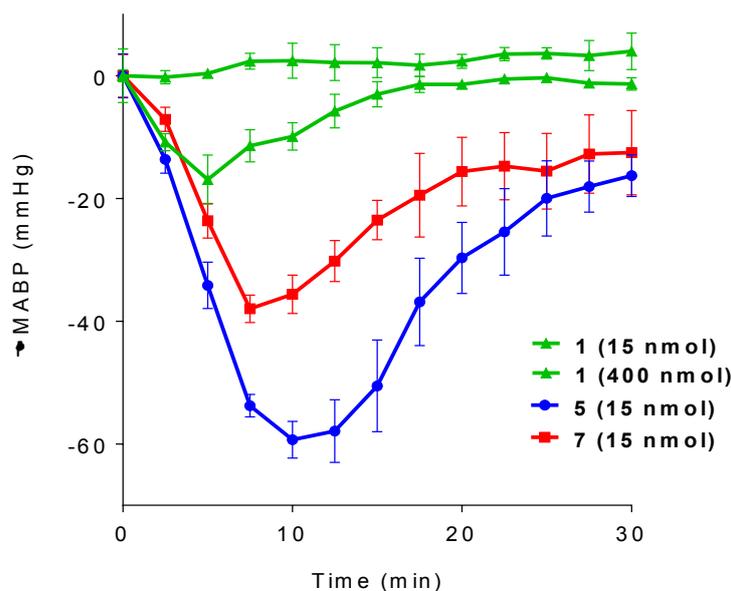


Figure 21. Effet de l'injection intraveineuse des peptides **1**, **5** et **7** sur la pression artérielle de rats vigiles et normo-tendus. Représentation de la diminution de pression artérielle (MABP) après une injection unique de **1** (15 et 400 nmol/kg, $n = 3$), **5** (15 nmol/kg, $n = 3$) et **7** (15 nmol/kg, $n = 3$) chez des rats mâles Sprague-Dawley.

7. Conclusion et perspectives

En travaillant sur ce peptide modèle, nous avons pu mettre en évidence que notre stratégie d'introduction d'une F-chaîne permettait bien d'augmenter considérablement la stabilité plasmatique du peptide natif de 4.6 min jusqu'à plus de 24 h avec la F-chaîne C₈F₁₇. Nous avons également montré qu'en modulant la longueur de la F-chaîne il était possible de venir réguler très finement la stabilité plasmatique du peptide natif. De même, il a été mis en avant que l'introduction d'une F-chaîne a peu d'impact sur l'affinité du peptide pour son récepteur ni sur son activité fonctionnelle *in*

vitro et que celle-ci n'induit pas non plus de cytotoxicité ou d'activité pro-inflammatoire jusqu'à 30 μM . L'activité biologique est, quant à elle, grandement améliorée par l'ajout de cette F-chaîne puisqu'à des doses relativement faibles nous obtenons un effet biologique largement amplifié sur la diminution de pression artérielle par rapport au peptide natif. Afin de mettre en avant les avantages à introduire une F-chaîne par rapport à une H-chaîne, habituellement utilisée pour stabiliser les peptides, une chaîne palmitoyle a également été introduite sur l'apeline. Cette lipoapeline présente le même profil pharmacologique et la même stabilité plasmatique que la fluoroapeline. Cependant, ce lipopeptide est moins biocompatible puisqu'il induit une forte activité hémolytique et pro-inflammatoire à partir de 7 μM . De même, la H-chaîne ne permet pas d'améliorer l'activité biologique *in vivo* de manière aussi efficace que la F-chaîne. Nous pouvons donc conclure que l'introduction d'une F-chaîne par rapport à une H-chaîne est une stratégie de stabilisation davantage biocompatible et efficace qui permet également d'améliorer l'activité biologique du peptide *in vivo*. Actuellement, le potentiel de la fluoroapeline comme éventuel candidat médicament pour le traitement de maladies cardiovasculaires telles que l'insuffisance cardiaque est en cours d'étude dans l'équipe de Catherine Llorens-Cortes (Collège de France).

Chapitre 2

**Conception de sondes fluorescentes
pour l'étude des interactions
ligand/récepteur et du trafic cellulaire
des fluoropeptides**

1. Introduction à la fluorescence : un outil pour suivre les interactions cellulaires

Depuis quelques dizaines d'années, les sondes fluorescentes sont de plus en plus utilisées pour étudier les procédés cellulaires.¹¹¹ La détection par fluorescence présente de nombreux avantages en comparaison avec les autres techniques d'imagerie moléculaire existantes. En effet, cette méthode offre une excellente sensibilité puisqu'elle permet d'imager une molécule isolée tout en présentant des temps de réponse extrêmement rapides (jusqu'à 10^{-8} à 10^{-10} s), limités seulement par la vitesse des procédés photo-physiques.¹¹² Les sondes fluorescence sont également une excellente alternative aux sondes radioactives. Le caractère non-invasif et non-destructif de cette technique lui permet d'être compatible avec les applications biologiques et médicales. De nos jours, cette détection par fluorescence est la technique la plus utilisée en biologie ou biochimie pour étudier les phénomènes cellulaires à un niveau moléculaire ainsi qu'en imagerie biomédicale pour visualiser des tissus ou un animal entier. La fluorescence est donc utilisée pour l'imagerie cellulaire¹¹³, pour des essais d'immunofluorescence¹¹⁴, pour mesurer la concentration d'une molécule à l'intérieur d'une cellule¹¹⁵, pour étudier le repliement et la dynamique des protéines¹¹⁶, ainsi que pour le suivi les interactions biomoléculaires¹¹⁷ ou pour la détection et la quantification des interactions ligand-récepteur.^{118, 119, 120} De ce fait, l'intérêt des ligands fluorescents pour l'étude des RCPG a été reconnu depuis de nombreuses années.¹²¹ Ces outils permettent la visualisation et la localisation des RCPG sur cellules et tissus, l'étude des changements conformationnels induits par la liaison d'un agoniste, le suivi en temps réel et la quantification de l'interaction ligand-RCPG, ainsi que la découverte de nouveaux ligands de RCPG. De nombreux ligands fluorescents ont ainsi été synthétisés et de nouveaux essais analytiques adaptés à l'étude des RCPG ont été développés (ELISA, anisotropie de fluorescence, FRET, TR-FRET).^{122, 123, 124, 125}

En vue d'étudier, *in cellulo*, la pharmacologie de la fluoroapeline ainsi que sa spécificité d'interaction avec son récepteur et son trafic intracellulaire, des sondes fluorescentes, dérivées de ce fluoropeptide, ont été développées. A ce jour, peu de ligands fluorescents pour le récepteur de l'apeline ont été décrits et l'étude du trafic cellulaire d'un fluoropeptide n'a encore jamais été effectuée. L'apeline-13 a été modifiée

soit par la Fluorescéine¹²⁶ soit par la Lissamine Rhodamine B (LRB)⁷⁸, mais les ligands résultants présentent une diminution significative de l'affinité pour le récepteur. Nous avons donc envisagé l'introduction d'un fluorophore dérivé d'une cyanine 5, le DY647, qui absorbe et émet en fluorescence dans le rouge lointain, afin de s'affranchir des phénomènes de photo-dommages cellulaires et de contamination due à l'auto-fluorescence des cellules qu'on rencontre avec des sondes excitables dans les régions bleue ou verte.^{127, 128}

2. Conception, synthèse et évaluation de sondes fluorescentes DY647 dérivées de l'apeline, de la fluoroapeline et de la lipoapeline

2.1. Conception et synthèse

Afin d'étudier, *in vitro*, la spécificité d'interaction de la fluoroapeline **5** avec son récepteur ainsi que son trafic intracellulaire, nous avons tout d'abord choisi d'introduire le fluorophore DY647 sur ce peptide. Ce fluorophore a été sélectionné car il présente une excellente brillance (coefficient d'extinction molaire de $250\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et qu'il est excitable dans le rouge lointain (647 nm), une zone d'excitation idéale pour des études sur cellules puisqu'elle permet de s'affranchir de l'auto-fluorescence cellulaire et de limiter également les dommages cellulaires.^{127, 128} De plus, son excitation ne se recoupe pas avec l'émission de la protéine fluorescente verte (GFP) ce qui permet l'utilisation de cellules dont les récepteurs APJ sont fusionnés à la GFP. Ce nouvel outil fluorescent devrait nous permettre de suivre, de manière très fine, les interactions spécifiques et non-spécifiques de la fluoroapeline avec son récepteur ainsi que sa capacité d'internalisation.

Nous avons choisi d'introduire le fluorophore DY647 sur la lysine se situant en partie N-terminale de l'apeline-17 en nous basant sur les études des relations structure-activité et de modélisation moléculaire précédemment décrites.¹⁰⁶ En effet, comme vu précédemment, ces études mettent en évidence que l'acide aminé Phe¹⁷ interagit avec le fond de la cavité du récepteur par des interactions de type π - π et que l'Arg⁶, l'Arg⁸ et la Lys¹² interagissent à l'entrée du site de liaison par interactions électrostatiques. Il est

donc primordial de ne pas toucher à toute cette partie de la séquence du peptide qui se situe dans la cavité du récepteur afin de ne pas perdre l'affinité du peptide pour son récepteur.

Comme l'apeline-17 comporte deux lysines dans sa séquence peptidique, il était important de venir introduire le fluorophore uniquement sur la lysine terminale sans modifier la Lys¹². Pour cela, nous avons remplacé la lysine N-terminale par une lysine que nous avons préalablement modifiée par une fonction hydrazine (Schéma 5). Cette modification chimique permet d'abaisser le pK_a de la lysine N-terminale de 10 à 6. Ainsi, en travaillant à pH 5.2, la Lys¹² sera protégée par protonation (pK_a = 10) et l'introduction du fluorophore DY647 se fera donc préférentiellement sur la fonction hydrazino de la lysine N-terminale (pK_a = 6).¹²⁹

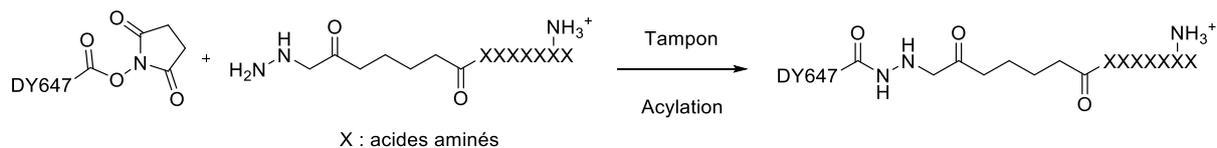


Schéma 5. Stratégie générale pour la synthèse de sondes fluorescentes par acylation chimiosélective d'hydrazinopeptides.

Pour effectuer la synthèse de cette fluoroapeline fluorescente, nous avons tout d'abord couplé les 16 premiers acides aminés de l'apeline-17 sur support solide en suivant une approche Fmoc/tBu. Après élongation du peptide sur une résine de Wang en utilisant un synthétiseur automatique, la Fmoc-L-Lys(N,N,N'-tris(Boc)hydrazinoacetyl)-OH (Fmoc-L-Lys((Boc)3aza-Gly)-OH) a été introduite manuellement sur support solide suivie de la F-chaîne activée sous forme d'ester, en utilisant comme agents de couplage HBTU, HOBt et DIEA dans DMF (Schéma 6). Les peptides ont ensuite été déprotégés et coupés de leur résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la fluoro-hydrazino-apeline **13** avec un rendement de 16% (37 étapes) et une très bonne pureté (> 95%). En tant que contrôle et référence, les hydrazino-peptides dérivés de

l'apeline acétylée **12** (rendement de 23% - 35 étapes), et de la lipoapeline **14** (rendement de 17% - 35 étapes) ont également été synthétisés en suivant la même approche. L'identité des peptides a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à basse résolution (Tableau 5).

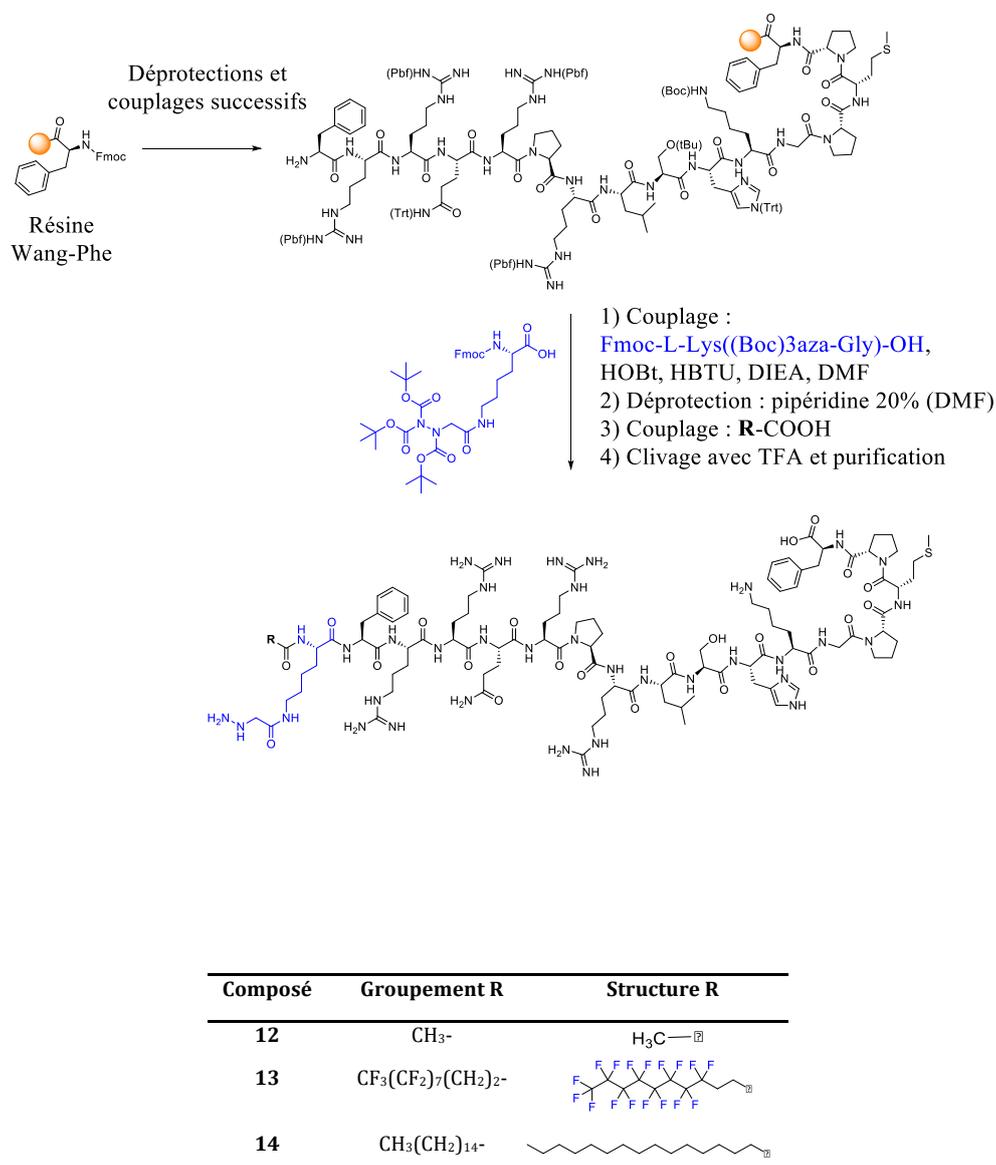
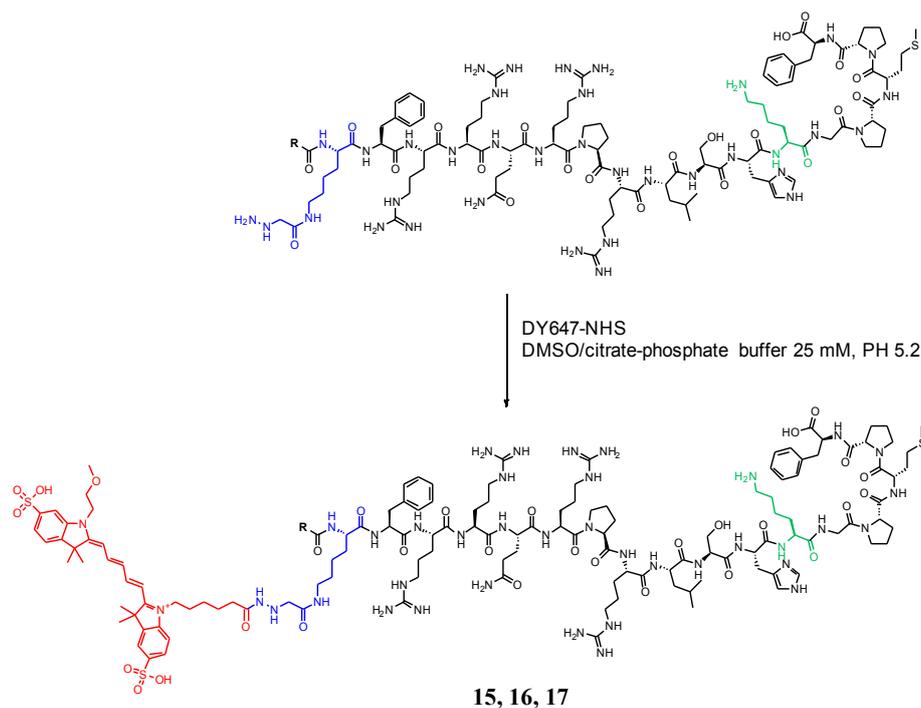


Schéma 6. Synthèse des dérivés hydrazino de l'apeline (**12**), de la fluoroapeline (**13**), et de la lipoapeline (**14**).

Tableau 5. Caractérisation chimique des dérivés hydrazino de l'apeline.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMBR)	CLHP t _R (min)	Rendement (%)
12	2252.2	2252.2	6.94	23
13	2684.2	2684.2	10.19	16
14	2448.4	2448.4	11.17	17

En raison du coût et de la sensibilité chimique du fluorophore DY647 aux conditions acides, nous avons choisi de ne pas l'introduire sur support solide puisque cette technique nécessite l'utilisation d'un large excès de réactif et d'un traitement final en condition acide pour séparer le peptide de la résine. De ce fait, les hydrazino-peptides **12**, **13** et **14** ont été ensuite engagés dans l'acylation chimio-sélective en solution du fluorophore DY647 activé par un ester de N-hydroxysuccinimide (DY647-NHS) (Schéma 7). En réalisant la réaction à pH 5.2 pendant 1 h, l'acylation sélective totale de l'hydrazine par le fluorophore DY647-NHS a pu être réalisée. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la fluoroapeline fluorescente **16** avec un rendement de 80% et une très bonne pureté (> 95%). En tant que contrôle et référence, l'apeline fluorescente **15** (rendement de 82%), et la lipoapeline fluorescente **17** (rendement de 92%) ont également été synthétisées en suivant la même approche. L'identité des peptides a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 6).



Composé	Groupement R	Structure R
15	CH ₃ -	
16	CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ -	
17	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ -	

Schéma 7. Synthèse des dérivés fluorescents DY647 de l'apeline (**15**), de la fluoroapeline (**16**), et de la lipoapeline (**17**).

Tableau 6. Caractérisation chimique des dérivés fluorescents DY647 de l'apeline.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t _R (min)	Rendement (%)
15	2919.4611	2919.4613	8.31	82
16	3351.4418	3351.4385	10.77	80
17	3115.6802	3115.6812	11.57	92

2.2. Evaluation pharmacologique

Afin de valider ces nouveaux outils fluorescents et confirmer leur utilisation pour le suivi des interactions ligand/récepteur sur cellules, nous avons voulu vérifier si leur affinité pour le récepteur de l'apeline n'était pas modifiée suite à l'introduction du fluorophore. Cette expérience, effectuée par Xavier Iturrioz (Collège de France), a été réalisée comme précédemment décrit par un test de compétition de liaison sur des membranes de cellules CHO qui expriment le récepteur humain de l'apeline, utilisant [¹²⁵I]-apeline-13 comme radioligand. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que l'introduction du fluorophore DY647 a un impact très limité sur l'affinité du peptide pour son récepteur (Figure 22 et Tableau 7) puisqu'on conserve toujours des affinités *sub*-nanomolaires pour l'apeline **15** ($K_i = 0.16 \pm 0.03$ nM), la fluoroapeline **16** ($K_i = 0.45 \pm 0.03$ nM) et la lipoapeline **17** ($K_i = 0.31 \pm 0.11$ nM). Le fluoroapeline **16** représente donc la première sonde fluorescente dans le rouge lointain, stables, et d'affinité *sub*-nanomolaire pour le récepteur de l'apeline.

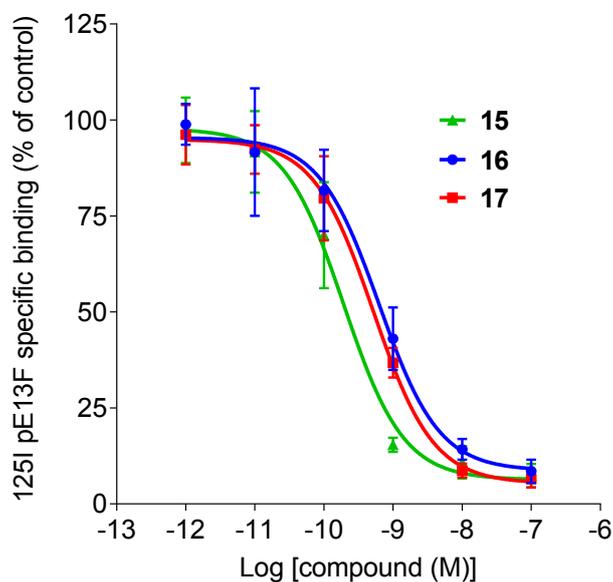


Figure 22. Evaluation de l'affinité des composés **15**, **16** et **17** pour le récepteur de l'apeline.

Tableau 7. Affinité des composés **1**, **15**, **16** et **17** pour le récepteur de l'apeline.

Composé	Groupement en partie N-terminale	Affinité pour le récepteur de l'apeline, K_i (nM)
1	H-	0.06 ± 0.01
15	CH ₃ CO-	0.16 ± 0.03
16	CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ CO-	0.45 ± 0.03
17	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO-	0.31 ± 0.11

2.3. Caractérisation spectrale des sondes

Nous avons évalué les propriétés spectrales de notre sonde fluoroapeline **16** afin de confirmer que l'introduction du fluorophore DY647 sur un peptide n'impact pas ses propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence. Le fournisseur Dyomics GmbH indique que, dans l'éthanol, le DY647 possède un maximum de fluorescence à 653 nm et une émission de fluorescence maximale à 672 nm. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 23, nous retrouvons exactement les mêmes valeurs pour la sonde fluoroapeline fluorescente **16**. Nous confirmons ainsi que l'introduction du DY647 sur l'apeline ne modifie pas ses propriétés spectrales.

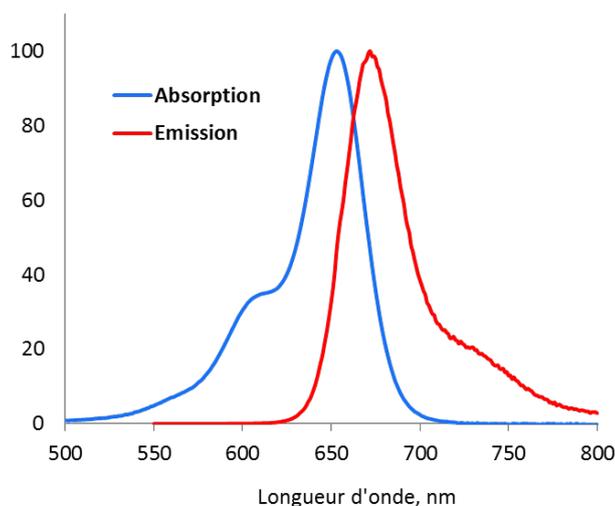


Figure 23. Caractérisation spectrale de la sonde fluoroapeline **16** dans le solvant éthanol.

2.4. Evaluation *in cellulo*

2.4.1. Etude des interactions avec les membranes cellulaires

Afin d'étudier l'impact de l'introduction d'une F-chaîne ou H-chaîne sur les interactions du peptide avec les membranes cellulaires, 50 nM des trois peptides fluorescents **15**, **16** et **17** ont été déposés sur des cellules HEK293 et le noyau des cellules a été marqué par le colorant Hoechst (en bleu). . Après incubation pendant 5 min et/ou 1 h à température ambiante, des images des cellules ont ensuite été réalisées par microscopie confocale suivant deux canaux : un canal pour le colorant Hoechst (excitation : 405 nm ; émission : 415 à 490 nm) et un canal pour la sonde DY647 (excitation : 635 nm ; émission : 645 à 750 nm). Comme le montre la Figure 24a, l'apeline ne présente aucune interaction non-spécifique avec les membranes. De façon similaire, nous pouvons voir sur la Figure 24b que la fluoroapeline se lie faiblement aux membranes cellulaires mais l'intensité de fluorescence est bien moins élevée que celle obtenue avec le lipopeptide (Figure 24c) qui semblent induire beaucoup plus d'interactions non-spécifiques. Nous pouvons également observer sur la Figure 24d qu'au bout d'une heure, à température ambiante, des vésicules intra-cytoplasmiques apparaissent montrant que le lipopeptide a pénétré dans la cellule de manière indépendante à la liaison à son récepteur.

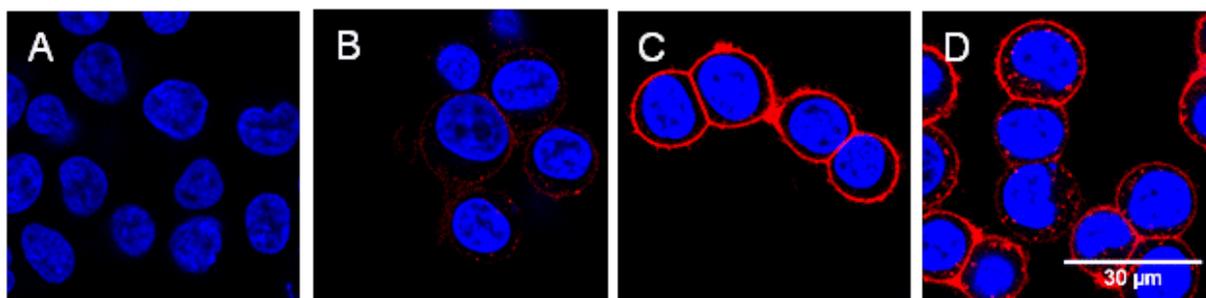


Figure 24. Evaluation des sondes fluorescentes DY647 dérivées de l'apeline **15**, de la fluoroapeline **15** et de la lipoapeline **17** par imagerie confocale sur des cellules HEK293 qui ne surexpriment pas le récepteur de l'apeline et dont le noyau est marqué avec un colorant Hoechst (en bleu). Les interactions non-spécifiques avec les membranes sont visibles (en rouge) après 5 min d'incubation des cellules à température ambiante en présence de 50 nM de peptides **15** (a), **16** (b) et **17** (c). Le lipopeptide **17** a également été observé après une incubation de 60 min à température ambiante (d).

Afin de quantifier précisément la différence d'interactions non-spécifiques avec les membranes entre la fluoroapeline et la lipoapeline, une étude supplémentaire a été réalisée par mesure de cytométrie en flux. Cette technique permet de mesurer une par une la fluorescence globale des cellules. 100 nM des trois peptides fluorescents **15**, **16** et **17** ont alors été déposés sur les cellules HEK293. La fluorescence des cellules a ensuite été évaluée au cytomètre en flux, nous permettant de tracer l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) pour chacun des trois peptides. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 25, la lipoapeline **17** présente un signal 5 fois supérieur à la fluoroapeline **16**. Cette mesure confirme que le lipopeptide interagit bien plus fortement avec les membranes cellulaires que le fluoropeptide.

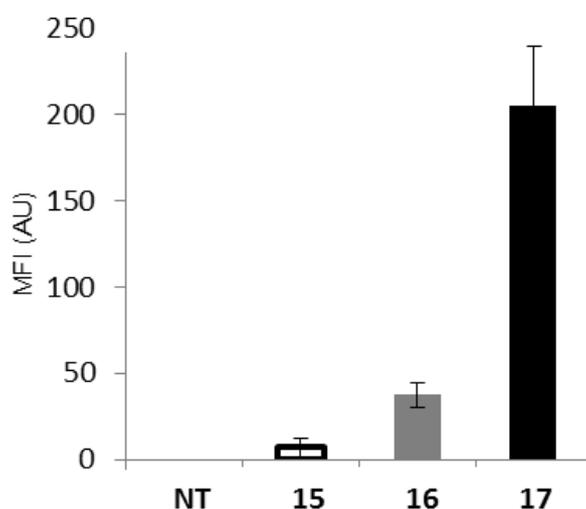


Figure 25. Evaluation des sondes fluorescentes DY647 dérivées de l'apeline **15**, de la fluoroapeline **16** et de la lipoapeline **17** par cytométrie en flux. Les interactions non-spécifiques avec les membranes ont été quantifiées sur les cellules HEK293 qui ne surexpriment pas le récepteur de l'apeline. Les profils de fluorescence ont été traduits en présentant les intensités moyennes de fluorescence (MFI) pour chacun des composés.

Cette forte interaction avec les membranes et cette capacité à internaliser indépendamment du récepteur pourrait potentiellement expliquer la forte activité hémolytique et la toxicité cellulaire que nous avons précédemment mesurées pour le lipopeptide. En se liant aux membranes, le lipopeptide pourrait entraîner des déstabilisations membranaires, voire la lyse des cellules. Cette augmentation des interactions non-spécifiques du lipopeptide en comparaison du fluoropeptide pourrait également expliquer la plus faible activité *in vivo* du lipopeptide.

2.4.2. Etude de la spécificité d'interaction des peptides pour le récepteur de l'apeline

Afin d'évaluer la liaison spécifique de la fluoroapeline à son récepteur, nous avons réalisé une expérience de compétition sur des cellules HEK293 surexprimant le récepteur de l'apeline auquel est fusionné une GFP (GFP-APJ-HEK293). Un excès (20 équiv.) d'apeline-17 non fluorescente **1** a été ajouté sur les cellules en compétition avec les sondes **15**, **16** et **17** (50 nM). Après 5 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été imagées par microscopie confocale suivant deux canaux : un canal pour la GFP (excitation : 488 nm ; émission : 500 à 580 nm) et un canal pour la sonde DY647 (excitation : 635 nm ; émission : 645 à 750 nm). Les images des Figures 26a et 26b montrent que la fluoroapeline **16** présente une excellente spécificité, tout comme l'apeline **15** puisqu'après saturation des récepteurs par le compétiteur, le signal de fluorescence des peptides disparaît. Au contraire, après avoir réalisé la compétition, nous pouvons observer une fluorescence membranaire résiduelle pour la lipoapeline (Figure 26c). Cette fluorescence résiduelle est due aux fortes interactions membranaires induites par la présence de la H-chaîne. Ainsi, ces expériences de compétition mettent en évidence que l'introduction d'une H-chaîne entraîne une diminution de la spécificité du peptide pour son récepteur contrairement à l'introduction de la F-chaîne qui permet de conserver une excellente spécificité de liaison.

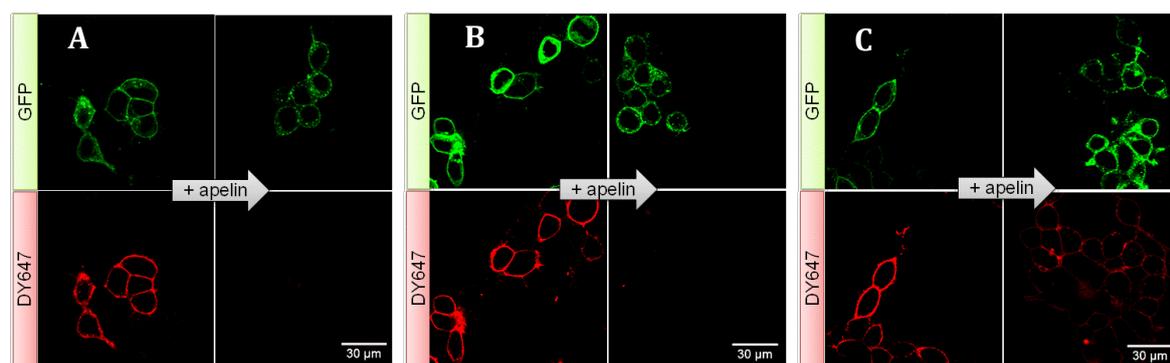


Figure 26. Evaluation des sondes fluorescentes DY647 dérivées de l'apeline **15** (a), de la fluoroapeline **16** (b) et de la lipoapeline **17** (c) par imagerie confocale sur des cellules GFP-APJ-HEK293, avec ou sans addition d'un excès d'apeline-17 native **1** (20 équiv.).

2.4.3. Etude de l'effet agoniste de la fluoroapeline

L'apeline est un agoniste au regard de l'internalisation du récepteur. En effet, en se liant au récepteur, elle provoque son internalisation. Dans le but d'évaluer si l'introduction de la F-chaîne pourrait impacter cette capacité du peptide à faire internaliser son récepteur, une dernière expérience de suivi de l'internalisation du récepteur a été réalisée. Pour cela, 50 nM de fluoro-peptide **16** ont été déposés sur les cellules GFP-APJ-HEK293. Les cellules ont ensuite été imagées par microscopie confocale après 5 min et 20 min d'incubation à température ambiante. Nous pouvons observer sur la Figure 27 qu'après 20 min d'incubation le récepteur de l'apeline (canal GFP) et le fluoro-peptide (canal DY647) sont internalisés et que le fluoro-peptide colocalise bien avec son récepteur puisque les deux images sont superposables. Ainsi, l'introduction d'une F-chaîne ne modifie pas la propriété du peptide apeline-17 à provoquer l'internalisation de son récepteur. La fluoroapeline est donc bien un agoniste au regard de l'internalisation de son récepteur.

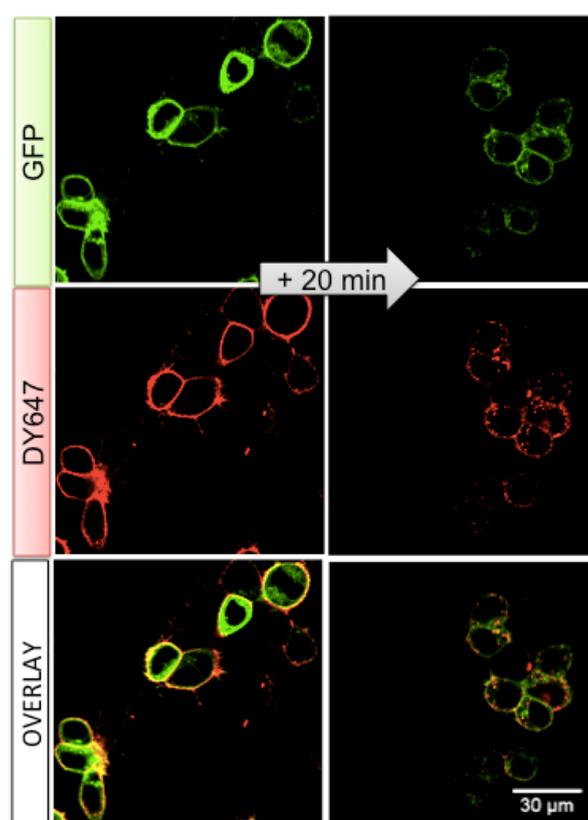


Figure 27. Evaluation du caractère agoniste de la fluoroapeline marquée par une sonde fluorescente DY647 (**16**) par imagerie confocale sur des cellules GFP-APJ-HEK293, après 5 et 20 min d'incubation.

3. Conclusion et perspectives

Cette étude nous a permis de concevoir les premières sondes fluorescentes dans le rouge lointain, stables, et d'affinité *sub*-nanomolaire pour le récepteur de l'apeline. En synthétisant les dérivés fluorescents de la fluoroapeline et de la lipoapeline, nous avons pu mettre en évidence, *in cellulo*, que l'introduction d'une F-chaîne permettait une meilleure spécificité de la sonde pour le récepteur par rapport à la lipoapeline. Nous avons également montré que l'introduction du fluorophore DY647 n'empêchait pas l'apeline de conserver son affinité pour son récepteur (diminution de l'affinité d'un facteur 7.5) ainsi que son caractère agoniste au regard de l'internalisation du récepteur. Nous envisageons maintenant l'introduction d'un acide aminé fluorogène et solvatochrome directement dans la séquence peptidique de l'apeline-17 afin d'être au plus proche de la structure de nos fluoropeptides et pouvoir suivre ainsi, de manière très fine, leur interaction avec les membranes cellulaires, les récepteurs et le trafic intracellulaire. En effet, cette sonde fluorogène et solvatochrome présenterait la particularité de voir son intensité de fluorescence ainsi que son maximum d'émission décalés en réponse à un changement d'environnement. Ces propriétés spectrales pourraient nous permettre de suivre très précisément le devenir du peptide au sein de la cellule, ainsi que de pouvoir discriminer, en deux couleurs différentes sur la même image, les peptides liés de manière spécifique aux récepteurs de ceux liés de manière non-spécifique aux membranes biologiques.

Chapitre 3

Compréhension du mécanisme de stabilisation plasmatisque des fluoropeptides

1. Compréhension du mécanisme de stabilisation des fluoropeptides

Notre stratégie de départ pour améliorer la stabilité des peptides natifs était d'introduire une F-chaîne pour forcer les fluoropeptides à s'auto-organiser en micelles, leur permettant ainsi d'être protégés des dégradations enzymatiques tout en conservant leur capacité à interagir avec leur récepteur et remplir leur fonction biologique (Figure 28). En effet, comme reporté dans la littérature, en raison de leur fort caractère à la fois hydrophobe et lipophile ces F-chaînes, introduites sur des fonctions alkyles, sont connues pour s'auto-organiser efficacement en micelles, en solution aqueuse.^{50, 51, 52} En transposant le concept à des peptides, nous espérons conserver ces propriétés physico-chimiques d'auto-assemblage pour obtenir ainsi des fluoropeptides présentant des organisations fortes mais réversibles. Par conséquent, après avoir confirmé que l'introduction d'une F-chaîne permettait d'augmenter considérablement la stabilité plasmatique du peptide natif, nous voulons maintenant évaluer le mécanisme de stabilisation et, dans ce sens, étudier la capacité de ces fluoropeptides à s'auto-organiser en micelles en solution aqueuse.

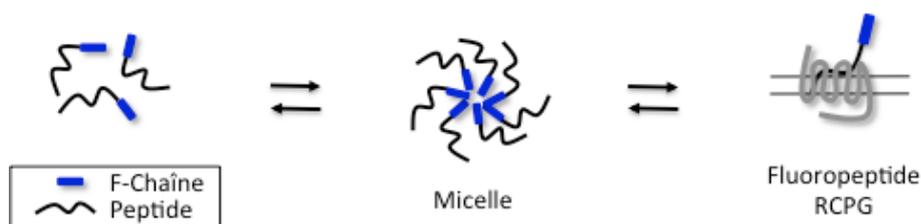


Figure 28. Nouvelle stratégie de stabilisation des peptides : introduction d'une F-chaîne pour forcer le peptide à s'auto-organiser en micelles de manière réversible.

2. Evaluation de l'organisation physico-chimique de la fluoropeptide

Afin d'étudier notre hypothèse de départ d'auto-organisation des fluoropeptides, nous avons tout d'abord évalué la concentration à partir de laquelle nous aurions une formation éventuelle de micelles. Cette concentration d'agrégation critique (CAC) a été déterminée en utilisant une sonde fluorescente solvatochrome sensible à l'environnement : le Nile Red.

Le fluorophore Nile Red est connu comme étant un excellent senseur d'organisation physico-chimique.^{130, 131, 132, 133} En effet, ce fluorophore présente un comportement solvatochrome dépendant de la polarité du milieu dans lequel il se trouve.¹³⁴ En milieu organique et apolaire, le Nile Red présente une très grande solubilité et des rendements quantiques très élevés (> 90% dans le dioxane). Lorsque la polarité du solvant diminue, l'émission de sa fluorescence est déplacée vers les longueurs d'onde plus faibles. En milieu aqueux, le Nile Red devient très faiblement fluorescent (rendement quantique de 5% en tampon phosphate 20 mM, pH 7.4). Une fois dispersées dans des organisations supramoléculaires, les molécules de Nile-Red s'insèrent dans une cavité hydrophobe et se mettent à fluorescer à nouveau. Ainsi, en faisant varier la concentration en fluoropeptides et en mesurant l'intensité de fluorescence des molécules de Nile Red nous pouvons corrélérer l'apparition de fluorescence à une organisation supramoléculaire (Figure 29). Cette méthode permet de déterminer des valeurs de CAC directement à partir de la fluoroapeline **5** qui a été utilisée lors de l'évaluation de la stabilité plasmatique. Les CAC de l'apeline native **1** et de la lipoapeline **7** ont également été évaluées en tant que contrôle et référence.

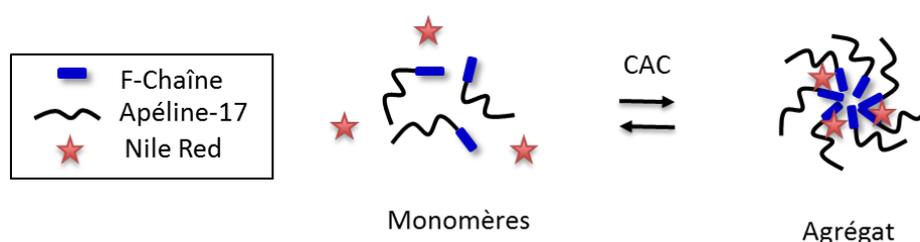


Figure 29. Evaluation de l'organisation en utilisant le fluorophore Nile Red.

Afin d'étudier la capacité de la fluoroapeline à s'auto-organiser en milieux aqueux, nous avons choisi d'évaluer différents milieux aqueux afin de voir si la concentration en sels pourrait avoir un impact sur l'organisation supra-moléculaire. Nous nous sommes alors intéressés à trois types de milieux aqueux, correspondant aux milieux utilisés pour les tests biologiques, *in vitro* et *in vivo* à savoir : eau milliQ, tampon PBS (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 0.24 g/L KH₂PO₄) et NaCl 0.9%. Afin de déterminer les CAC, différentes concentrations en peptides **1**, **5** et **7** ont été évaluées allant de 0.001 à 500 μM pour une concentration fixe en Nile Red (30 μM). L'intensité de fluorescence des molécules de Nile Red a été mesurée par spectroscopie UV-visible en excitant le Nile Red

à 530 nm et en mesurant son émission à 615 nm. Ainsi, les CAC ont été déterminées en mesurant la concentration qui correspond au point d'inflexion des courbes d'intensité de fluorescence.

Dans l'eau milliQ, aucun changement de fluorescence n'a été observé jusqu'à 500 μM , indiquant une absence d'organisation de nos peptides dans ce milieu. En revanche, comme le montre la Figure 30, dans le tampon PBS l'intensité de fluorescence des molécules de Nile Red augmente en fonction de la concentration en fluoroapeline **5** et lipoapeline **7** ajoutée, alors qu'elle reste faible et stable pour l'apeline native **1**. Ainsi, en déterminant la concentration qui correspond au point d'inflexion des courbes, nous pouvons conclure que la fluoroapeline **5** et la lipoapeline **7** sont capables de s'auto-organiser pour des concentrations supérieures à 80 μM dans le tampon PBS (Tableau 8). Par ailleurs, nous pouvons observer, sur la Figure 30, que l'intensité de fluorescence du Nile Red est plus importante dans les organisations lipopeptides par rapport aux fluoropeptides. Cet effet peut s'expliquer par le caractère à la fois hydrophobe et lipophile des F-chaînes, présentant certainement un environnement moins favorable pour les molécules de Nile Red. Des résultats identiques ont été obtenus dans NaCl 0.9% (Tableau 8) avec des CAC se situant de nouveau à 80 μM .

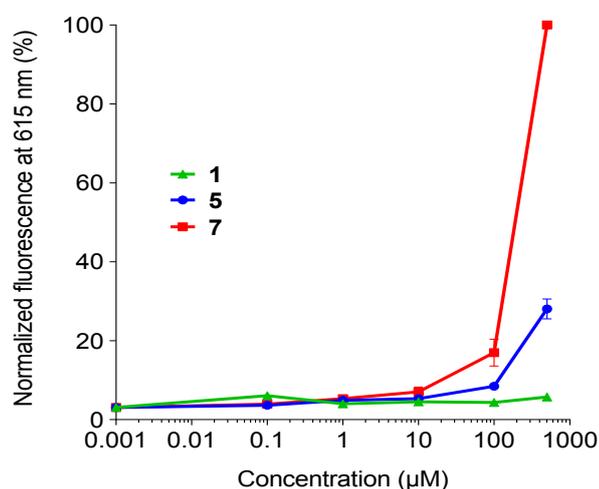


Figure 30. Evaluation de l'auto-organisation des composés apeline native **1**, fluoroapeline **5** et lipoapeline **7** dans le tampon PBS en utilisant le Nile Red comme senseur d'organisation moléculaire.

Etant donné que la fluoro- et lipoapeline présentent sept charges positives il n'est pas surprenant que ces peptides soient parfaitement solubles dans l'eau. En revanche, il

est connu qu'en présence de sels la solvataion du composé diminue et donc conduit à une organisation des molécules pour minimiser l'état d'énergie libre des peptides.¹³⁵ En effet, les composés ioniques présents dans les milieux salins PBS ou NaCl 0.9%, peuvent capturer les molécules d'eau par solvataion entraînant ainsi une diminution des liaisons hydrogène entre le peptide et le solvant aqueux. De plus, nous avons pu mettre en évidence que la présence d'une chaîne hydrophobe, F-chaîne ou H-chaîne, est clairement nécessaire pour entraîner une organisation du peptide en milieu salin. Ce phénomène est semblable à ce qui est décrit dans la littérature pour les peptides amphiphiles où il a été montré que la présence d'une H-chaîne hydrophobe est nécessaire pour forcer un peptide à s'auto-organiser.¹³⁶

Tableau 8. Propriétés physico-chimiques des composés **1**, **5** et **7**.

Composé	Solubilité ^a (mM)	CAC (μM)	
		PBS	NaCl 0.9%
1	> 1	> 500	> 500
5	> 1	80	80
7	> 1	80	80

^aMesurée à pH 7.4 dans un tampon PBS

Afin d'étudier plus en détail l'organisation de nos peptides nous avons également évalué la taille et l'homogénéité des organisations par mesure de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Nous confirmons ainsi l'obtention d'organisations homogènes (indice de polydispersité < 0.3), de diamètre 100 nm et réversibles puisque lorsque l'on dilue la solution de fluoroapeline à 10 μM, nous perdons le pic d'organisation micellaire à 100 nm. En raison du caractère réversible de l'organisation, de la taille de 100 nm et de l'homogénéité de l'organisation, nous pouvons supposer qu'il s'agit très probablement de structures organisées en micelles.¹³⁷

La force ionique du plasma étant comparables à ceux des milieux salins PBS ou NaCl 0.9% utilisés, nous pouvons supposer que la CAC dans le plasma sera potentiellement assez proche de celle mesurée dans ces milieux. De ce fait, nous pouvons conclure que notre hypothèse de départ d'organisation en micelles ne permet probablement pas d'expliquer les excellentes stabilités plasmatiques mesurées

précédemment. En effet, les mesures de stabilité plasmatique de la fluoroapeline ont été effectuées à 5 μM , une concentration bien inférieure aux CAC mesurées dans les tampons. En revanche, cette auto-organisation confère aux peptides une excellente solubilité en solution aqueuse (> 1 mM dans le PBS) malgré l'ajout d'une F-chaîne ou H-chaîne hydrophobe.

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que l'introduction d'une F-chaîne ou d'une H-chaîne entraîne bien une auto-organisation réversible de l'apeline-17 mais que les CAC mesurées restent trop élevées pour expliquer les fortes stabilités plasmatiques mesurées en présence de seulement 5 μM de peptides. Pour expliquer le mécanisme de stabilisation, nous nous sommes donc tournés vers une nouvelle hypothèse. Il est connu que les lipopeptides, tel que le liraglutide, sont très probablement protégés des dégradations enzymatiques grâce à leur importante affinité de liaison pour les protéines plasmatiques telles que l'albumine.¹³⁸ Ce mécanisme de liaison à l'albumine est également reporté pour de nombreux médicaments pour lesquels l'albumine est utilisé en tant que transporteur, permettant d'augmenter leur temps de résidence dans le sang.^{35, 139} De plus, il est également connu que les F-chaînes sont capables de se lier à l'albumine avec de bonnes affinités.^{140, 141} De ce fait, nous avons ensuite voulu vérifier si l'introduction d'une F-chaîne sur un peptide permettait au fluoropeptide de se lier, lui aussi, à l'albumine plasmatique, pouvant ainsi expliquer le mécanisme d'augmentation de stabilité de la fluoroapeline (Figure 31).

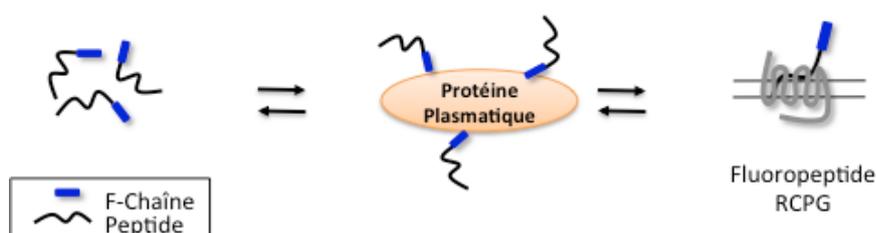


Figure 31. Mécanisme hypothétique de l'augmentation de stabilité plasmatique de la fluoroapeline par liaison aux protéines circulantes.

3. Evaluation de la liaison de la fluoroapeline aux protéines plasmatiques

L'albumine est de loin la protéine la plus abondante du plasma puisqu'elle se retrouve à des concentrations allant de 35 à 50 mg/mL et représente plus de 50% des protéines plasmatiques. De plus, il est connu que, dans le plasma, les médicaments peuvent se lier à de nombreux composants sanguins tels que l'albumine, les glycoprotéines, les lipoprotéines et les immunoglobines. Cependant, en raison du large excès et de la petite taille de l'albumine, cette protéine est significativement la plus impliquée.¹⁴² Ainsi, nous avons voulu dans un premier temps évaluer l'affinité de liaison de nos composés pour l'albumine, la protéine plasmatique majoritaire dans le plasma.

Afin d'évaluer ces affinités de liaison pour l'albumine, nous nous sommes tournés vers une technique de mesure de l'anisotropie de fluorescence.¹⁴³ Cette technique permet de mesurer la diffusion rotationnelle d'une molécule fluorescente. Par conséquent, quand une molécule fluorescente se lie à une autre molécule cible, le complexe résultant aura une diffusion rotationnelle plus faible et donc une plus grande anisotropie de fluorescence (Figure 32). Cette technique permet l'utilisation d'une très faible quantité de ligand fluorescent car la titration s'effectue en faisant varier la molécule cible non fluorescente. On obtient ainsi l'affinité de la molécule fluorescente pour la molécule cible. Nous avons donc utilisés les peptides fluorescents **15**, **16** et **17** précédemment synthétisés pour évaluer, par anisotropie de fluorescence, la liaison à l'albumine de différentes espèces (bovine, de souris, de rat et humaine).

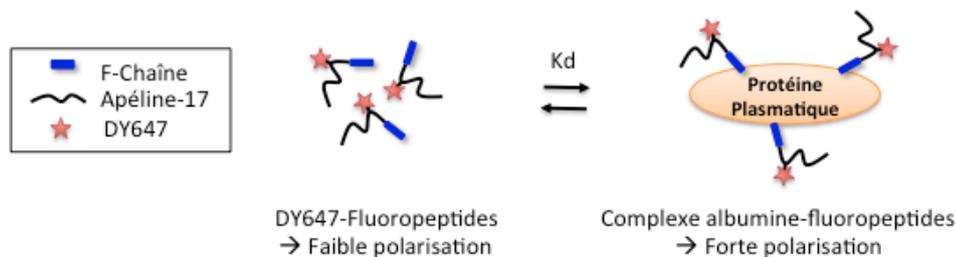


Figure 32. Principe de l'essai de la mesure de l'affinité de liaison des fluoropeptides à l'albumine par anisotropie de fluorescence.

3.1. Affinité de liaison à l'albumine en milieu aqueux

Tout d'abord, nous avons voulu évaluer l'affinité directe des peptides pour l'albumine dans un tampon Hepes utilisé classiquement sur la plateforme PCBIS (Illkirch) pour les mesures d'anisotropie (50 mM Hepes, 150 mM KCl, 0.2% Pluronic F-127, pH 7.5). Les mesures ont été réalisées en utilisant une concentration fixe en peptides fluorescents **15**, **16** et **17** (0.25 μ M) et en faisant varier la concentration en albumine afin de déterminer des constantes d'affinité pour cette protéine. Comme le montre la Figure 33 et le Tableau 9, la fluoroapeline **16** et la lipoapeline **17** présentent une bien meilleure affinité (K_d) pour l'albumine de souris contrairement à l'apeline **15** (K_d **15** > 100 μ M; K_d **16** = 0.89 \pm 0.10 μ M; K_d **17** = 0.66 \pm 0.11 μ M). Puisque l'apeline native ne se lie pas à l'albumine de souris contrairement à la fluoroapeline et à la lipoapeline, nous pouvons supposer que c'est cette forte affinité pour l'albumine qui permet de protéger les fluoro- et lipopeptides des dégradations enzymatiques, expliquant ainsi les fortes stabilités obtenus dans le plasma de souris.

Dans le but de développer un nouveau médicament, il est important de montrer que cette affinité à l'albumine reste similaire entre différentes espèces, et notamment chez l'Homme. Afin de vérifier ceci, nous avons donc mesuré l'affinité des composés pour l'albumine bovine, de souris, de rat et humaine. Comme le montrent les résultats de la Figure 33 et du Tableau 9, l'apeline **15** ne se lie pas à l'albumine de ces quatre espèces pour des concentrations en protéine inférieures à 100 μ M. En revanche, la fluoroapeline **16** et la lipoapeline **17** se lient à l'albumine de ces quatre espèces avec des constantes de dissociation variant seulement de 0.89 à 3.61 μ M pour la fluoroapeline et de 0.52 à 0.84 μ M pour la lipoapeline. Ainsi, ces résultats confirment que l'affinité des composés pour l'albumine est similaire en fonction des différentes espèces évaluées (de souris, de rat, bovine, et humaine). Ces résultats sont donc très encourageants pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques applicables chez l'Homme.

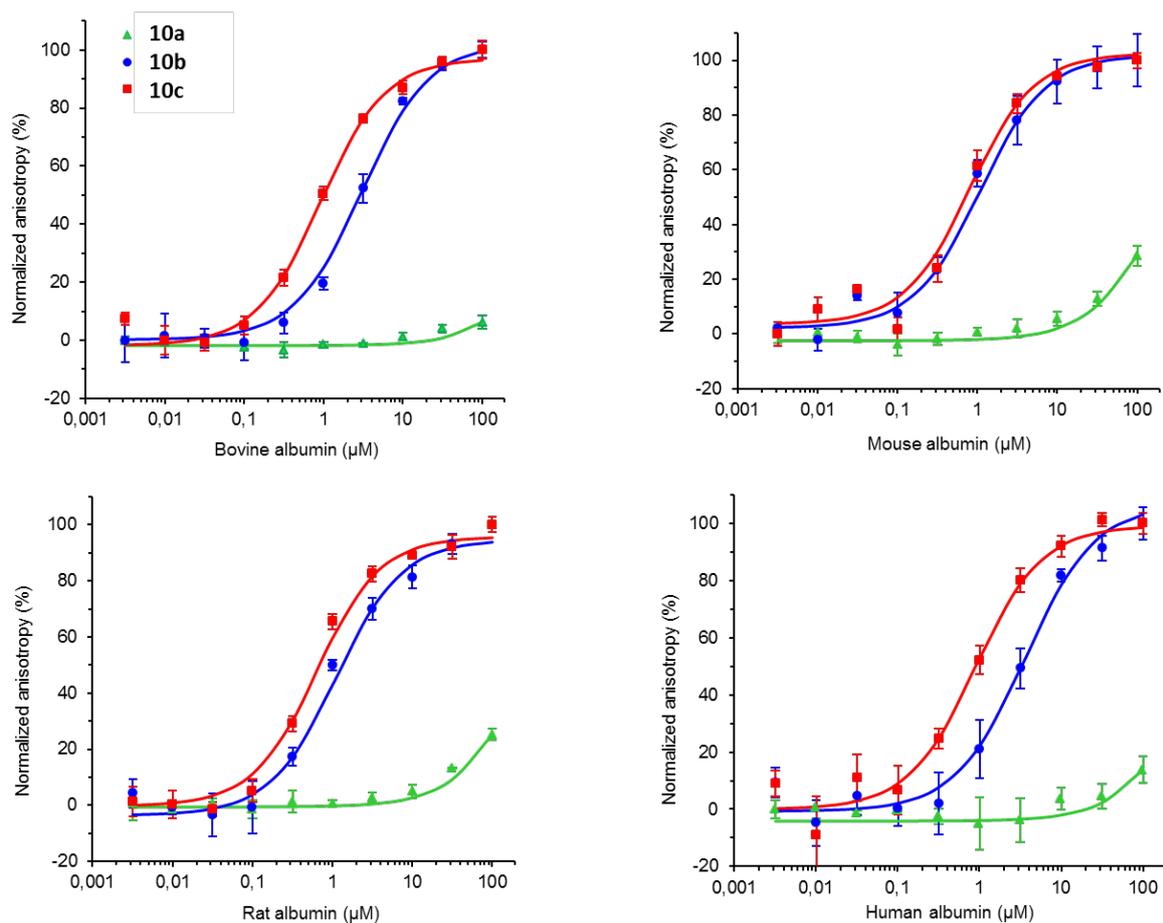


Figure 33. Evaluation de la liaison des peptides fluorescents apeline native **15**, fluoroapeline **16** et lipoapeline **17** à l'albumine bovine (a), de souris (b), de rat (c) et humaine (d) par mesure de l'anisotropie de fluorescence.

Tableau 9. Constantes de dissociation (K_d) des peptides fluorescents apeline **15**, fluoroapeline **16** et lipoapeline **17** à l'albumine de différentes espèces (bovine, de rat, de souris, humaine).

Composé	Constantes de dissociation à l'albumine (K_d , μM)			
	Bovine	Mouse	Rat	Human
15	>100	>100	>100	>100
16	2.90 ± 0.33	0.89 ± 0.10	1.08 ± 0.26	3.61 ± 0.90
17	0.79 ± 0.07	0.66 ± 0.11	0.52 ± 0.05	0.84 ± 0.11

3.2. Affinité de la fluoroapeline pour les protéines plasmatiques

Afin de valider notre hypothèse, il est également important de vérifier que nous conservons bien l'affinité à l'albumine lorsque le peptide se trouve dans un environnement plasmatique puisque les mesures de stabilité ont été réalisées dans du plasma de souris ou humain. En effet, dans un environnement plasmatique, les peptides peuvent rencontrer des compétiteurs potentiels tels que des acides gras. La présence de ces compétiteurs pourrait entraîner une diminution conséquente de l'affinité des peptides pour l'albumine. Par conséquent, de nouvelles mesures d'anisotropie ont été réalisées en faisant varier, cette fois-ci, le pourcentage de plasma pour une concentration fixe en peptide. En raison du large excès et de la petite taille de l'albumine, nous avons négligé les autres protéines plasmatiques pour pouvoir calculer les constantes de dissociation à l'albumine.¹⁴²

Comme le montre le Tableau 10, nous pouvons observer que l'affinité de la fluoroapeline et de la lipoapeline pour l'albumine est identique en milieu tampon ou en milieu plasmatique puisqu'on conserve des constantes de dissociation de l'ordre du micromolaire. De même, nous avons à nouveau montré que l'apeline native ne se lie pas aux protéines plasmatiques pour des concentrations en albumine inférieures à 100 μM . Les tests ont été réalisés à la fois dans du plasma de rat, de souris et humain. Ces résultats démontrent ainsi l'efficacité de la fluoroapeline à se lier à l'albumine plasmatique malgré la présence de compétiteurs potentiels contenus dans le sang. Nous avons ainsi pu confirmer que la fluoroapeline et la lipoapeline se lient à l'albumine circulante dans le sang contrairement à l'apeline. De même, nous avons pu mettre en évidence que la présence d'une chaîne hydrophobe semble primordiale pour permettre cette interaction.

Tableau 10. Constantes de dissociation (K_d) des peptides fluorescents apeline **15**, fluoroapeline **16** et lipoapeline **17** dans le plasma de différentes espèces (bovine, de rat, de souris, humaine).

Composé	Constantes de dissociation dans le plasma (K_d , μM)		
	Mouse	Rat	Human
15	> 100	> 100	> 100
16	1.66 \pm 0.25	1.51 \pm 0.47	3.16 \pm 0.49
17	0.55 \pm 0.04	0.36 \pm 0.04	0.58 \pm 0.13

3.3. Impact de la longueur de la F-chaîne sur l'affinité de liaison à l'albumine

Pour terminer, nous avons voulu étudier l'impact de la longueur de la F-chaîne sur l'affinité à l'albumine. En effet, nous avons montré précédemment qu'en diminuant la longueur de la F-chaîne nous obtenions des stabilités plasmatiques plus faibles. Ainsi, il est important de vérifier qu'en diminuant la longueur de la F-chaîne nous diminuons proportionnellement son affinité pour l'albumine afin de confirmer le mécanisme de stabilisation plasmatique. Pour cela, nous avons synthétisé le dérivé fluorescent DY647 de l'apeline qui présente une F-chaîne plus courte C_4F_9 (**19**). Ce composé a été préparé comme décrit précédemment en utilisant une stratégie de synthèse sur support solide ainsi qu'une acylation chimiosélective en solution. Le dérivé **19** a ainsi été obtenu avec un rendement isolé de 15% et une pureté CLHP > 95% (Schéma 8 et Tableau 11).

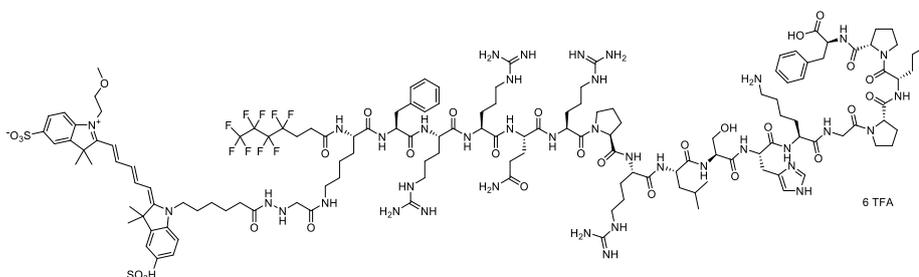


Schéma 8. Représentation chimique de la fluoroapeline C_4F_9 fluorescente **19**.

Tableau 11. Caractérisation chimique de la fluoroapeline C₄F₉ fluorescente **19**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t _R (min)	Rendement (%)
19	3152.4546	3152.4736	9.36	15

L'affinité de la fluoroapeline C₄F₉ **19** pour l'albumine bovine a ensuite été évaluée en anisotropie de fluorescence. La Figure 34 et le Tableau 12 permettent de mettre en évidence que cette fluoroapeline C₄F₉ **19** se lie à l'albumine bovine avec une affinité 30 fois plus faible que la fluoroapeline C₈F₁₇ **16** ($K_d = 79.6 \pm 13.9 \mu\text{M}$ vs $2.6 \pm 0.19 \mu\text{M}$). Or, comme vu précédemment, cette fluoroapeline C₄F₉ présente une stabilité plasmatique bien plus faible que la fluoroapeline C₈F₁₇ dans le plasma de souris ($t_{1/2} = 55 \text{ min}$ vs $> 24 \text{ h}$). Ce résultat confirme ainsi qu'en augmentant la longueur de la F-chaîne, il est possible d'augmenter l'affinité du peptide pour l'albumine ce qui justifie très probablement l'amélioration de la stabilité plasmatique résultante. En effet, en se liant à l'albumine plasmatique, le peptide devrait être protégé des dégradations enzymatiques en raison de l'encombrement stérique.

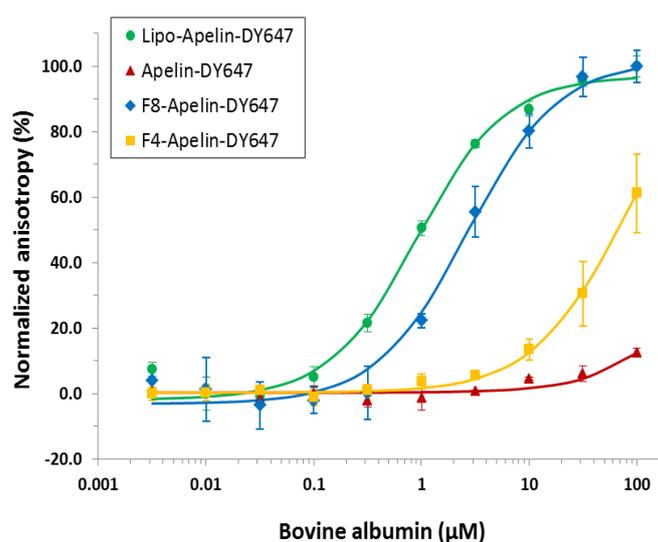
**Figure 34.** Evaluation de la liaison des peptides fluorescents apeline native **15**, fluoroapeline C₄F₉ **19**, fluoroapeline C₈F₁₇ **16**, et lipoapeline **17** à l'albumine bovine par mesure de l'anisotropie de fluorescence.

Tableau 12. Constantes de dissociation des peptides fluorescents apeline **15**, fluoroapeline C₄F₉ **19**, fluoroapeline C₈F₁₇ **16**, et lipoapeline **17** à l'albumine bovine.

Composé	Groupement en partie N-terminale	Constante de dissociation à l'albumine bovine, K _d (μM)
15	CH ₃ CO-	> 500
19	CF ₃ (CF ₂) ₃ (CH ₂) ₂ CO-	79.6 ± 13.9
16	CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ CO-	2.60 ± 0.19
17	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO-	0.79 ± 0.07

4. Conclusion et perspectives

Grâce à ces études pour la compréhension du mécanisme de stabilisation des fluoropeptides nous avons pu mettre en évidence que la fluoroapeline est capable de s'auto-organiser en agrégats réversibles et de taille homogène (100 nm) dans différents milieux aqueux (PBS et NaCl 0.9%). Nous avons également montré que la concentration d'agrégation critique est de 80 μM. Ces CAC étant supérieures à la concentration en peptide utilisée pour les mesures de stabilité plasmatique (5 μM), il est peu probable que cette auto-organisation des fluoropeptides puisse expliquer le mécanisme de stabilisation. En revanche, cette auto-organisation permet à la fluoroapeline de conserver une très bonne solubilité en solution aqueuse (> 1 mM dans PBS) malgré l'ajout d'une F-chaîne hydrophobe. Nous avons donc envisagé un mécanisme alternatif de protection contre la dégradation enzymatique qui repose sur la capacité des chaînes hydrophobes à se lier aux protéines circulantes dans le plasma. En effet, il est connu que les peptides ou autres médicaments se liant à l'albumine présentent des temps de résidence dans le sang grandement améliorés.^{35, 142, 144, 145} Cette interaction avec une grosse protéine de 66 kDa génère un encombrement stérique qui permet de limiter à la fois la dégradation enzymatique en rendant le peptide invisible au système enzymatique mais aussi la clairance rénale et hépatique. Nous avons ainsi confirmé que l'introduction d'une F-chaîne permet d'induire une liaison de la fluoroapeline à l'albumine contrairement au peptide non modifié. De plus, nous avons mis en évidence que cette

affinité de la fluoroapeline pour l'albumine dépend de la longueur de la F-chaîne et corrèle bien avec les stabilités plasmatiques mesurées. En effet, la fluoroapeline la plus stable (F-chaîne C₈F₁₇) présente une affinité de 2.6 µM pour l'albumine bovine, alors que la fluoroapeline la moins stable (F-chaîne C₄F₉) présente une affinité de 79.6 µM. L'ensemble de ces résultats nous confortent dans l'idée que c'est certainement cet encombrement stérique induit par une liaison à l'albumine qui permet de protéger le peptide de la protéolyse et ainsi de prolonger considérablement sa demi-vie plasmatique à plus de 24 h. Nous tentons maintenant de co-cristalliser la fluoroapeline **5** avec l'albumine humaine afin d'identifier la nature et le nombre de sites de liaison à l'albumine pour pouvoir ensuite optimiser notre vecteur en introduisant par exemple entre la F-chaîne et le peptide natif des acides aminés qui pourraient venir renforcer l'interaction avec le site de liaison.

Chapitre 4

**Extension du concept à d'autres
peptides ciblant des RCPG**

1. Contexte de l'étude

Après avoir validé l'efficacité de notre stratégie de stabilisation plasmatique avec l'apeline-17, nous avons voulu étendre le concept à d'autres peptides ciblant des RCPG. Nous avons donc choisi d'introduire la F-chaîne sur quatre autres ligands : l'apeline-13, l'angiotensine II, l'ocytocine et la spexine. Ces peptides ont été sélectionnés à la fois pour leurs potentiels effets thérapeutiques prometteurs mais également car ils présentent des structures et des propriétés physico-chimiques différentes de l'apeline-17.

2. Extension du concept à l'apeline-13

Comme vu précédemment, l'apeline-13 est un des ligands endogènes du récepteur APJ, identifié par Tatemoto en même temps que l'apeline-36 et l'apeline-17.⁷⁴ Tatemoto a également montré que l'apeline-13 possède, la plupart du temps, une substitution par un acide aminé pyroglutaminé en partie N-terminale (pE13F). Cette modification permet au peptide de conserver son activité biologique tout en le rendant plus résistant aux dégradations enzymatiques. Parmi toutes les formes de l'apeline, pE13F correspond à la séquence peptidique la plus abondante retrouvée dans le système cardiovasculaire humain.¹⁴⁶ Tout comme l'apeline-17, ce peptide est lui aussi responsable de la régulation cardio-vasculaire et représente donc une cible attrayante pour le développement de nouvelles thérapies pour l'insuffisance cardiaque ou l'hypertension artérielle.^{147, 89, 73} Ces maladies sont généralement caractérisées par une dérégulation du système hormonal impliqué dans la régulation de la fonction cardiovasculaire ou dans le maintien des équilibres hydriques. Des injections d'apeline-13 seraient donc prometteuses pour permettre de rétablir la régulation du système cardiovasculaire (Figure 35). Cependant, en raison de sa faible stabilité métabolique, il n'est pas envisageable d'utiliser ce peptide en tant que médicament. En effet, la stabilité plasmatique de pE13F est de 7.2 min dans le plasma de souris.¹⁰⁹

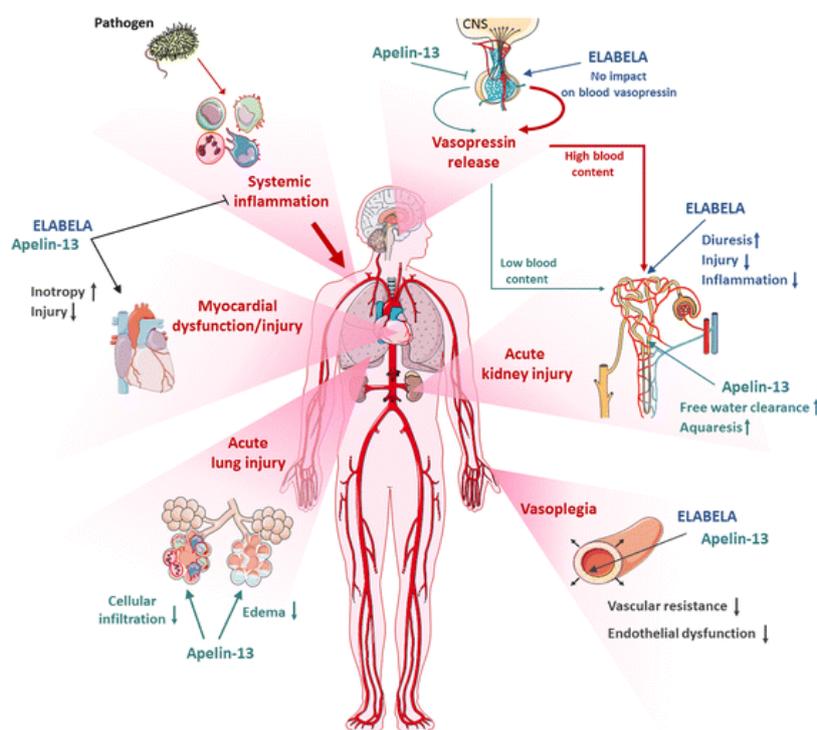


Figure 35. Régulation biologique de l'apeline-13 sur le système cardiovasculaire en réponse à une inflammation systémique.¹⁴⁸

En vue de développer des analogues plus stables de l'apeline-13, de nombreuses études des relations structure-activité (Ala-scans) ou de mutagenèse dirigée ont été réalisées afin de déterminer les sites de pE13F impliqués dans l'interaction avec le récepteur.^{108, 149} De plus, il est connu que l'enzyme carboxypeptidase (ACE II) est l'enzyme principalement responsable de la dégradation enzymatique de pE13F, en clivant le peptide entre les acides aminés Pro¹² et Phe¹³.⁹⁵ En se basant sur l'ensemble de ces observations, des études sur la stabilisation enzymatique de pE13F ont déjà été réalisées et reportées dans la littérature. Celles-ci ont permis d'évaluer l'activité et la stabilité de nouveaux analogues présentant différentes modifications structurales telles que la substitution de certains acides aminés de pE13F par des acides aminés de configuration D ou non naturels, non reconnus par les enzymes^{101, 46}, la cyclisation du peptide⁹⁷ et l'introduction d'une chaîne PEGylée¹⁰¹ ou palmitoylée⁴⁶. Cependant, l'ensemble de ces modifications n'a pas permis d'isoler un peptide à la fois stable et affiné pour le récepteur de l'apeline. L'analogue le plus prometteur décrit est celui comportant une H-chaîne palmitoylée en partie N-terminale.⁴⁶ L'introduction de cette H-chaîne permet d'augmenter la stabilité plasmatique à plus de 29 h mais le peptide résultant

présente une diminution de l'activité fonctionnelle sur cellules par rapport au peptide natif. Par ailleurs, comme montré dans le chapitre 1, l'utilisation d'une H-chaîne induit de la cytotoxicité et diminue la spécificité d'interaction du peptide à son récepteur en augmentant notamment les interactions pour les membranes biologiques. Il serait donc intéressant d'introduire une F-chaîne sur l'apeline-13 afin d'évaluer la stabilité et l'efficacité biologique du fluoropeptide résultant. Cette étude nous permettrait également d'étudier l'efficacité de la F-chaîne sur un peptide plus court et moins chargé que l'apeline-17.

2.1. Conception et synthèse des fluoropeptides

Nous avons choisi d'introduire les F-chaînes en partie N-terminal de l'apeline-13 en nous basant sur les études des relations structure-activité et de modélisation moléculaire effectuées sur le complexe peptide-récepteur. En effet, comme vu précédemment, ces études mettent en évidence que l'acide aminé Phe¹³, en partie C-terminale, interagit avec le fond de la cavité du récepteur par des interactions π - π et que l'Arg², l'Arg⁴ et la Lys⁸ sont engagées dans des interactions électrostatiques à l'entrée du site de liaison (Figure 36).^{101, 108} Il est donc primordial de ne pas modifier cette partie du peptide qui est impliquée dans l'interaction ligand-récepteur.

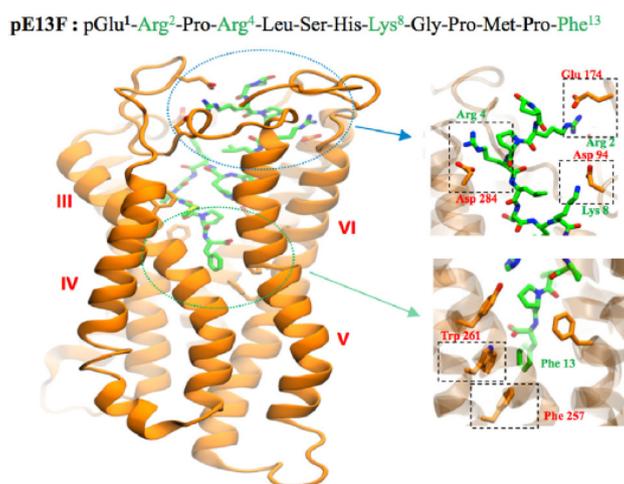


Figure 36. Représentation tridimensionnelle de la modélisation du récepteur de l'apeline humain complexé avec pE13F. Le récepteur de l'apeline est en orange et le peptide pE13F est en vert. Le cercle bleu montre une vue détaillée du site de liaison de pE13F avec des interactions entre les résidus basiques de pE13F (Arg², Arg⁴, et Lys⁸, en vert) et les résidus acides du récepteur de l'apeline (Asp⁹⁴, Glu¹⁷⁴, et Asp²⁸⁴, en orange).

Le cercle vert montre une vue détaillée de la cavité hydrophobe du récepteur dans laquelle la partie C-terminale de pE13F (Phe¹³, en vert) interagit avec des résidus aromatiques du récepteur (Phe²⁵⁷ et Trp²⁶¹, en orange).¹⁰⁹

La fluoroapeline-13 a été synthétisée sur support solide selon une stratégie Fmoc/tBu. Après élongation du peptide sur une résine de Wang en utilisant un synthétiseur automatique, la fluoro-apeline-13 a été synthétisée en introduisant directement la F-chaîne par acylation de la fonction amino N-terminale en utilisant comme agents de couplage un mélange HBTU, HOBt et DIEA dans DMF (Schéma 9). Le peptide a été séparé de la résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la fluoro-apeline-13 **20** avec un rendement de 48% (26 étapes) ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité des peptides a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 13). L'apeline-13 pyroglutaminée (pyr-apeline-13) commerciale nous a servi de référence.

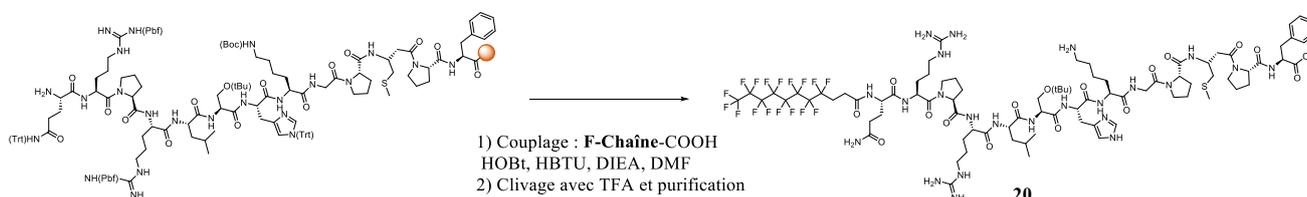


Schéma 9. Synthèse de la fluoroapeline-13 **20**.

Tableau 13. Caractérisation chimique de la fluoroapeline-13 **20**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t _R (min)	Rendement (%)
20	2023.8212	2023.8275	11.05	48

2.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique

Afin d'évaluer l'impact de la F-chaîne sur les propriétés pharmacologiques de l'apeline-13, l'activité fonctionnelle de la fluoroapeline-13 ainsi que sa stabilité plasmatique ont été mesurées. Pour cela, la société CEREP a évalué la capacité de la fluoroapeline-13 à inhiber la production d'AMPc induite par la forskoline sur des cellules CHO surexprimant le récepteur APJ. De plus, la demi-vie *in vitro* ($t_{1/2}$) des peptides a également été mesurée dans du plasma humain à 37 °C.

Comme le montre le Tableau 14, comme c'était le cas pour la fluoroapeline-17, l'introduction d'une F-chaîne ne modifie pratiquement pas l'activité fonctionnelle de l'apeline-13 native et permet une augmentation considérable de la stabilité plasmatique du peptide ($t_{1/2} = 1241$ min).

Tableau 14. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique des composés pyroglu-apeline-13 et de la fluoroapeline-13 **20**.

Composé	Inhibition AMPc, CI₅₀ (nM)	Stabilité plasmatique, $t_{1/2}$ (min)^a
Pyroglu-apeline-13	24	5
20	2.7	1241

a : stabilité déterminée dans le plasma humain à 37 °C.

L'apeline-13 est un peptide plus court que son dérivé apeline-17 et il présente seulement trois acides aminés chargés à pH 7.4, contre six pour l'apeline-17. Comme le montre le Tableau 15, ses propriétés structurales et physico-chimiques sont donc assez différentes de l'apeline-17 et pourtant l'introduction de la F-chaîne permet à nouveau d'améliorer considérablement la stabilité plasmatique du peptide sans modifier son activité fonctionnelle. Cependant, afin de confirmer que la différence de stabilité plasmatique s'explique bien, ici aussi, par une différence d'affinité de liaison pour l'albumine, il serait intéressant de mesurer des constantes de dissociation à l'albumine.

Tableau 15. Caractéristiques physico-chimiques de la composition peptidique de l'apeline 17, de la fluoroapeline-17, de la pyroglu-apeline-13 et de la fluoroapeline-13.

Composé	Nombre d'acides aminés chargés à pH 7.4	% acides aminés basiques	% acides aminés acides	% acides aminés neutre	% acides aminés hydrophobes
Apeline-17	6	35	0	35	30
5	6	35	0	35	30
Pyroglu-apeline-13	3	23	0	46	31
20	3	23	0	46	31

3. Extension du concept à l'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II) est un peptide composé de huit acides aminés et produit à partir du substrat angiotensinogène suite à plusieurs coupures enzymatiques par la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Plus précisément, la rénine coupe l'angiotensinogène formant ainsi l'angiotensine I (Ang I) qui a son tour est convertie en Ang II par l'ACE (Figure 37).¹⁵⁰ Ainsi, l'Ang II a initialement été décrite comme une hormone périphérique capable de réguler les effets du système rénine-angiotensine (SRA) en agissant comme agoniste des récepteurs AT1 et AT2.¹⁵¹ L'Ang II circulante serait donc impliquée dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et des équilibres hydriques (vasoconstriction, rétention d'eau et de sodium, augmentation de la prise d'eau).^{152, 153} L'Ang II est également produite dans le cerveau, exerçant également un effet central sur la régulation de la fonction rénale et de la pression sanguine.¹⁵⁴ Par ailleurs, il a été montré qu'une augmentation d'Ang II est une des causes principales des procédés d'inflammation induits par l'hypertension.^{155, 156} Le traitement de l'hypertension s'effectue donc soit en limitant la synthèse d'Ang II par l'administration d'inhibiteurs de l'ACE, soit en bloquant l'activité du peptide par l'utilisation d'antagonistes du récepteur AT1.¹⁵⁷

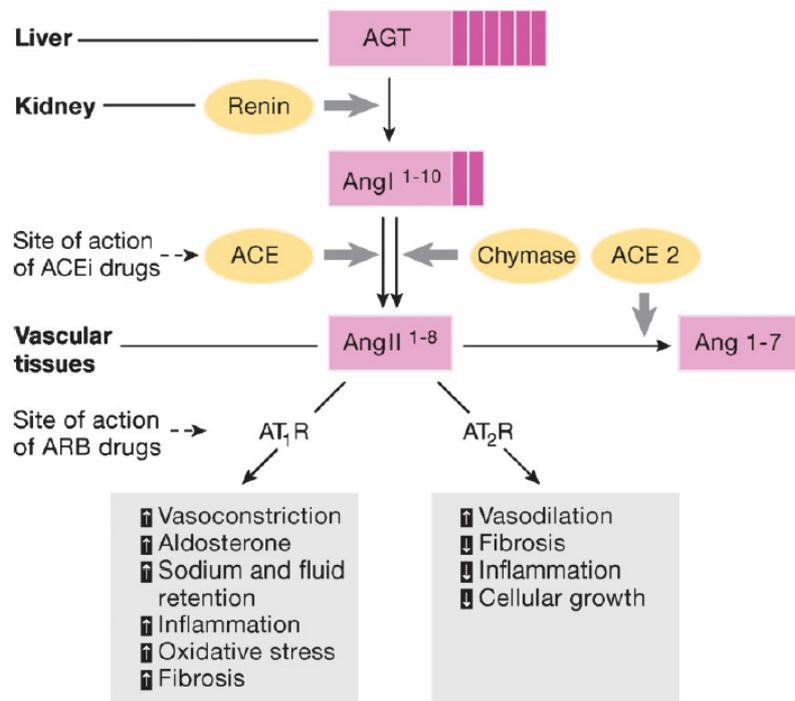


Figure 37. Le système Rénine-Angiotensine (SRA).¹⁵⁸

L'Ang II est généralement utilisée en cas de choc septique lorsque les autres traitements ne sont pas suffisamment efficaces pour rétablir la pression sanguine.¹⁵⁹ En effet, son rôle important dans les phénomènes de régulation de la pression sanguine permet de palier aux chocs septiques qui sont associés à une hypotension artérielle et une vasodilatation systémique persistante. Cependant, à forte dose, son important effet vasoconstricteur peut conduire des effets secondaires dramatiques en aggravant la perfusion tissulaire. Le développement d'une Ang II plus stable permettrait certainement de diminuer considérablement les doses injectées pour palier à ces effets secondaires et développer ainsi un traitement efficace contre les chocs septiques. Dans ce sens, un dérivé cyclique a été développé, permettant d'obtenir une stabilité plasmatique de 926 min vs 166 min pour l'Ang II native.^{160, 161} En introduisant une F-chaîne, nous espérons augmenter encore davantage sa stabilité plasmatique ce qui permettrait d'évaluer l'efficacité de notre approche sur un peptide présentant une structure peptidique différente de l'apeline-17.

3.1. Conception et synthèse des fluoropeptides

Nous avons choisi d'introduire la F-chaîne en partie N-terminale de l'angiotensine II en nous basant sur les études des relations structure-activité qui montrent que la partie C-terminale est primordiale pour l'affinité du peptide à son récepteur AT1.¹⁶²

Le composé fluoroangiotensine II a été synthétisé sur support solide selon une stratégie Fmoc/tBu. Le peptide protégé a d'abord été élaboré sur une résine de Wang en utilisant un synthétiseur automatique. La F-chaîne a ensuite été introduite manuellement sur support solide en utilisant comme agents de couplage HBTU, HOBt et DIEA dans DMF (Schéma 10). Les peptides ont été séparés de leur résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la fluoroangiotensine **22** avec un rendement de 47% (16 étapes) ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité du peptide a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 16). L'angiotensine II commerciale nous a servi de référence.

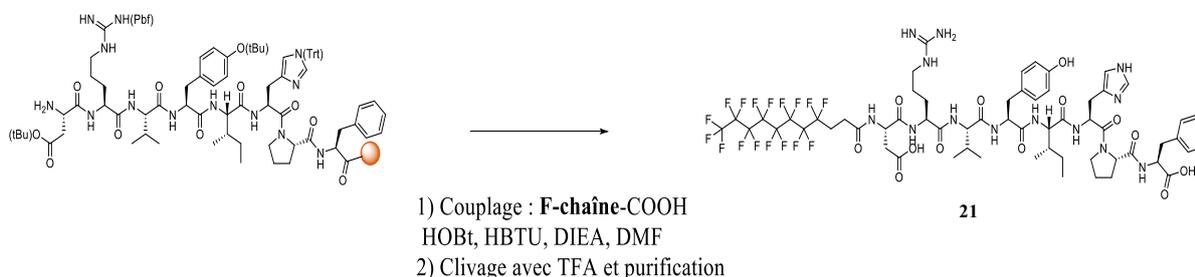


Schéma 10. Synthèse de la fluoroangiotensine **21**.

Tableau 16. Caractérisation chimique de la fluoroangiotensine **21**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t_R (min)	Rendement (%)
21	1519.5258	1519.5231	12.94	47

3.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique

Afin d'évaluer l'impact de la F-chaîne sur les propriétés pharmacologiques de l'angiotensine II, son activité fonctionnelle ainsi que sa stabilité plasmatique ont été mesurées. Pour cela, la société CEREP a évalué la capacité de la fluoroangiotensine II à induire la production de calcium sur des cellules HEK-293 sur-exprimant le récepteur AT1. De plus, la demi-vie *in vitro* ($t_{1/2}$) des peptides a également été mesurée dans du plasma humain à 37 °C.

Comme le montre le tableau 17, l'introduction de la F-chaîne sur l'angiotensine II entraîne une diminution de l'efficacité fonctionnelle du peptide d'un facteur 33 ($CE_{50} = 460$ nM vs 14 nM pour le peptide natif). En revanche, comme précédemment décrit pour la fluoroapeline-13, la stabilité du peptide dans du plasma humain est considérablement augmentée de 85 min à plus de 24 h grâce à l'incorporation de la F-chaîne. Ceci démontre à nouveau l'effet bénéfique des F-chaînes sur l'augmentation de la stabilité plasmatique des peptides malgré, dans ce cas, une petite baisse de l'activité fonctionnelle. Afin de diminuer l'impact de la F-chaîne sur l'activité fonctionnelle du peptide, il serait intéressant d'introduire un espaceur entre le peptide et la F-chaîne.

Tableau 17. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique des composés angiotensine II et fluoroangiotensine II **21**.

Composé	Production Ca^{2+} , CE_{50} (nM)	Stabilité plasmatique, $t_{1/2}$ (min) ^a
Angiotensine II	14	85
21	460	> 1440

a : stabilité déterminée dans le plasma humain à 37 °C.

L'angiotensine II est un peptide qui présente une séquence différente de l'apeline-17 et de l'apeline-13. Ce peptide, composé de huit acides aminés, est nettement plus court que les dérivés de l'apeline et contient seulement deux charges dans sa séquence peptidique à pH 7, contre six pour l'apeline-17 (Tableau 18). Si on compare les séquences des trois peptides fluorocarbonés (**5**, **20** et **21**) dont la stabilité est supérieure à 24 h, on s'aperçoit qu'une arginine est toujours présente à proximité de la

chaîne, séparée par seulement un ou deux acides aminés. La présence d'un acide aminé chargé à proximité de la F-chaîne est peut-être nécessaire pour permettre la liaison d'un fluoropeptide à l'albumine. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant, en perspective, de contrôler l'affinité de ces différents composés pour l'albumine, ainsi que de substituer l'arginine par un acide aminé neutre ou hydrophobe.

Tableau 18. Caractéristiques physico-chimiques de la composition peptidique de l'apeline 17, de la fluoroapeline-17, de l'angiotensine et de la fluoroangiotensine.

Composé	Nombre d'acides aminés chargés à pH 7.4	% acides aminés basiques	% acides aminés acides	% acides aminés neutre	% acides aminés hydrophobes
Apeline-17	6	35	0	35	30
5	6	35	0	35	30
Angiotensine II	2	12.5	12.5	12.5	62.5
21	2	12.5	12.5	12.5	62.5

4. Extension du concept à l'ocytocine

L'ocytocine (OT) est une hormone neuropeptidique cyclique découverte par Dale en 1906¹⁶³ et dont la séquence primaire fut la première séquence à avoir été identifiée, purifiée et synthétisée dans les années 1950 pour une hormone peptidique.⁶ Ce peptide cyclique, composé de neuf acides aminés, est un ligand endogène agoniste du récepteur de l'ocytocine (OTR) dont la biosynthèse s'effectue dans l'hypothalamus.¹⁶⁴ L'ocytocine est connue pour son rôle important dans la stimulation des contractions utérines et de la lactation *post-natale*.¹⁶⁵ Ainsi, l'ocytocine est administrée sous perfusion (Pitocin®) pour le déclenchement ou l'accélération du travail dans le cas d'un accouchement à terme mais également sous forme nasale (Syntocinon®) pour faciliter l'éjection du lait pendant l'allaitement. En plus de ces fonctions physiologiques, il a été reporté que l'ocytocine intervient dans la reproduction, la naissance, l'allaitement, ainsi que dans les comportements maternels, sexuels et sociaux (Figure 38).¹⁶⁶ De même, il a récemment été montré sur des souris que des injections d'ocytocine permettaient d'améliorer le

comportement relationnel et la mise en confiance de ces derniers.¹⁶⁷ Ces études mettent donc en avant le potentiel thérapeutique de l'ocytocine pour le traitement de troubles comportementaux tels que l'autisme.

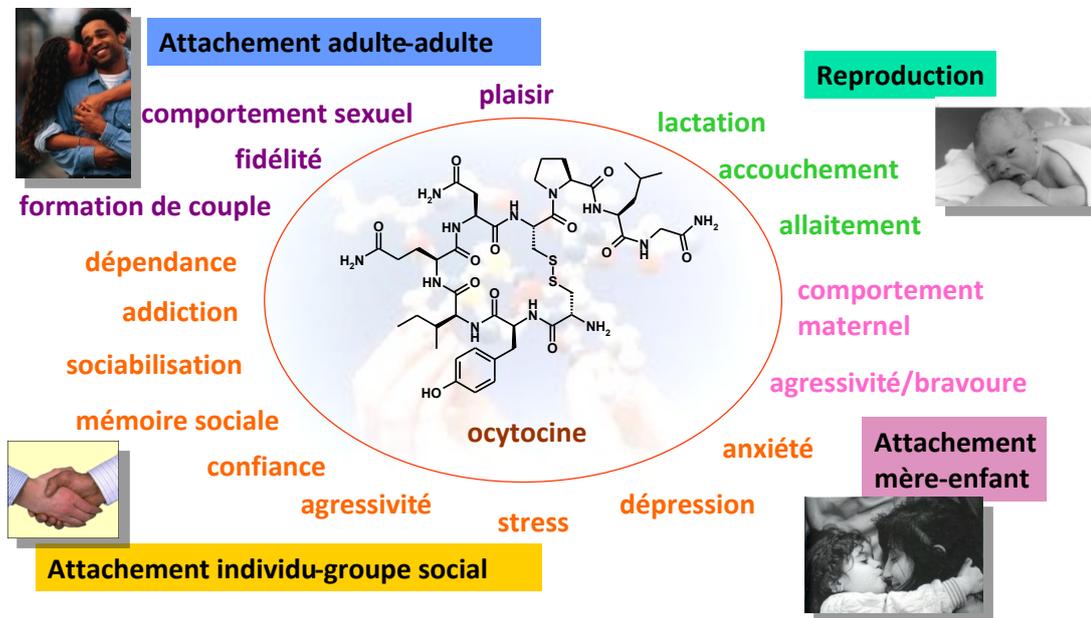


Figure 38. Implications de l'ocytocine dans différents phénomènes liés à la survie de l'espèce.

Des analogues plus stables de l'ocytocine ont été développés en remplaçant l'ensemble des acides aminés de configuration L par des acides aminés de configuration D ou en cyclisant le peptide entre les extrémités N-terminale et C-terminale.¹⁶⁸ Cette dernière modification a permis d'améliorer la demi-vie plasmatique à plus de 48 h contre 11 h pour l'ocytocine native dans le plasma humain mais a conduit à une diminution conséquente de l'affinité du peptide pour le récepteur ainsi que de son activité fonctionnelle sur cellules. En vue de développer une molécule à la fois stable et biologiquement efficace, l'introduction d'une F-chaîne sur l'ocytocine paraît prometteuse et nous permettrait également d'évaluer l'extension de notre stratégie aux peptides cycliques.

4.1. Conception et synthèse des fluoro-peptides

Pour la synthèse de la fluoroocytocine nous n'avons pas choisi d'introduire la F-chaîne en partie N-terminale car il a été reporté dans la littérature que cette partie est primordiale pour conserver l'affinité du peptide pour son récepteur (Figure 39).^{169, 164} Nous avons alors choisi de substituer le résidu Leu⁸ par un résidu Lys⁸ afin de venir introduire la F-chaîne sur la fonction epsilon-amino de la lysine. Cette substitution est classiquement réalisée pour l'introduction de sondes fluorescentes et permet une conservation de l'activité du peptide *in vitro* et *in vivo*.^{170, 171}

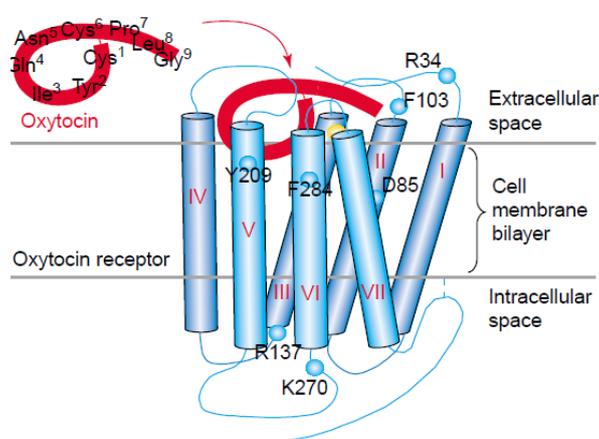


Figure 39. Modèle schématique de l'interaction entre l'ocytocine et son récepteur OTR.¹⁶⁴

Le composé fluoroocytocine cyclique a été synthétisé manuellement par Stéphanie Riché, sur support solide, selon une approche Fmoc/tBu, en partant d'une résine Rink-amide. Une Fmoc-L-Lys(Mmt) a été introduite en position 8 du peptide afin de pouvoir permettre l'incorporation de la F-chaîne. Le groupement Mmt de la lysine a ensuite été déprotégé en présence d'un mélange AcOH/TFE/DCM (1/2/7). La F-chaîne a ensuite été introduite par acylation de la fonction epsilon-amino déprotégée en utilisant comme agents de couplage HBTU, HOBT et DIEA dans DMF (Schéma 11). Pour finir, la fonction alpha-amino du résidu cystéine a été déprotégée en utilisant un mélange pipéridine/DMF (20/80). Enfin, les peptides ont été séparés de leur résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la fluoroocytocine **23** avec un rendement de 8% (24 étapes) ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité du peptide a été confirmée par analyse CLHP et

analyse de masse à haute résolution (Tableau 19). L'ocytocine native commerciale nous a servi de référence.

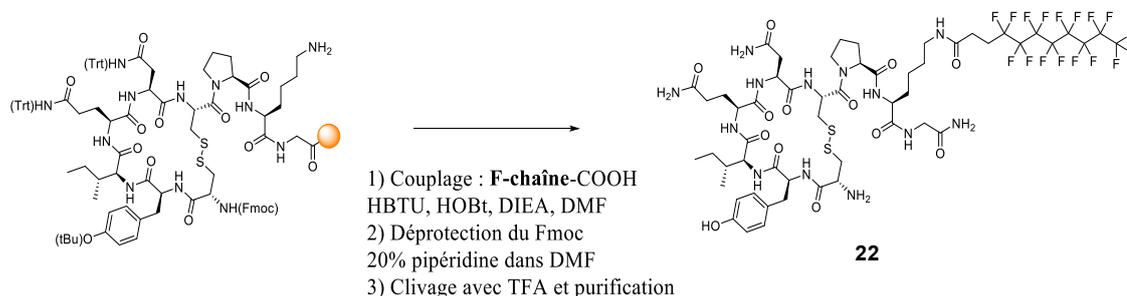


Schéma 11. Synthèse de la fluorocytocine **22**.

Tableau 19. Caractérisation chimique de la fluorocytocine **22**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t_R (min)	Rendement (%)
22	1495.4386	1495.4344	12.78	8

4.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique

Afin d'évaluer l'impact de la F-chaîne sur les propriétés pharmacologiques de l'ocytocine, son activité fonctionnelle ainsi que sa stabilité plasmatique ont été mesurées. Pour cela, la société CEREP a évalué la capacité de la fluorocytocine à induire la production de calcium sur des cellules ECV-304 surexprimant le récepteur OT. De plus, la demi-vie *in vitro* ($t_{1/2}$) des peptides a également été mesurée dans du plasma humain à 37 °C.

Comme le montre le Tableau 20, l'introduction d'une F-chaîne sur l'ocytocine induit une perte considérable de l'activité fonctionnelle du peptide ($CE_{50} = 42$ nM pour le peptide natif et très supérieure à 100 nM pour la fluorocytocine). Par ailleurs, la présence de la F-chaîne a, dans ce cas, peu d'impact sur la stabilité plasmatique du peptide qui est seulement augmentée d'un facteur 1.6 ($t_{1/2} = 147$ min pour le peptide natif vs 239 min pour la fluorocytocine **22**).

Tableau 20. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique des composés ocytocine et fluoroocytoïcine **22**.

Composé	Production Ca²⁺, CE₅₀ (nM)	Stabilité plasmatique, t_{1/2} (min)^a
Ocytocine	42	147
22	< 25% à 100 nM	239

a : stabilité déterminée dans le plasma humain à 37 °C.

L'introduction d'une F-chaîne sur un peptide cyclique n'a donc pas permis d'obtenir un peptide stable et affin qui aurait pu potentiellement être utilisable pour le traitement de troubles comportementaux tels que l'autisme. L'ocytoïcine étant un peptide déjà très contraint stériquement par la présence de son cycle, l'ajout d'une F-chaîne entraîne une gêne stérique qui rend difficile la liaison du peptide à son récepteur ou à l'albumine circulante. De plus, comme le montre le Tableau 21, les caractéristiques physico-chimiques de l'ocytoïcine sont très différentes de l'apeline-17. Il serait donc intéressant de rajouter un espaceur, entre la F-chaîne et le peptide natif, afin de développer un nouvel analogue qui conserverait peut-être l'affinité pour son récepteur tout en permettant à la F-chaîne d'accéder à un site de liaison à l'albumine.

Tableau 21. Caractéristiques physico-chimiques de la composition peptidique de l'apeline 17, de la fluoroapeline-17, de l'ocytoïcine et de la fluoroocytoïcine.

Composé	Nombre d'acides aminés chargés à pH 7.4	% acides aminés basiques	% acides aminés acides	% acides aminés neutre	% acides aminés hydrophobes
Apeline-17	6	35	0	35	30
5	6	35	0	35	30
Ocytoïcine	1	11	0	44.5	44.5
22	0	0	0	55.5	44.5

5. Extension du concept à la spexine

Le neuropeptide Q, appelé également spexine, est une hormone de quatorze acides aminés découverte récemment par Mirabeau par analyses bio-informatiques.¹⁷² Depuis, il a été reporté l'expression de la spexine, de type ARNm ou protéines, à la fois dans le cerveau ainsi que dans les tissus périphériques humains, de souris, de rats et de poissons rouges.^{173, 174} Des études de biodistribution dans les tissus ont montré que la spexine est largement exprimée dans la peau, le système nerveux, le système digestif, le système endocrinien, le système reproductif, le système urinaire et le système digestif, suggérant de nombreuses fonctions physiologiques possibles pour ce peptide (Figure 40).¹⁷⁵ Dans ce sens, des études sur souris ont mis en évidence la capacité de la spexine à moduler la fonction cardiovasculaire et rénale ainsi que la nociception.¹⁷⁵ Ce peptide est également impliqué dans la régulation du poids en réduisant l'absorption adipocytaire des graisses à longue chaîne chez le rat et la souris.¹⁷³

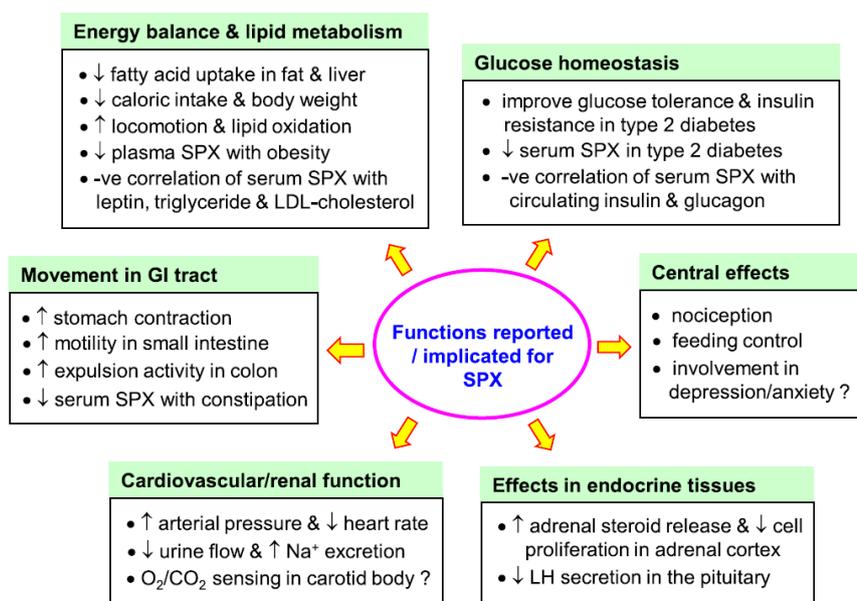


Figure 40. Fonctions biologiques de la spexine identifiées suite à des études *in vivo* et *in vitro*.¹⁷⁶

Il a également été montré que la spexine est un ligand endogène qui agit sur les récepteurs galanine 2 et 3 (GALR2 et GALR3) mais pas sur le récepteur galanine 1 (GALR1).¹⁷⁷ Les récepteurs GALR1 et GALR2 sont connus pour être impliqués dans la régulation de la réponse neuronale à la douleur.¹⁷⁸ Ce peptide pourrait donc présenter un intérêt prometteur pour le développement de nouveaux médicaments analgésiques qui ne passeraient pas par les récepteurs opioïdes. En effet, ces derniers sont les

principaux responsables des nombreux effets secondaires rencontrés avec les analgésiques actuellement sur le marché tels que la morphine : dépendance, accoutumance, nausées, vomissements, vertiges.¹⁷⁹ Dans ce but, des dérivés plus stables de la spexine native ont récemment été synthétisés (substitution des acides aminés sensibles au clivage enzymatique, PEGylation, acétylation ou introduction d'un groupement Fmoc en partie N-terminale). Ces composés présentent à la fois une stabilité plasmatique améliorée (atteignant une demi-vie de 14 h pour la Fmoc-spexine contre 4 h pour la spexine native), tout en présentant un effet anxiolytique chez la souris.¹⁸⁰ L'introduction d'une F-chaîne sur ce peptide paraît donc intéressante en vue d'améliorer les dérivés existants et permettre ainsi le développement de nouveaux médicaments aux propriétés analgésiques qui ne passeraient pas par les récepteurs opioïdes.

5.1. Conception et synthèse des fluoropeptides

Les études des relations structure-activité, décrites dans la littérature, ont permis de mettre en évidence que les résidus Thr³, Tyr⁹ et Leu¹⁰ jouent un rôle critique dans l'activation des récepteurs GALR2 et GALR3.¹⁸⁰ De ce fait, il semblerait que la spexine interagisse avec ces récepteurs par la partie centrale de sa séquence peptidique. Par conséquent, nous avons choisi d'introduire la F-chaîne à la fois en partie N-terminale mais également du côté C-terminal. En se basant sur les résultats de stabilité plasmatique obtenus sur les autres composés (apeline-13, apeline-17 et angiotensine II), nous avons pu observer que la présence d'une arginine ou de charges semblait importante pour permettre l'amélioration de la stabilité plasmatique. Par conséquent, nous avons également voulu introduire un espaceur chargé positivement entre la spexine et la F-chaîne afin d'évaluer son impact sur la stabilité plasmatique. Nous avons alors choisi d'insérer un espaceur constitué de l'enchaînement : arginine-glycine-arginine (RGR). Cet espaceur devrait également nous permettre d'améliorer la solubilité du composé spexine, un peptide très hydrophobe (50% d'acides aminés hydrophobes contre 30% pour l'apeline-17, Tableau 24).

Pour les composés avec la F-chaîne introduite en partie N-terminale, la séquence Fmoc-spexine protégée contenant les 14 acides aminés a d'abord été synthétisée sur

résine de Rink en utilisant un synthétiseur automatique selon une stratégie Fmoc/tBu. L'espaceur, composé de la séquence RGR, et/ou de la F-chaîne ont ensuite été introduits manuellement sur support solide en utilisant comme agents de couplage HBTU, HOBt et DIEA dans DMF (Schéma 12). Les peptides ont été séparés de leur résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la fluorospexine **24** et la fluoro-RGR-spexine **27** avec des rendements de 26% (31 étapes) et 31% (37 étapes) respectivement, ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). La spexine native **23** a également été synthétisée dans ces mêmes conditions pour nous servir de référence (Rdt = 31%, 30 étapes). L'identité des peptides a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 22).

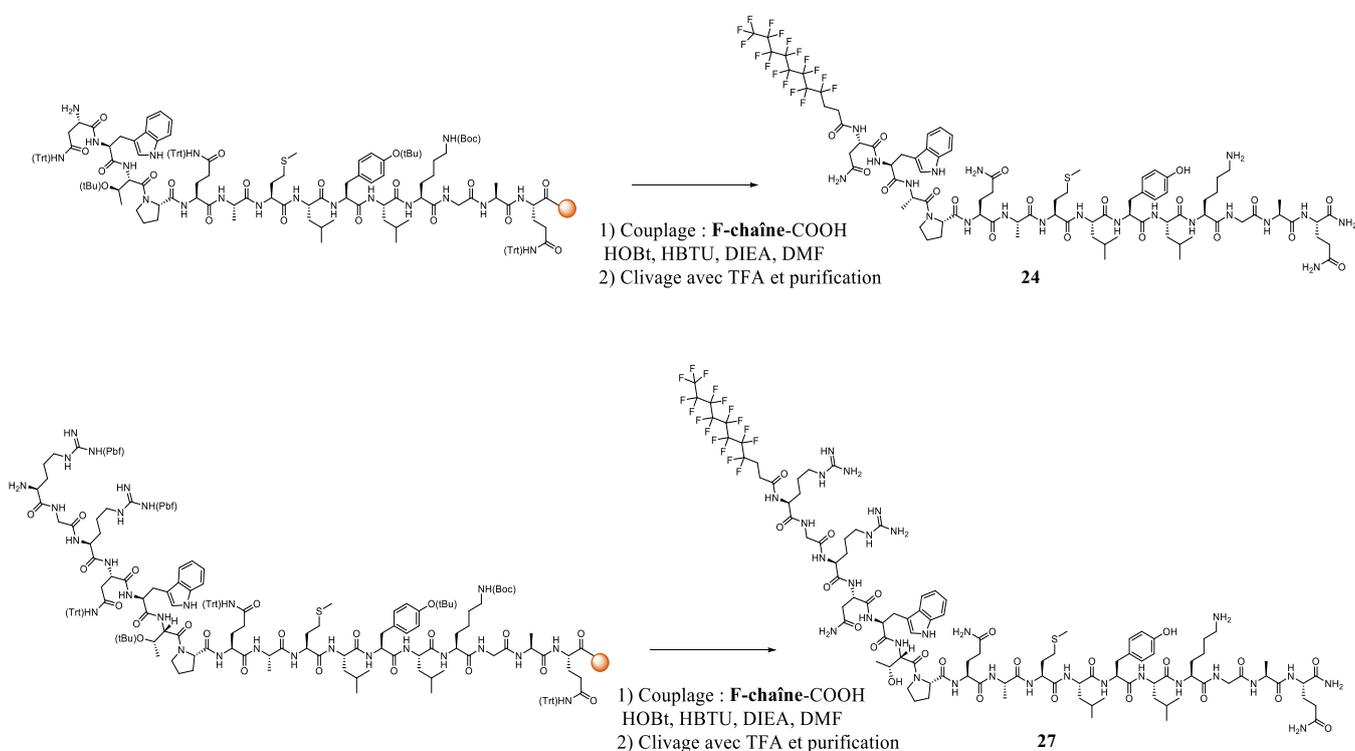


Schéma 12. Synthèse de deux dérivés fluorocarbonés de la spexine **24** et **27**.

Pour les composés avec la F-chaîne introduite du côté C-terminal, la séquence Fmoc-spexine-Lys(ivDde) protégée a d'abord été synthétisée sur une résine de Rink en utilisant un synthétiseur automatique et en introduisant, en premier, une Fmoc-Lys(ivDde) avant de coupler les 14 acides aminés de la spexine. Toujours sur support solide, la partie N-terminale de la spexine a été acétylée et le groupement protecteur

ivDde de la lysine a ensuite été clivé par traitement avec 2% d'hydrazine dans DMF (v/v). Enfin, l'espaceur RGR et/ou la F-chaîne ont été introduits manuellement sur la chaîne latérale de cette lysine en utilisant comme agents de couplage HBTU, HOBt et DIEA dans DMF (Schéma 13). Les peptides ont été séparés de leur résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la spexine-Lys(fluoro) **29** et la spexine-Lys(RGR-fluoro) **30** avec des rendement de 7.5% (35 étapes) et 13% (41 étapes) respectivement, ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité des peptides a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 22).

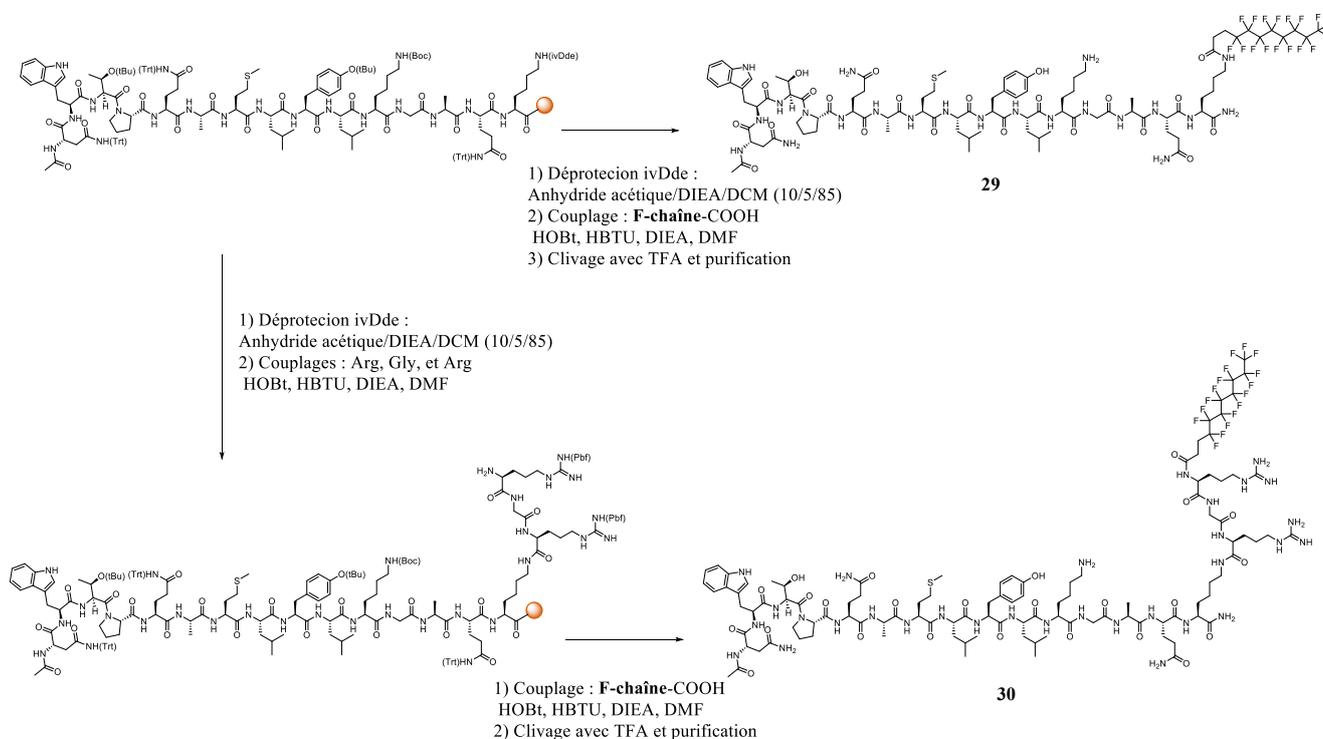


Schéma 13. Synthèse des dérivés fluorocarbonés de la spexine **29** et **30**.

Tableau 22. Caractérisation chimique de la spexine et de ses dérivés fluorocarbonés.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t_R (min)	Rendement (%)
23	1618.8290	1618.8303	8.20	31
24	2092.8202	2092.8187	13.58	26
27	2462.0439	2462.0501	10.96	31
29	2262.9271	2262.9268	13.11	7.5
30	2632.1494	2632.1530	11.10	13

5.2. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique

Afin d'évaluer l'impact de la F-chaîne sur les propriétés pharmacologiques du peptide, nous avons mesuré l'activité fonctionnelle des fluorospexines **24**, **27**, **29** et **39** ainsi que leur stabilité plasmatique. Pour cela, Glenn-Marie Le Coz (ESBS) a évalué la capacité des fluorospexines à induire la production de calcium sur des cellules CHO sur-exprimant le récepteur GALR2. La demi-vie *in vitro* ($t_{1/2}$) des fluorospexines a également été mesurée dans du plasma de souris à 37 °C.

Comme le montre le Tableau 23, le site d'introduction de la F-chaîne sur la spexine, du côté N-terminal ou C-terminal, a un impact important sur les propriétés pharmacologiques du peptide résultant. En effet, l'introduction d'une F-chaîne en partie N-terminale permet d'améliorer considérablement l'activité fonctionnelle du peptide d'un facteur 100 ($CE_{50} = 0.2$ nM pour la fluorospexine **24** vs 23 nM pour la spexine native **23**) alors que les composés avec la F-chaîne introduite du côté C-terminal ne présentent aucune amélioration de l'activité fonctionnelle (CE_{50} de 51 nM pour la spexine-Lys(fluoro) **27** vs 23 nM pour la spexine native **23**). L'introduction de l'espaceur RGR n'a pas d'impact sur l'activité fonctionnelle de ces fluorospexines. En revanche, la stabilité plasmatique peut être modulée par la présence de cet espaceur. En effet, sans l'espaceur, les dérivés fluorocarbonés de la spexine présentent une stabilité augmentée d'un facteur environ 2.5 et ceci quelque-soit la position de la F-chaîne ($t_{1/2} = 60$ min pour la spexine natif **23** vs 156 min pour la fluorospexine **24** et 198 min pour la spexine-Lys(fluoro) **27**). En rajoutant l'espaceur chargé RGR entre la spexine et la F-chaîne, la stabilité

plasmatique est encore doublée ($t_{1/2}$ = 156 min pour la fluorospexine **24** vs 300 min pour la fluoro-RGR-spexine **27** ; $t_{1/2}$ = 198 min pour la spexine-Lys(fluoro) **29** vs 390 min pour la spexine-Lys(RGR-fluoro) **30**).

Tableau 23. Activité fonctionnelle et stabilité plasmatique de la spexine et de ses dérivés fluorocarbonés.

Composé	Production Ca ²⁺ , CE ₅₀ (nM)	Stabilité plasmatique, $t_{1/2}$ (min) ^a
23	23 ± 10	~ 60
24	0.2 ± 0.08	156 ± 12
27	0.5 ± 0.1	300 ± 6
29	51 ± 24	198 ± 12
30	23 ± 6	390 ± 18

a : stabilité déterminée dans le plasma souris à 37 °C.

Nous pouvons ainsi observer que l'introduction d'une F-chaîne sur la spexine ne permet pas d'obtenir des stabilités plasmatiques aussi importantes que celles évaluées précédemment. La spexine étant composée à 93% d'acides aminés hydrophobes ou non polaires (Tableau 24), elle présente une hydrophobie bien plus importante que les autres peptides évalués, conduisant peut-être à une moins bonne affinité du peptide pour l'albumine. En effet, l'insertion d'un espaceur chargé permet déjà de doubler la stabilité des fluorospexines **24** et **29**. Ce résultat met de nouveau en avant que la présence de charges, à proximité de la F-chaîne, semble importante pour permettre l'éventuelle liaison du peptide à l'albumine. Cependant, cet espaceur ne suffit toujours pas à atteindre les 24 h de stabilité plasmatique obtenus sur les autres peptides linéaires.

En revanche, l'insertion de la F-chaîne en partie N-terminale permet d'améliorer considérablement l'activité fonctionnelle de la spexine native **23**. Ce résultat est très prometteur pour des applications thérapeutiques puisque cette amélioration de l'activité *in vitro* pourrait résulter en une augmentation de l'effet biologique *in vivo*.

Tableau 24. Caractéristiques physico-chimiques de la composition peptidique de l'apeline 17, de la fluoroapeline-17, de la spexine et de ses dérivés fluorocarbonés.

Composé	Nombre d'acides aminés chargés à pH 7.4	% acides aminés basiques	% acides aminés acides	% acides aminés neutre	% acides aminés hydrophobes
Apeline-17	6	35	0	35	30
5	6	35	0	35	30
Spexine (23)	1	7	0	43	50
24	1	7	0	43	50
27	3	18	18	41	41
29	1	6.7	0	40	53.3
30	3	17	0	39	44

Afin de mieux comprendre le mécanisme de stabilisation plasmatique sur ce peptide et de déterminer le vecteur optimal, nous avons également choisi de faire varier la nature de la chaîne (F-chaîne vs H-chaîne) ainsi que la longueur de la F-chaîne (C₄F₉ vs C₆F₁₃ vs C₈F₁₇). Pour cela, nous avons synthétisé la C₄F₉-RGR-spexine (composés **25**), la C₆F₁₃-RGR-spexine (composé **26**) et la lipo-RGR-spexine (composé **28**). Ces composés sont actuellement en cours d'évaluations biologiques (activité fonctionnelle, stabilité plasmatique, toxicité cellulaire). Nous avons choisi d'introduire l'espaceur RGR sur l'ensemble de ces composés puisque les meilleurs résultats de stabilité ont été obtenus en présence de cet espaceur. Nous avons également développé des sondes fluorescentes DY647 dérivées de la spexine acétylée (composé **34**), de la fluorospexine (composé **36**) et de la fluoro-RGR-spexine (composé **37**) afin de pouvoir évaluer la liaison aux protéines plasmatiques par anisotropie de fluorescence. Cela pourrait ainsi nous permettre de comprendre pourquoi la présence de l'espaceur RGR permet de doubler la stabilité de la fluorospexine. Nous souhaitons également utiliser ces sondes fluorescente pour suivre *in vitro* le comportement de ces fluoropeptides dérivés de la spexine.

5.3. Evaluation des propriétés physico-chimiques

En vue de développer un outil pharmacologique pour étudier le système spexine/GALR2 et son implication dans la régulation de la douleur, il est important de concevoir des molécules suffisamment solubles pour ne pas induire de toxicité lors de l'administration du composé. En effet, comme vu précédemment et montré dans le Tableau 24, la spexine est un peptide qui présente une composition peptidique très hydrophobe (50% d'acides aminés hydrophobes). L'ajout d'une F-chaîne hydrophobe peut donc entraîner des problèmes de synthèse et de solubilité. Il serait donc intéressant d'évaluer si l'introduction de l'espaceur chargé (RGR) pourrait potentiellement compenser l'augmentation d'hydrophobie qu'on s'attend à retrouver. De ce fait, nous avons étudié les propriétés physico-chimiques des trois composés que nous souhaitons évaluer *in vivo* : spexine native **23**, fluorospexine **24** et fluoro-RGR-spexine **27**.

Comme le montre le Tableau 22, l'introduction de la F-chaîne décale grandement le temps de rétention CLHP du composé puisque l'on passe de 8.2 min pour la spexine native **23** à 13.58 min pour la fluorospexine **24**. De même, les rendements isolés sont un peu réduits lorsque l'on introduit la F-chaîne (31% pour la spexine native **23** contre 26% pour la fluorospexine **24**). Ces résultats mettent ainsi en évidence l'augmentation d'hydrophobie induite par la présence de la F-chaîne. En introduisant l'espaceur RGR, nous retrouvons pour la fluoro-RGR-spexine **27** un temps de rétention intermédiaire entre ces deux composés ($t_R = 10.96$ min) et un rendement identique au peptide natif (Rdt = 31%), démontrant ainsi l'efficacité de l'espaceur RGR à compenser l'augmentation d'hydrophobie induite par la présence de la F-chaîne.

Nous avons également étudié la capacité de ces peptides à s'auto-organiser en assemblage supra-moléculaire. Pour cela, nous avons utilisé le fluorophore Nile Red connu comme étant un excellent senseur d'organisation physico-chimique, comme vu dans le Chapitre 3.^{130, 131, 132, 133} Ainsi, en faisant varier la concentration en peptides et en mesurant l'intensité de fluorescence du Nile Red, nous pouvons corrélérer l'apparition de fluorescence à une organisation physico-chimique (Figure 41). Cette méthode permet de déterminer la concentration à partir de laquelle les peptides s'organisent en agrégats.

Nous avons effectué l'étude dans le tampon HEPES/0.1%BSA utilisé pour les mesures de l'activité fonctionnelle *in vitro* (Tampon composé de 10 mM Hepes, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂.6H₂O, 1.25 mM CaCl₂, 2H₂O, 6 mM KCl, 10 mM Glucose, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ BSA). Comme nous pouvons le voir sur la Figure 41, la spexine native ne présente pas d'organisation en-dessous de 500 μM alors que la fluorospexine s'organise à partir de 10 μM et la fluoro-RGR-spexine à partir de 100 μM. De plus, en-dessus de 100 μM, ces dérivés fluorocarbonés présentaient un aspect trouble, nous laissant penser que les agrégats formés étaient de taille trop élevée pour être des micelles. Pour confirmer ceci, nous avons évalué, par mesure de diffusion dynamique de la lumière (DLS), la taille des organisations en se plaçant à des concentrations de 100 μM et 300 μM. Nous confirmons ainsi la formation d'assemblages de type agrégats non-micellaires inhomogènes puisque nous avons mesuré des tailles d'organisation de l'ordre de 2000 à 3000 nm et des indices de polydispersité très élevés (indice de polydispersité > 0.4).

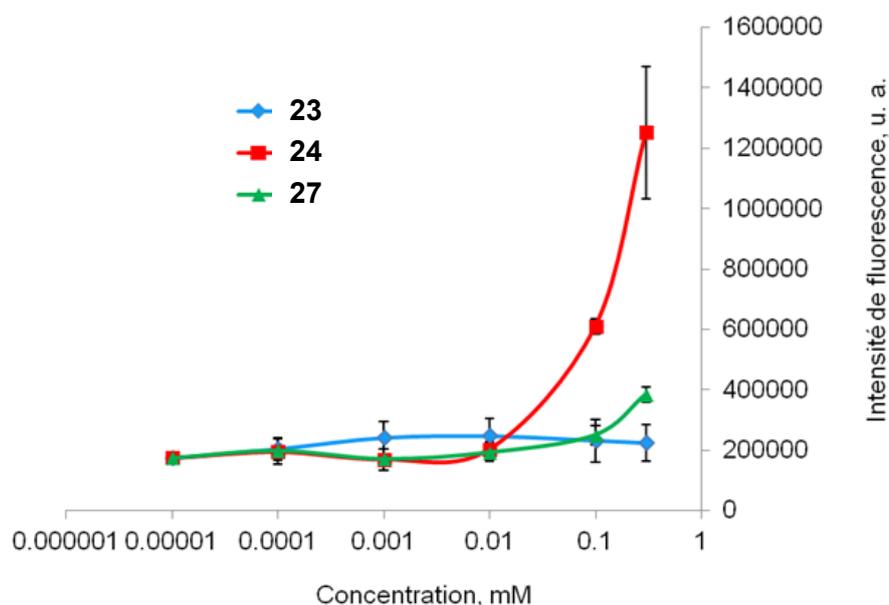


Figure 41. Evaluation de l'organisation des composés spexine native **23**, fluorospexine **24** et fluoro-RGR-spexine **27** dans le tampon HEPES/BSA, en utilisant la sonde fluorescente Nile Red comme senseur d'organisation physico-chimique.

Ces résultats mettent en évidence le fort caractère hydrophobe des dérivés fluorocarbonés de la spexine qui précipitent en solution aqueuse pour former des agrégats non solubles. Nous pouvons cependant observer que l'introduction de l'espaceur RGR permet d'obtenir une meilleure solubilité que la fluorospexine puisque la

formation d'agrégats apparait à des concentrations 10 fois supérieure. Il est donc plus intéressant d'utiliser la fluorospexine avec espaceur puisque son introduction permet à la fois de diminuer le caractère hydrophobe, d'augmenter les rendements de synthèse, d'augmenter la solubilité et de doubler la stabilité plasmatique.

5.4. Evaluation de l'activité biologique *in vivo*

Afin d'évaluer l'impact de la F-chaîne sur l'activité biologique *in vivo*, l'effet analgésique des deux spexines fluorocarbonées **24** et **27** ainsi que de la spexine native **23** a été mesuré par Glenn-Marie Le Coz (ESBS). L'essai consiste à plonger la queue de souris alertes dans de l'eau à 47 °C et à mesurer le temps de réponse que mettent les souris pour retirer leur queue de l'eau chaude. Les mesures ont été réalisées à différents temps après injection intracérébrale de la spexine **23**, de la fluorospexine **24** et de la fluoro-RGR-spexine **27**. Des courbes de réponse analgésique ont ainsi pu être obtenues à différentes doses de produit injecté (0.01 nmol à 10 nmol).

Comme le montre la Figure 42, il faut une dose de 10 nmol de spexine pour avoir une réponse analgésique maximale : temps de réponse de 14 secondes pour des souris qui ont reçu 10 nmol de spexine contre 9 secondes pour des souris non-traitées. Cette même réponse analgésique est obtenue en utilisant des doses 10 fois inférieures de fluoro-spexine et 100 fois inférieure de fluoro-RGR-spexine. Ainsi, en introduisant une F-chaîne, l'activité biologique est considérablement améliorée puisqu'en utilisant 10 à 100 fois moins de produit nous obtenons la même réponse analgésique que le peptide natif. Ces résultats montrent que l'augmentation de l'efficacité *in vitro* des fluorospexines **24** et **27** est confirmée *in vivo* dans un modèle murin.

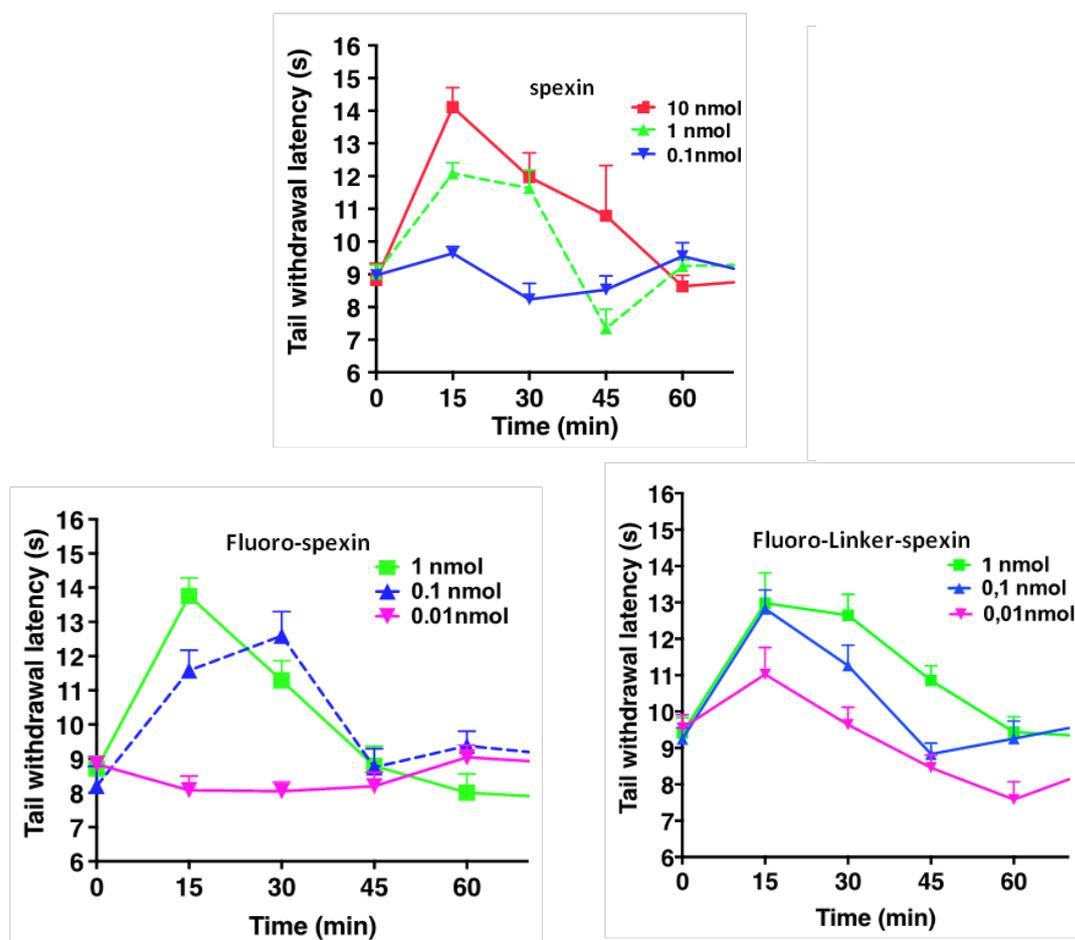


Figure 42. Activité analgésique *in vivo* dans un modèle souris de la spexine **23**, de la fluorospexine **24** et de la fluoro-RGR-spexine **27**.

Les résultats obtenus sont très prometteurs pour le développement de nouveaux médicaments aux propriétés analgésiques qui ne passeraient pas par les récepteurs opioïdes contrairement à la plupart des médicaments analgésiques présents sur le marché. En effet, l'ajout d'une F-chaîne pourrait permettre de minimiser considérablement la dose à administrer puisqu'en injectant 10 à 100 fois moins de fluoropeptides nous obtenons le même effet thérapeutique que le peptide natif. En diminuant la dose à administrée, cela pourrait permettre de minimiser grandement les effets secondaires et l'éventuelle toxicité engendrée lors de l'administration massive d'un agent thérapeutique.

6. Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a permis de mettre en avant l'extension de notre stratégie de stabilisation à d'autres peptides qui présentent des structures et des activités biologiques différentes de l'apeline-17. Nous avons également pu montrer que la composition structurale du peptide semble importante pour permettre sa stabilisation lors de l'introduction d'une F-chaîne. En effet, nous n'avons pas réussi à augmenter la stabilité plasmatique de l'ocytocine, un peptide cyclique, et nous avons stabilisé que très peu la spexine qui présente un fort caractère hydrophobe. Nous avons également mis en évidence que la présence d'un acide aminé chargé, à proximité de la F-chaîne, semble importante pour permettre une stabilisation optimale du peptide. De plus, nous avons montré sur la spexine l'intérêt d'utiliser un espaceur RGR pour favoriser la solubilité du composé, sa stabilité plasmatique ainsi que son activité *in vivo*. Nous cherchons donc maintenant à développer un espaceur qui pourrait permettre de stabiliser le plus de peptides possible, y compris ceux qui présentent une structure peptidique très apolaire. Par ailleurs, nous avons découvert que l'introduction d'une F-chaîne sur la spexine permettait d'améliorer considérablement son activité fonctionnelle *in vitro*. Dans ce cas, la chaîne permet certainement une meilleure interaction peptide/récepteur. Cet effet biologique conduit également à une augmentation de l'efficacité thérapeutique *in vivo* et ouvre la voie au développement prometteur de nouveaux médicaments analgésiques. En vue de valoriser ces résultats, l'extension du concept de stabilisation à d'autres peptides que l'apeline a donc été breveté (Iturrioz X.; Llorens-Cortes C.; Bonnet D. patent 2016, EP16305733.4.) ainsi que le nouveau mécanisme des F-chaînes qui permettent d'augmenter l'activité biologique *in cellulo* et *in vivo* de la spexine (Esteouille L.; Simonin F.; Bonnet D. patent 2017, PCT/EP2017/064803). Ces deux brevets font aujourd'hui l'objet de projets de maturation pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

Chapitre 5

Conception, synthèse et évaluation de nouvelles sondes fluorescentes « turn-on » pour l'étude *in vivo* des fluoropeptides : preuve de concept sur le récepteur de l'ocytocine

1. Contexte de l'étude

1.1. Sondes fluorogènes

La fluorescence est une des techniques les plus utilisées pour le suivi des interactions biologiques car elle permet l'étude des systèmes biologiques au niveau biomoléculaire avec une résolution spatiale et temporelle très élevée.¹¹¹ Cependant, les approches classiques pour le suivi des interactions ligand-récepteur par fluorescence sont généralement impactées par la présence d'un important bruit de fond résultant de l'excès de ligands fluorescents non-liés à sa cible. Pour réduire ce signal de fond, l'excès de ligands doit être éliminé suite à plusieurs étapes de lavage, limitant ainsi l'utilisation de ces sondes *in vivo*. Dans le but de suivre l'interaction ligand/récepteur à la fois *in vitro* et *in vivo*, de nouvelles sondes fluorescentes fluorogènes ont alors récemment été développées.^{181, 182} Ces sondes présentent la particularité de ne pas fluorescer en solution aqueuse et de ne révéler leur fluorescence qu'une fois liées au récepteur. Ce phénomène, appelé également effet « turn-on », permet ainsi de diminuer considérablement leur bruit de fond et donc d'améliorer le rapport signal/bruit et la sensibilité de détection. Ces nouveaux outils fluorescents sont donc prometteurs pour une détection moléculaire très fine en biologie et sont utilisés comme senseurs biologiques, permettant une détection directe d'une interaction moléculaire sans étape de lavage. Cela offre également la possibilité de suivre *in vivo* les interactions moléculaires.^{183, 184} Cependant, la plupart de ces sondes sont excitables dans la région du bleu, une région qui conduit à des phénomènes de photo-dommages cellulaires et de contamination du signal due à l'auto-fluorescence des cellules dans cette région d'excitation.^{127, 128} De plus, ces sondes présentent une brillance limitée en raison de leur faible coefficient d'extinction molaire ($< 60\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et une photo-stabilité assez basse, limitant considérablement le développement d'essais biologiques qui nécessitent une sensibilité élevée.

1.2. Sondes fluorescentes dimériques « turn-on »

Une alternative encore faiblement étudiée repose sur l'utilisation de sondes dimériques ultra-brillantes capables de former des agrégats intramoléculaires non-fluorescents en milieu aqueux.^{185, 186} Les sondes fluorescentes dimériques « turn-on » les plus brillantes et fluorogènes développées à ce jour ont été conçues au sein de notre laboratoire. Elles sont constituées d'une pince sur laquelle le fluorophore squarine a été greffé à chaque extrémité et présentent ainsi l'avantage d'être à la fois bien plus photostables et brillantes que les sondes fluorogènes existantes.¹⁸⁶ En milieu aqueux, les deux fluorophores vont s'agréger par interactions π - π , conduisant à l'apparition d'agrégats-H faiblement émetteurs. Au contraire, dans un milieu apolaire, les deux fluorophores vont se désassembler, réactivant ainsi leur capacité à fluorescer, on parle alors d'effet « turn-on ». Par cet effet d'agrégation intramoléculaire, ces sondes deviennent donc sensibles à la polarité du milieu dans lequel elles se trouvent, leur conférant ainsi des propriétés fluorogènes. En introduisant un ligand sur l'assemblage dimérique, il est possible de suivre l'interaction ligand-récepteur de manière très sensible puisque l'excès de sonde en solution sera non fluorescent, entraînant une augmentation considérable du rapport signal/bruit. Au contraire, les sondes liées à leur récepteur vont se retrouver dans un environnement apolaire (membrane cellulaire), se dissocier et fluorescer de manière ultra-brillante (Figure 43). En introduisant ces pinces « turn-on » sur le peptide carbétocine (CBT), un ligand endogène du récepteur de l'ocytocine (récepteur OT), il a donc été possible de détecter sa liaison au récepteur OT sur des cellules vivantes avec un excellent rapport signal/bruit. L'étude de ce RCPG est primordiale car elle pourrait apporter de nombreuses informations sur le mécanisme de fonctionnement du récepteur OT qui est connu pour jouer un rôle crucial dans la reproduction, l'allaitement et les interactions sociales (autisme).^{187, 166}

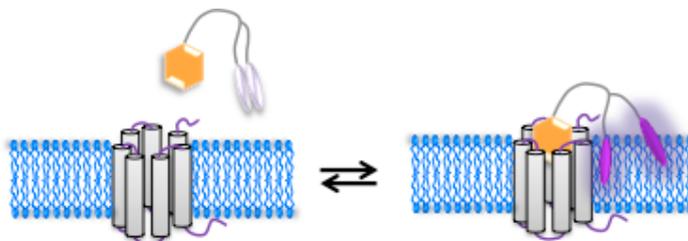


Figure 43. Principe des sondes dimériques « turn-on ».

1.3. Sondes « turn-on » pour l'imagerie *in vivo* des récepteurs de l'ocytocine

En vue de développer des sondes fluorogènes utilisables pour l'imagerie *in vivo* des fluoropeptides, nous avons choisi d'utiliser la même structure en pinces que ces sondes « turn-on » mais en substituant la squarine par le fluorophore cyanine 5.5. En effet, cette sonde fluorescente possède à la fois une excellente brillance (coefficient d'extinction d'environ $250\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ainsi qu'une fenêtre d'excitation dans le proche infrarouge (650 - 800 nm), idéale pour des applications biologiques.¹⁸⁸ Avant d'introduire cette sonde sur un fluoropeptide, il nous fallait valider l'efficacité *in vitro* et *in vivo* du concept appliqué à la cyanine 5.5. Nous avons choisi comme modèle le peptide carbétocine. En effet, la CBT est connue pour se lier au récepteur OT, un récepteur impliqué dans la production du lait post-natale. Par conséquent, l'administration de ce ligand *in vivo* chez des souris allaitantes devrait nous permettre un suivi plus aisé de l'interaction ligand-récepteur puisque les souris allaitantes présentent une forte expression de récepteurs OT dans leurs glandes mammaires.^{187, 189} En imageant la sonde « turn-on » chez ces souris allaitantes et en réalisant ensuite un test de compétition avec le ligand non-fluorescent, nous souhaitons étudier la sélectivité *in vivo* de la sonde et confirmer ainsi son utilisation pour l'imagerie de nos fluoropeptides.

2. Conception et synthèse des sondes « turn-on »

2.1. Stratégie de synthèse

Afin de développer ces sondes « turn-on », nous avons tout d'abord choisi de synthétiser manuellement, sur support solide, la pince constituée d'unités PEGylées et d'une lysine servant de répartiteur (Schéma 14). La synthèse de cette pince a été réalisée sur une résine « SPOrT » qui a été préalablement développée au laboratoire.¹⁹⁰ L'utilisation de cette résine permet d'introduire sur la pince une fonction alcyne après l'étape de clivage. Cette fonction alcyne permettra, en présence d'une fonction azoture, d'effectuer des réactions orthogonales.

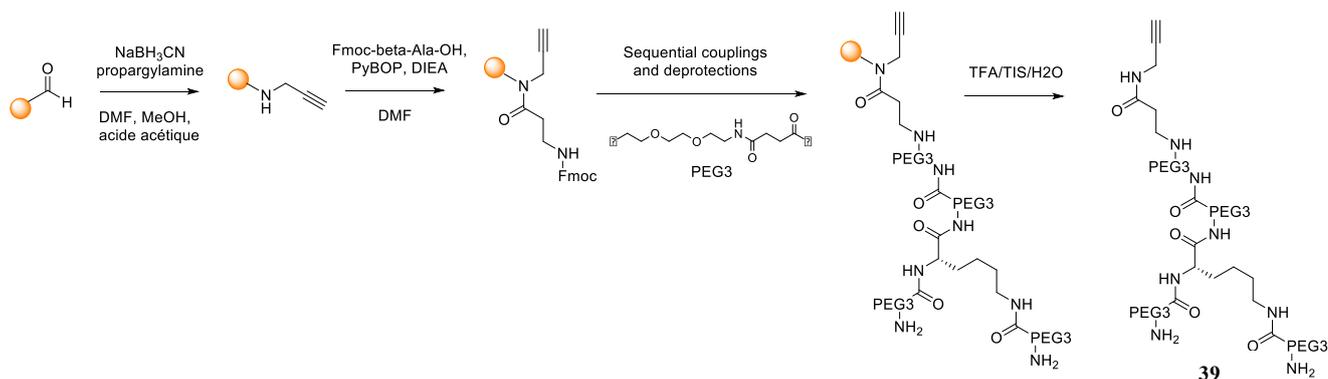


Schéma 14. Synthèse de la pince dimère, composé **39**.

Par ailleurs, afin de concevoir des sondes excitables dans le rouge lointain, nous avons choisi d'introduire un fluorophore original dérivé de la cyanine 5.5 (Cy5.5). Ce fluorophore a été synthétisé par Mayeul Collot (Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Illkirch) et présente une longue chaîne PEGylée afin d'améliorer la solubilité de la cyanine 5.5 en milieu aqueux tout en diminuant les interactions avec les membranes lipidiques. L'introduction de ce fluorophore, sur chaque extrémité de la pince, a été réalisée par couplage peptidique en solution afin de minimiser la consommation en Cy5.5 (Schéma 15).

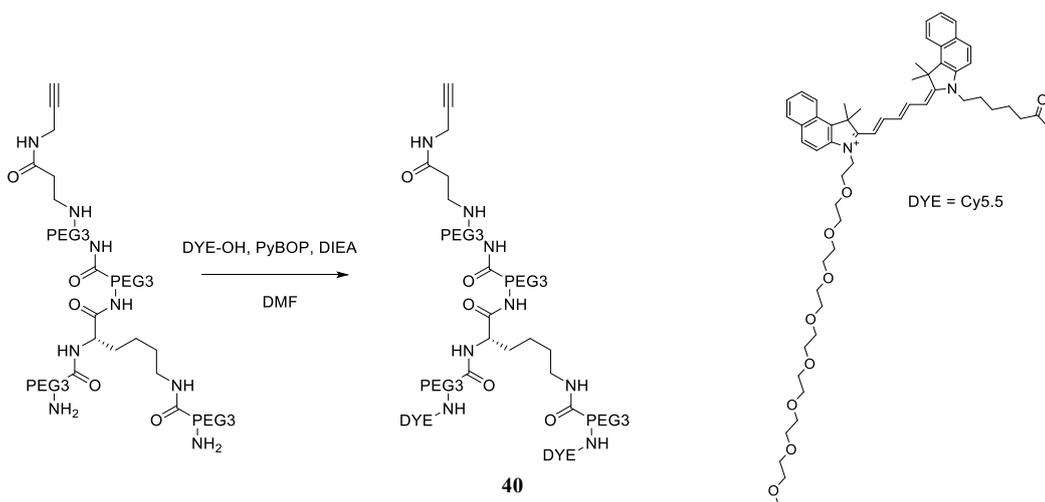


Schéma 15. Synthèse du dimère-Cy5.5, composé **40**.

Enfin, en utilisant un ligand peptidique préalablement modifié par une fonction azoture tel que la carbétocine-N₃ (CBT-N₃) il est possible de développer, par une réaction de cycloaddition-1,3-dipolaire catalysée par le cuivre^{191, 192}, des sondes fluorescentes dimériques pour le suivi des interactions ligand/récepteur OT *in vitro* et *in vivo* (Schéma 16 et 17.a).

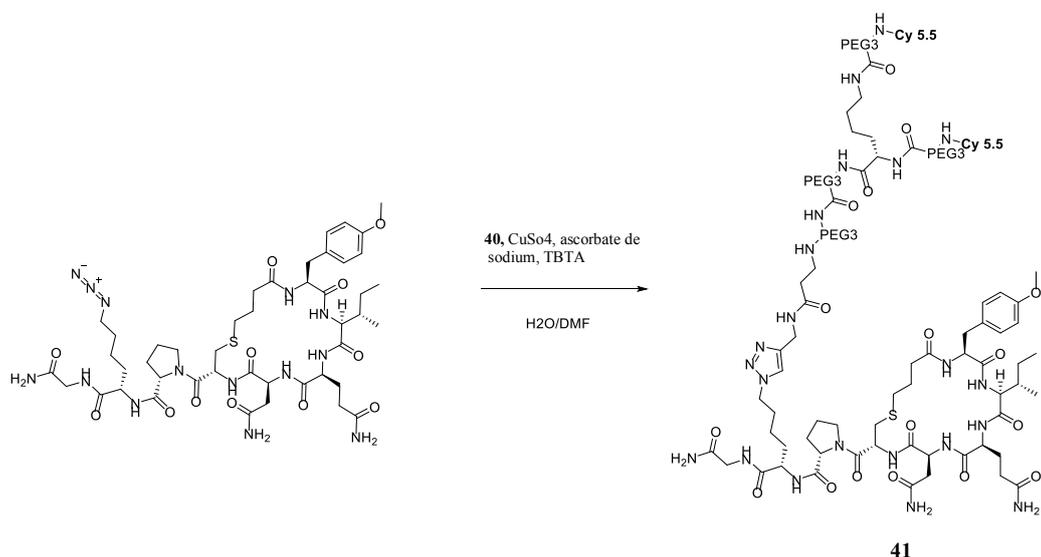


Schéma 16. Synthèse de la sonde finale CBT-dimère-Cy5.5, composé **41**.

Dans le but de démontrer l'efficacité de nos pinces « turn-on », nous avons également synthétisé le composé monomérique qui nous servira de contrôle dans la suite de notre étude (Schéma 17.b).

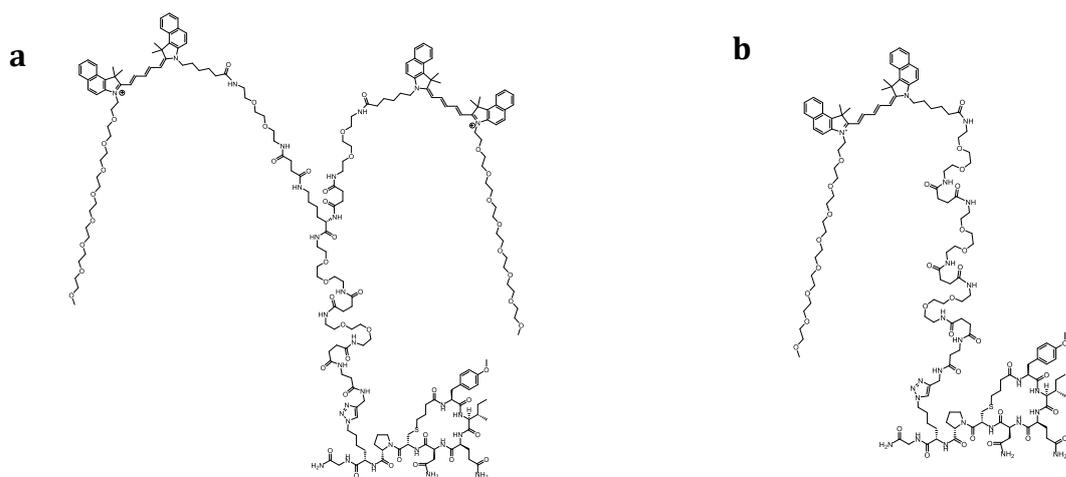


Schéma 17. Structure de la CBT-dimère-Cy5.5 **41** (a) et de la CBT-monomère-Cy5.5 **44** (b).

2.2. Synthèse et caractérisation de la carbétocine-N₃

La carbétocine-N₃ a été synthétisée sur support solide selon une stratégie Fmoc/tBu. Après élongation du peptide sur une résine de Rink, l'acide 4-bromobutyrique a été introduit en partie N-terminale du peptide afin de réaliser une cyclisation intramoléculaire entre la fonction thiol de la cystéine et le carbone en alpha du brome. Pour cela, nous avons traité la résine avec le mélange d'ammoniac dans méthanol/THF (1/4) pendant 4 h. La CBT-N₃ a ensuite été séparée de la résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la CBT-N₃ **38** (Schéma 18) un rendement de 28% (22 étapes) ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité du peptide a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 25).

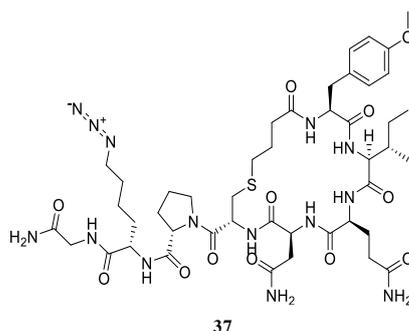


Schéma 18. Structure de la CBT-N₃ **37**.

Tableau 25. Caractérisation chimique la CBT-N₃ **37**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMHR)	CLHP t _R (min)	Rendement (%)
37	1028.4862	1028.4882	11.04	28

2.3. Synthèse et caractérisation des chaînes dimère et monomère

La synthèse des chaînes dimère et monomère a été effectuée sur support solide en utilisant une résine « SPORt », préalablement développée au laboratoire.¹⁹⁰ L'unité PEGylée, Fmoc-NH-PEG3-COOH, a été synthétisée comme décrit précédemment par Soriano.¹⁹³ Les différentes unités de Fmoc-NH-PEG3-COOH ont été introduites sur la résine par des étapes successives de déprotection avec 20% de pipéridine dans DMF et de couplage en utilisant HBTU, HOBT et DIEA dans DMF (Schéma 14). L'obtention de la pince s'est faite en introduisant, avant la dernière unité, une Fmoc-Lys(Fmoc)-OH dans les mêmes conditions de couplage. Les chaînes ont ensuite été séparées de leur résine suite à un traitement par une solution de TFA. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler la chaîne dimère **39** et la chaîne monomère **42** (Schéma 19) avec des rendements de 23% (10 étapes) et 24% (8 étapes) respectivement, ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité des chaînes a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à basse résolution (Tableau 26).

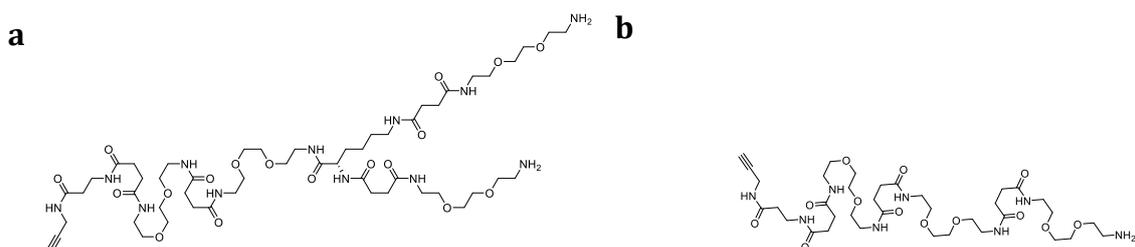


Schéma 19. Structure du dimère **39** (a) et du monomère **42** (b).

Tableau 26. Caractérisation chimique du dimère **39** et du monomère **42**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMBR)	CLHP t _R (min)	Rendement (%)
39	588.34	588.35	5.51	23
42	409.23	409.24	5.48	24

2.4. Synthèse et caractérisation des sondes fluorogènes visant OTR

Le fluorophore Cy5.5 a ensuite été introduit sur les chaînes dimère et monomère par couplage peptidique en solution en utilisant PyBOP et DIEA comme agents de couplage dans DMF (Schéma 15). Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler les composés dimère-Cy5.5 **40** et monomère-Cy5.5 **43** (Schéma 20) avec des rendements de 77% et 58% respectivement, ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité des chaînes a été confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à basse résolution (Tableau 27).

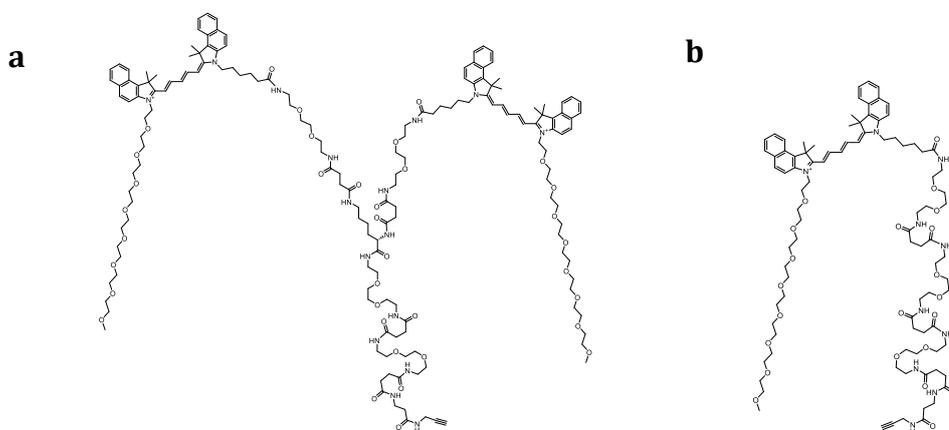


Schéma 20. Structure du dimère-Cy5.5 **40** (a) et du monomère-Cy5.5 **43** (b).

Tableau 27. Caractérisation chimique du dimère-Cy5.5 **40** et du monomère-Cy5.5 **43**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMBR)	CLHP t_R (min)	Rendement (%)
40	3012.80	3012.73	14.71	77
43	1734.99	1734.01	13.15	58

Pour finir, le ligand CBT-N₃, dérivé de la carbétocine, a été introduit sur le dimère-Cy5.5 et sur le monomère Cy5.5 suite à une réaction de chimie « click » en solution en présence de CuSO₄, ascorbate de sodium et TBTA dans DMF/H₂O (8/2) (Schéma 16). Les réactions ont été complètes après 3 h à 37 °C. Une étape de purification par CLHP préparative a permis d'isoler les composés CBT-dimère-Cy5.5 **41** et CBT-monomère-Cy5.5 **44** (Schéma 21) avec des rendements de 40% et 44% respectivement, ainsi qu'une très bonne pureté (> 95%). L'identité des chaînes a été

confirmée par analyse CLHP et analyse de masse à haute résolution (Tableau 28).

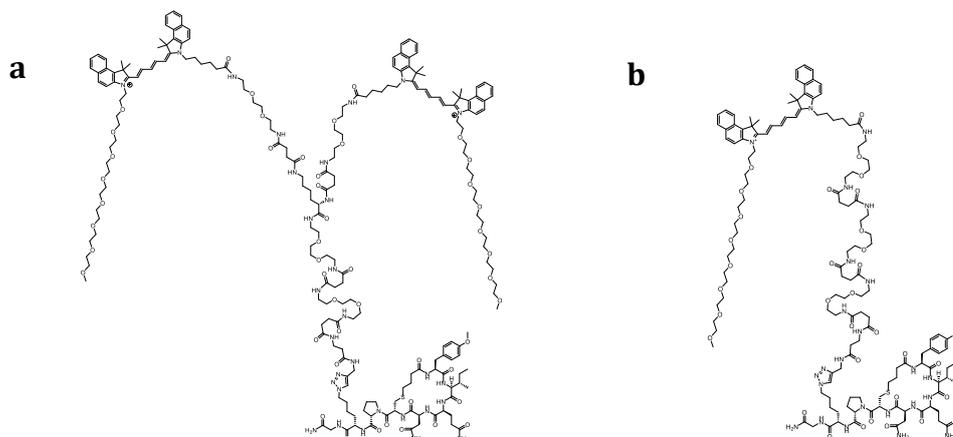


Schéma 21. Structure du CBT-dimère-Cy5.5 **41** (a) et du CBT-monomère-Cy5.5 **44** (b).

Tableau 28. Caractérisation chimique du CBT-dimère-Cy5.5 **41** et du CBT-monomère-Cy5.5 **44**.

Composé	Masse théorique	Masse observée (SMBR)	CLHP t_R (min)	Rendement (%)
41	4036.2147	4036.2069	14.2	40
44	2761.4692	2761.4667	12.8	44

3. Evaluation spectroscopique des propriétés fluorogènes de la pince “turn on”

Dans un premier temps, il a été important de valider l’efficacité de nos pinces à produire un effet « turn-on ». Pour cela, nous avons évalué les propriétés spectroscopiques d’absorption et d’émission de fluorescence du dimère-Cy5.5 en les comparant à celles obtenues pour le monomère-Cy5.5. Les coefficients d’extinction molaire (ϵ) se situant aux alentours de $500\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le dimère-Cy5.5 et de $250\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le monomère-Cy5.5, nous avons choisi de travailler à une concentration de 200 nM et 400 nM respectivement. Il est important de noter que les

coefficients d'extinction de ces fluorophores peuvent être comparés à ceux des quantum dots, les sondes les plus brillantes connues à ce jour.^{194, 195}

3.1. Etude des propriétés spectrales d'absorption et d'excitation du dimère-Cy5.5 dans l'eau

En vue d'étudier l'efficacité de nos pinces à s'associer dans l'eau pour former des agrégats-H non fluorescents, nous avons tout d'abord voulu mesurer les propriétés spectroscopiques d'absorption de ce dimère-Cy5.5 **40** pour les comparer au spectre d'excitation. La mesure du spectre d'absorption du monomère-Cy5.5 **43** dans l'eau a également été effectuée comme contrôle.

Le spectre d'absorption du monomère-Cy5.5 présente un épaulement aux alentours de 625 nm avec un maximum d'absorbance à 685 nm (Figure 44). Au contraire, le dimère-Cy5.5 présente une bande d'absorbance maximale à 625 nm avec un épaulement aux alentours de 685 nm (Figure 44). De plus, le spectre d'absorption du dimère-Cy5.5 dans l'eau diffère de son spectre d'excitation. Ces résultats mettent en avant la formation d'espèces non-fluorescentes dans l'eau pour le dimère-Cy5.5. En se basant sur les études reportées précédemment, nous pouvons conclure que ces espèces non-fluorescentes correspondent très probablement à la formation d'agrégats-H.^{196, 186}

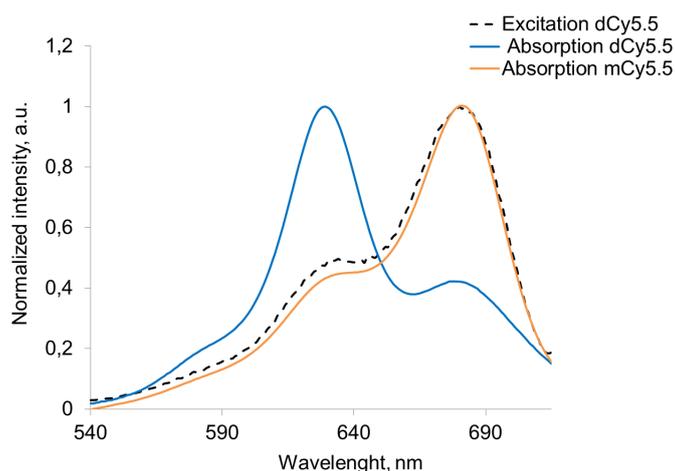


Figure 44. Evaluation de l'absorption des sondes dimère-Cy5.5 **40** à 200 nM (en bleu) et monomère-Cy5.5 **43** à 400 nM (en orange) dans l'eau ainsi que du spectre d'excitation du dimère-Cy5.5 **40** à 200 nM (en pointillés) dans l'eau également.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons également mesuré les spectres d'absorption de la sonde dimère-Cy5.5 en faisant varier sa concentration de 50 à 500 nM dans l'eau. Comme le montre la Figure 45, quelque-soit la concentration en sonde, les spectres d'absorption présentent la même allure. Puisque l'effet de dilution des sondes n'a aucun impact sur l'allure des spectres d'absorption, nous pouvons confirmer que les espèces non-fluorescentes observées ne sont pas dues à de l'agrégation intermoléculaire mais bien à la formation d'agrégats-H intramoléculaires.

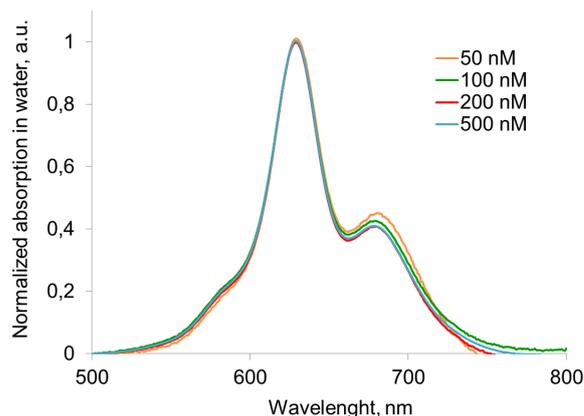


Figure 45. Evaluation de l'absorption de la sonde dimère-Cy5.5 **40** dans l'eau en faisant varier sa concentration de 50 à 500 nM.

3.2. Etude des spectres d'absorption du monomère et du dimère-Cy5.5 dans différents solvants

En vue d'évaluer la capacité des pinces à se dissocier en milieu organique nous avons également étudié les propriétés spectroscopiques d'absorption du dimère-Cy5.5 **41** dans des solvants aqueux et organiques, présentant différentes polarités, tels que PBS, H₂O, méthanol, éthanol, DMSO, DMF et dioxane. Nous avons également mesuré les spectres en faisant varier le pourcentage de méthanol dans l'eau afin d'étudier très précisément le changement de comportement des pinces en fonction de la polarité du milieu dans lequel elles se trouvent. Ces résultats ont été comparés avec le monomère-Cy5.5 **43** qui nous sert de contrôle.

Comme le montre la Figure 46a, les spectres d'absorbance du dimère-Cy5.5 **40** dans les solvants organiques (méthanol, éthanol, DMSO, DMF et dioxane) présentent de la même allure que ceux du monomère-Cy5.5 **43** (Figure 46c). De plus, lorsque le pourcentage de méthanol augmente, nous pouvons constater que les formes fluorescentes du dimère-Cy5.5 deviennent prépondérantes sur les formes non-fluorescentes à partir de 50% de méthanol (Figure 46b). Ainsi, en milieu organique, les pinces « turn-on » se trouvent essentiellement sous forme d'espèces fluorescentes non-agrégées puisque les spectres d'absorption sont identiques au spectre d'excitation (Figure 44). Nous pouvons également observer sur la Figure 46a que les pinces s'agrègent dans un milieu tampon (PBS), puisque nous obtenons un spectre d'absorption identique à celui dans l'eau avec formation d'espèces non-fluorescentes (diminution importante du pic d'absorbance à 685 nm). Ce résultat est encourageant pour l'utilisation potentielle de ces sondes lors des études *in vitro* qui s'effectuent dans un milieu tampon.

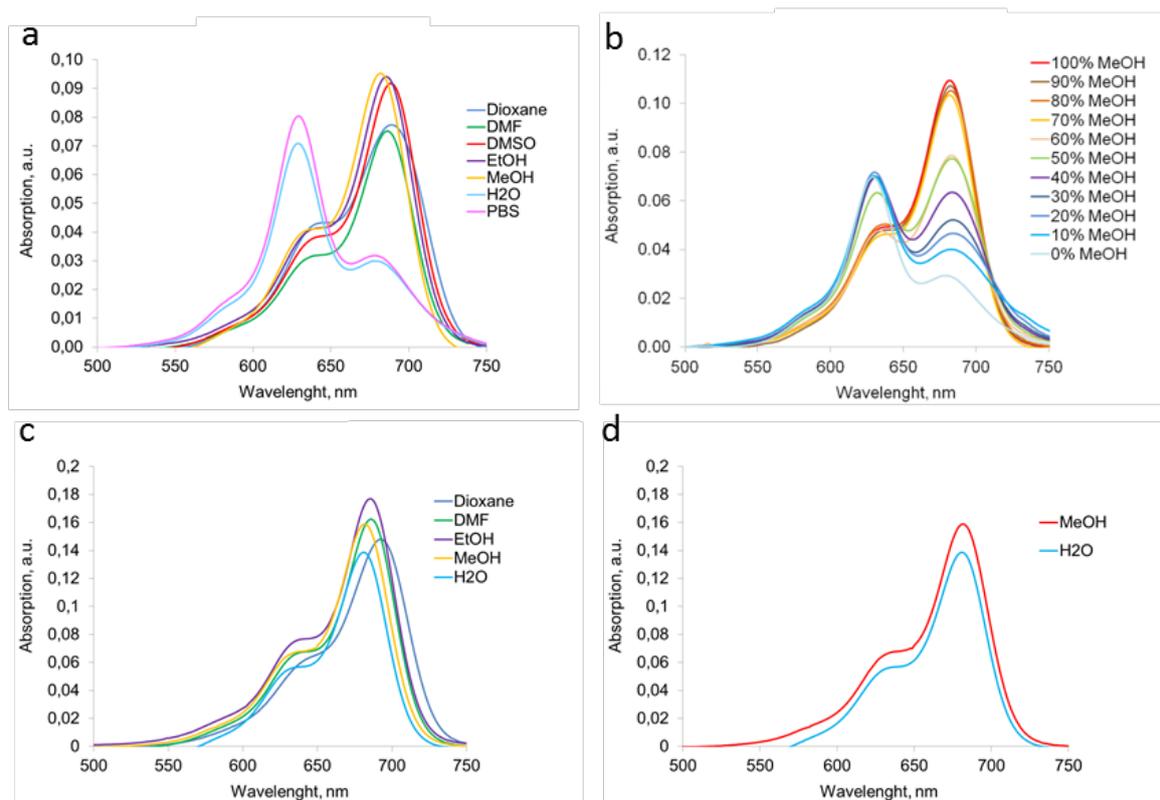


Figure 46. Evaluation de l'absorption de la sonde dimère-Cy5.5 **40** à 200 nM dans différents solvants (a) ou en faisant varier le pourcentage de méthanol dans l'eau (b). Evaluation de l'adsorption du monomère-Cy5.5 **43** à 400 nM dans différents solvants (c) ou en faisant le focus sur eau vs méthanol (d).

3.3. Mesure des spectres de fluorescence du monomère et du dimère-Cy5.5 dans différents solvants

Les propriétés fluorogènes du dimère-Cy5.5 **40** ont ensuite été évaluées en excitant la sonde à 630 nm et en mesurant sa fluorescence dans les solvants utilisés lors de l'étude de l'absorption : PBS, H₂O, méthanol, éthanol, DMSO, DMF et dioxane. Ces mesures ont été réalisées en parallèle avec le monomère-Cy5.5 **43** utilisé comme contrôle pour démontrer l'intérêt du système dimérique. Nous avons également évalué les spectres de fluorescence du dimère-Cy5.5 **40** en faisant varier le pourcentage de méthanol dans l'eau afin de suivre, de manière fine, les changements d'intensité de fluorescence de notre système en fonction de l'environnement (aqueux vs organique) dans lequel il se trouve.

Comme nous pouvons le voir en comparant les Figures 47a et 47b, la différence d'intensité de fluorescence entre les milieux aqueux et organique est beaucoup plus importante pour le dimère-Cy5.5 que pour le monomère-Cy5.5. En effet, à la longueur d'onde d'émission de 710 nm, le rapport des intensités de fluorescence entre le DMF et l'eau est d'un facteur 57 pour le dimère-Cy5.5 contre seulement un facteur 2.8 pour le monomère-Cy5.5. Ce résultat met donc en avant l'efficacité du système dimérique à produire un important effet « turn-on » de la fluorescence contrairement au monomère. Nous pouvons également observer les propriétés fluorogènes du dimère-Cy5.5 en étudiant l'évolution de ses spectres de fluorescence en fonction du pourcentage de méthanol dans l'eau. En effet, l'intensité de fluorescence de la sonde augmente proportionnellement avec l'ajout de méthanol, confirmant ainsi que la sonde fluoresce différemment en fonction de l'environnement dans lequel elle se trouve (Figure 47c).

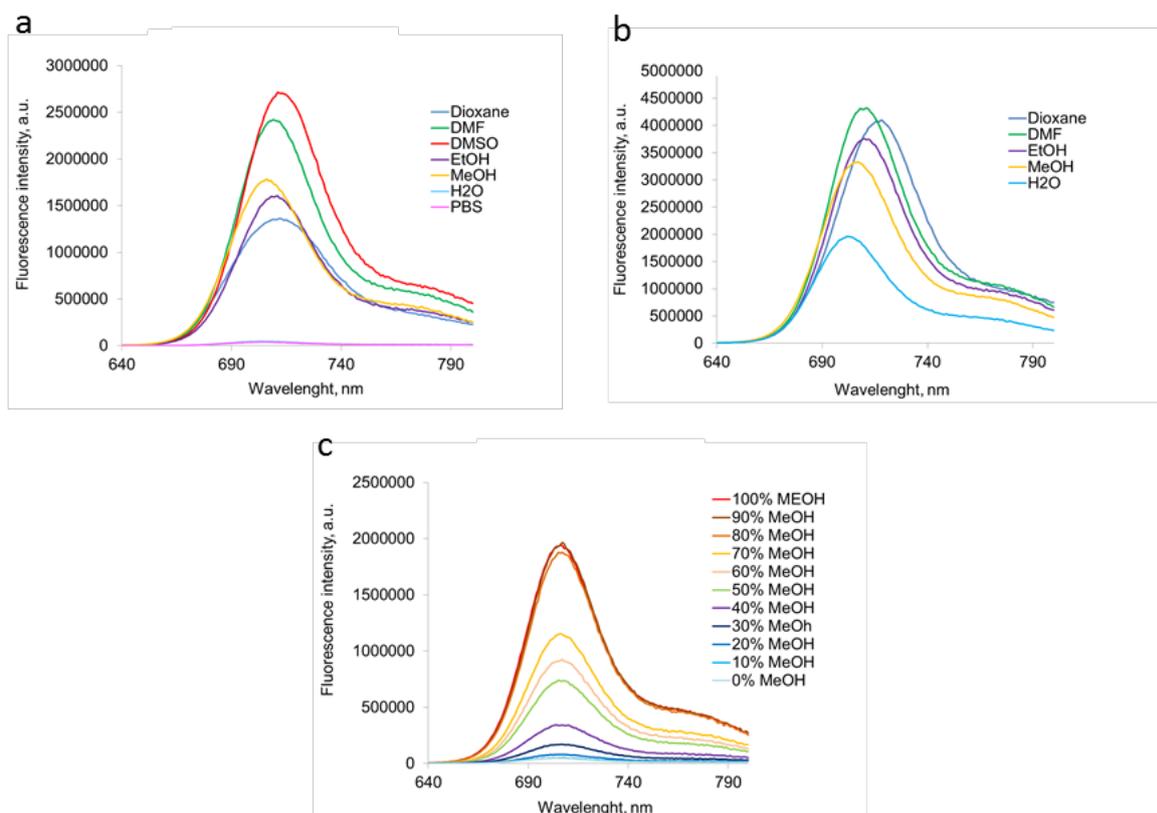


Figure 47. Evaluation de la fluorescence de la sonde dimère-Cy5.5 **40** à 200 nM dans (a) et de celle du monomère-Cy5.5 **43** à 400 nM (b) dans différents solvants. Evaluation de la fluorescence de la sonde dimère-Cy5.5 **40** en faisant varier le pourcentage de méthanol dans l'eau (c).

3.4. Détermination des rendements quantiques et évaluation de l'effet "turn-on"

Les rendements quantiques ont pu être calculés en utilisant les données des mesures d'absorption et de fluorescence du dimère-Cy5.5 **40** et du monomère-Cy5.5 **43** dans les différents solvants. La Rhodamine 800 dans l'éthanol a été utilisée comme référence ($QY = 25\%^{197}$).

Comme le montre le Tableau 29, le rendement quantique (QY) de fluorescence du dimère-Cy5.5 dans l'eau est 55 fois plus faible que celui de la sonde seule ($QY = 0,4\%$ pour le dimère-Cy5.5 vs 22% pour la Cy5.5). Ce résultat met bien en avant la capacité de la sonde dimérique à être faiblement fluorescente en solution aqueuse. Par ailleurs,

l'effet « turn-on » entre l'eau et le dioxane est d'un facteur 70 pour le dimère-Cy5.5 contre 2.7 pour la Cy5.5 (Figure 48). De même, l'effet « turn-on » théorique entre l'eau et le DMF est d'un facteur 140 pour le dimère, contre un facteur 2.3 pour le monomère-Cy5.5. L'ensemble de ces résultats confirment bien que la structure dimérique offre un excellent effet « turn-on » contrairement à la sonde monomérique.

Tableau 29. Rendements quantiques (QY) de fluorescence pour le composé dimère-Cy5.5 **40** et pour le composé monomère-Cy5.5 **43**.

Solvant	QY (dimère-Cy5.5), %	QY (monomère-Cy5.5), %
Dioxane	28	59
DMF	56	50
DMSO	58	-
Ethanol	26	34
Methanol	26	32
H₂O	0.4	22
PBS	0.3	-

La sonde dimère-Cy5.5 ainsi obtenue peut être considérée comme la sonde possédant l'effet « turn-on » le plus efficace décrit à ce jour. En effet, le « turn-on » est 2.5 fois plus important que celui des dimères-squaraine, la meilleure génération connue de sondes « turn-on ».¹⁸⁶

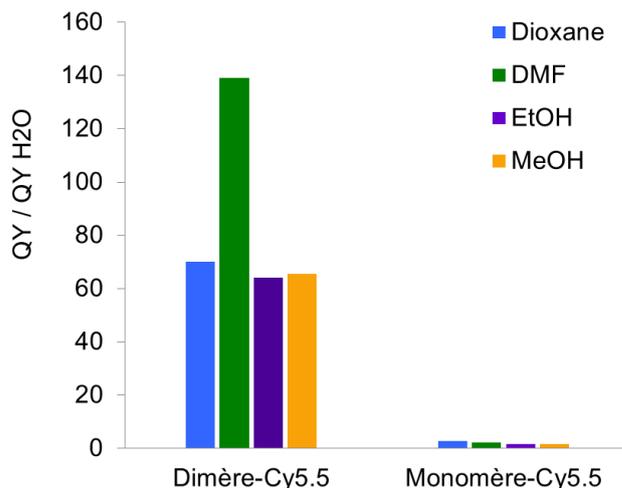


Figure 48. Représentation de l'effet « turn-on » en calculant le rapport des rendements quantiques de fluorescence dans les solvants organiques par rapport à celui obtenu dans l'eau pour le dimère-Cy5.5 **40** et pour le monomère-Cy5.5 **43**.

3.5. Evaluation spectroscopique des propriétés fluorogènes de la sonde CBT-dimère-Cy5.5

Avant de réaliser les évaluations biologiques il est important de vérifier que l'introduction du ligand CBT ne modifie pas les propriétés fluorogènes de la sonde « turn-on ». Pour contrôler ceci, les propriétés spectroscopiques d'absorption et de fluorescence du CBT-dimère-Cy5.5 à 200 nM ont été mesurées.

Comme le montre la Figure 49, les spectres d'absorption et de fluorescence obtenus pour le CBT-dimère-Cy5.5 **41** sont identiques à ceux mesurés pour le dimère-Cy5.5 **40** sans ligand (Figures 46 et 47). Nous retrouvons ainsi que la sonde dimérique est toujours capable de s'agréger en solvant aqueux (H₂O et PBS) pour former des espèces non-fluorescentes malgré la présence du ligand CBT (Figures 49c et d). Nous pouvons également constater que la présence de ce dernier ne modifie pas les propriétés fluorogènes de la sonde puisqu'en faisant varier le pourcentage de méthanol dans l'eau nous pouvons de nouveau observer qu'au-delà de 50% de méthanol les espèces fluorescentes deviennent prépondérantes (Figure 49a) et que l'intensité de

fluorescence de la sonde augmente bien proportionnellement avec l'ajout de méthanol (Figure 49b). Nous pouvons donc conclure que l'introduction du ligand ne semble pas modifier les propriétés spectroscopiques de la sonde.

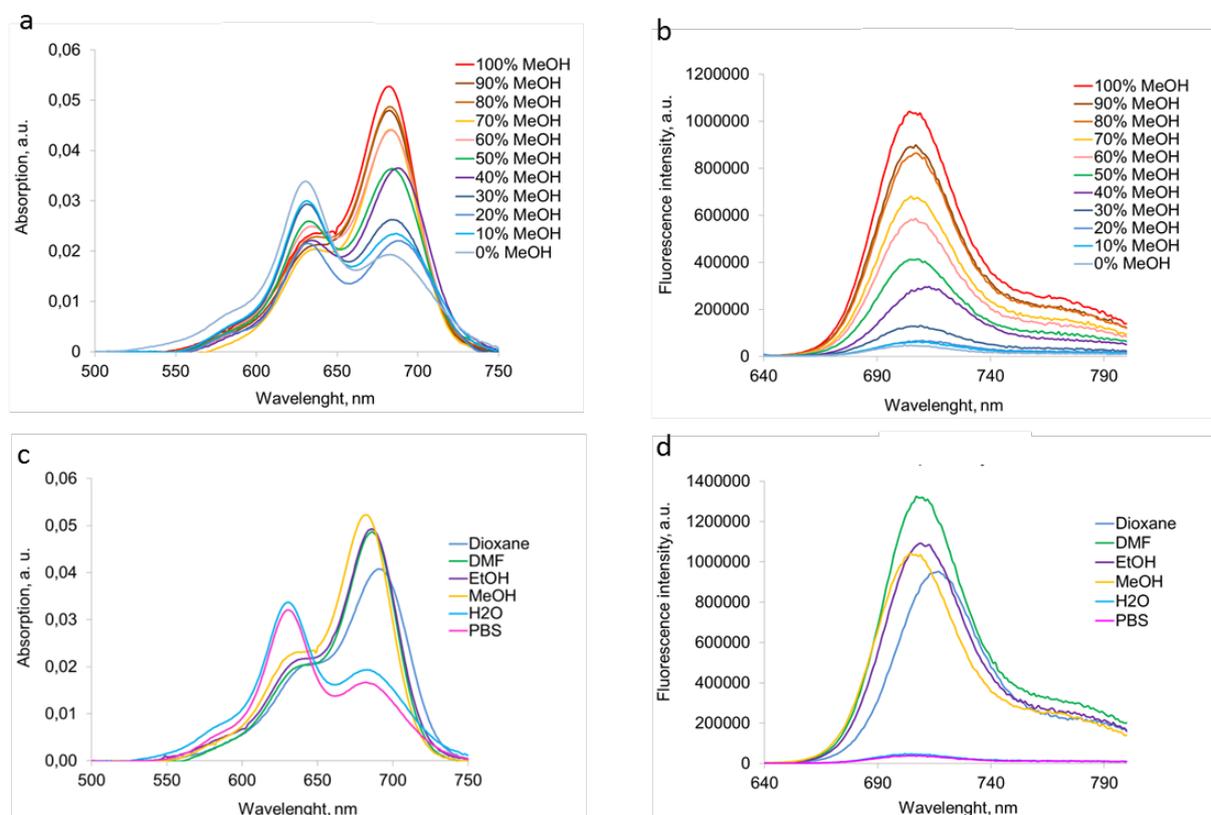


Figure 49. Evaluation de l'absorption et de la fluorescence de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 **41** à 200 nM en faisant varier le pourcentage de méthanol dans l'eau (a et b) ou dans différents solvants (c et d).

Afin de confirmer ceci, nous avons également calculé les rendements quantiques de fluorescence et nous les avons comparés à ceux obtenus pour la sonde sans ligand. Ainsi, nous pouvons observer sur le Tableau 29 que les rendements quantiques de cette sonde CBT-dimère-Cy5.5 **41** sont similaires à ceux du dimère-Cy5.5 **40** sans ligand. Nous pouvons alors envisager l'utilisation de cette sonde CBT-dimère-Cy5.5 pour des applications biologiques *in cellulo* et *in vivo*.

Tableau 29. Rendements quantiques de fluorescence pour le composé dimère-Cy5.5 **40** et pour le composé CBT-dimère-Cy5.5 **41**.

Solvant	QY (dimère-Cy5.5), %	QY (CBT-dimère-Cy5.5), %
Dioxane	28	34
DMF	56	47
Ethanol	26	31
Methanol	26	27
H₂O	0.4	0.8

Après avoir validé que l'ajout du ligand CBT permettait bien de conserver les propriétés spectrales du système dimère-Cy5.5, il est important de vérifier que ce ligand fluorescent reste spécifique du récepteur OT et conserve bien sa fonction d'agoniste. Pour étudier ces propriétés pharmacologiques nous avons choisi de suivre le devenir des sondes fluorescentes sur cellules.

4. Evaluation des propriétés pharmacologiques des sondes dimères et monomères

Dans le but de confirmer l'utilisation potentielle de cette sonde « turn-on » pour le suivi des interactions ligand/récepteur *in cellulo* et *in vivo*, il est important d'évaluer l'impact du système dimérique et monomérique sur les propriétés pharmacologiques du ligand CBT. Pour ce faire, l'activité fonctionnelle des sondes CBT-dimère-Cy5.5 **41** et CBT-monomère-Cy5.5 **44** a été évaluée par Sophie Gioria (PCBIS) en mesurant la capacité des sondes à induire la production de calcium sur des cellules HEK293 sur-exprimant le récepteur OT. L'ocytocine et la carbétocine, deux ligands endogènes du récepteur OT, ont été utilisés en tant que contrôles.

Comme le montre la Figure 50 et le Tableau 30, l'introduction du groupement dimère-Cy5.5 entraîne une diminution conséquente de l'activité fonctionnelle du ligand CBT d'un facteur 215 ($CE_{50} = 418$ nM pour le composé **41** vs 1.94 nM pour la CBT native).

Cette diminution d'efficacité fonctionnelle est un peu moins importante lorsque l'on introduit le groupement monomère-Cy5.5 sur le ligand CBT ($CE_{50} = 49.5$ nM pour le composé **44** vs 1.94 nM pour la CBT native). Par conséquent, l'introduction d'un groupement monomère-Cy5.5 ou dimère-Cy5.5 sur le ligand CBT a un impact important sur ses propriétés pharmacologiques, conduisant à une baisse significative de son activité fonctionnelle. Cependant, malgré l'ajout de ces groupements encombrants, le ligand conserve sa capacité à se fixer à son récepteur et à induire la production de calcium au sein de la cellule. De ce fait, nous pouvons envisager l'utilisation de ces sondes pour le suivi *in cellulo* et *in vivo* des interactions ligand/récepteur.

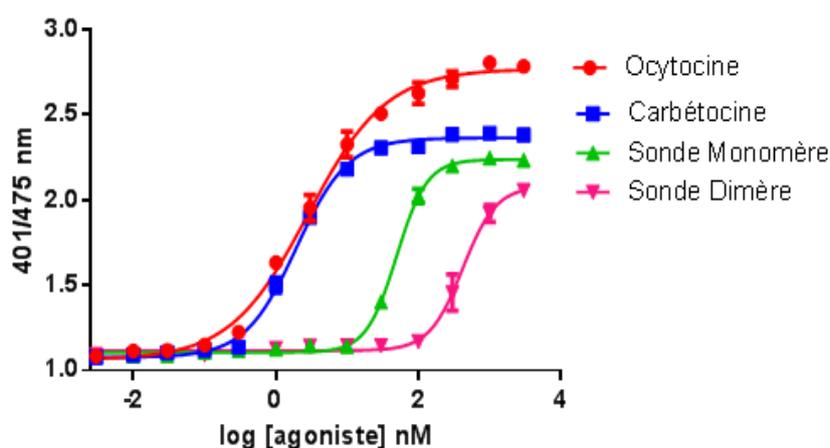


Figure 50. Evaluation de l'activité fonctionnelle des composés ocytocine, carbétocine, sonde monomère **44** et sonde dimère **41** sur le récepteur OT.

Tableau 30. Activité fonctionnelle des composés ocytocine, carbétocine, sonde monomère **44** et sonde dimère **41** sur le récepteur OT en mesurant leur capacité à induire la production de calcium.

Composé	Production de Ca^{2+}
	CE_{50} (nM)
Ocytocine	2.82 ± 0.78
Carbétocine	1.94 ± 1.20
44	49.5 ± 2.04
41	418 ± 1.85

5. Evaluation biologique *in cellulo* des sondes dimères et monomères par microscopie confocale

Dans le but de montrer, *in cellulo*, que les sondes CBT-dimère-Cy5.5 ciblent de manière spécifique les récepteurs OT avec un très bon rapport signal/bruit nous avons tout d'abord choisi d'évaluer la spécificité de cette sonde pour son récepteur, puis d'étudier sa capacité à le faire internaliser et enfin nous avons voulu comparer le bruit de fond de cette sonde avec le dérivé monomérique. Nous espérons ainsi visualiser l'efficacité de cette nouvelle sonde « turn-on » *in vitro* pour confirmer sa possible utilisation pour de l'imagerie *in vivo*.

5.1. Evaluation de la spécificité des sondes pour le récepteur OT

Afin d'évaluer la spécificité de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 pour le récepteur OT, nous avons incubé des cellules adhérentes HEK293 surexprimant le récepteur OT sur lequel est fusionnée la protéine fluorescente verte (GFP-OTR-HEK293) en présence de 10 nM de sonde **41**.

Après 5 min d'incubation à température ambiante, nous pouvons observer sur la Figure 50 une forte fluorescence dans le canal de la Cy5.5 (excitation : 635 nm ; émission : 650 à 800 nm). Cette fluorescence des sondes colocalise parfaitement avec la fluorescence mesurée dans le canal de la GFP (excitation : 488 nm ; émission : 500 à 580 nm). La différence d'intensité de fluorescence des cellules, dans le canal de la GFP, s'explique par des variations au niveau de l'expression du récepteur OT à la surface des cellules. Cette variation d'intensité se retrouve dans le canal de la Cy5.5 et corrèle parfaitement avec le signal de la GFP. Nous pouvons donc en déduire que la liaison de la sonde à la membrane semble bien proportionnelle au niveau d'expression du récepteur. Afin de confirmer cette spécificité de la sonde pour le récepteur OT, nous avons réalisé un test de compétition en additionnant un excès de ligand CBT non-fluorescent (200 équiv.). Comme le montre la Figure 51, l'excès de CBT non-fluorescente déplace complètement la sonde de la membrane, confirmant ainsi la spécificité de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 pour son récepteur. Par conséquent, la sonde dimère-Cy5.5 **41** pourra être

injectée chez la souris afin de suivre, *in vivo*, sa biodistribution ainsi que ses interactions ligand/récepteur.

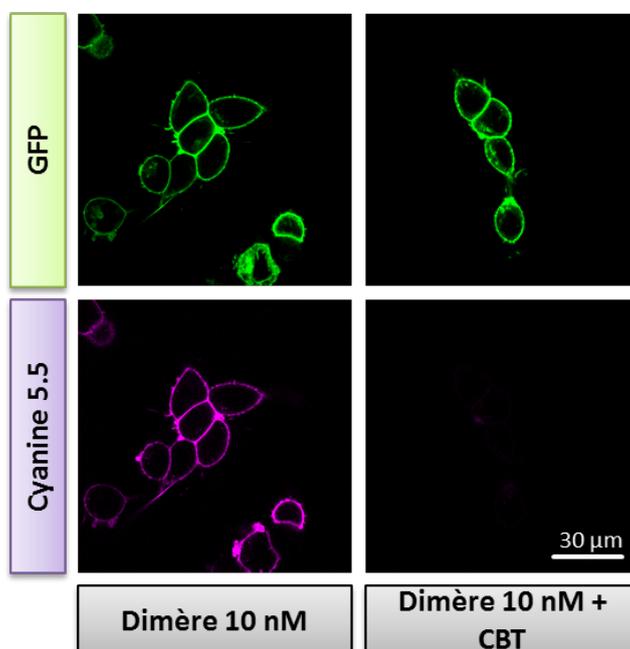


Figure 51. Evaluation *in cellulo* de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 **41** sur des cellules GFP-OTR-HEK293. Les interactions avec le récepteur sont visibles après 5 min d'incubation des cellules à température ambiante en présence de 10 nM de sondes. La spécificité de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 pour le récepteur OT a pu être observée après incubation d'un mélange de sonde **41** et de ligand CBT non-fluorescent mis en excès (200 équiv.).

Les mêmes études *in cellulo* ont été réalisées pour la sonde CBT-monomère-Cy5.5 **44**. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 52, cette sonde est complètement déplacée après ajout d'un excès de ligand CBT non-fluorescent (200 equiv.). Ce résultat nous permet de confirmer la spécificité de la sonde CBT-monomère-Cy5.5 **44** pour le récepteur OTR et donc de valider également son utilisation en tant que contrôle pour des futures études *in vivo*.

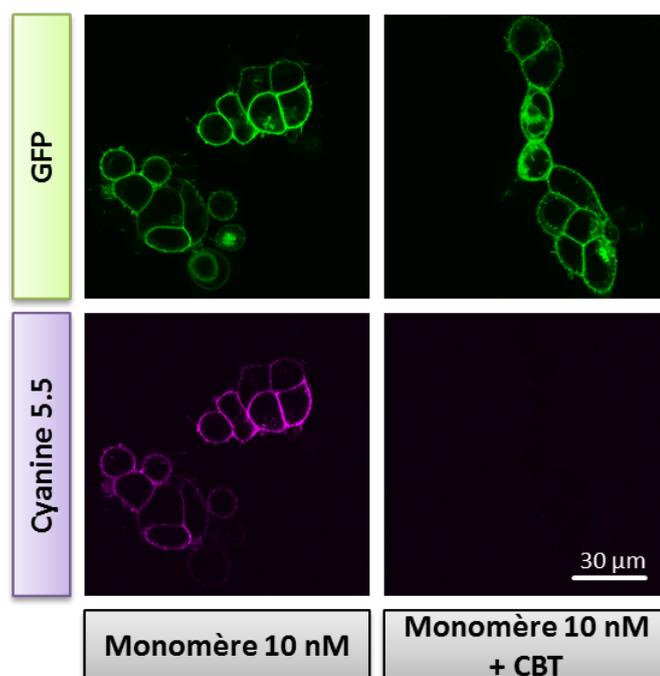


Figure 52. Evaluation *in cellulo* de la sonde CBT-monomère-Cy5.5 **44** sur des cellules GFP-OTR-HEK293. Les interactions avec le récepteur sont visibles après 5 min d'incubation des cellules à température ambiante en présence de 10 nM de sondes. La spécificité de la sonde CBT-monomère-Cy5.5 pour le récepteur OT a pu être observée après incubation d'un mélange de sonde **44** et de ligand CBT non fluorescent mis en excès (200 équiv.).

5.2. Evaluation de la capacité de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 à faire internaliser le récepteur OT

Afin de confirmer que l'insertion d'une pince fluorescente sur la CBT ne modifie pas l'activité agoniste de ce ligand, nous avons mesuré sa capacité à faire internaliser son récepteur OT. Pour ce faire, nous avons incubé à 37 °C les cellules GFP-OTR-HEK293 en présence de 10 nM de sonde CBT-dimère-Cy5.5 **41** pendant 5 min ou 30 min.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 53, après 5 min d'incubation à 37 °C nous avons un signal uniquement membranaire de la sonde qui colocalise avec le signal des récepteurs OT marqués par la GFP. Quand les cellules sont incubées avec la sonde pendant 30 min, nous pouvons observer que la sonde entraîne l'internalisation du récepteur. Cette internalisation est caractérisée par la diminution du signal membranaire et l'apparition de petits spots lumineux à l'intérieur des cellules qui

colocalisent, en partie, entre le canal de la GFP et celui de la Cy5.5. Nous pouvons ainsi confirmer que l'introduction du dimère-Cy5.5 sur le ligand CBT permet au peptide de conserver sa fonction d'agoniste sur l'internalisation du récepteur OTR.

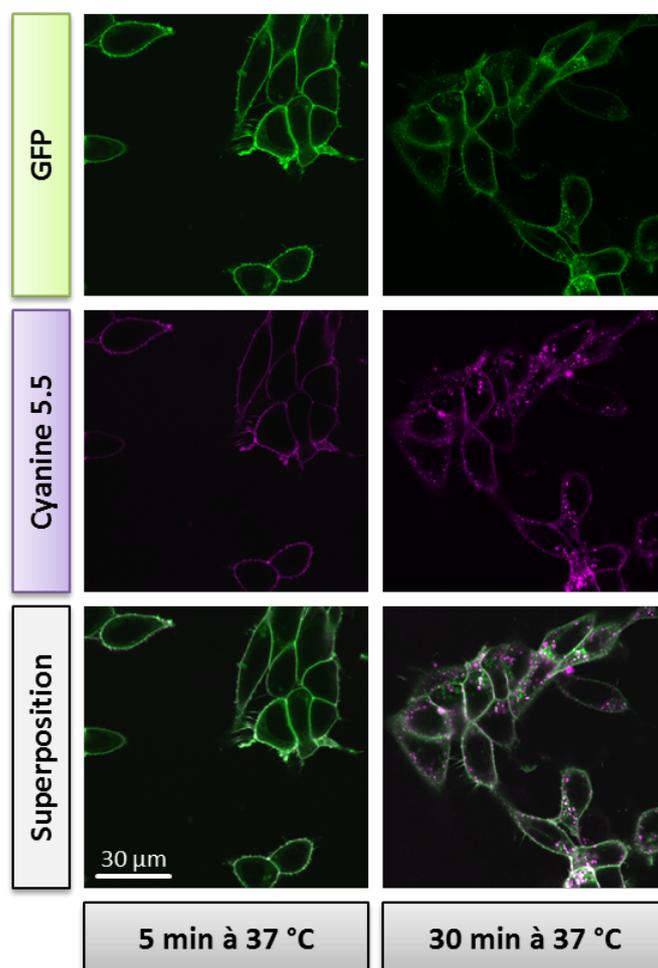


Figure 53. Evaluation *in cellulo* de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 **41** sur des cellules GFP-OTR-HEK293. L'internalisation du récepteur est visible après 30 min d'incubation des cellules à 37 °C en présence de 10 nM de sondes.

5.3. Evaluation de l'effet « turn-on » *in cellulo*

L'effet « turn-on » de notre pince a également été évalué *in cellulo*. Pour cela, nous avons incubé les cellules GFP-OTR-HEK293 en présence de 500 nM de CBT-dimère-Cy5.5 **41** ou de CBT-monomère-Cy5.5 **44** pendant 5 min à température ambiante.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 54, à 500 nM aucun bruit de fond en solution n'apparaît pour les sondes dimères alors que les sondes monomères

présentent une importante fluorescence dans le milieu extracellulaire. Cette fluorescence dans le tampon est même proche du signal spécifique des membranes, masquant alors ce dernier. Comme vu lors des études de spectroscopie, en solution aqueuse, les dimères se trouvent dans un état d'agrégation intramoléculaire et s'auto-quenchent, ne contribuant pas au signal de bruit de fond, contrairement aux monomères. Après s'être liés aux récepteurs membranaires, l'environnement des sondes doit être beaucoup plus hydrophobe, ce qui conduit au désassemblage des dimères et donc à l'activation de leur fluorescence (effet « turn-on »). Nous confirmons ainsi le potentiel prometteur des sondes dimères-Cy5.5 à diminuer considérablement le bruit de fond en solution permettant une amélioration conséquente du rapport signal/bruit.

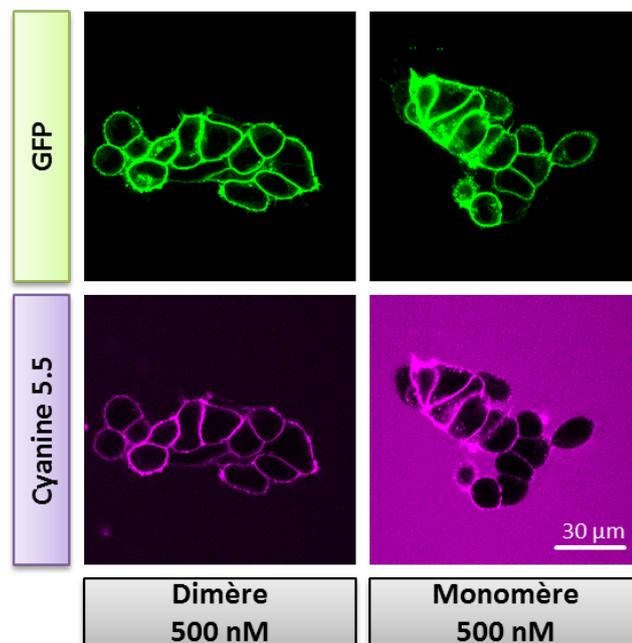


Figure 54. Evaluation de l'effet « turn-on » de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 **41** par rapport à la sonde CBT-monomère-Cy5.5 **44** sur des cellules GFP-OTR-HEK293 après 5 min d'incubation des cellules à température ambiante en présence de 500 nM de sondes.

6. Evaluation biologique *in vivo* des sondes dimères et monomères

Après avoir montré l'efficacité de nos sondes « turn-on » pour l'imagerie cellulaire du récepteur OT, nous avons voulu évaluer leur potentiel pour l'imagerie de ce récepteur *in vivo*. Ces sondes ont donc été administrées chez la souris afin de démontrer, pour la première fois, l'intérêt d'utiliser des sondes « turn-on » pour le suivi de la biodistribution d'un peptide *in vivo*. Pour cela, nous avons choisi d'administrer le composé dans des souris allaitantes, 11 jours après leur accouchement. En effet, la forte expression des récepteurs OT dans les glandes mammaires de souris est reportées comme étant maximale plusieurs jours après la mise bas.¹⁸⁹ En vue de montrer la spécificité de la sonde pour son récepteur nous avons également choisi de réaliser une expérience de compétition en administrant un excès de ligand CBT non-fluorescent avant l'administration de la sonde. Enfin, nous avons également choisi d'administrer la sonde monomère dans le but de comparer l'efficacité et le rapport signal/bruit par rapport à la sonde dimère.

La sonde CBT-dimère-Cy5.5 **41** a donc été injectée par voie intraveineuse à une dose de 7.5 nmol dans des souris allaitantes, 11 jours après leur accouchement. Pour les expériences de compétition, le ligand CBT non-fluorescent a été injecté en excès (60 équiv.) 5 min avant l'administration de la sonde. Les expériences ont été répétées sur trois souris différentes pour chaque paramètre évalué. Juste après l'imagerie des 30 minutes, certains organes des souris ont été prélevés afin de pouvoir comparer plus précisément la biodistribution des sondes. La sonde CBT-monomère-Cy5.5 **44** a été administrée dans les mêmes conditions pour nous servir de contrôle.

Nous pouvons observer sur la Figure 55 que la sonde dimère permet d'imager de manière très précise les glandes mammaires puisque nous avons apparition nette d'un signal de fluorescence sur les dix mamelles de la souris. Le foie est également très fluorescent, mais cette fluorescence est très probablement due à une accumulation non spécifique classique de la sonde dans cette organe comme il l'a déjà été décrit pour les sondes fluorescentes dérivées de cyanine 5.¹⁹⁸ Nous pouvons également constater que lorsque nous effectuons la compétition avec l'excès de ligand CBT non-fluorescent, nous

le signal de la sonde dimère s'éteint sur les dix mamelles. Ces résultats mettent en avant la capacité de la sonde CBT-dimère-Cy5.5 à rester spécifique du récepteur OT *in vivo*. Par ailleurs, nous pouvons observer que le signal résultant de la sonde dimérique est beaucoup plus spécifique du récepteur OT que celui obtenu avec la sonde monomérique qui présente un signal beaucoup plus diffus, avec un important bruit de fond. Cette observation démontre l'efficacité de la sonde dimère à produire un effet « turn-on » même *in vivo*, lui permettant ainsi d'être éteinte dans la circulation sanguine contrairement à la sonde monomère. Grâce à l'utilisation du système en pince, nous confirmons l'importante amélioration du rapport signal/bruit que nous souhaitons obtenir.

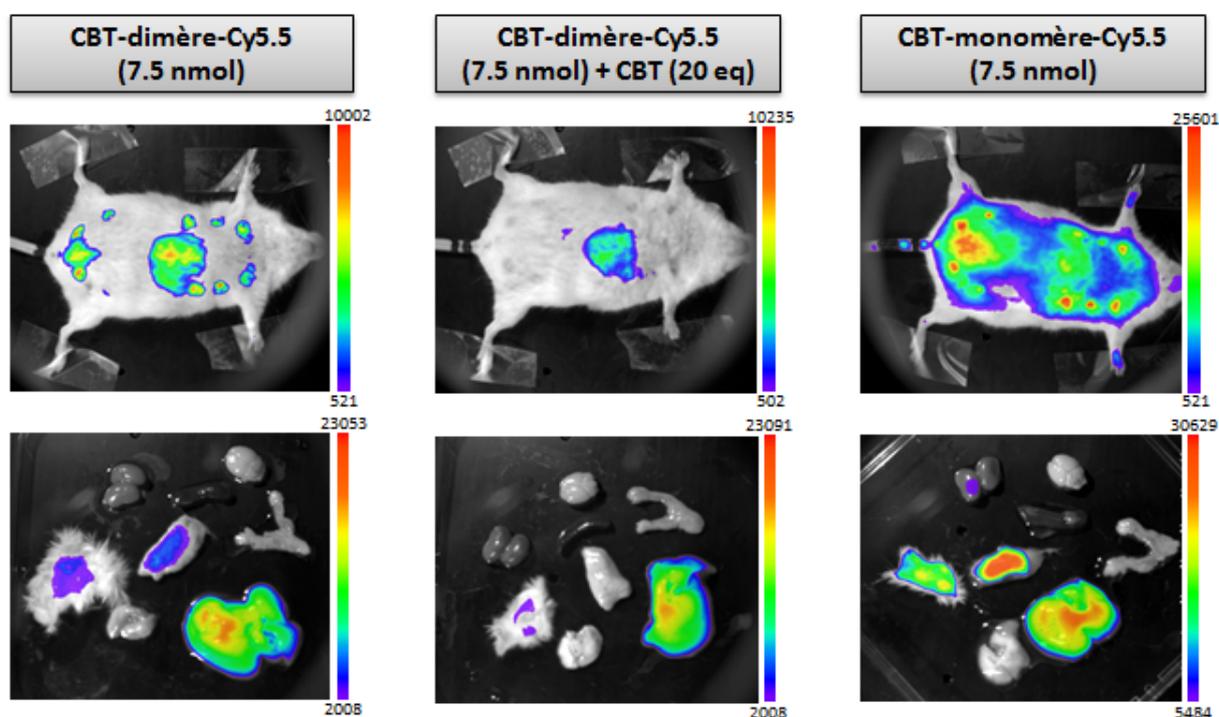


Figure 55. Evaluation des sondes CBT-dimère-Cy5.5 **41** et CBT-monomère-Cy5.5 **44** après administration intraveineuse de 7.5 nmol dans des souris allaitantes. Pour l'expérience de compétition, 60 équivalents de ligand CBT non-fluorescent ont été administrés 5 min avant l'administration de la sonde. Les images ont toutes été réalisées 30 min après administration de la sonde. Certains organes ont été prélevés juste après l'imagerie à 30 min : mammelle (1), glande mammaire (2), rein (3), cerveau (4), rate (5), cornes utérines (6), foie (7) et poumons (8).

Par ailleurs, la spécificité de la sonde dimère pour le récepteur OT a été confirmée par l'étude de la biodistribution sur des organes isolés (Figure 55). En effet, nous pouvons observer une extinction du signal de fluorescence sur les mamelles et les glandes mammaires après compétition avec l'excès de ligand CBT. Nous pouvons également constater que le foie reste éclairé après compétition avec le ligand CBT, ce qui confirme bien l'accumulation non spécifique de la sonde dans le foie. De plus, les reins, le cerveau, les poumons, la rate et les cornes utérines ne présentent aucun signal de fluorescence traduisant ainsi une absence d'interaction de nos sondes dans ces organes.

Par conséquent, l'administration de ces sondes chez la souris allaitante nous a permis de valider leur utilisation pour le suivi *in vivo* de la spécificité du ligand CBT pour le récepteur OT qui est surexprimé dans les glandes mammaires de souris allaitantes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'utilisation de sonde « turn-on » permet effectivement bien d'augmenter le rapport signal/bruit *in vivo* et d'imager très précisément l'interaction ligand/récepteur. En effet, une simple expérience de compétition nous a permis de déplacer le ligand fluorescent lié au récepteur et de mettre ainsi en avant la spécificité d'un ligand pour son récepteur *in vivo*.

7. Conclusion et perspectives

Suite à l'ensemble des résultats de cette étude, nous avons pu démontrer l'intérêt des sondes « turn-on » Cy5.5 dérivées du ligand carbétocine pour le suivi des interactions CBT/récepteur OT *in vitro* et *in vivo* sans passer par des étapes de rinçage des ligands non-liés qui sont longues, coûteuses et impossibles à réaliser *in vivo*. Cette technique nous a permis de suivre la liaison spécifique de notre peptide à la fois *in cellulo* et *in vivo* avec une excellente sensibilité dénuée de bruit de fond. En validant notre concept sur le ligand CBT, nous avons pu confirmer la forte expression des récepteurs OT au niveau des glandes mammaires. Nous pouvons maintenant envisager, en perspectives, l'utilisation de ces sondes sur d'autres ligands tels que nos fluoropeptides. Cet outil nous permettrait de suivre *in vivo* la biodistribution des fluoropeptides ainsi que leur possible accumulation et leur voie d'élimination. Nous souhaitons également synthétiser des sondes « turn-on » dérivées de lipopeptides pour

comparer, *in vivo*, la biodistribution de peptides stabilisés par une F-chaîne ou une H-chaîne. Nous espérons ainsi pouvoir mettre en évidence *in vivo* les fortes interactions non-spécifiques observées avec la lipoapéline *in cellulo*. L'intérêt ultime de ces sondes « turn-on » dérivées de fluoropeptides serait de pouvoir suivre *in vivo* la biodistribution de peptides instables, ce qui était impossible à réaliser au préalable en seulement quelques minutes. Nous pourrions ainsi identifier de nouvelles zones d'expression de récepteurs pour un ligand donné et découvrir de nouveaux rôles physiologiques pour ce ligand, avec potentiellement de nouvelles applications thérapeutiques.

Conclusion Générale

Au cours des dernières années, les peptides sont de plus en plus utilisés pour des applications médicales. Cet intérêt pour le développement de peptides thérapeutiques s'explique par le fait que les peptides sont des molécules de la régulation cellulaire très sélectives et efficaces qui se lient de manière spécifique à un récepteur cellulaire comme par exemple les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPG représentent une famille de choix pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques puisque 30% des médicaments actuellement sur le marché ciblent un de ces récepteurs. Cependant, les peptides sont rarement directement utilisables en tant qu'agent thérapeutique car ils présentent, la plupart du temps, une très faible stabilité plasmatique.

L'objectif principal de ma thèse était donc de développer une nouvelle méthode pour augmenter la stabilité plasmatique et l'activité biologique de peptides ayant pour cibles les RCPG. En se basant sur les propriétés uniques des F-chaînes, nous avons proposé leur incorporation dans la séquence d'un peptide endogène afin de contraindre le peptide à s'organiser en solution aqueuse et ainsi à être protégé de la protéolyse. L'apeline-17 a été sélectionnée comme peptide modèle pour ses propriétés thérapeutiques potentiellement intéressantes pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que l'introduction d'une F-chaîne (C₈F₁₇) en partie N-terminale du peptide permettait d'augmenter considérablement la stabilité plasmatique du peptide natif de 4 min à plus de 24 h sans modifier son affinité pour son récepteur ni son activité fonctionnelle. Nous avons également montré qu'en diminuant la longueur de la F-chaîne il était possible de moduler très finement la stabilité plasmatique du peptide natif. Par ailleurs, afin de démontrer l'efficacité de notre approche, nous avons également préparé la lipoapeline correspondante qui comporte une H-chaîne palmitoyl habituellement utilisée pour stabiliser les peptides. Cela nous a permis de mettre en évidence que la fluoroapeline présentait un pouvoir hémolytique et une activité pro-inflammatoire inférieurs à ceux de la lipoapeline ainsi qu'une meilleure sélectivité vis-à-vis du récepteur de l'apeline. Enfin, l'évaluation des deux composés dans un modèle de rats normotendus a montré une meilleure efficacité de la fluoroapeline à induire une diminution de la pression artérielle.

Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme de stabilisation plasmatique de la fluoroapeline. Ainsi, nous avons pu montrer que la fluoroapeline était capable de s'auto-organiser en agrégats réversibles et de taille homogène (100 nm) dans différents milieux aqueux (PBS ou NaCl 0.9%) à des concentrations supérieures à 80 μM . Cependant, la stabilité plasmatique de la fluoroapeline a été mesurée à des concentrations inférieures (5 μM) tendant à démontrer que cette auto-organisation ne suffit pas à expliquer le mécanisme de stabilisation. En revanche, nous avons mis en évidence par une méthode fluorescente originale que l'introduction d'une F-chaîne permettait à la fluoroapeline de se lier à l'albumine circulante dans le plasma contrairement au peptide natif. De plus, nous avons montré que la stabilité plasmatique de la fluoroapeline était directement fonction de la longueur de la F-chaîne et de son affinité pour l'albumine. L'ensemble de ces résultats nous conforte dans l'idée que c'est certainement cet encombrement stérique, induit par une liaison à l'albumine, qui permet de protéger le peptide de la reconnaissance enzymatique et ainsi de prolonger considérablement sa demi-vie plasmatique à plus de 24 h. Cette liaison à l'albumine devrait également permettre de limiter la filtration rénale et d'augmenter ainsi la demi-vie plasmatique *in vivo*.

Par ailleurs, nous avons également pu étendre le concept à d'autres peptides ciblant les RCPG qui présentent des structures et des activités biologiques différentes de l'apeline-17, à savoir : l'apeline-13, l'angiotensine II, l'ocytocine et la spexine. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que la composition structurale du peptide semble importante pour permettre sa stabilisation lors de l'introduction d'une F-chaîne. En effet, nous avons obtenu des stabilités de l'ordre de 24 h uniquement pour l'apeline-13 et l'angiotensine II. L'introduction de la F-chaîne sur le peptide cyclique ocytocine a permis d'augmenter seulement d'un facteur 1.6 sa stabilité plasmatique (4 h dans le plasma humain) tout en entraînant une perte de l'activité fonctionnelle. Ce peptide étant déjà très contraint stériquement, il serait intéressant de rajouter un espaceur entre la F-chaîne et le peptide afin de permettre au peptide de conserver son efficacité biologique et de pouvoir accéder aux poches de liaison de l'albumine. De même, l'introduction de la F-chaîne sur la spexine induit seulement un faible effet sur la stabilisation plasmatique du peptide (2.5 h dans le plasma de souris). Par contre, de manière surprenante, la présence de la F-chaîne permet d'augmenter considérablement l'activité fonctionnelle

de la spexine *in cellulo* d'un facteur 100 et *in vivo* d'un facteur 10 dans un modèle murin de douleur. Ces résultats prometteurs ouvrent ainsi la voie au développement potentiel de nouveaux médicaments analgésiques qui ne passeraient pas par les récepteurs opioïdes. Par ailleurs, afin d'augmenter la solubilité de la fluorospexine, un espaceur peptidique (RGR) a été ajouté entre le peptide et la F-chaîne. Cet espaceur permet non seulement une augmentation de la solubilité de la fluorospexine d'un facteur 10 mais également de doubler sa stabilité plasmatique. Des études pour comprendre la corrélation entre la nature de l'espaceur et la stabilité métabolique du peptide sont en cours. Nous espérons ainsi améliorer notre compréhension du mécanisme de stabilisation des F-chaînes afin de développer un fluoro-espaceur qui pourrait permettre de stabiliser différents peptides, y compris ceux qui présentent une structure peptidique très apolaire ou contrainte.

Enfin, dans le but de suivre la biodistribution, l'accumulation et l'élimination des fluoropeptides *in vivo* avec une excellente sensibilité du signal, nous avons également développé une sonde fluorescente basée sur l'introduction d'une pince « turn-on » comportant deux cyanines 5.5 sur un ligand d'intérêt. Afin de valider l'efficacité de nos pinces « turn-on » nous sommes partis d'un peptide modèle : la carbétocine. En effet, ce ligand est connu pour se lier au récepteur OT, un récepteur impliqué notamment dans la production du lait post-natale. Le suivi *in vivo* de l'interaction ligand/récepteur est donc plus aisé puisque les souris allaitantes présentent une forte expression de récepteurs OT dans leurs glandes mammaires. Après avoir conçu, synthétisé ces sondes et évalué leur propriété fluorogène, nous avons démontré leur spécificité d'interaction sur des cellules exprimant le récepteur OT. Nous avons également pu mettre en évidence, sur ces mêmes cellules, que la détection du récepteur s'effectue avec un excellent rapport signal/bruit en raison de leur excellent caractère « turn-on ». De plus, nous avons également évalué leur potentiel pour la détection du récepteur OT *in vivo*, sur un modèle de souris allaitantes présentant une sur-expression du récepteur OT au niveau des glandes mammaires. Nous avons ainsi montré que les pinces « turn-on » permettent de détecter, avec une grande sensibilité et spécificité, les récepteurs OT également *in vivo*. Après avoir validé l'efficacité de ces sondes « turn-on » sur le ligand CBT, nous souhaitons maintenant évaluer cet outil sur les fluoropeptides et comparer leur biodistribution avec celle des lipopeptides et du peptide natif. Ces résultats nous permettraient

potentiellement de mettre en évidence, *in vivo*, le caractère non spécifique observé *in cellulo* avec la lipoapeline ce qui pourrait expliquer les différences d'activité biologique mesurées par rapport à la fluoroapeline. Enfin, cet outil pourrait nous permettre de suivre le mode et la vitesse d'élimination des fluoropeptides, l'accumulation potentielle sur certains tissus, ainsi que la détection de la cartographie des récepteurs de l'apeline.

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse montrent l'intérêt de la nouvelle stratégie de conjugaison de F-chaînes sur des peptides visant les RCPG afin d'augmenter leur stabilité métabolique et leur activité *in vivo*. L'étude de la biodistribution et de la cinétique d'élimination des fluoropeptides est en cours d'évaluation, tout comme les modes d'administration des composés (administration par voies intrapéritonéale ou orale). Cette technologie a fait l'objet de 3 dépôts de brevets et est actuellement valorisée par le biais de la SATT conectus Alsace auprès de partenaires industriels. Ainsi, ce nouveau concept devrait permettre de faciliter le développement de nouveaux outils pharmacologiques et/ou agents thérapeutiques dérivés de peptides natifs.

Experimental Part

General methods

1. Chemical characterization

Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed either on a C18 Ascentis Express column (2.7 μm , 4.6 mm \times 75 mm) using a linear gradient (5% to 100% in 7 min, flow rate of 1.6 mL \cdot min $^{-1}$) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v/v); either on a C18 Sunfire column (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 20 min, flow rate of 1 mL \cdot min $^{-1}$) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm.

High resolution mass spectra (HRMS) were obtained on an Agilent Technologie 6520 Accurare-Mass Q.Tof LC/MS apparatus equipped with a Zorbax SB C18 column (1.8 μm , 2.1 \times 50 mm) using electrospray ionization (ESI) and a time-of-flight analyzer (TOF).

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance spectrometer (400 MHz for ¹H spectra and 126 MHz for ¹³C) at 25 °C. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual solvent and coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz). Signals are described as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br s (broad singlet) and br d (broad doublet). Deuterated solvents were purchased from Sigma-Aldrich.

2. General methods for peptides synthesis

2.1. Reagents

Reagents were obtained from commercial sources and used without any further purification. Fmoc-Lys(Boc)-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Lys(N₃)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(Me)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH were purchased from Novabiochem, Polypeptides and Iris Biotech. Fmoc-protected Rink amide resin was purchased from Iris Biotech and the overall yields

for the solid-phase syntheses were calculated based on the initial loadings provided by the supplier (0.7 mmol.g⁻¹). Fmoc-protected preloaded Wang resin was purchased from Novabiochem and the overall yields for the solid-phase syntheses were calculated based on the initial loadings provided by the supplier (0.67 mmol.g⁻¹). 4,4,5,5,6,6,7,7,7-Nonafluoroheptanoic acid, 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid, 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoic acid and hexadecanoic acid were purchased from Sigma-Aldrich, undecanoic acid was purchased from Acros Organics. DY647-NHS-Ester was purchased from Dyomics GmbH. Fluorooxytocin (compose **22**) was synthesized by Stéphanie Riché in our Laboratory. Pegylated-cyanine 5.5 (Cy5.5) was synthesized by Mayeul Collot (LBP, Illkirch).

2.2. General method for automated solid-phase peptide synthesisⁱ

Automated solid-phase peptide synthesis (SPPS) was performed using an Applied Biosystem ABI 433A synthesizer (Appelar, France) by standard Fmoc solid-phase chemistry on a preloaded Wang resin (0.67 mmol.g⁻¹ resin, 0.1 mmol scale), or on a Rink amide resin (0.7 mmol.g⁻¹) using NMP as solvent. The coupling of each amino acid (10 equiv.) was carried out using HBTU (10 equiv.), and DIEA (10 equiv.). Fmoc groups were removed using a 20% v/v solution of piperidine in NMP. Washing steps were performed using NMP, DCM and MeOH. Each coupling and Fmoc deprotection steps were followed by UV absorption at 301 nm. At the end of peptide synthesis, the resin was washed with MeOH and DCM and then dried *in vacuo*.

2.3. General method for peptide elongation with amino acids

Peptide elongation was realized using the dried resin previously synthesized by automated SPPS. Non-automated SPPS were performed in polypropylene tubes equipped with polyethylene frits and polypropylene caps using an orbital agitator shaking device. The Fmoc-protected resin (1 equiv.) was swollen for 1 h in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. *N*-terminal-Fmoc-group was removed by using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). All Fmoc-

ⁱ Performed by Nicolas Humbert (LBP, Illkirch)

ⁱⁱ Performed by Patrick Gizzi (PCBIS, Illkirch)

deprotection steps were performed in the same way. The piperidine solution was drained off and the resin was washed three times with successively DMF, DCM and MeOH. All Fmoc-protected amino acids (4 equiv.) were coupled in DMF (1 mL per 0.1 mmol of resin) for 45 min using HBTU (3.8 equiv.) and HOBT (4 equiv.) with DIEA (12 equiv.) as activating agents. The excess of solvent was removed by filtration and the resin was washed three times with successively DMF, DCM and MeOH.

2.4. General method for the acylation of peptides with alkyl or perfluoroalkyl chains

The resin containing the peptide sequence of interest (1 equiv.) was swollen for 1 h in DMF, and the excess of solvent was removed by filtration. *N*-terminal-Fmoc-group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. In a separate vial, DIEA (8 equiv.) was added to a solution of the chain (2 equiv.), HBTU (1.9 equiv.), and HOBT (2 equiv.) in DMF (1 mL per 0.1 mmol of resin). The mixture was stirred at room temperature for 1 min and was added to the resin. The mixture was shaken at room temperature for 2 h. The solution was drained and the resin was washed with DMF, DCM, and MeOH then dried *in vacuo*.

2.5. General method for peptide acetylation

The resin containing the peptide sequence of interest was swollen for 1 h in DMF, and the excess of solvent was removed by filtration. *N*-terminal-Fmoc-group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The acetylation was performed by adding a solution of acetic anhydride/DIEA/DCM 10/5/85 (3 mL per 0.1 mmol of resin), during 10 min. The solution was drained, and the resin was washed three times with DCM. The final resin was dried *in vacuo*.

2.6. General method for the monitoring of solid-phase peptide reactions

The completion was monitored with the Kaiser test¹⁹⁹, the TNBS test²⁰⁰, or the chloranil test²⁰¹ as well as by analytical HPLC following cleavages of small aliquots of resin with TFA/H₂O/TIS 95/2.5/2.5 (v/v/v).

Kaiser test and TNBS test were used for all the amino acids except proline where Chloranil test was used. For Kaiser test, few resin beads were transferred to a small glass tube and one drop of the ninhydrin solution was added, as well as one drop of the phenol solution and three drops of KCN in pyridine. The glass tube was mixed and heated using a heat gun. Dark blue resin beads indicate the presence of resin-attached primary amines. For TNBS test, few resin beads were transferred to a small glass tube and 3 μ L of TNBS were added as well as 5 μ L of 10% DIPEA in DMF. The glass tube was mixed during 5 min. Red or deep-orange resin beads indicate the presence of resin-attached primary amines. For Chloranil test, few resin beads were transferred to a small glass tube and one drop of the acetaldehyde solution was added as well as one drop of the chloranil solution. The glass tube was mixed during 10 min. Blue resin beads indicate the presence of resin-attached proline.

2.7. General method for peptide cleavage and deprotection

Final peptides were cleaved from the resin under reducing conditions with TFA/phenol/thioanisole/EDT/H₂O 85/4/4.5/2/4.5 (v/v) for peptides containing cysteine or methionine in the sequence, or with TFA/H₂O/TIS 95/2.5/2.5 (v/v) for other peptides (1 mL per 0.1 mmol of resin). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The solution was vacuum filtered, and the peptides were precipitated with cold diethyl ether (30 volumes per volume of the cleavage mixture). The precipitated peptides were centrifuged at 3000 rpm and 4 °C for 2 min. The precipitate was washed with cold diethyl ether and centrifuged again at 3000 rpm and 4 °C for 2 min. The diethyl ether solution was removed by decantation and the precipitate was dried *in vacuo*. Finally, the crude product was dissolved in DMSO and purified.

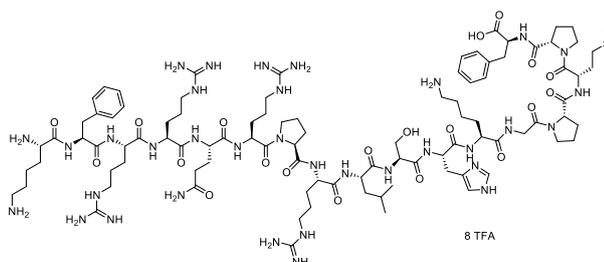
2.8. General method for peptide purification

Crude peptides were purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm , 19 \times 150 mm) using a linear gradient (5% to 60% in 30 min, flow-rate of 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired peptide were freeze-dried.

Chapter I: Development of a novel method to increase peptides plasma stability and biological activity using fluorocarbon chains: proof of concept on model peptide apelin-17

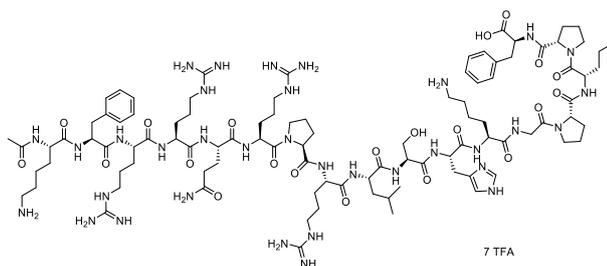
1. Chemical synthesis

H-KFRRQRPRLSHKGPMPF-OH, 8 TFA (1)



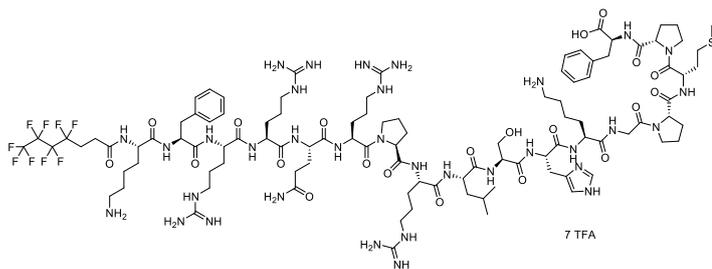
Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. Resin-bound peptide (19 μmol) was then treated using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (29.9 mg, 43%) as a white solid. $t_R = 6.68$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{96}\text{H}_{156}\text{N}_{34}\text{O}_{20}\text{S}$: 2137.1956 found: 2137.1978.

CH₃CO-KFRRQRPRLSHKGPMPF-OH, 7 TFA (2)



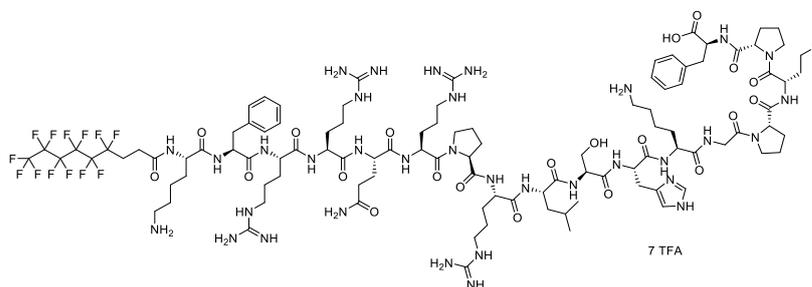
Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. Resin-bound peptide (12 μmol) was then acylated, cleaved and purified according the general methods 2.5, 2.7 and 2.8, affording the title compound (8.2 mg, 23%) as a white solid. $t_R = 6.85$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{98}\text{H}_{158}\text{N}_{34}\text{O}_{21}\text{S}$: 2179.2062; found: 2179.2024.

$CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-KFRRQRPLSHKGMPF-OH$, 7 TFA (**3**)



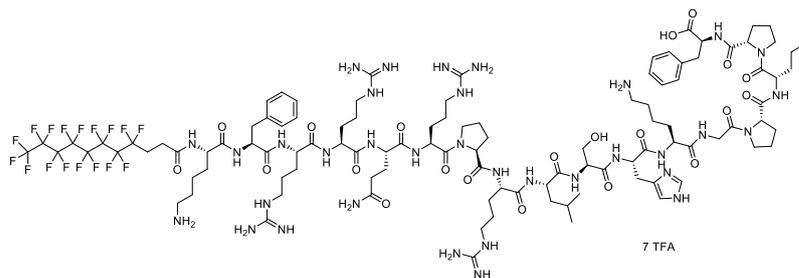
Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (12 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (9.1 mg, 24%) as a white solid. $t_R = 8.37$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{103}H_{159}F_9N_{34}O_{21}S$: 2411.1996; found: 2411.1941.

$CF_3(CF_2)_5(CH_2)_2CO-KFRRQRPLSHKGMPF-OH$, 7 TFA (**4**)



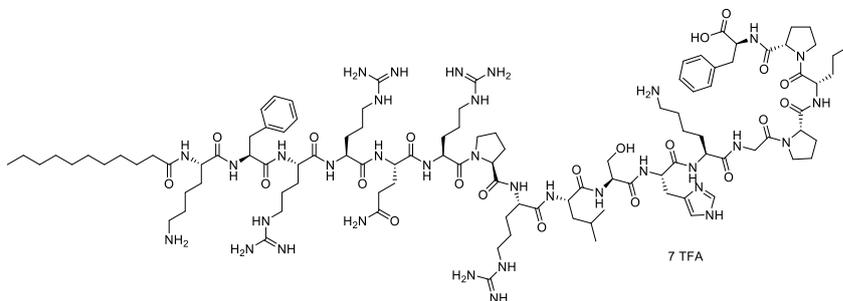
Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (12 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (6.8 mg, 17%) as a white solid. $t_R = 9.18$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{105}H_{159}F_{13}N_{34}O_{21}S$: 2511.1932; found: 2511.1910.

CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-KFRRQRPRLSHKGMPF-OH, 7 TFA (5)



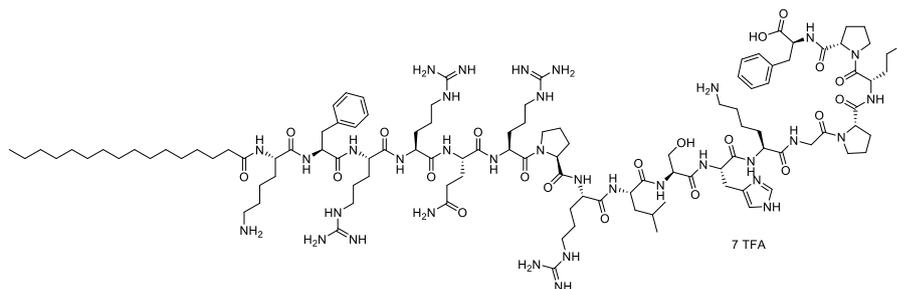
Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (51 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (48 mg, 28%) as a white solid. t_R = 10.35 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₀₇H₁₅₉F₁₇N₃₄O₂₁S: 2611.1868; found: 2611.1867.

CH₃(CH₂)₉CO-KFRRQRPRLSHKGMPF-OH, 7 TFA (6)



Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. Undecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (8 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (6.9 mg, 28%) as a white solid. t_R = 9.35 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₀₇H₁₇₆N₃₄O₂₁S: 2305.3470; found: 2305.3521.

CH₃(CH₂)₁₄CO-KFRRQRPRLSHKGPMPF-OH, 7 TFA (7)



Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. Hexadecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (19 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (15.9 mg, 26%) as a white solid. t_R = 10.88 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₁₂H₁₈₆N₃₄O₂₁S: 2375.4253; found: 2375.4292.

2. Solubility evaluationⁱⁱ

Solubility in HEPES buffered saline (10 mM HEPES and 145 mM NaCl, pH 7.4) was evaluated by first dissolving the compounds in DMSO to obtain stock solutions at 10 mM. The stock solutions were diluted to a final concentration of 1 mM in HEPES buffered saline. Samples were stirred for 1 min and sonicated for 1 min. After centrifugation at 4000 rpm for 2 min, the concentration in the supernatant was measured by an HPLC procedure using a calibration curve established. The experiments were performed in duplicate.

3. Pharmacological characterization

3.1. Membrane preparations and radioligand binding experimentsⁱⁱⁱ

Membrane preparations from CHO cells stably expressing the wild-type human apelin receptor were purchased from PerkinElmer (Wellesley, MA, USA). Membranes from CHO

ⁱⁱ Performed by Patrick Gizzi (PCBIS, Illkirch)

ⁱⁱⁱ Performed by Xavier Iturioz (Collège de France, Paris)

cells stably expressing the rat apelin receptor-EGFP were prepared as described previously.²⁰² Membrane preparations (1-5 g total mass of membranes/assay) were incubated for 1 h at 20 °C with 0.2 nM [¹²⁵I]-pE13F (PerkinElmer) in binding buffer alone or in the presence of the peptide at various concentrations. The reaction was stopped and filtered on Whatman GF/C filters. After washing, radioactivity was counted. Saturation-binding curves were obtained by incubating membrane proteins with [¹²⁵I]-pE13F at different concentrations.

3.2. cAMP assay^{iv}

cAMP was quantified using the cAMP dynamic 2 assay kit (Cisbio Bioassays, Codolet, France) based on homogeneous time-resolved fluorescence technology. The stimulation was done in the stimulation buffer (HBSS, 5 mM Hepes, 0.1% BSA stabilizer, 1 mM 3-isobutyl-methylxanthine, IBMX, pH 7.4). Briefly, CHO cells stably expressing the rat ApelinR-EGFP were dispensed into a 384-well plate (2000 cells per well) and stimulated with 10⁻⁶ M forskolin and increasing pyroglutamyl-apelin-13 (pE13F) concentrations (10⁻¹⁴ to 10⁻⁴ M) for 30 min at 20 °C. Cells were then lysed, and cAMP levels were determined following the manufacturer's instructions. Basal levels were determined in parallel by incubating cells in the absence of pE13F.

3.3. Plasmatic stability assay^v

Plasmatic stability was determined in mouse serum at 37 °C after 1 h, 4 h and 24 h. For each compound, a 10 mM DMSO stock solution was diluted in DMSO to a final concentration of 500 µM. This solution was again diluted in mouse serum to a final concentration of 5 µM. The mixture was divided into two aliquots of a final volume solution of 200 µL. The incubation of each aliquot was stopped at *t*₀, 1 h, 4 h or 24 h by taking 70 µL of the supernatant and by adding 175 µL of ice cold MeCN. Each sample was frozen and stored at -80 °C. After defrosting, samples were stirred for 3 min, sonicated for 1 min, and then centrifuged 5 min at 15 000 g and 4 °C before LC-MS/MS analysis. The percentage of the test

^{iv} Performed by Xavier Iturioz (Collège de France, Paris)

^v Performed by Patrick Gizzi (PCBIS, Illkirch)

compound that remained relative to that present at t_0 was determined by monitoring the peak area of the chromatogram. Half-life ($T_{1/2}$) was estimated from the slope of the initial linear range of the logarithmic curve of the compound remaining (%) against time, assuming first-order kinetics. Native apelin-17 was used as positive control.

4. Toxicological evaluation

4.1. Cell culture^{vi}

Cell media and supplements were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO). RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) cells were cultured in DMEM high glucose (4.5 g/L) with stabilized glutamine supplemented with 5% (v/v) of heat decompemented fetal calf serum (FCS), Penicillin (100 U/mL) and Streptomycin (100 µg/mL) (referred as complete medium) at 37 °C with 5% CO₂, 95% humidity. HEK293 cells expressing or not ApelinR were grown in RPMI with stabilized glutamine supplemented with 10% (v/v) of heat decompemented fetal calf serum (FCS), Penicillin (1000 U/mL) and Streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C with 5% CO₂, 95% humidity.

4.2. Cell viability assays^{vii}

The cytotoxic effects of apelin compounds on RAW 264.7 cells were evaluated by measuring cell metabolic activity using MTS assay (Promega, Madison, WI). MTS is composed of tetrazolium compound associated with an electron-coupling reagent (phenazine methosulfate). MTS is bioreduced by dehydrogenase enzymes found in metabolically active cells so that the quantity of formazan produced as measured by absorbance at 490 nm is directly proportional to cell viability. 50 000 cells per well were seeded in 96-well plates in 100 µL of complete medium. After 24 h, compounds to test were added to cells and the incubation was continued for 24 h at 37 °C (5% CO₂). 20 µL of MTS (Promega Corporation, Madison, WI) were then added to each well. After 1 h of incubation at 37 °C, absorbance was measured at 490 nm (SP200, Safas, Monaco). The absorbance of the blank (complete medium + MTS) was subtracted from the values of

^{vi} Performed by Cendrine Seguin (CAMB, Illkirch)

^{vii} Performed with the help of Cendrine Seguin (CAMB, Illkirch)

each well. The absorbance of non-treated cells was considered as 100% of viability. The percentage of viability was calculated using the following formula:

% viable cell = [absorbance (treatment) / absorbance (100% viability) x 100].

4.3. Assessment of TNF- α production^{viii}

The cytotoxic effects of apelin compounds on RAW 264.7 cells were also evaluated by measuring the TNF- α concentration in cell supernatants. 50 000 RAW 264.7 cells per well were seeded in 96-well plates in 100 μ L of complete medium. After 24 h, cells were exposed to the different compounds during for another day at 37 °C (5% CO₂). TNF- α concentration in cell supernatants was evaluated by ELISA (n=3) using commercially available reagents and following the manufacturer instructions.

Briefly, capture antibody was diluted to 1 μ g/mL in a 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6. 50 μ L of this solution was added per well in a 96-well plate in order to coat the plate surface during one night at 4 °C. Capture antibody was blocked with PBS + 0.05% Tween 20 + 1% BSA (1 h, 37 °C). Samples were then diluted 10 times with PBS and incubated with capture antibody (2 h, 37 °C). Then, detection antibody was diluted 1 000 times to 0.5 μ g/mL in PBS + 0.05% Tween 20 + 1% BSA (1 h, 37 °C). Avidin HRP diluted 50 000 times was then introduced (45 min, 37 °C) and the revelation was conducted by adding a solution of 1.25 mM of tetramethylbenzidine and 13.05 mM of H₂O₂ in 0.1 M citrate buffer pH 5. Revelation was finally stopped by addition of 1 M HCl and absorbance was immediately measured at 450 nm.

4.4. Hemolysis experiments^{ix}

Prior to the experiment, sheep red blood cells (RBC) (Eurobio, Courtaboeuf, France) were recovered by centrifugation at 700 and room temperature for 5 min and washed three times with HEPES buffered saline (HEPES 10 mM, NaCl 145 mM, pH 7.4). RBC were then resuspended in the HEPES buffer and plated in 96-well plates at 10⁶ cells per well in 100 μ L. Solutions of peptides at different concentrations in HEPES buffered saline (100

^{viii} Performed with the help of Cendrine Seguin (CAMB, Illkirch)

^{ix} Performed with the help of Béatrice Heurtault (CAMB, Illkirch)

μL) were then added to the cells and incubated for 30 min at 37 °C. The release of hemoglobin was determined after centrifugation at 700 g at room temperature for 5 min by spectrophotometric analysis of the supernatant at 550 nm. Complete hemolysis (100% control value) was achieved using TritonX-100 to a final concentration of 0.2% (w/v) in Hepes buffered saline. The negative control was defined by suspension of RBC in Hepes buffered saline alone. The experiments were performed in triplicate.

5. *In vivo* evaluation

5.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (130-180 g) were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest-St-Isle, France). The animals were maintained for 12 h light/dark cycles with free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with current institutional guidelines for the care and use of experimental animals.

5.2. Blood pressure recording in alert rats^x

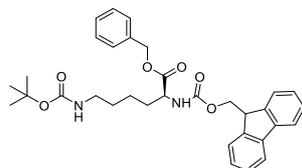
Sprague-Dawley male rats were anesthetized with isoflurane (4% for induction and 2% for maintenance). A catheter was inserted into the right femoral vein. An additional catheter was inserted into the right femoral artery to monitor mean arterial blood pressure (MABP). The catheters were tunneled subcutaneously to exit from the neck. The animals were allowed to recover for at least 24 h. Peptides were dissolved in 0.2 ml saline at a final concentration of 15 or 400 nmol/kg. The resulting solution was administered to alert rats via the venous catheter, immediately followed by 0.2 ml of saline alone to flush the venous catheter. Blood pressure was recorded for 30 min before injection in order to determine baseline blood pressure and for 30 min after administration of the peptides. This procedure was validated by the local animal ethics committee (CEEA n°59, reference number 1966.01).

^x Performed by Adrien Flahault (Collège de France, Paris)

Chapter II: Synthesis of fluorescent probes for the study of ligand/receptor interaction and intracellular trafficking of fluoropeptides

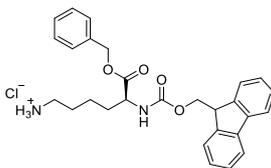
1. Chemical synthesis

(S)-benzyl-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-((tert-butoxycarbonyl)amino) hexanoate (**8**)



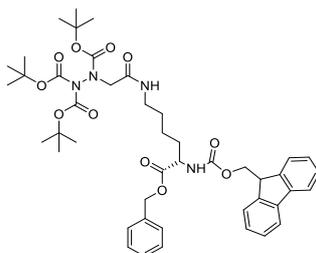
Fmoc-Lys(Boc)-OH (1 g, 1.54 mmol) and benzyl alcohol (192 μ L, 1.85 mmol) were mixed in DCM (3 mL). The mixture was cooled to 0 $^{\circ}$ C before the addition of DCC (381 mg, 1.85 mmol) and DMAP (18.8 mg, 0.154 mmol). The reaction mixture was stirred for 2 h at ice-water temperature, then warmed to room temperature and stirred for 3 h. The crude mixture was isolated by filtration, the residue was washed with DCM and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in EtOAc and washed with water, 0.5 N HCl, saturated NaHCO₃, and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography eluted with 10-20% EtOAc in *n*-heptane to obtain a yellowish oil (1.05 g, 1.42 mmol, 92%). t_R = 6.31 min (>95% purity [220.8 nm]); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.78 (d, J = 7.78 Hz, 2 H), 7.61 (br d, J = 7.53 Hz, 2 H), 7.45 - 7.28 (m, 9 H), 5.45 - 5.34 (m, 1 H), 5.20 (q, J = 12.13 Hz, 2 H), 4.51 (br s, 1 H), 4.47 - 4.33 (m, 3 H), 4.27 - 4.18 (m, 1 H), 3.07 (br s, 3 H), 1.86 (br d, J = 9.79 Hz, 1 H), 1.65 - 1.78 (m, 1 H), 1.44 (s, 9 H), 1.30 - 1.39 (m, 3 H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ ppm 172.2, 155.9, 143.8, 143.6, 141.3, 141.2, 135.2, 128.6, 128.5, 128.3, 127.6, 127.0, 125.0, 119.9, 67.1, 66.9, 53.7, 47.0, 39.9, 32.0, 29.5, 28.3, 22.2.

(S)-benzyl-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-aminohexanoate-hydrochloride (**9**)



Compound 8 (500 mg, 1.07 mmol) was dissolved in 4N HCl in dioxane (10 mL). The mixture was stirred during 1 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, the residue washed three times with toluene and concentrated under reduced pressure. The crude was dried under vacuum to give a clear oil (432 mg, 1.07 mmol, 100%). $t_R = 4.47$ min (>95% purity [220.8 nm]); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 7.95 - 7.80 (m, 4 H), 7.72 (br d, $J=7.03$ Hz, 1 H), 7.47 - 7.38 (m, 2 H), 7.38 - 7.28 (m, 5 H), 7.27 - 7.11 (m, 1 H), 5.14 (s, 1 H), 4.38 - 4.18 (m, 2 H), 4.15 - 3.92 (m, 1 H), 3.34 (s, 1 H), 2.73 (br d, $J=5.52$ Hz, 1 H), 1.81 - 1.17 (m, 5 H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 172.2, 156.1, 143.8, 143.7, 141.2, 135.2, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 127.7, 127.1, 125.2, 119.9, 67.3, 53.8, 47.1, 31.6, 27.1, 22.4.

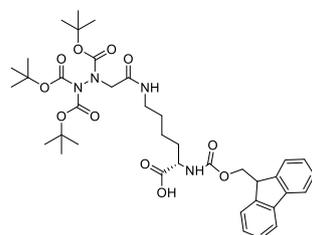
(S)-Benzyl-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-(2-(1,2,2-tris(*tert*-butoxy carbonyl)hydrazinyl)acetamido)hexanoic acid (**10**)



Compound 9 (520 mg, 1.05 mmol), 2-({bis[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino})[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino)acetic acid (341 mg, 0.875 mmol) and PyBOP (546 mg, 1.05 mmol) were dissolved in DMF (2.4 mL). DIEA (868 μL , 5.25 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting crude was solubilized in diethyl ether and washed with water. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , isolated by filtration and concentrated under reduced pressure. The crude was purified on silica gel eluted with 1-2% MeOH in DCM to obtain a white solid (554 mg, 0.67 mmol,

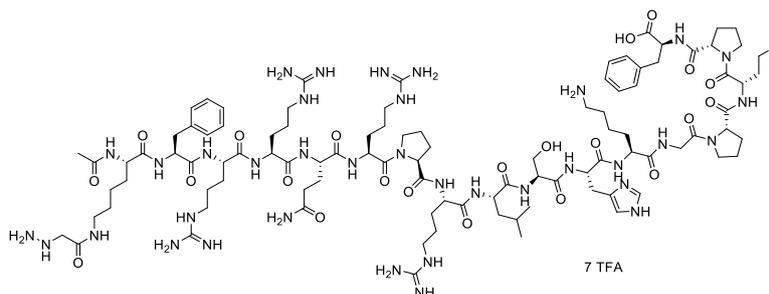
76%). $t_R = 7.27$ min (>97% purity [220.8 nm]); mp 67-69 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 7.93 - 7.84 (m, 2 H), 7.80 (br d, $J=6.53$ Hz, 1 H), 7.71 (br d, $J=6.78$ Hz, 2 H), 7.56 - 7.37 (m, 2 H), 7.37 - 7.26 (m, 6 H), 5.12 (s, 2 H), 4.34 - 4.12 (m, 3 H), 4.02 (br s, 1 H), 3.91 (br s, 2 H), 3.32 (s, 1 H), 3.07 (br s, 2 H), 1.78 - 1.52 (m, 2 H), 1.48 - 1.40 (m, 15 H), 1.40 - 1.20 (m, 12 H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 167.4, 156.6, 153.8, 150.7, 144.3, 141.2, 136.4, 128.8, 128.4, 128.2, 128.1, 127.5, 120.6, 84.3, 84.3, 84.3, 82.5, 81.8, 66.3, 47.1, 28.1, 28.0, 27.9, 27.9.

(S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-(2-(1,2,2-tris(tert-butoxycarbonyl)hydrazinyl)acetamido)hexanoic acid (**11**)



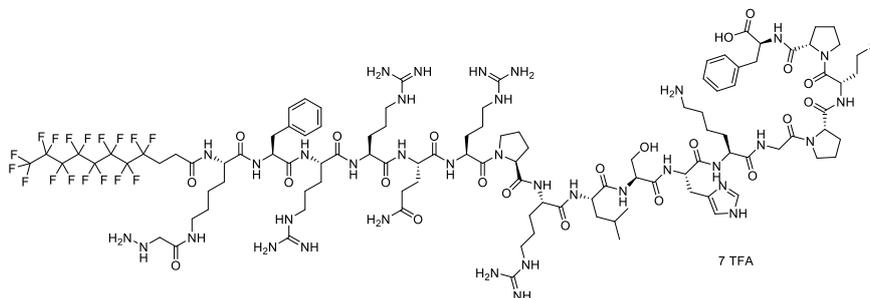
Compound 10 (536 mg, 0.645 mmol) was dissolved in MeOH (20 mL). Pd/C (55 mg) was added to the mixture and stirred under H_2 for 2 h. The crude mixture was isolated by filtration on celite and washed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dried under vacuum to give a white solid (412 mg, 0.56 mmol, 86%). $t_R = 6.25$ min (>97% purity [220.8 nm]); mp 108-110 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 7.89 (d, $J=7.28$ Hz, 3 H), 7.72 (br d, $J=6.78$ Hz, 2 H), 7.59 - 7.51 (m, 1 H), 7.44 - 7.38 (m, 2 H), 7.36 - 7.29 (m, 2 H), 4.30 - 4.24 (m, 2 H), 3.91 (s, 2 H), 3.15 - 3.05 (m, 2 H), 1.69 (br d, $J=6.02$ Hz, 1 H), 1.60 (br d, $J=4.27$ Hz, 1 H), 1.46 - 1.43 (m, 18 H), 1.40 - 1.35 (m, 12 H), 1.24 (br s, 2 H), 0.85 (t, $J=6.65$ Hz, 2 H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 173.8, 166.8, 155.9, 153.3, 153.1, 150.2, 143.7, 140.6, 128.8, 127.5, 126.9, 125.2, 121.3, 120.0, 83.7, 81.9, 81.3, 53.8, 46.6, 31.1, 27.5, 27.4, 22.0; MS (ESI) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd 741.3; found 741.2.

CH₃CO-K(COCH₂NH-NH₂)-FRRQRPLSHKGMPF-OH, 7 TFA (12)



Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (13 μ mol) was swollen in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Boc)₃-Aza-Gly-OH **11** (2 equiv.) was performed using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.), and DIEA (8 equiv.) as coupling reagents in DMF. The mixture was shaken at room temperature for 45 min. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was acylated, cleaved and purified according the general methods 2.5, 2.7 and 2.8, affording the title compound (9.1 mg, 23%) as a white solid. $t_R = 6.94$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): [M+H]⁺ calcd 2252.2; found 2252.2.

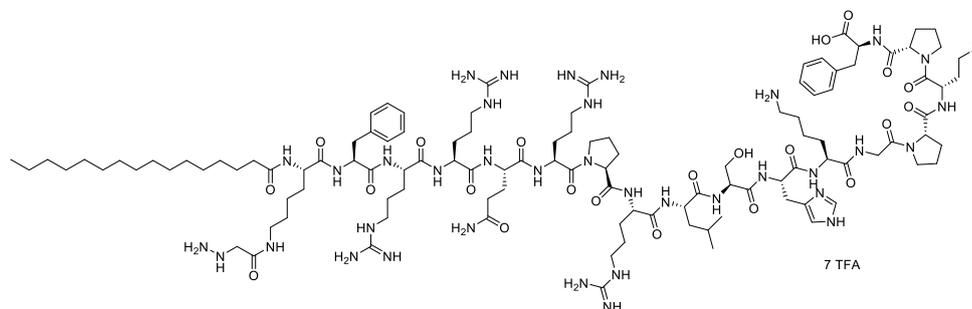
CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-K(COCH₂NH-NH₂)-FRRQRPLSHKGMPF-OH, 7 TFA (13)



Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (13 μ mol) was swollen in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Boc)₃-

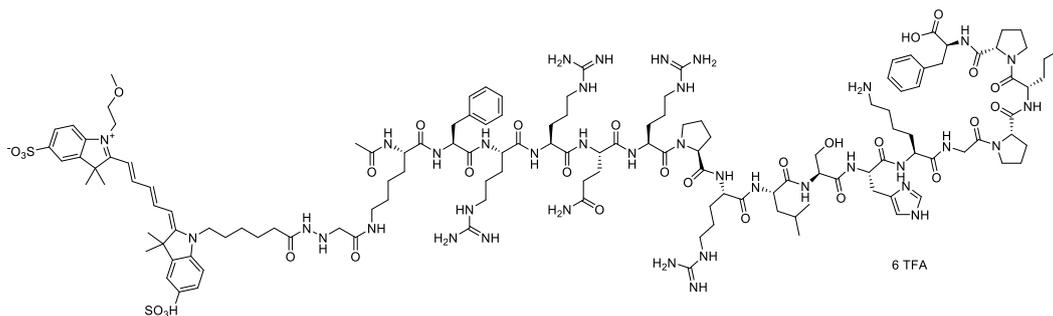
Aza-Gly-OH **11** (2 equiv.) was performed using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.), and DIEA (8 equiv.) as coupling reagents in DMF. The mixture was shaken at room temperature for 45 min. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (6.2 mg, 16%) as a white solid. $t_R = 10.19$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd 2684.2; found 2684.2.

*CH₃(CH₂)₁₄CO-K(COCH₂NH-NH₂)-FRRQRPRLSHKGMPF-OH, 7 TFA (**14**)*



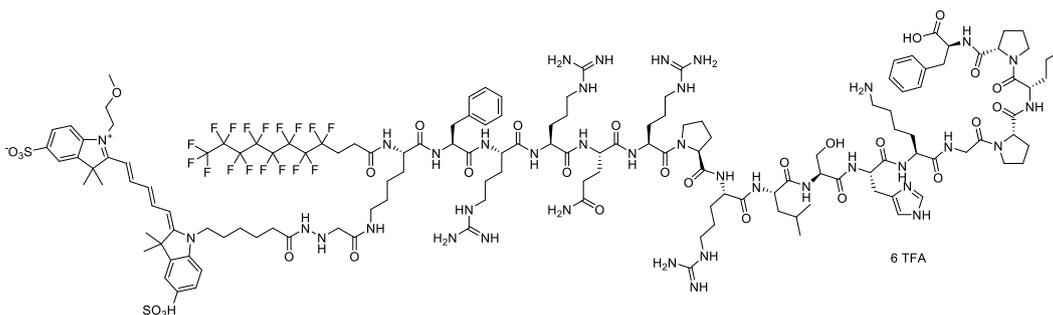
Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (13 μ mol) was swollen in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Boc)₃-Aza-Gly-OH **11** (2 equiv.) was performed using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.), and DIEA (8 equiv.) as coupling reagents in DMF. The mixture was shaken at room temperature for 45 min. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Hexadecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (7.3 mg, 17%) as a white solid. $t_R = 11.17$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd 2448.4; found 2448.4.

CH₃CO-K(COCH₂NH-NH-DY647)-FRRQRPLSHKGPMPF-OH, 6 TFA (15)



Compound **12** (0.37 μmol , 1 equiv.) was dissolved in a citrate-phosphate buffer (25 mM, pH 5.2), and the pH of the mixture was re-adjusted to pH 5.2 with Na_2HPO_4 0.2 M. A solution of DY-647P1-NHS-Ester (1.1 equiv.) in DMSO was added to finally get a 3/1 (v/v) buffer/DMSO solution. The mixture was stirred 1 h at room temperature under argon. Finally, the crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson GX271 system) on a Kinetex C18 column (5 μm , 10 \times 150 mm) using a linear gradient (10% to 70% in 40 min, flow-rate of 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v), affording the title compound (1.1 mg, 82%) as a blue solid. t_R = 8.31 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{141}\text{H}_{204}\text{N}_{38}\text{O}_{30}\text{S}_3$: 2919.4611; found: 2919.4613.

CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-K(COCH₂NH-NH-DY647)-FRRQRPLSHKGPMPF-OH, 6 TFA (16)



Compound **13** (0.37 μmol , 1 equiv.) was dissolved in a citrate-phosphate buffer (25 mM, pH 5.2), and the pH of the mixture was re-adjusted to pH 5.2 with Na_2HPO_4 0.2 M. A solution of DY-647P1-NHS-Ester (1.1 equiv.) in DMSO was added to finally get a 3/1 (v/v) buffer/DMSO. The mixture was stirred 1 h at room temperature under argon atmosphere. Finally, the crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson GX271 system) on a Kinetex C18 column (5 μm , 10

buffer alone or in the presence of the peptide at various concentrations. The reaction was stopped and filtered on Whatman GF/C filters. After washing, radioactivity was counted. Saturation-binding curves were obtained by incubating membrane proteins with [¹²⁵I]-pE13F at different concentrations.

3. Fluorescence spectroscopy and microscopy

3.1. Absorbance and fluorescence spectroscopy studies

Absorption spectra were recorded on a Cary 4000 spectrophotometer (Varian) and fluorescence spectra on a Fluoromax 3 (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer. Fluorescence emission spectra were systematically recorded at 653 nm excitation wavelength (20 °C) for the DY647 derivatives. All fluorescence spectra were corrected for instrumental effects.

3.2. Fluorescence experiments^{xii}

For confocal microscopy studies, ApelinR-EGFP HEK293 and wild-type HEK293 cells were seeded onto 35 mm ibiTreat Ibidi Polymer Coverslip at a density of 50 000 cells/Ibidi 24 h before microscopy.. Cells were washed twice with HBSS, then a solution of the fluorescent ligand at 50 nM or a mixture of the fluorescent ligand at 50 nM and native apelin 17 at 1 μM was added to cells. After 5 or 20 min of incubation at room temperature, cells were imaged on a Leica TCS SPE-II microscope with a HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS objective. For confocal images, excitation/emission wavelengths of 635/645-750 nm were used for the fluorescent peptides **15**, **16** and **17**, 405/415-490 for the Hoechst fluorescence and 488/500-580 nm for the GFP fluorescence.

^{xii} Cell-culture was performed by Christel Valencia (PCBIS, Illkirch)

3.3. Flow cytometry assay^{xiii}

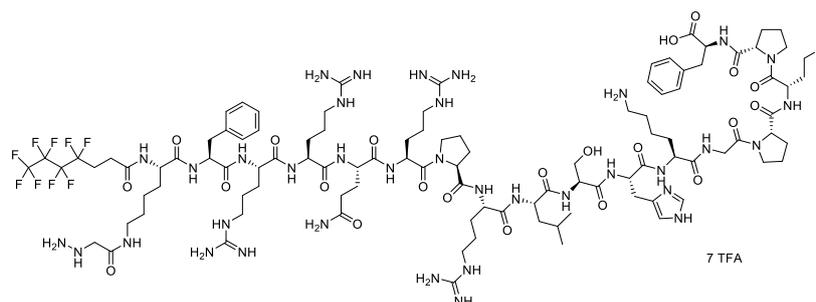
Wild-type HEK293 cells (1.5×10^6 per mL) were incubated at 4 °C for 25 min with the fluorescent peptides **15**, **16** and **17** at 100 nM. Cells were washed with PBS, detached, resuspended in PBS and then analyzed on a FACSCalibur (BD, Franklin Lake, NJ, USA) using CellQuest Software (BD) for data acquisition and FlowJo Software (FlowJo Inc) for data analysis.

^{xiii} Performed with the help of Cendrine Seguin (CAMB, Illkirch)

Chapter III: Understand the mechanism of plasma stability of fluoro-peptides

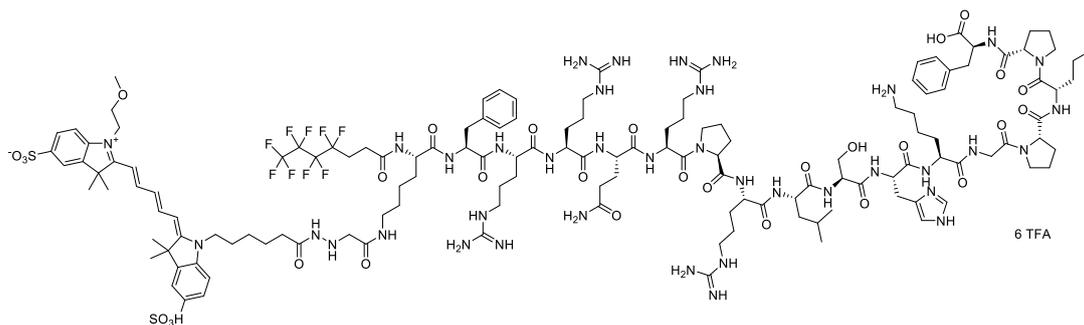
1. Chemical synthesis

$CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-K(COCH_2NH-NH_2)-FRRQRPLSHKGMPF-OH$, 7 TFA (**18**)



Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (18 μ mol) was swollen in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Boc)₃-Aza-Gly-OH **11** (2 equiv.) was performed using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.), and DIEA (8 equiv.) as coupling reagents in DMF. The mixture was shaken at room temperature for 45 min. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (8.9 mg, 15%) as a white solid. $t_R = 8.61$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd 2485.7; found 2485.

CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO-K(COCH₂NH-NH-DY647)-FRRQRPRLSHKGPMPF-OH, 6 TFA (19)



Compound **18** (0.37 μmol , 1 equiv.) was dissolved in a citrate-phosphate buffer (25 mM, pH 5.2), and the pH of the mixture was re-adjusted to pH 5.2 with Na_2HPO_4 0.2 M. A solution of DY-647P1-NHS-Ester (1.1 equiv.) in DMSO was added to finally get a 3/1 (v/v) buffer/DMSO. The mixture was stirred 1 h at room temperature under argon atmosphere. Finally, the crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson GX271 system) on a Kinetex C18 column (5 μm , 10 \times 150 mm) using a linear gradient (10% to 70% in 40 min, flow-rate of 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v), affording the title compound (0.21 mg, 15%) as a blue solid. $t_{\text{R}} = 9.36$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{139}\text{H}_{203}\text{F}_9\text{N}_{38}\text{O}_{30}\text{S}_3$: 3152.4546; found: 3152.4736.

2. Physico-chemical characterization

2.1. Evaluation of the Critical Aggregation Concentration (CAC)

Nile Red stock solutions were prepared by dissolving the dye in DMSO at 1.5 mM. Stock solutions of apelin derivatives were prepared at 10 mM in water (MilliQ). The dilutions to get final solutions with desired concentration of apelin derivatives (from 0.001 to 500 μM) and Nile Red (30 μM) were performed using water (MilliQ), NaCl 0.9% or PBS. The solutions were stirred for 1 h at room temperature, and then transferred to a 96-well microplate. All fluorescence measurements were carried out using an Envision Multilabel plate reader (Perkin Elmer) at 25 $^{\circ}\text{C}$. Excitation/emission wavelengths of 530/615 nm were used, with a bandwidth of 35/8.5 nm. Fluorescence intensity was plotted as a function of peptide concentration, and each CAC value was calculated by determining the intersection of the two lines formed by the data points.

2.2. Dynamic Light Scattering measurement

The average diameter of particles was measured at 25 °C by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern instruments, Orsay, France) with a scattering angle of 173°. The stock solutions of peptides at 10 mM in water (MilliQ) were diluted either in water (MilliQ), NaCl 0.9% or in PBS to a final concentration of 1 mM. The experience was performed in triplicate. The polydispersity index (PDI) reflects the size distribution of the organizations. It indicates a monodispersed diameter distribution when its value is inferior to 0.3.

3. Fluorescence polarization albumin binding assay^{xiv}

Human albumin, rat albumin, mouse albumin, bovine albumin, human serum, rat serum and mouse serum were purchased from Sigma-Aldrich. Binding assays were conducted in 96-well black polystyrene plates (Costar 3686, Corning, Acton, MA) and in a total volume of 15 µL. Fluorescence polarization binding assays were performed using the EnVision 2104 multilabel plate reader (Perkin-Elmer Waltham, MA) and carried out at room temperature (25 °C). The polarization degree was measured with an excitation wavelength set at 620 nm, and an emission wavelength set at 688 nm. All titrations were performed by adding increasing amounts of proteins (with final concentrations ranging from 0 to 100 µM) to a fixed concentration of fluorescent compounds (0.25 µM) in assay buffer (50 mM Hepes, 150 mM KCl, 0.2% Pluronic F-127, pH 7.5). The plate was incubated for 5 min at room temperature before the measurement.

The binding affinity of the fluorescent compounds for the proteins was expressed as dissociation constant ($K_d = 1/K_{ass}$) and was calculated by fitting the sigmoid dose-dependent change in fluorescence polarization as a function of protein concentration in Microsoft Excel solver and using the following equations:



^{xiv} Performed with the help of Romain Hany (PCBIS, Illkirch)

$$K_d = \frac{[P][L_f]}{[PL]} \quad (2)$$

$$[P_t] = [P] + [PL] \quad (3)$$

$$[L_t] = [L_f] + [PL] \quad (4)$$

Where $[P]$, $[L_f]$ et $[PL]$ are, respectively, the equilibrium concentrations of the free protein, of the free ligand and of the free ligand-protein complex. $[P_t]$ is a total protein concentration (X input), $[L_t]$ is a total ligand concentration (constant) and K_d is the dissociation constant (variable to be fitted).

The fraction of ligand bound to protein (F_b) is described by:

$$F_b = \frac{[L_t] - [L_f]}{[L_t]} \quad (5)$$

Substituting Eq. (3) and (4) into Eq. (2) and (5) we obtain:

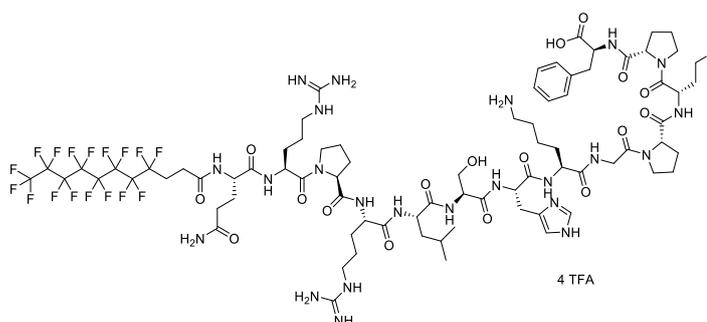
$$F_b = \frac{K_d + [L_t] + [P_t] - \sqrt{(K_d + [L_t] + [P_t])^2 - 4[L_t][P_t]}}{2[L_t]}$$

Chapter IV: Extension of the concept to other peptides targeting GPCRs

GPCRs

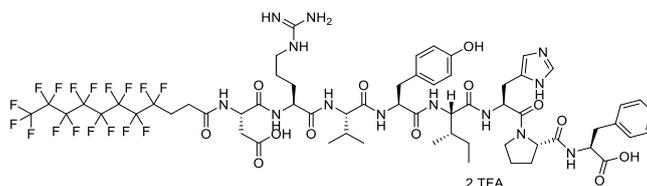
1. Chemical synthesis

$CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-QRPRLSHKGMPF-OH$, 4 TFA (**20**)



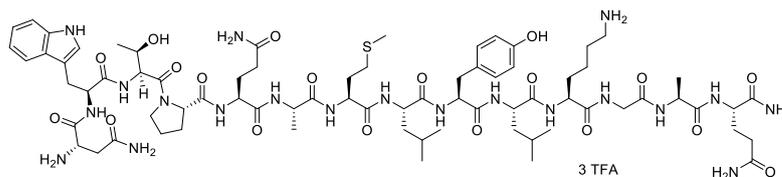
Fmoc-Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (16 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (18.9 mg, 48%) as a white solid. t_R = 11.05 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₈₀H₁₁₄F₁₇N₂₃O₁₇S: 2023.8212; found: 2023.8275.

$CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-DRVYIHPF-OH$, 2 TFA (**21**)



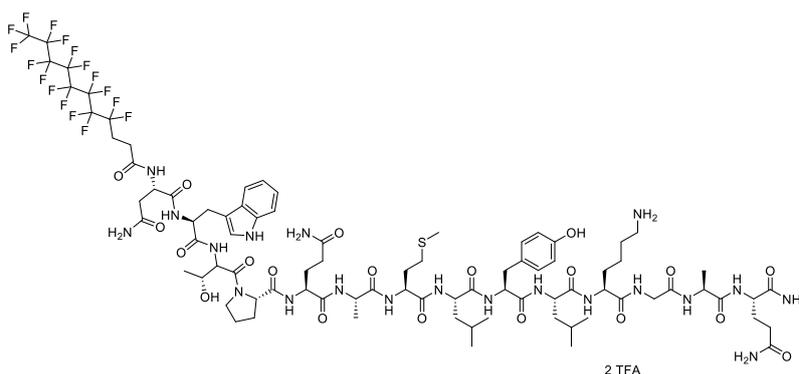
Fmoc-D(tBu)R(Pbf)VY(tBu)IHPF-Wang sequence was synthesized following the general method 2.2. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (50 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (41.4 mg, 47%) as a white solid. t_R = 12.94 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₆₁H₇₄F₁₇N₁₃O₁₃: 1519.5258; found: 1519.5231.

***H*-NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**23**)**



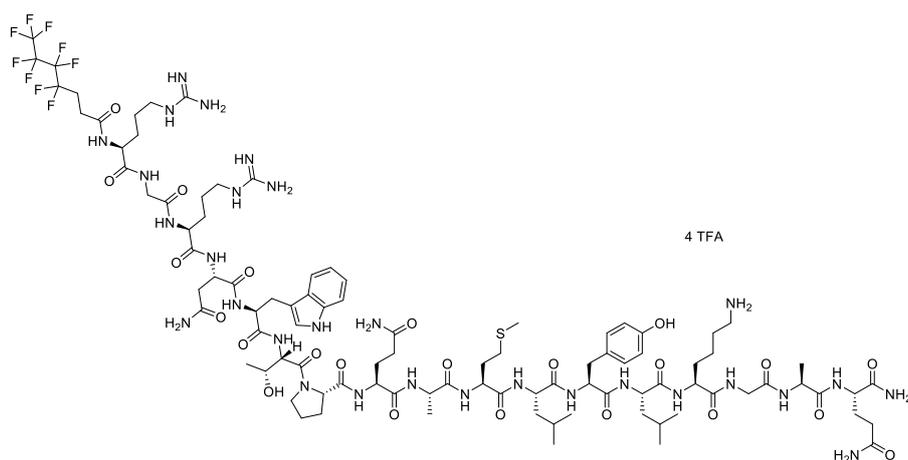
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (46 μ mol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (25 mg, 31%) as a white solid. t_R = 8.24 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₇₄H₁₁₄N₂₀O₁₉S: 1618.8290; found: 1618.8303.

***CF*₃(*CF*₂)₇(*CH*₂)₂CO-NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 2 TFA (**24**)**



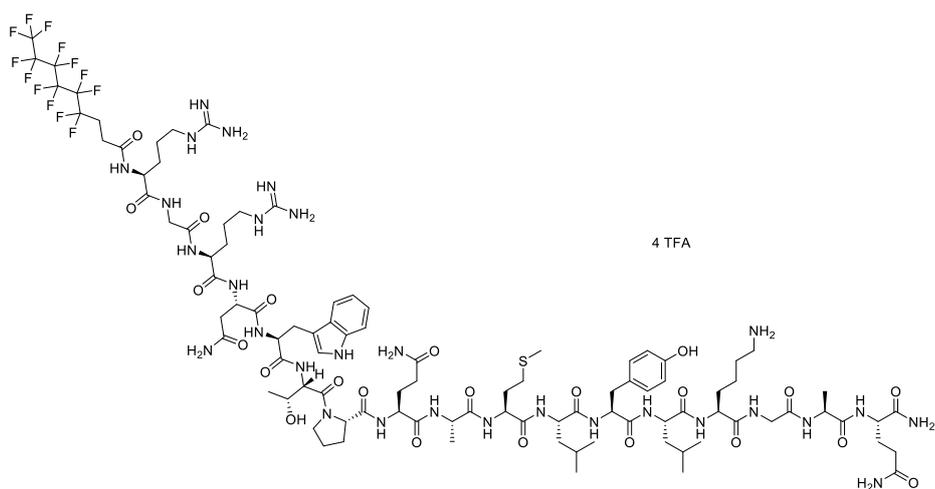
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (46 μ mol) following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (26 mg, 26%) as a white solid. t_R = 13.60 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₈₅H₁₁₇F₁₇N₂₀O₂₀S: 2092.8202; found: 2092.8187.

$CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH_2$, 4 TFA (**25**)



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (36 μ mol) following the general method 2.3. 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (17 mg, 18%) as a white solid. t_R = 10.09 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{95}H_{144}F_9N_{29}O_{23}S$: 2262.0567; found: 2262.0547.

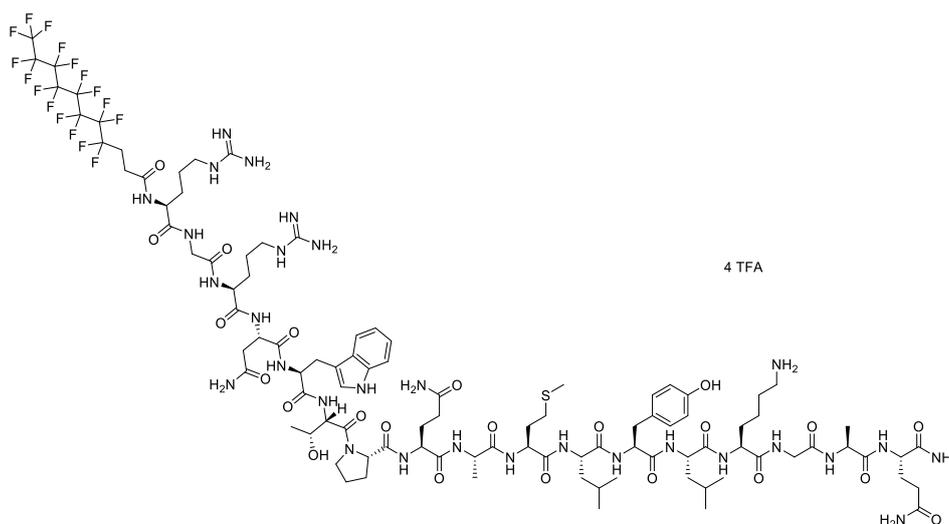
$CF_3(CF_2)_5(CH_2)_2CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH_2$, 4 TFA (**26**)



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (39 μ mol) following the

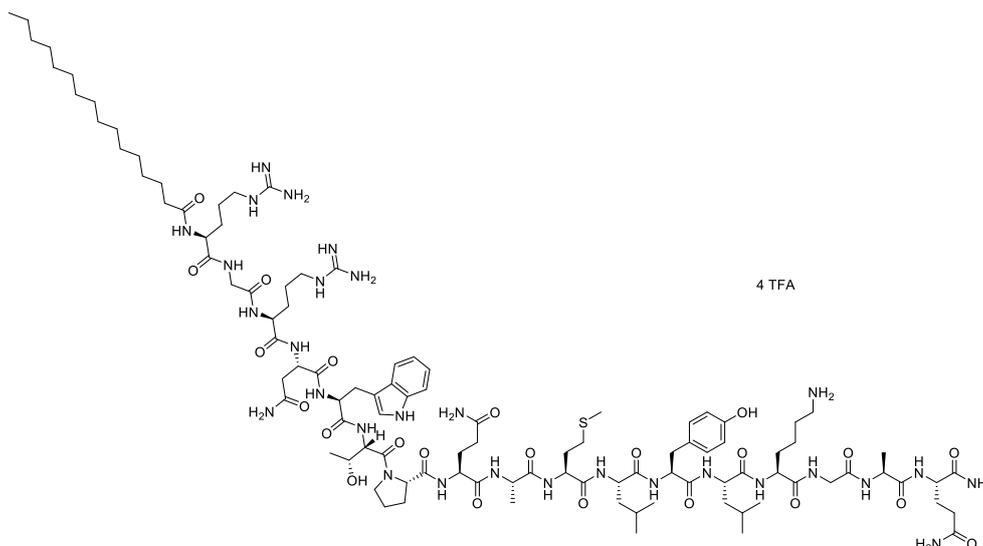
general method 2.3. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (9.1 mg, 8.6%) as a white solid. $t_R = 10.40$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{97}H_{144}F_{13}N_{29}O_{23}S$: 2362.0503; found: 2362.0477.

$CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH_2$, 4 TFA (**27**)



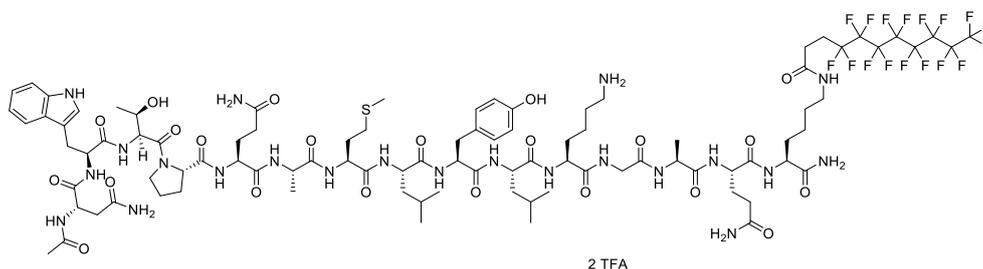
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (50 μ mol) following the general method 2.3. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.6 and 2.7, affording the title compound (42.9 mg, 31%) as a white solid. $t_R = 11.02$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{99}H_{144}F_{17}N_{29}O_{23}S$: 2462.0439; found: 2462.0502.

$CH_3(CH_2)_{14}CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH_2$, 4 TFA (**28**)



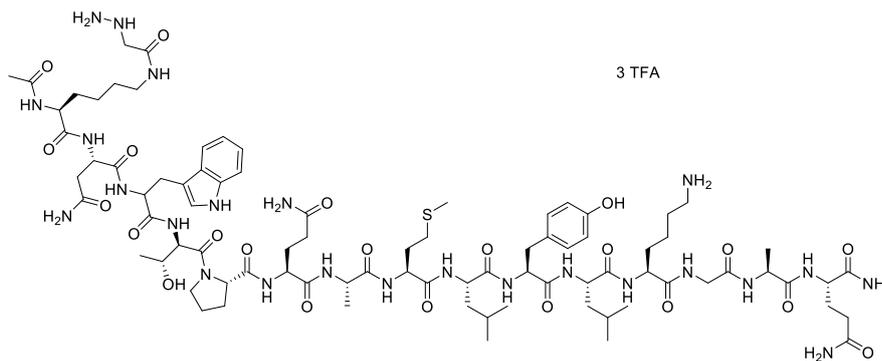
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (36 μ mol) following the general method 2.3. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (14.5 mg, 16%) as a white solid. t_R = 12.66 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₀₄H₁₇₁N₂₉O₂₃S: 2226.2823; found: 2226.2831

$CH_3CO-NWTPQAMLYLKGAQ-K[OC(CF_2)_7(CF_3)]-NH_2$, 2 TFA (**29**)



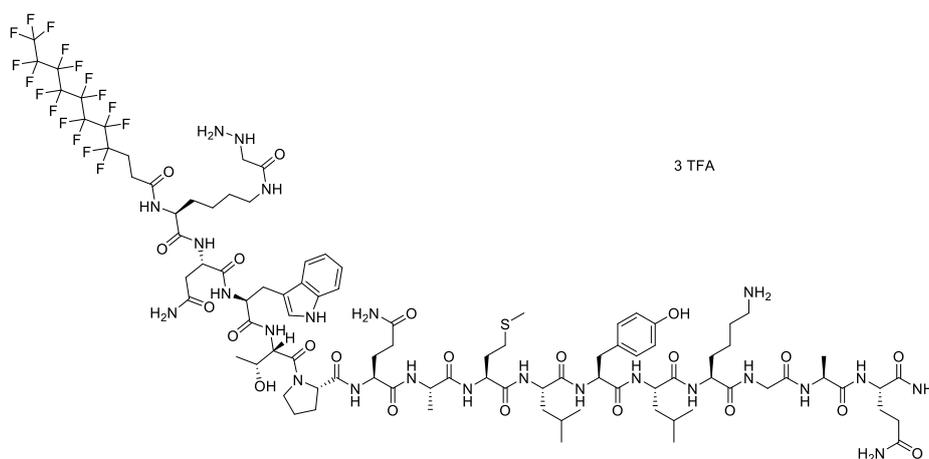
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)K(ivDde)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (44 μ mol) was acylated following the general method 2.5. Deprotection of the ivDde protecting group was performed in a solution of 2% (v/v) hydrazine in DMF (3 times for 3 min). The hydrazine solution was drained off and the resin was washed three times with

$CF_3CO-K(COCH_2NH-NH-DY647)-CH_3CO-NWTPQAMLYLKGAQ-NH_2$, 3 TFA (**31**)



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (15 μ mol) was swollen in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Boc)₃-Aza-Gly-OH **11** (2 equiv.) was performed using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.), and DIEA (8 equiv.) as coupling reagents in DMF. The mixture was shaken at room temperature for 45 min. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was acylated, cleaved and purified according the general methods 2.5, 2.7 and 2.8, affording the title compound (3 mg, 13%) as a white solid. t_R = 8.22 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{84}H_{132}N_{24}O_{22}S$: 1860.9669; found: 1860.9579.

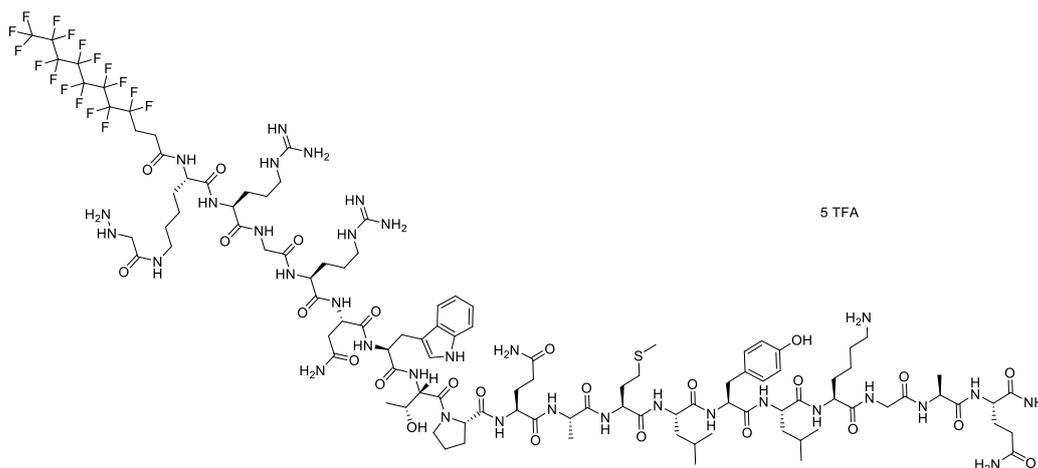
$CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-K(COCH_2NH-NH_2)-NWTPQAMLYLKGAQ-NH_2$, 3 TFA (**32**)



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. The resin-bound peptide (15 μ mol) was

swollen in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Boc)₃-Aza-Gly-OH **11** (2 equiv.) was performed using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.), and DIEA (8 equiv.) as coupling reagents in DMF. The mixture was shaken at room temperature for 45 min. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified according the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (3 mg, 8%) as a white solid. t_R = 11.83 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₉₃H₁₃₃F₁₇N₂₄O₂₂S: 2292.9476; found: 2292.9376.

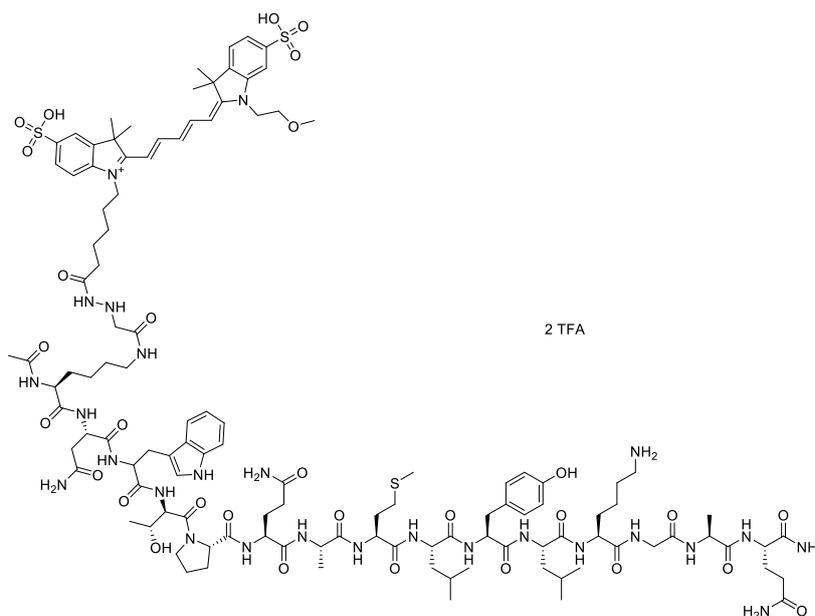
*CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-K(COCH₂NH-NH₂)-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 5 TFA (**33**)*



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 2.2. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (15 μmol) following the general method 2.3. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Boc)₃-Aza-Gly-OH **11** (2 equiv.) was performed using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.), and DIEA (8 equiv.) as coupling reagents in DMF. The mixture was shaken at room temperature for 45 min. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH.

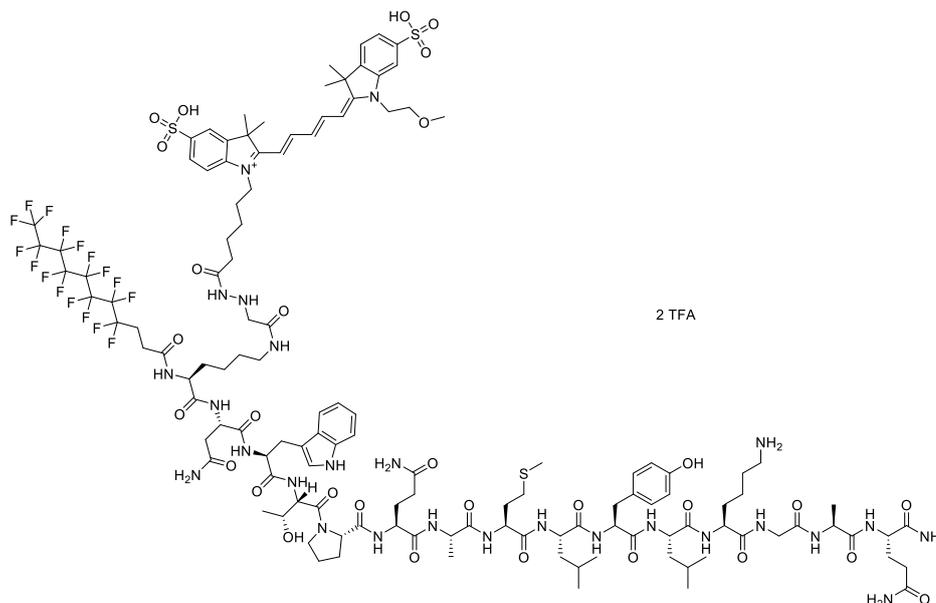
4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 2.4. Finally, the peptide was cleaved and purified according the general methods 2.7 and 2.8, affording the title compound (3.9 mg, 8.6%) as a white solid. $t_R = 10.41$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{107}H_{160}F_{17}N_{33}O_{25}S$: 2662.1712; found: 2662.1592.

CH₃CO-K(COCH₂NH-NH-DY647)-NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 2 TFA (34)



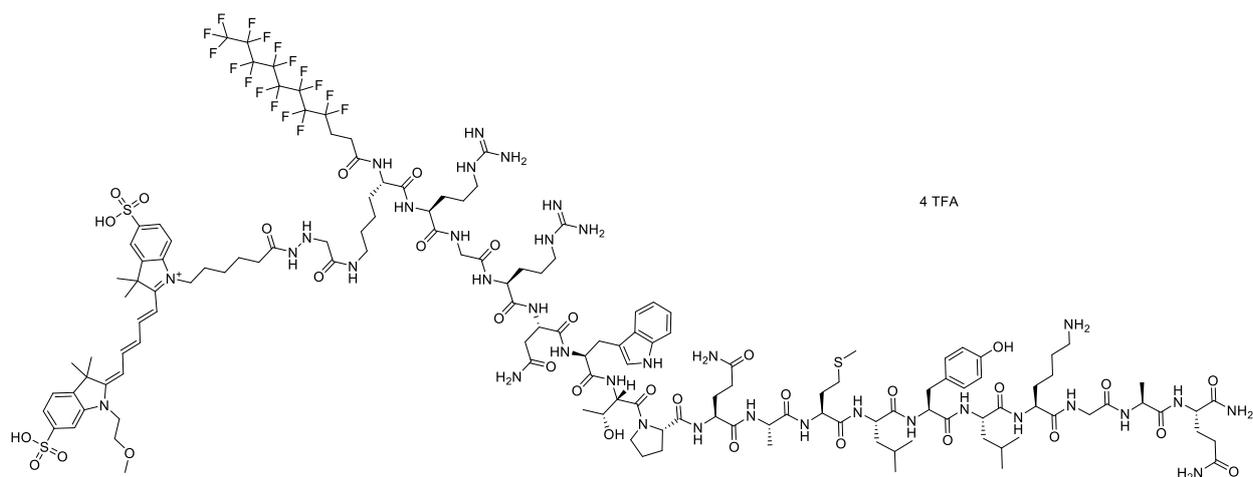
Compound **31** (0.37 μ mol, 1 equiv.) was dissolved in a citrate-phosphate buffer (25 mM, pH 5.2), and the pH of the mixture was re-adjusted to pH 5.2 with Na_2HPO_4 0.2 M. A solution of DY647-NHS-Ester (1.1 equiv.) in DMSO was added to finally get a 3/1 (v/v) buffer/DMSO. The mixture was stirred 1 h at room temperature under argon atmosphere. Finally, the crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson GX271 system) on a Kinetex C18 column (5 μ m, 10 \times 150 mm) using a linear gradient (10% to 70% in 40 min, flow-rate of 5 ml.min⁻¹) of solvent B solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v/v), affording the title compound (0.45 mg, 35%) as a blue solid. $t_R = 9.24$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{118}H_{173}N_{26}O_{30}S_3^+$: 2531.2051; found: 2531.1934.

$CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-K(COCH_2NH-NH-DY647)-NWTPQAMLYLKGAQ-NH_2$, 2 TFA (**35**)



Compound **32** (0.37 μmol , 1 equiv.) was dissolved in a citrate-phosphate buffer (25 mM, pH 5.2), and the pH of the mixture was re-adjusted to pH 5.2 with Na_2PO_4 0.2 M. A solution of DY-647-NHS-Ester (1.1 equiv.) in DMSO was added to finally get a 3/1 (v/v) buffer/DMSO. The mixture was stirred 1 h at room temperature under argon atmosphere. Finally, the crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson GX271 system) on a Kinetex C18 column (5 μm , 10 \times 150 mm) using a linear gradient (10% to 70% in 40 min, flow-rate of 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v), affording the title compound (0.55 mg, 48%) as a blue solid. $t_R = 12.94$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{127}\text{H}_{174}\text{F}_{17}\text{N}_{26}\text{O}_{30}\text{S}_3^+$: 2963.1858; found: 2963.1748.

CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-K(COCH₂NH-NH-DY647)-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 4 TFA (36)



Compound **33** (0.37 μmol , 1 equiv.) was dissolved in a citrate-phosphate buffer (25 mM, pH 5.2), and the pH of the mixture was re-adjusted to pH 5.2 with Na_2PO_4 0.2 M. A solution of DY-647-NHS-Ester (1.1 equiv.) in DMSO was added to finally get a 3/1 (v/v) buffer/DMSO. The mixture was stirred 1 h at room temperature under argon atmosphere. Finally, the crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson GX271 system) on a Kinetex C18 column (5 μm , 10 \times 150 mm) using a linear gradient (10% to 70% in 40 min, flow-rate of 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v), affording the title compound (0.4 mg, 31%) as a blue solid. $t_{\text{R}} = 11.88$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{141}\text{H}_{201}\text{F}_{17}\text{N}_{35}\text{O}_{33}\text{S}_3^+$: 3332.4095; found: 3332.3942.

2. Solubility evaluation

Solubility of spexin derivatives was measured by dissolving the compounds in DMSO to obtain solution stocks at 10 mM. The stock solutions were diluted to a final concentration of 100 μM in a pH 7.4 HEPES/0.1% BSA buffer with the following composition: 10 mM HEPES, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl_2 , 1.25 mM CaCl_2 , 6 mM KCl, 10 mM Glucose, 0.4 mM NaH_2PO_4 , 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA. Samples were stirred for 5 min on an orbital agitator at room temperature and then centrifuged 2 min at 13 000 rpm. 500 μL of supernatant were taken and 500 μL of ACN are added to the supernatant to induce BSA precipitation. The solution was then centrifuged again for 2 min at 13 000 rpm. The

concentration in the supernatant was measured by an HPLC procedure using a calibration curve established for each compound by diluting a 10 mM DMSO stock solution to adapted concentrations. The experiments were performed in duplicate.

3. Pharmacological characterization

3.1. Agonist activity of fluoroapelin-13 compounds^{xv}

The evaluation of the agonist activity of fluoroapelin-13 compounds at the human APJ receptor expressed in transfected CHO cells was determined by measuring their effects on cAMP modulation using the HTRF detection method. The cells were suspended in HBSS buffer (Invitrogen) complemented with 20 mM HEPES (pH 7.4) and 500 mM IBMX, then distributed in microplates at a density of 1.5×10^4 cells/well in the presence of either of the following: HBSS (basal control), the reference agonist at 30 nM (stimulated control) or various concentrations (EC_{50} determination), or the test compounds. Thereafter, the adenylyl cyclase activator NKH 477 was added at a final concentration of 0.3 mM. Following 10 min incubation at 37 °C, the cells were lysed and the fluorescence acceptor (D2-labeled cAMP) and fluorescence donor (anti-cAMP antibody labeled with europium cryptate) was added. After 60 min at room temperature, the fluorescence transfer was measured at $\lambda_{ex} = 337$ nm and $\lambda_{em} = 620$ and 665 nm using a microplate reader (Envision, Perkin Elmer). The cAMP concentration was determined by dividing the signal measured at 665 nm by that measured at 620 nm (ratio). The results were expressed as a percent of the control response to 30 nM apelin-13. The standard reference agonist was apelin-13, which was tested in each experiment at several concentrations to generate a concentration-response curve from which its EC_{50} value was calculated.

^{xv} Performed by Eurofins Pharma Discovery Services

3.2. Agonist activity of fluoroangiotensin II^{xvi}

The evaluation of the agonist activity of fluoroangiotensin II at the human AT1 receptor expressed in transfected HEK-293 cells was determined by measuring their effect on cytosolic Ca²⁺ ion mobilization using a fluorimetric detection method. The cells were suspended in DMEM buffer (Invitrogen), then distributed in microplates at a density of 4.10⁴ cells/well. The fluorescent probe (Fluo4 Direct, Invitrogen) mixed with probenidol in HBSS buffer (Invitrogen) complemented with 20 mM Hepes (Invitrogen) (pH 7.4) was then added into each well and equilibrated with the cells for 60 min at 37 °C then 15 min at 22 °C. Thereafter, the assay plates were positioned in a microplate reader (CellLux, PerkinElmer) which was used for the addition of the test compound, reference agonist or HBSS buffer (basal control), and the measurements of changes in fluorescence intensity which varies proportionally to the free cytosolic Ca²⁺ ion concentration. For stimulated control measurements, angiotensin-II at 30 nM was added in separate assay wells. The results were expressed as a percent of the control response to 30 nM angiotensin-II. The standard reference agonist was angiotensin-II, which was tested in each experiment at several concentrations to generate a concentration-response curve from which its EC₅₀ value was calculated.

3.3. Agonist activity of fluorooxytocin^{xvii}

The evaluation of the agonist activity of fluorooxytocin at the human OT receptor endogenously expressed in ECV304 cells was determined by measuring their effect on cytosolic Ca²⁺ ion mobilization using a fluorimetric detection method. The cells were suspended in DMEM buffer (Invitrogen), then distributed in microplates at a density of 3.10⁴ cells/well. The fluorescent probe (Fluo4 Direct, Invitrogen) mixed with probenidol in HBSS buffer (Invitrogen) complemented with 20 mM Hepes (Invitrogen) (pH 7.4) was then added into each well and equilibrated with the cells for 60 min at 37 °C then 15 min at 22 °C. Thereafter, the assay plates were positioned in a microplate reader (CellLux, PerkinElmer) which was used for the addition of the test compound, reference agonist or HBSS buffer (basal control), and the measurements of changes in fluorescence

^{xvi} Performed by Eurofins Pharma Discovery Services

^{xvii} Performed by Eurofins Pharma Discovery Services

intensity which varies proportionally to the free cytosolic Ca²⁺ ion concentration. For stimulated control measurements, oxytocin at 3 mM was added in separate assay wells. The results were expressed as a percent of the control response to 3 mM oxytocin. The standard reference agonist is oxytocin, which was tested in each experiment at several concentrations to generate a concentration-response curve from which its EC₅₀ value was calculated.

3.4. Agonist activity of fluorospexin compounds^{xviii}

The evaluation of the agonist activity of fluorospexin compounds at the GALR2 receptor endogenously expressed in CHO cells was determined by measuring their effect on cytosolic Ca²⁺ ion mobilization using a fluorimetric detection method. CHO cells expressing GalR2 were loaded with 2.5 mM of Fluo-4 AM in the presence of 2.5 mM probenidol. Agonist-evoked increases in intracellular calcium were recorded over time (5 sec intervals over 220 sec) at 37 °C by using a Flexstation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Fluorescence signals were recorded at 520 nm (excitation at 485 nm). Peak amplitudes were normalized to baseline and maximal fluorescence level elicited by 20 mM digitonin, and EC₅₀ were calculated with Graphpad/Prism software.

4. Plasmatic stability assay

4.1. Human plasma stability of fluoroapelin-13 compounds, fluoroangiotensin and fluoroxytocin^{xix}

Plasmatic stability was determined in human plasma after at 0, 30 min, 1 h, 1.5 h and 2 h of incubation at 37 °C. The concentration used for the assay was of 1 mM with a final DMSO concentration of 0.5 %. Human plasma was prewarmed at 37 °C for 5 min, followed by addition of the test compound. The mixture was incubated at 37 °C for 2 h. An aliquot of the incubation mixture was transferred to MeCN at 0, 30 min, 1 h, 1.5 h and 2 h, respectively. Samples were then mixed and centrifuged. Supernatants were used for HPLC-MS/MS analysis without further dilution. Samples were finally analyzed by HPLC-

^{xviii} Performed by Glenn-Marie Le Coz (BSC, Illkirch)

^{xix} Performed by Eurofins Pharma Discovery Services

MS/MS. The percentage of the test compound that remained relative to that present at t_0 was determined by monitoring the peak area of the chromatogram. Half-life ($t_{1/2}$) was estimated from the slope of the initial linear range of the logarithmic curve of the compound remaining (%) against time, assuming first-order kinetics. Reference compounds propoxycaine and propantheline were tested along with the test compound in each assay.

4.2. Mouse serum stability of fluorospexin compounds^{xx}

Plasmatic stability was determined in mouse serum after 3 h, 6 h and 24 h of incubation at 37 °C. For each compound, the 10 mM DMSO stock solution was diluted with DMSO to a final concentration of 500 μ M. This solution was again diluted in mouse serum to a final concentration of 5 μ M. The mixture was divided into two aliquots. The incubation of each aliquot was stopped at t_0 , 3 h, 6 h or 24 h by taking 70 μ L of the supernatant and by adding 175 μ L of ice cold MeCN. Each sample was frozen and stored at -80 °C. After defrosting, samples were stirred for 5 min, sonicated for 1 min, and then centrifuged 5 min at 15 000 g and 4 °C. Samples were finally analyzed by LC-MS/MS. The percentage of the test compound that remained relative to that present at t_0 was determined by monitoring the peak area of the chromatogram. Half-life ($t_{1/2}$) was estimated from the slope of the initial linear range of the logarithmic curve of the compound remaining (%) against time, assuming first-order kinetics. Procaine was used as positive control.

5. Physico-chemical characterization

5.1. Evaluation of the Critical Aggregation Concentration (CAC)

Nile Red stock solutions were prepared by dissolving the dye in DMSO to a final concentration of 1.5 mM. Stock solutions of each spexin derivatives were prepared at 10 mM in DMSO, and then combined with the dye stock solution and an HEPES/0.1%BSA buffer (with the following composition: 10 mM Hepes, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 10 mM Glucose, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ BSA) to provide the

^{xx} Performed by Glenn-Marie Le Coz (BSC, Illkirch)

appropriate final peptide concentrations with 3% of DMSO in each solution. The solutions were stirred for 1 h at room temperature, and then transferred to a 96-well microplate and centrifuged before fluorescence measurements. All fluorescence measurements were carried out using an Envision Multilabel plate reader (Perkin Elmer) at 25 °C. Excitation/emission wavelengths of 530/615 nm were used, with a bandwidth of 35/8.5 nm. Fluorescence intensity was plotted as a function of peptide concentration, and each CMC value was calculated by determining the intersection of the two lines formed by the data points.

5.2. Dynamic Light Scattering measurements

The average diameter of peptide aggregates was measured at 25 °C by the dynamic light scattering method using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern instruments, Orsay, France) with a scattering angle of 173°. The samples were solubilized in 0.9 % NaCl to a final concentration of 200 µM. The measurement was performed in triplicate. The polydispersity index (PDI) reflects the size distribution of the organizations. It indicates a monodispersed diameter distribution when its value is inferior to 0.3.

6. *In vivo* evaluation of fluorospexin compounds

6.1. Animals

Nociception tests were performed on awake C57BL/6N male mice (25-30g weight; Janvier Labs, France). Animals were housed in groups of five per cage and kept under a 12h/12h light/dark cycle at 21 ± 1°C with *ad libitum* access to food and water. Experiments were performed during the light-on phase of the cycle. Mice were habituated to the testing room and equipment and handled for 1 week before starting behavioural experiments.

6.2. Tail immersion test^{xxi}

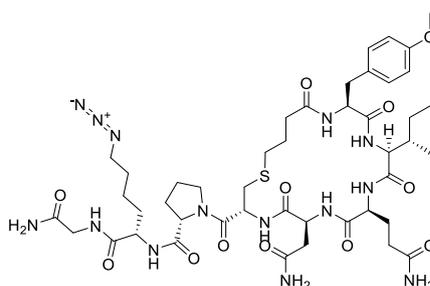
The nociceptive thermal threshold of mice was determined using the tail immersion test. Mice were restrained in a grid pocket and their tail was immersed in a thermostated water bath (47 ± 0.5 °C). The latency (in sec) for tail withdrawal from hot water was taken as a measure of the nociceptive response. In the absence of any nociceptive reaction, a cut-off value of 25 sec was set to avoid tissue damage.

^{xxi} Performed by Glenn-Marie Le Coz (BSC, Illkirch)

Chapter V: Design, synthesis and evaluation of novel “turn-on” fluorescent probes for the in vivo studies of fluoropeptides: proof of concept on oxytocin receptor

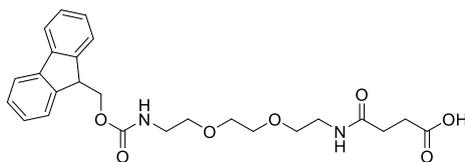
1. Chemical synthesis

Cyclo(butyryl-YIQNC)-PK(N₃)G-NH₂ (37)



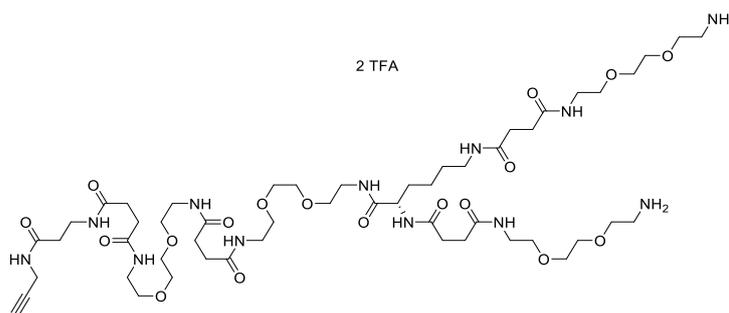
On a Fmoc-Rink amide resin (210 μmol), Fmoc-protected amino acids were introduced following the general method 2.3, except the introduction of Fmoc-Cys(Mmt)-OH (5 equiv.) which was carried out by using HATU (4.9 equiv.) with tetramethylpiperidine (10 equiv.) in DMF for 45 min. 4-Bromobutyric acid (5 equiv.) was coupled using DIC (5 equiv.) and HOBt (5 equiv.) in DMF for 24 h in order to obtain the 4-Bromobutyric acid-Y(Me)IQ(Trt)N(Trt)C(Mmt)PK(N₃)G-Rink sequence of resin-bound peptide. To remove the cysteine-Mmt protecting group the peptide was treated with TFA/TIS/DCM 1/5/94 (7 times for 2 min). The removal of Mmt was monitored by HPLC. The intramolecular cyclisation was performed in 1.4 M NH₃ in MeOH/THF 1/4 (v/v) for 4 h at room temperature. The peptide was cleaved from the resin by TFA/H₂O/TIS 95/2.5/5.5 (v/v/v) treatment for 3 h at room temperature and purified following the general protocol, affording the title compound (60 mg, 28%) as a white solid. t_R =11.04 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₅₅H₆₈N₁₄O₁₂S: 1028.4862; found: 1028.4882.

Fmoc-4-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethylamino)-4-oxobutanoic acid (**38**)



Fmoc-4-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethylamino)-4-oxobutanoic acid (Fmoc-PEG-unit) was synthesized as previously described (¹⁹³Soriano et al., 2009). The product was obtained as clear oil (12.6 mg, 66%) and used without any additional purification. $t_R = 3.11$ min (>95% purity [220.8 nm]); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.27 (t, $J=7.15$ Hz, 1 H), 2.40 - 2.58 (m, 2 H), 2.64 - 2.71 (m, 3 H), 3.27 - 3.67 (m, 11 H), 3.29 - 3.31 (m, 1 H), 4.20 - 4.28 (m, 1 H), 4.39 - 4.50 (m, 2 H), 7.10 (br s, 1 H), 7.29 - 7.43 (m, 5 H), 7.54 - 7.63 (m, 2 H), 7.77 (d, $J=7.53$ Hz, 2 H).

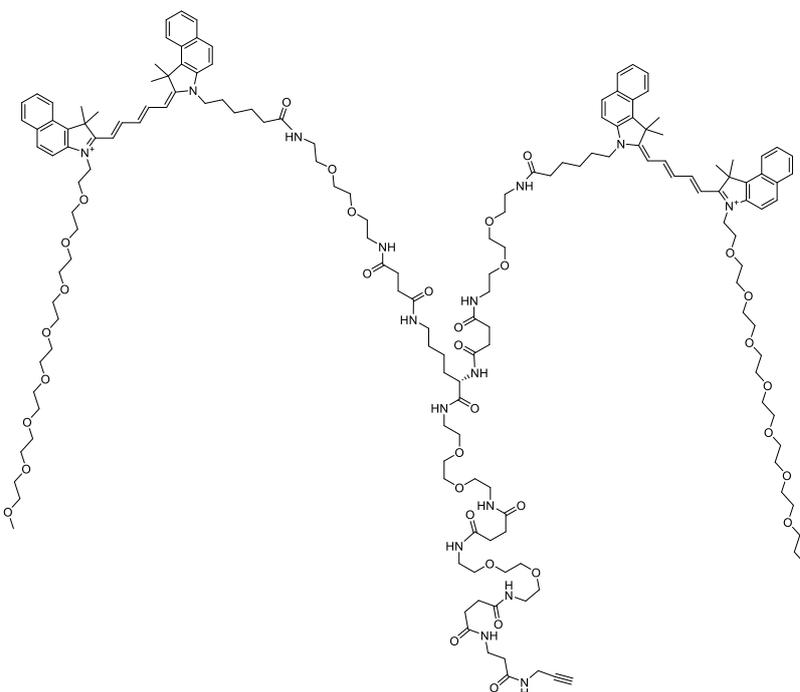
Dimeric chain, 2 TFA (**39**)



The dimeric chain was synthesized on a SPOrT resin (120 μ mol), obtained by Riché Stéphanie as previously described.¹⁹⁰ Fmoc-protected-PEG units (2 equiv.) were introduced using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.) and DIEA (6 equiv.). Fmoc-Lys-Boc (4 equiv.) was introduced using HBTU (3.8 equiv.), HOBT (4 equiv.) and DIEA (12 equiv.). Finally, Fmoc-protected-PEG units (4 equiv.) were introduced on the deprotected lysine by using HBTU (3.8 equiv.), HOBT (4 equiv.) and DIEA (12 equiv.). After the final Fmoc cleavage, the dimer chain was cleaved from the resin by TFA/H₂O/TIS 95/2.5/2.5 treatment for 3 h at room temperature. The resin was removed by vacuum filtration, and the dimeric chain was precipitated with cold diethyl ether (30 volumes per volume of the cleavage mixture). The precipitated dimeric chains were centrifuged at 3000 rpm at 4 °C for 2 min. The precipitate was washed with cold diethyl ether (30 volumes per volume of the cleavage mixture) and centrifuged again at 3000 rpm at 4 °C for 2 min. The diethyl ether solution was eliminated under reduced pressure and the precipitate

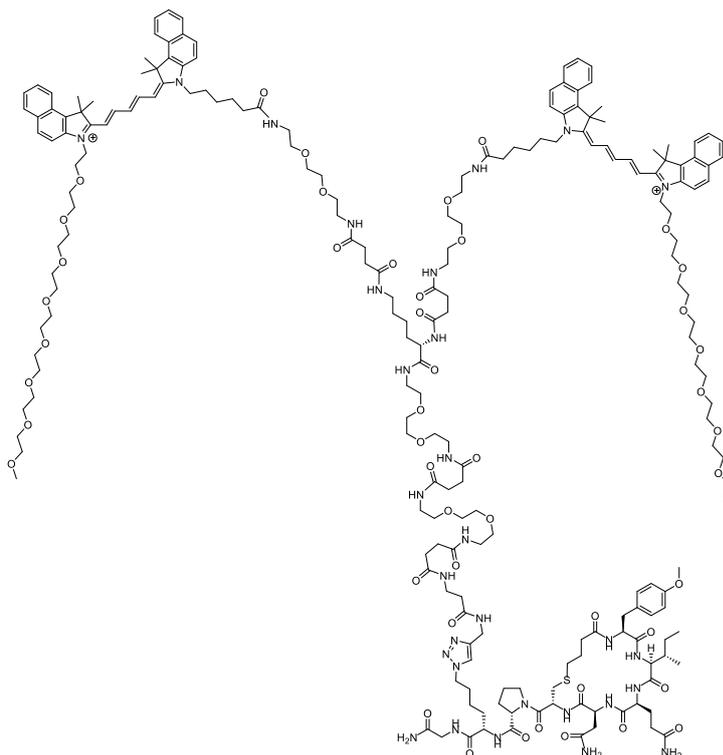
was dried *in vacuo*. The crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm , 19 \times 150 mm) using a linear gradient (0% to 30% in 40 min, flow-rate of 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v/v), to obtain the dimeric chain (20 mg, 23%) as a brown oil. $t_{\text{R}} = 5.51$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$ calcd 588.34; found 588.35.

Cy5.5-dimeric chain (**40**)



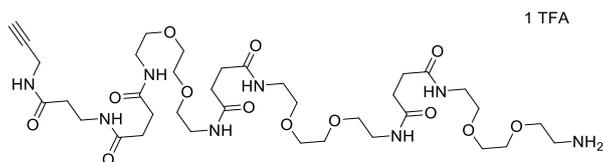
Pegylated-cyanine 5.5 (Cy5.5) was synthesized by Mayeul Collot (LBP, Illkirch) and used without any further purification. Pegylated-cyanine 5.5 (1.9 equiv., 13 mg, 0.012 mmol) and the dimeric chain **40** (1 equiv., 9 mg, 0.006 mmol) were solubilized in 262 μL of dry DMF. PyBOP (2 equiv., 6.66 mg, 0.012 mmol) and DIEA (6 equiv., 4.97 mg, 6.36 μL , 0.0385 mmol) were added to the mixture. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm , 19 \times 150 mm) using a linear gradient (15% to 60% in 30 min, flow-rate of 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v/v), to obtain the desired product (16 mg, 77%) as a blue solid. $t_{\text{R}} = 14.71$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ calcd 3012.80; found 3012.73.

Cy5.5-dimeric chain-CBT (**41**)



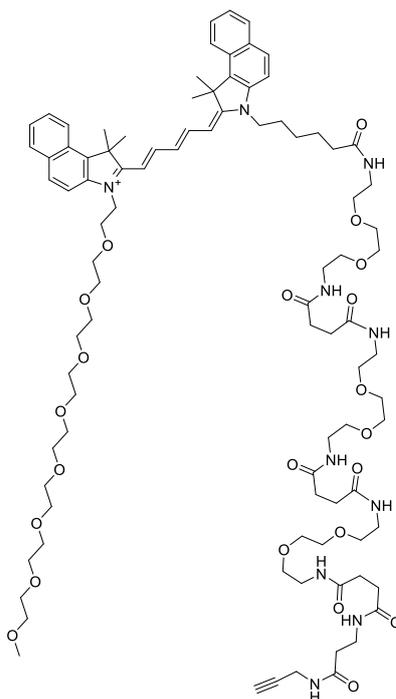
CuSO₄ (1 equiv., 20.4 μL of 0.1 M H₂O solution, 2.04 μmol), sodium ascorbate (1.2 equiv., 24.4 μL of 0.1 M H₂O solution, 2.44 μmol) and TBTA (1.2 equiv., 24.4 μL of 0.1 M DMF solution, 2.44 μmol) were pre-activated during 20 min at room temperature in a total volume of H₂O/DMF 2/8 (v/v) of 70 μL. Compound **39** (1.2 equiv., 2.52 mg, 2.44 μmol) and Cy5.5-dimeric chain **41** (1 equiv., 6.6 mg, 2.04 μmol) were added to the mixture followed by 700 μL of H₂O/DMF 2/8 (v/v). The reaction mixture was stirred for 3 h at 37 °C. The crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (20% to 70% in 30 min, flow-rate of 20 ml.min⁻¹) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v/v), to obtain the desired product (3.5 mg, 40%) as a blue solid. *t_R* = 14.2 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₂₀₉H₃₀₈N₃₀O₄₈S²⁺: 4036.2147; found: 4036.2069.

Monomeric chain, 1 TFA (42)



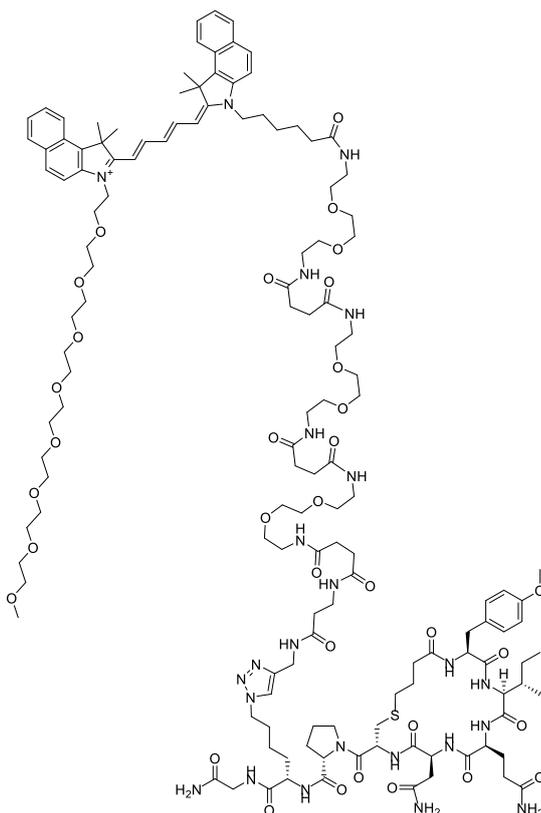
The monomeric chain was synthesized on a SPOrT resin (60 μmol), obtained by Riché Stéphanie as previously described.¹⁹⁰ All Fmoc-protected-PEG units (2 equiv.) were introduced using HBTU (1.9 equiv.), HOBT (2 equiv.) and DIEA (6 equiv.). The monomeric chain was cleaved from the resin by TFA/H₂O/TIS 95/2.5/2.5 (v/v/v) treatment for 3 h at room temperature. The resin was removed by vacuum filtration, and the monomeric chains were precipitated with cold diethyl ether (30 volumes per volume of the cleavage mixture). The precipitated monomeric chains were centrifuged at 3000 rpm at 4 °C for 2 min. The precipitate was washed with cold diethyl ether (30 volumes per volume of the cleavage mixture) and centrifuged again at 3000 rpm at 4 °C for 2 min. The diethyl ether solution was eliminated under reduced pressure and the precipitate was dried *in vacuo*. The crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm , 19 \times 150 mm) using a linear gradient (0% to 30% in 40 min, flow-rate of 20 ml.min⁻¹) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v/v), to obtain the monomeric chain (13.3 mg, 24%) as a brown oil. $t_{\text{R}} = 5.48$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$ calcd 409.23; found 409.24.

Cy5.5- monomeric chain **(43)**



Pegylated-cyanine 5.5 (Cy5.5) was synthesized by Mayeul Collot (LBP, Illkirch) and used without any further purification. Pegylated-cyanine 5.5 (1.2 equiv., 9.59 mg, 0.009 mmol) and the monomeric chain **43** (1 equiv., 7 mg, 0.008 mmol) were solubilized in 308 μL of dry DMF. PyBOP (1.2 equiv., 4.7 mg, 0.009 mmol) and DIEA (6 equiv., 5.83 mg, 7.46 μL , 0.045 mmol) were added to the mixture. The crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm , 19 \times 150 mm) using a linear gradient (15% to 60% in 30 min, flow-rate of 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v), to obtain the desired product (8.1 mg, 58%) as a blue solid. $t_{\text{R}} = 13.15$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd 1734.99; found 1734.01.

Cy5.5-monomeric chain-CBT (44)



CuSO_4 (1 equiv., 32.5 μL of 0.1 M H_2O solution, 3.25 μmol), sodium ascorbate (1.2 equiv., 39 μL of 0.1 M H_2O solution, 3.9 μmol) and TBTA (1.2 equiv., 39 μL of 0.1 M DMF solution) were pre-activated during 20 min at room temperature in a total volume of $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 2/8 (v/v) of 100 μL . Compound **39** (1.2 equiv., 4.01 mg, 3.9 μmol) and Cy5.5-monomeric chain **44** (1 eq., 6 mg, 3.25 μmol) were added to the mixture followed by 1100 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 2/8 (v/v). The reaction mixture was stirred for 3 h at 37 $^\circ\text{C}$. The crude product was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm , 19 \times 150 mm) using a linear gradient (20% to 70% in 40 min, flow-rate of 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v), to obtain the desired product (4.1 mg, 44%) as a blue solid. $t_{\text{R}} = 12.8$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{137}\text{H}_{205}\text{N}_{24}\text{O}_{34}\text{S}^+$: 2761.4693; found: 2761.4667.

2. Pharmacological characterization^{xxii}

2.1.1. Cell Lines, Culture Conditions, and Treatment

HEK293 cells were stably transfected with an expressing vector coding for the OTR cDNA using lipofectamin (Invitrogen). Cell selection was performed using 800 µg/mL geneticin (Sigma). Cells were grown in minimal essential medium (Invitrogen) complemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen), 2 mM glutamine (Sigma), 100 U/mL penicillin (Sigma), 100 µg/mL streptomycin (Sigma), and 500 µg/mL geneticin (Sigma). Compounds dilutions were performed manually then compounds were dispensed into 384 wells microplate (Greiner 784201). Addition of compounds was performed by using the FlexStation 3 apparatus 30 s after the beginning of readings. In order to assess the maximum calcium level, the addition of digitonin (Sigma Aldrich) (100 µM) was performed 80 s after compound treatment.

2.1.1. Calcium measurement

Cells were loaded with 5 µM of the calcium-sensing dye Indo-1 acetoxy-methyl ester (Indo-1 AM) in HEPES buffer (10 mM HEPES, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 0.4 mM NaH₂PO₄ and 5.6 mM glucose, pH 7.4) supplemented with 0,1% bovine serum albumin, for 45 minutes at 37°C in the presence of 5% CO₂. After washing they were collected in HEPES-bovine serum albumin buffer at 1.3x10⁶ cells/mL and seeded into 384 well polystyrene plates (Greiner 781091) in order to get 50 000 cells/well and then centrifuged 5 min at 800 rpm. Intracellular Ca²⁺ release measurement was performed by monitoring the fluorescence of the ratiometric calcium probe Indo-1 using the FlexStation 3 microplate reader (Molecular Devices Corp., Palo Alto, CA, USA). Fluorescence (excitation at 338 nm, emissions recorded at 401 nm and 475 nm) was acquired at room temperature over a 3 minutes kinetic period. Fluorescence emission ratio (signal=(fluorescence measured at 401 nm)/(fluorescence measured at 475 nm)) was calculated in order to follow the calcium release. Minimum signal was obtained before addition of compound treatment and maximum signal was given after digitonin addition. Normalization was done using the following equation: Normalized Signal = 100 x (signal-signal min) / (signal max-signal min).

^{xxii} Performed by Sophie Gioria (PCBIS, Illkirch)

3. Fluorescence spectroscopy and microscopy

3.1. Absorption and fluorescence spectroscopy studies

Absorption spectra were recorded on a Cary 4000 spectrophotometer (Varian) and fluorescence spectra on a Fluoromax 3 (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer. Fluorescence emission spectra were systematically recorded at 630 nm excitation wavelength at 20 °C. All fluorescence spectra were corrected for instrumental effects. Fluorescence quantum yields (QY) were measured using Rhodamine 800 in EtOH as a reference (QY = 25%¹⁹⁷).

3.2. Fluorescence confocal microscopy experiments

3.2.1. Cell Lines, Culture Conditions, and Treatment^{xxiii}

HEK293 cells expressing the GFP-coupled oxytocin receptor (GFP-OTR) and wild-type HEK293 cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM, Invitrogen 21090) with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 2 mM of glutamine 50 µg/mL of hygromycin B for GFP-OTR cells at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. 70-80% cell confluence was maintained by removal of a portion of the culture and replacement with fresh medium twice a week. For confocal microscopy studies, cells were seeded onto 35 mm ibiTreat Ibidi Polymer Coverslip at a density of 100 000 cells/Ibidi 24 h before microscopy.

3.2.2. Confocal microscopy experiments

Cells were washed two times by gentle rinsing with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, no phenol red), then solutions of fluorescent ligands at 10 nM in HBSS (1 mL) were added and the cells were incubated for 5 min at room temperature. For competition experiments, a mixture of 10 nM of fluorescent ligands and 2 µM of carbetocin was used. Fluorescence confocal microscopy experiments were performed on a Leica TCS SPE-II microscope with a HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS objective. For

^{xxiii} Performed by Christel Valencia (PCBIS, Illkirch)

confocal images, excitation/emission wavelengths of 635/650-800 nm were used for the fluorescent peptides and 488/500-580 nm for the GFP fluorescence.

4. *In vivo* evaluation

4.1. Animals

Twelve-week-old pregnant female Swiss mice were purchased from Janvier Laboratories (France). Animals were maintained under controlled environmental conditions (20 ± 2 °C) with a relative humidity ($50 \pm 10\%$) and a 12 h light/dark cycle in Individually ventilated cages (GM500, Techniplast) with bedding made from spruce wood chips (Safe, villeAuggy, France) and enriched with nestlets. Food (autoclavable diet, D04, Safe, France) and tap water were available *ad libitum*. Animal experimentation was conducted with the approval of the French ministry of agriculture and the Ethics local committee for animal experimentation of the Strasbourg University (CREMEAS).

4.2. *In vivo* fluorescence biodistribution^{xxiv}

Animal imaging of the fluorescence signal in nursing mice was performed by using a luminograph (NightOwl, Berthold Technologies). The images were done 11 days after mouse delivery. Mice were anesthetized intraperitoneally (Ketamine 150 mg/kg, xylazine 10mg/kg) and fluorescent compounds (100 μ L containing 7.5 nmol in 0.9 % NaCl) or non-fluorescent carbetocin (100 μ L containing 450 nmol in 0.9 % NaCl) were administered intravenously (tail vein). After few minutes, mice were placed repeatedly in the luminograph (10 and 30 min after intravenous administration of the probes), and positioned either on the flank or in decubitus dorsal. Mice were imaged using a halogen lamp, (75 W, 340–750 nm) and emission of the dyes was collected separately using filter set: 630/700 nm for Cy5.5. The experiments were repeated on three mice.

^{xxiv} Performed with the help of François Daubeuf (LIT, Illkirch)

Bibliographie

- (1) Sato, A. K.; Viswanathan, M.; Kent, R. B.; Wood, C. R. Therapeutic Peptides: Technological Advances Driving Peptides into Development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17* (6), 638–642.
- (2) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (1), 122–128.
- (3) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. The Future of Peptide-Based Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81* (1), 136–147.
- (4) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatsky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (1–2), 40–56.
- (5) Gunnoo, S. B.; Madder, A. Bioconjugation – Using Selective Chemistry to Enhance the Properties of Proteins and Peptides as Therapeutics and Carriers. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (34), 8002–8013.
- (6) Vigneaud, V. du; Ressler, C.; Swan, C. J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S. The Synthesis of an Octapeptide Amide with the Hormonal Activity of Oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (19), 4879–4880.
- (7) Merrifield, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- (8) Chang, C.-D.; Felix, A. M.; Jimenez, M. H.; Meienhofer, J. Solid-Phase Peptide Synthesis of Somatostatin Using Mild Base Cleavage of N α -9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino Acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *15* (5), 485–494.
- (9) Dawson, P.; Muir, T.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science* **1994**, *266* (5186), 776–779.
- (10) Albericio, F.; Kruger, H. G. Therapeutic Peptides. *Future Med. Chem.* **2012**, *4* (12), 1527–1531.
- (11) Erak, M.; Bellmann-Sickert, K.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G. Peptide Chemistry Toolbox -Transforming Natural Peptides into Peptide Therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2759–2765.
- (12) Lien, S.; Lowman, H. B. Therapeutic Peptides. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (12), 556–562.
- (13) Nguyen, J.-T.; Kiso, Y. Delivery of Peptide Drugs. In *Peptide Chemistry and Drug Design*; Dunn, B. M., Ed.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp 271–310.
- (14) Adessi, C.; Soto, C. Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and Bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9* (9), 963–978.
- (15) Goodwin, D.; Simerska, P.; Toth, I. Peptides as Therapeutics with Enhanced Bioactivity. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (26), 4451–4461.
- (16) Fominaya, J.; Bravo, J.; Rebollo, A. Strategies to Stabilize Cell Penetrating Peptides for in Vivo Applications. *Ther. Deliv.* **2015**, *6* (10), 1171–1194.
- (17) Moss, M. Peptoids: Emerging Therapeutics for Neurodegeneration. *J. Neurol. Neuromedicine* **2017**, *2* (7), 1–5.
- (18) Liskamp, R. M. J.; Rijkers, D. T. S.; Kruijtzter, J. A. W.; Kemmink, J. Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics. *ChemBioChem* **2011**, *12* (11), 1626–1653.
- (19) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. Peptoids: A Modular Approach to Drug Discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (20), 9367–9371.
- (20) Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; García Ramos, Y.; Lubell, W. D. Azapeptides and Their Therapeutic Potential. *Future Med. Chem.* **2011**, *3* (9), 1139–1164.

- (21) Bock, J. E.; Gavenonis, J.; Kritzer, J. A. Getting in Shape: Controlling Peptide Bioactivity and Bioavailability Using Conformational Constraints. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (3), 488–499.
- (22) Lau, Y. H.; de Andrade, P.; Wu, Y.; Spring, D. R. Peptide Stapling Techniques Based on Different Macrocyclisation Chemistries. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (1), 91–102.
- (23) Li, H.; Aneja, R.; Chaiken, I. Click Chemistry in Peptide-Based Drug Design. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9797–9817.
- (24) Walensky, L. D.; Bird, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (15), 6275–6288.
- (25) Forood, B.; Feliciano, E. J.; Nambiar, K. P. Stabilization of α -Helical Structures in Short Peptides via End Capping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (3), 838–842.
- (26) Sim, S.; Kim, Y.; Kim, T.; Lim, S.; Lee, M. Directional Assembly of α -Helical Peptides Induced by Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (50), 20270–20272.
- (27) Verdine, G. L.; Hilinski, G. J. All-Hydrocarbon Stapled Peptides as Synthetic Cell-Accessible Mini-Proteins. *Drug Discov. Today Technol.* **2012**, *9* (1), 41–47.
- (28) Dharanipragada, R. New Modalities in Conformationally Constrained Peptides for Potency, Selectivity and Cell Permeation. *Future Med. Chem.* **2013**, *5* (7), 831–849.
- (29) Fletcher, S.; Hamilton, A. D. Targeting Protein-Protein Interactions by Rational Design: Mimicry of Protein Surfaces. *J. R. Soc. Interface* **2006**, *3* (7), 215–233.
- (30) van Witteloostuijn, S. B.; Pedersen, S. L.; Jensen, K. J. Half-Life Extension of Biopharmaceuticals Using Chemical Methods: Alternatives to PEGylation. *ChemMedChem* **2016**, *11* (22), 2474–2495.
- (31) Abuchowski, A.; van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F. Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (11), 3578–3581.
- (32) Egleton, R. D.; Mitchell, S. A.; Huber, J. D.; Palian, M. M.; Polt, R.; Davis, T. P. Improved Blood-Brain Barrier Penetration and Enhanced Analgesia of an Opioid Peptide by Glycosylation. *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299* (3), 967–972.
- (33) Elsadek, B.; Kratz, F. Impact of Albumin on Drug Delivery — New Applications on the Horizon. *J. Controlled Release* **2012**, *157* (1), 4–28.
- (34) Fanali, G.; di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Human Serum Albumin: From Bench to Bedside. *Mol. Aspects Med.* **2012**, *33* (3), 209–290.
- (35) Pollaro, L.; Heinis, C. Strategies to Prolong the Plasma Residence Time of Peptide Drugs. *MedChemComm* **2010**, *1* (5), 319–324.
- (36) Kratz, F. Albumin as a Drug Carrier: Design of Prodrugs, Drug Conjugates and Nanoparticles. *J. Controlled Release* **2008**, *132* (3), 171–183.
- (37) Arroyo, V.; García-Martínez, R.; Salvatella, X. Human Serum Albumin, Systemic Inflammation, and Cirrhosis. *J. Hepatol.* **2014**, *61* (2), 396–407.
- (38) Holmes, D. L.; Thibaudeau, K.; L'Archevêque, B.; Milner, P. G.; Ezrin, A. M.; Bridon, D. P. Site Specific 1:1 Opioid:Albumin Conjugate with in Vitro Activity and Long in Vivo Duration. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (4), 439–444.
- (39) Stoddart, C. A.; Nault, G.; Galkina, S. A.; Thibaudeau, K.; Bakis, P.; Bousquet-Gagnon, N.; Robitaille, M.; Bellomo, M.; Paradis, V.; Lis court, P.; et al. Albumin-Conjugated C34 Peptide HIV-1 Fusion Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (49), 34045–34052.
- (40) Baggio, L. L.; Huang, Q.; Cao, X.; Drucker, D. J. An Albumin-Exendin-4 Conjugate Engages Central and Peripheral Circuits Regulating Murine Energy and Glucose Homeostasis. *Gastroenterology* **2008**, *134* (4), 1137–1147.

- (41) Koehler, M. F. T.; Zobel, K.; Beresini, M. H.; Caris, L. D.; Combs, D.; Paasch, B. D.; Lazarus, R. A. Albumin Affinity Tags Increase Peptide Half-Life in Vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (20), 2883–2886.
- (42) Zhang, L.; Bulaj, G. Converting Peptides into Drug Leads by Lipidation. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (11), 1602–1618.
- (43) Zaykov, A. N.; Mayer, J. P.; DiMarchi, R. D. Pursuit of a Perfect Insulin. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (6), 425–439.
- (44) Lorenz, M.; Evers, A.; Wagner, M. Recent Progress and Future Options in the Development of GLP-1 Receptor Agonists for the Treatment of Diabetes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (14), 4011–4018.
- (45) Maletínská, L.; Neugebauer, W.; Parê, M.-C.; Pêrodin, J.; Pham, D.; Escher, E. Lipid Masking and Reactivation of Angiotensin Analogues. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79* (7), 2023–2034.
- (46) Juhl, C.; Els-Heindl, S.; Schönauer, R.; Redlich, G.; Haaf, E.; Wunder, F.; Riedl, B.; Burkhardt, N.; Beck-Sickinger, A. G.; Bierer, D. Development of Potent and Metabolically Stable APJ Ligands with High Therapeutic Potential. *ChemMedChem* **2016**, *11* (21), 2378–2384.
- (47) Buse, J. B.; Rosenstock, J.; Sesti, G.; Schmidt, W. E.; Montanya, E.; Brett, J. H.; Zychma, M.; Blonde, L. Liraglutide Once a Day versus Exenatide Twice a Day for Type 2 Diabetes: A 26-Week Randomised, Parallel-Group, Multinational, Open-Label Trial (LEAD-6). *Lancet* **2009**, *374* (9683), 39–47.
- (48) P. Garay, R. Immunogenicity of Polyethylene Glycol (PEG). *Open Conf. Proc. J.* **2011**, *2* (1), 104–107.
- (49) Krafft, M. Fluorocarbons and Fluorinated Amphiphiles in Drug Delivery and Biomedical Research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47* (2–3), 209–228.
- (50) Krafft, M. P.; Riess, J. G. Chemistry, Physical Chemistry, and Uses of Molecular Fluorocarbon-Hydrocarbon Diblocks, Triblocks, and Related Compounds—Unique “Apolar” Components for Self-Assembled Colloid and Interface Engineering. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (5), 1714–1792.
- (51) Ravey, J. C.; Gherbi, A.; Stébé, M. J. Comparative Study of Fluorinated and Hydrogenated Nonionic Surfactants. In *Trends in Colloid and Interface Science II*; Degiorgio, V., Ed.; 1988; Vol. 76, pp 234–241.
- (52) Krafft, M.; Riess, J. Highly Fluorinated Amphiphiles and Colloidal Systems, and Their Applications in the Biomedical Field. A Contribution. *Biochemistry* **1998**, *80* (5–6), 489–514.
- (53) Sadtler, V. M.; Jeanneaux, F.; Pierre Krafft, M.; Rábai, J.; Riess, J. G. Perfluoroalkylated Amphiphiles with a Morpholinophosphate or a Dimorpholinophosphate Polar Head Group. *New J. Chem.* **1998**, *22* (6), 609–613.
- (54) Riess, J. G.; Krafft, M. P. Fluorinated Materials for in Vivo Oxygen Transport (Blood Substitutes), Diagnosis and Drug Delivery. *Biomaterials* **1998**, *19* (16), 1529–1539.
- (55) Moradi, S.; Jahanian-Najafabadi, A.; Roudkenar, M. H. Artificial Blood Substitutes: First Steps on the Long Route to Clinical Utility. *Clin. Med. Insights Blood Disord.* **2016**, *9*, 33–41.
- (56) Spahn, D. R. Blood Substitutes Artificial Oxygen Carriers: Perfluorocarbon Emulsions. *Crit. Care* **1999**, *3* (5), 93–97.
- (57) Lowe, K. C. Perfluorinated Blood Substitutes and Artificial Oxygen Carriers. *Blood Rev.* **1999**, *13* (3), 171–184.

- (58) Spahn, D. R.; van Bremp, R.; Theilmeier, G.; Reibold, J.-P.; Welte, M.; Heinzerling, H.; Birck, K. M.; Keipert, P. E.; Messmer, K. Perflubron Emulsion Delays Blood Transfusions in Orthopedic Surgery. *Anesthesiology* **1999**, *91* (5), 1195–1208.
- (59) Mitten, R. M.; Burgan, A. R.; Hamblin, A.; Yee, G.; Long, D. C.; Long, D. M.; Mattrey, R. F. Dose Related Biodistribution & Elimination of 100% PFOB Emulsion. *Biomater. Artif. Cells. Artif. Organs* **1988**, *16* (1–3), 683–684.
- (60) Tsuda, Y.; Yamanouchi, K.; Yokoyama, K.; Suyama, T.; Watanabe, M.; Ohyanagi, H.; Saitoh, Y. Discussion and Considerations for the Excretion Mechanism of Perfluorochemical Emulsion. *Biomater. Artif. Cells. Artif. Organs* **1988**, *16* (1–3), 473–483.
- (61) Ravis, W. R.; Hoke, J. F.; Parsons, D. L. Perfluorochemical Erythrocyte Substitutes: Disposition and Effects on Drug Distribution and Elimination. *Drug Metab. Rev.* **1991**, *23* (3–4), 375–411.
- (62) Ni, Y.; Klein, D. H.; Song, D. Recent Developments in Pharmacokinetic Modeling of Perfluorocarbon Emulsions. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **1996**, *24* (2), 81–90.
- (63) Francis, J. N.; Bunce, C. J.; Horlock, C.; Watson, J. M.; Warrington, S. J.; Georges, B.; Brown, C. B. A Novel Peptide-Based Pan-Influenza A Vaccine: A Double Blind, Randomised Clinical Trial of Immunogenicity and Safety. *Vaccine* **2015**, *33* (2), 396–402.
- (64) Francis, J. N.; Thaburet, J.-F.; Bonnet, D.; Sizer, P. J.; Brown, C. B.; Georges, B. Increasing Cellular Immunogenicity to Peptide-Based Vaccine Candidates Using a Fluorocarbon Antigen Delivery System. *Vaccine* **2015**, *33* (8), 1071–1076.
- (65) Foord, S. M.; Bonner; Richard. International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57* (2), 279–288.
- (66) Fredriksson, R. The Repertoire of G-Protein-Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67* (5), 1414–1425.
- (67) Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K. The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **2009**, *459* (7245), 356–363.
- (68) Venkatakrisnan, A. J.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F.; Babu, M. M. Molecular Signatures of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **2013**, *494* (7436), 185–194.
- (69) Wootten, D.; Christopoulos, A.; Sexton, P. M. Emerging Paradigms in GPCR Allosterism: Implications for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (8), 630–644.
- (70) Lappano, R.; Maggiolini, M. G Protein-Coupled Receptors: Novel Targets for Drug Discovery in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (1), 47–60.
- (71) Lagerström, M. C.; Schiöth, H. B. Structural Diversity of G Protein-Coupled Receptors and Significance for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (4), 339–357.
- (72) Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How Many Drug Targets Are There? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (12), 993–996.
- (73) O’Carroll, A.-M.; Lolait, S. J.; Harris, L. E.; Pope, G. R. The Apelin Receptor APJ: Journey from an Orphan to a Multifaceted Regulator of Homeostasis. *J. Endocrinol.* **2013**, *219* (1), 13–35.
- (74) Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M.-X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; et al. Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251* (2), 471–476.

- (75) Habata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Fukusumi, S.; Kawamata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Nishizawa, N.; Murosaki, S.; Kurokawa, T.; et al. Apelin, the Natural Ligand of the Orphan Receptor APJ, Is Abundantly Secreted in the Colostrum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1999**, *1452* (1), 25–35.
- (76) Kawamata, Y.; Habata, Y.; Fukusumi, S.; Hosoya, M.; Fujii, R.; Hinuma, S.; Nishizawa, N.; Kitada, C.; Onda, H.; Nishimura, O.; et al. Molecular Properties of Apelin: Tissue Distribution and Receptor Binding. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2001**, *1538* (2–3), 162–171.
- (77) De Mota, N.; Reaux-Le Goazigo, A.; El Messari, S.; Chartrel, N.; Roesch, D.; Dujardin, C.; Kordon, C.; Vaudry, H.; Moos, F.; Llorens-Cortes, C. Apelin, a Potent Diuretic Neuropeptide Counteracting Vasopressin Actions through Inhibition of Vasopressin Neuron Activity and Vasopressin Release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (28), 10464–10469.
- (78) Iturrioz, X.; Alvear-Perez, R.; De Mota, N.; Franchet, C.; Guillier, F.; Leroux, V.; Dabire, H.; Le Jouan, M.; Chabane, H.; Gerbier, R.; et al. Identification and Pharmacological Properties of E339-3D6, the First Nonpeptidic Apelin Receptor Agonist. *FASEB J.* **2010**, *24* (5), 1506–1517.
- (79) Messari, S. E.; Iturrioz, X.; Fassot, C.; De Mota, N.; Roesch, D.; Llorens-Cortes, C. Functional Dissociation of Apelin Receptor Signaling and Endocytosis: Implications for the Effects of Apelin on Arterial Blood Pressure. *J. Neurochem.* **2004**, *90* (6), 1290–1301.
- (80) Masri, B.; Morin, N.; Cornu, M.; Knibiehler, B.; Audigier, Y. Apelin (65-77) Activates P70 S6 Kinase and Is Mitogenic for Umbilical Endothelial Cells. *FASEB J.* **2004**, *18* (15), 1909–1911.
- (81) Ceraudo, E.; Galanth, C.; Carpentier, E.; Banegas-Font, I.; Schonegge, A.-M.; Alvear-Perez, R.; Iturrioz, X.; Bouvier, M.; Llorens-Cortes, C. Biased Signaling Favoring Gi over Beta-Arrestin Promoted by an Apelin Fragment Lacking the C-Terminal Phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (35), 24599–24610.
- (82) Lee, D. K.; Cheng, R.; Nguyen, T.; Fan, T.; Kariyawasam, A. P.; Liu, Y.; Osmond, D. H.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *J. Neurochem.* **2001**, *74* (1), 34–41.
- (83) Castan-Laurell, I.; Dray, C.; Attané, C.; Duparc, T.; Knauf, C.; Valet, P. Apelin, Diabetes, and Obesity. *Endocrine* **2011**, *40* (1), 1–9.
- (84) Carpéné, C.; Dray, C.; Attané, C.; Valet, P.; Portillo, M. P.; Churruca, I.; Milagro, F. I.; Castan-Laurell, I. Expanding Role for the Apelin/APJ System in Physiopathology. *J. Physiol. Biochem.* **2007**, *63* (4), 358–373.
- (85) Reaux, A.; De Mota, N.; Skultetyova, I.; Lenkei, Z.; El Messari, S.; Gallatz, K.; Corvol, P.; Palkovits, M.; Llorens-Cortès, C. Physiological Role of a Novel Neuropeptide, Apelin, and Its Receptor in the Rat Brain: Physiological Role of Apelin. *J. Neurochem.* **2001**, *77* (4), 1085–1096.
- (86) Goazigo, A. R.-L.; Morinville, A.; Burlet, A.; Llorens-Cortes, C.; Beaudet, A. Dehydration-Induced Cross-Regulation of Apelin and Vasopressin Immunoreactivity Levels in Magnocellular Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* **2004**, *145* (9), 4392–4400.
- (87) Hus-Citharel, A.; Bodineau, L.; Frugière, A.; Joubert, F.; Bouby, N.; Llorens-Cortes, C. Apelin Counteracts Vasopressin-Induced Water Reabsorption via Cross Talk between Apelin and Vasopressin Receptor Signaling Pathways in the Rat Collecting Duct. *Endocrinology* **2014**, *155* (11), 4483–4493.
- (88) Blanchard, A.; Steichen, O.; De Mota, N.; Curis, E.; Gauci, C.; Frank, M.; Wuerzner, G.; Kamenicky, P.; Passeron, A.; Azizi, M.; et al. An Abnormal Apelin/Vasopressin

- Balance May Contribute to Water Retention in Patients with the Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone (SIADH) and Heart Failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98* (5), 2084–2089.
- (89) Japp, A. G.; Newby, D. E. The Apelin-APJ System in Heart Failure. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75* (10), 1882–1892.
- (90) Tatemoto, K.; Takayama, K.; Zou, M.-X.; Kumaki, I.; Zhang, W.; Kumano, K.; Fujimiya, M. The Novel Peptide Apelin Lowers Blood Pressure via a Nitric Oxide-Dependent Mechanism. *Regul. Pept.* **2001**, *99* (2–3), 87–92.
- (91) Japp, A. G.; Cruden, N. L.; Amer, D. A. B.; Li, V. K. Y.; Goudie, E. B.; Johnston, N. R.; Sharma, S.; Neilson, I.; Webb, D. J.; Megson, I. L.; et al. Vascular Effects of Apelin In Vivo in Man. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52* (11), 908–913.
- (92) Iwanaga, Y.; Kihara, Y.; Takenaka, H.; Kita, T. Down-Regulation of Cardiac Apelin System in Hypertrophied and Failing Hearts: Possible Role of Angiotensin II–Angiotensin Type 1 Receptor System. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2006**, *41* (5), 798–806.
- (93) Ashley, E.; Powers, J.; Chen, M.; Kundu, R.; Finsterbach, T.; Caffarelli, A.; Deng, A.; Eichhorn, J.; Mahajan, R.; Agrawal, R. The Endogenous Peptide Apelin Potently Improves Cardiac Contractility and Reduces Cardiac Loading in Vivo. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *65* (1), 73–82.
- (94) Wang, W.; McKinnie, S. M. K.; Patel, V. B.; Haddad, G.; Wang, Z.; Zhabyeyev, P.; Das, S. K.; Basu, R.; McLean, B.; Kandalam, V.; et al. Loss of Apelin Exacerbates Myocardial Infarction Adverse Remodeling and Ischemia-Reperfusion Injury: Therapeutic Potential of Synthetic Apelin Analogues. *J. Am. Heart Assoc.* **2013**, *2* (4), 1–34.
- (95) Wang, W.; McKinnie, S. M. K.; Farhan, M.; Paul, M.; McDonald, T.; McLean, B.; Llorens-Cortes, C.; Hazra, S.; Murray, A. G.; Vederas, J. C.; et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17. *Hypertension* **2016**, *68* (2), 365–377.
- (96) Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; et al. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (17), 14838–14843.
- (97) Brame, A. L.; Maguire, J. J.; Yang, P.; Dyson, A.; Torella, R.; Cheriyan, J.; Singer, M.; Glen, R. C.; Wilkinson, I. B.; Davenport, A. P. Design, Characterization, and First-in-Human Study of the Vascular Actions of a Novel Biased Apelin Receptor Agonist. *Hypertension* **2015**, *65* (4), 834–840.
- (98) Fukamizu, A.; Ichihara, S.; Morishita, S.; Kohda, T.; Ishida, J.; Kimura, J.; Hamada, J. Evaluation of Novel Cyclic Analogues of Apelin. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22* (4), 547–552.
- (99) Jia, Z. Q.; Hou, L.; Leger, A.; Wu, I.; Kudej, A. B.; Stefano, J.; Jiang, C.; Pan, C. Q.; Akita, G. Y. Cardiovascular Effects of a PEGylated Apelin. *Peptides* **2012**, *38* (1), 181–188.
- (100) McKeown, S. C.; Zecri, F. J.; Fortier, E.; Taggart, A.; Sviridenko, L.; Adams, C. M.; McAllister, K. H.; Pin, S. S. The Design and Implementation of a Generic Lipopeptide Scanning Platform to Enable the Identification of ‘Locally Acting’ Agonists for the Apelin Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (20), 4871–4875.
- (101) Murza, A.; Parent, A.; Besserer-Offroy, E.; Tremblay, H.; Karadereye, F.; Beaudet, N.; Leduc, R.; Sarret, P.; Marsault, É. Elucidation of the Structure-Activity Relationships of Apelin: Influence of Unnatural Amino Acids on Binding, Signaling, and Plasma Stability. *ChemMedChem* **2012**, *7* (2), 318–325.

- (102) Juhl, C.; Els-Heindl, S.; Schönauer, R.; Redlich, G.; Haaf, E.; Wunder, F.; Riedl, B.; Burkhardt, N.; Beck-Sickinger, A. G.; Bierer, D. Development of Potent and Metabolically Stable APJ Ligands with High Therapeutic Potential. *ChemMedChem* **2016**, *11* (21), 2378–2384.
- (103) Gerbier, R.; Alvear-Perez, R.; Margathe, J.-F.; Flahault, A.; Couvineau, P.; Gao, J.; De Mota, N.; Dabire, H.; Li, B.; Ceraudo, E.; et al. Development of Original Metabolically Stable Apelin-17 Analogs with Diuretic and Cardiovascular Effects. *FASEB J.* **2017**, *31* (2), 687–700.
- (104) Margathe, J.-F.; Iturrioz, X.; Alvear-Perez, R.; Marsol, C.; Riché, S.; Chabane, H.; Tounsi, N.; Kuhry, M.; Heissler, D.; Hibert, M.; et al. Structure–Activity Relationship Studies toward the Discovery of Selective Apelin Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (7), 2908–2919.
- (105) Narayanan, S.; Maitra, R.; Deschamps, J. R.; Bortoff, K.; Thomas, J. B.; Zhang, Y.; Warner, K.; Vasukuttan, V.; Decker, A.; Runyon, S. P. Discovery of a Novel Small Molecule Agonist Scaffold for the APJ Receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (16), 3758–3770.
- (106) Iturrioz, X.; Gerbier, R.; Leroux, V.; Alvear-Perez, R.; Maigret, B.; Llorens-Cortes, C. By Interacting with the C-Terminal Phe of Apelin, Phe255 and Trp259 in Helix VI of the Apelin Receptor Are Critical for Internalization. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (42), 32627–32637.
- (107) Langelaan, D. N.; Bebbington, E. M.; Reddy, T.; Rainey, J. K. Structural Insight into G-Protein Coupled Receptor Binding by Apelin. *Biochemistry* **2009**, *48* (3), 537–548.
- (108) Gerbier, R.; Leroux, V.; Couvineau, P.; Alvear-Perez, R.; Maigret, B.; Llorens-Cortes, C.; Iturrioz, X. New Structural Insights into the Apelin Receptor: Identification of Key Residues for Apelin Binding. *FASEB J.* **2015**, *29* (1), 314–322.
- (109) Flahault, A.; Couvineau, P.; Alvear-Perez, R.; Iturrioz, X.; Llorens-Cortes, C. Role of the Vasopressin/Apelin Balance and Potential Use of Metabolically Stable Apelin Analogs in Water Metabolism Disorders. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8* (120), 1–14.
- (110) van Witteloostuijn, S. B.; Pedersen, S. L.; Jensen, K. J. Half-Life Extension of Biopharmaceuticals Using Chemical Methods: Alternatives to PEGylation. *ChemMedChem* **2016**, *11* (22), 2474–2495.
- (111) Hanson, G. T.; Hanson, B. J. Fluorescent Probes for Cellular Assays. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2008**, *11* (7), 505–513.
- (112) Baldini, F. Alexander P. Demchenko: Introduction to Fluorescence Sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395* (5), 1195–1196.
- (113) Wombacher, R.; Cornish, V. W. Chemical Tags: Applications in Live Cell Fluorescence Imaging. *J. Biophotonics* **2011**, *4* (6), 391–402.
- (114) Fritschy, J.; Härtig, W. Immunofluorescence. In *Encyclopedia of life sciences*; John Wiley & Sons, 2001; pp 1–7.
- (115) Yang, Y.; Zhao, Q.; Feng, W.; Li, F. Luminescent Chemodosimeters for Bioimaging. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 192–270.
- (116) Royer, C. A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (5), 1769–1784.
- (117) Deshayes, S.; Divita, G. Fluorescence Technologies for Monitoring Interactions Between Biological Molecules In Vitro. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2013; Vol. 113, pp 109–143.
- (118) Heppert, J. K.; Dickinson, D. J.; Pani, A. M.; Higgins, C. D.; Steward, A.; Ahringer, J.; Kuhn, J. R.; Goldstein, B. Comparative Assessment of Fluorescent Proteins for in

- Vivo Imaging in an Animal Model System. *Mol. Biol. Cell* **2016**, *27* (22), 3385–3394.
- (119) Ma, Z.; Du, L.; Li, M. Toward Fluorescent Probes for G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs): Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8187–8203.
- (120) Leopoldo, M.; Lacivita, E.; Berardi, F.; Perrone, R. Developments in Fluorescent Probes for Receptor Research. *Drug Discov. Today* **2009**, *14* (13–14), 706–712.
- (121) Vernall, A. J.; Hill, S. J.; Kellam, B. The Evolving Small-Molecule Fluorescent-Conjugate Toolbox for Class A GPCRs: Fluorescent Ligands for GPCRs. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171* (5), 1073–1084.
- (122) He, X.-P.; Tian, H. Lightening up Membrane Receptors with Fluorescent Molecular Probes and Supramolecular Materials. *Chem* **2018**, *4* (2), 246–268.
- (123) Altschuh, D.; Oncul, S.; Demchenko, A. P. Fluorescence Sensing of Intermolecular Interactions and Development of Direct Molecular Biosensors. *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19* (6), 459–477.
- (124) Zhang, R.; Xie, X. Tools for GPCR Drug Discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33* (3), 372–384.
- (125) Cottet, M.; Faklaris, O.; Falco, A.; Trinquet, E.; Pin, J.-P.; Mouillac, B.; Durroux, T. Fluorescent Ligands to Investigate GPCR Binding Properties and Oligomerization. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41* (1), 148–153.
- (126) Wang, L.-Y.; Zhang, D.-L.; Zheng, J.-F.; Zhang, Y.; Zhang, Q.-D.; Liu, W.-H. Apelin-13 Passes through the ADMA-Damaged Endothelial Barrier and Acts on Vascular Smooth Muscle Cells. *Peptides* **2011**, *32* (12), 2436–2443.
- (127) Andersson, H.; Baechi, T.; Hoechl, M.; Richter, C. Autofluorescence of Living Cells. *J. Microsc.* **2002**, *191* (1), 1–7.
- (128) Kuroda, T.; Satoh, Y.; Akutsu-Yamauchi, H.; Shikanai, Y. Quantitative Analysis of Photodamage during Fluorescence Bioimaging: Monitoring of Nitric Oxide Production Using DAF-2. *Bioimaging Soc.* **2006**, *16* (1), 9–18.
- (129) Margathe, J.-F.; Iturrioz, X.; Regenass, P.; Karpenko, I. A.; Humbert, N.; de Rocquigny, H.; Hibert, M.; Llorens-Cortes, C.; Bonnet, D. Convenient Access to Fluorescent Probes by Chemoselective Acylation of Hydrazinopeptides: Application to the Synthesis of TheFirst Far-Red Ligand for Apelin Receptor Imaging. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (4), 1399–1405.
- (130) Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Mohr, P. C.; Khot, G.; Rabe, J. P.; Mohr, A. Nile Red Dye in Aqueous Surfactant and Micellar Solution. *Langmuir* **2015**, *31* (9), 2639–2648.
- (131) Trappmann, B.; Ludwig, K.; Radowski, M. R.; Shukla, A.; Mohr, A.; Rehage, H.; Böttcher, C.; Haag, R. A New Family of Nonionic Dendritic Amphiphiles Displaying Unexpected Packing Parameters in Micellar Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (32), 11119–11124.
- (132) Stuart, M. C. A.; van de Pas, J. C.; Engberts, J. B. F. N. The Use of Nile Red to Monitor the Aggregation Behavior in Ternary Surfactant-Water-Organic Solvent Systems. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18* (9), 929–934.
- (133) Daban, J.-R.; Sam, M.; Bartolomi, S. Use of Nile Red as a Fluorescent Probe for the Study of the Hydrophobic Properties of Protein-Sodium Dodecyl Sulfate Complexes in Solution. *Anal. Biochem.* **1991**, *199* (2), 162–168.
- (134) Kucherak, O. A.; Oncul, S.; Darwich, Z.; Yushchenko, D. A.; Arntz, Y.; Didier, P.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. Switchable Nile Red-Based Probe for Cholesterol and Lipid Order at the Outer Leaflet of Biomembranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (13), 4907–4916.
- (135) Wang, J.; Liu, K.; Xing, R.; Yan, X. Peptide Self-Assembly: Thermodynamics and Kinetics. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (20), 5589–5604.

- (136) Dehsorkhi, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W. Self-Assembling Amphiphilic Peptides. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20* (7), 453–467.
- (137) Letchford, K.; Burt, H. A Review of the Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules and Polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65* (3), 259–269.
- (138) Plum, A.; Jensen, L. B.; Kristensen, J. B. In Vitro Protein Binding of Liraglutide in Human Plasma Determined by Reiterated Stepwise Equilibrium Dialysis. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102* (8), 2882–2888.
- (139) Roy, S. Review on Interaction of Serum Albumin with Drug Molecules. *J. Pharmacol. Toxicol. Stud.* **2016**, *4* (2), 7–16.
- (140) Bischel, H. N.; MacManus-Spencer, L. A.; Zhang, C.; Luthy, R. G. Strong Associations of Short-Chain Perfluoroalkyl Acids with Serum Albumin and Investigation of Binding Mechanisms. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30* (11), 2423–2430.
- (141) Chen, H.; He, P.; Rao, H.; Wang, F.; Liu, H.; Yao, J. Systematic Investigation of the Toxic Mechanism of PFOA and PFOS on Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Modeling. *Chemosphere* **2015**, *129*, 217–224.
- (142) Kratz, F.; Elsadek, B. Clinical Impact of Serum Proteins on Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2012**, *161* (2), 429–445.
- (143) Dagher, R.; Pigault, C.; Bonnet, D.; Boeglin, D.; Pourbaix, C.; Kilhoffer, M.-C.; Villa, P.; Wermuth, C. G.; Hibert, M.; Haiech, J. Use of a Fluorescent Polarization Based High Throughput Assay to Identify New Calmodulin Ligands. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2006**, *1763* (11), 1250–1255.
- (144) Elsadek, B.; Kratz, F. Impact of Albumin on Drug Delivery - New Applications on the Horizon. *J. Controlled Release* **2012**, *157* (1), 4–28.
- (145) Flint, A.; Nazzal, K.; Jagielski, P.; Hindsberger, C.; Zdravkovic, M. Influence of Hepatic Impairment on Pharmacokinetics of the Human GLP-1 Analogue, Liraglutide: Liraglutide Kinetics in Liver Disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2010**, *70* (6), 807–814.
- (146) Maguire, J. J.; Kleinz, M. J.; Pitkin, S. L.; Davenport, A. P. [Pyr1]Apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart: Vasoactive Mechanisms and Inotropic Action in Disease. *Hypertension* **2009**, *54* (3), 598–604.
- (147) Falcão-Pires, I.; Gonçalves, N.; Henriques-Coelho, T.; Moreira-Gonçalves, D.; Roncon-Albuquerque, R.; Leite-Moreira, A. F. Apelin Decreases Myocardial Injury and Improves Right Ventricular Function in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296* (6), 2007–2014.
- (148) Coquerel, D.; Sainsily, X.; Dumont, L.; Sarret, P.; Marsault, É.; Auger-Messier, M.; Lesur, O. The Apelinergic System as an Alternative to Catecholamines in Low-Output Septic Shock. *Crit. Care* **2018**, *22* (1), 1–7.
- (149) Medhurst, A. D.; Jennings, C. A.; Robbins, M. J.; Davis, R. P.; Ellis, C.; Winborn, K. Y.; Lawrie, K. W. M.; Hervieu, G.; Riley, G.; Bolaky, J. E.; et al. Pharmacological and Immunohistochemical Characterization of the APJ Receptor and Its Endogenous Ligand Apelin. *J. Neurochem.* **2003**, *84* (5), 1162–1172.
- (150) Vallotton, M. B. The Renin-Angiotensin System. *Trends Pharmacol. Sci.* **1987**, *8* (2), 69–74.
- (151) Verdonk, K.; Danser, A. H. J.; van Esch, J. H. M. Angiotensin II Type 2 Receptor Agonists: Where Should They Be Applied? *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21* (4), 501–513.

- (152) Wassmann, S.; Nickenig, G. Pathophysiological Regulation of the AT1-Receptor and Implications for Vascular Disease. *J. Hypertens.* **2006**, *24* (1), 15–21.
- (153) Busse, L. W.; McCurdy, M. T.; Ali, O.; Hall, A.; Chen, H.; Ostermann, M. The Effect of Angiotensin II on Blood Pressure in Patients with Circulatory Shock: A Structured Review of the Literature. *Crit. Care* **2017**, *21* (1), 324–336.
- (154) Saavedra, J. M. Brain Angiotensin II: New Developments, Unanswered Questions and Therapeutic Opportunities. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, *25* (3–4), 485–512.
- (155) Marc, Y.; Llorens-Cortes, C. The Role of the Brain Renin–Angiotensin System in Hypertension: Implications for New Treatment. *Prog. Neurobiol.* **2011**, *95* (2), 89–103.
- (156) Ruiz-Ortega, M.; Esteban, V.; Rupérez, M.; Sánchez-López, E.; Rodríguez-Vita, J.; Carvajal, G.; Egido, J. Renal and Vascular Hypertension-Induced Inflammation: Role of Angiotensin II. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2006**, *15* (2), 159–166.
- (157) Brown, N. J.; Vaughan, D. E. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation* **1998**, *97* (14), 1411–1420.
- (158) Benigni, A.; Cassis, P.; Remuzzi, G. Angiotensin II Revisited: New Roles in Inflammation, Immunology and Aging: Angiotensin II in Inflammation, Immunology, Aging. *EMBO Mol. Med.* **2010**, *2* (7), 247–257.
- (159) Corrêa, T. D.; Takala, J.; Jakob, S. M. Angiotensin II in Septic Shock. *Crit. Care* **2015**, *19* (1), 98–104.
- (160) Kluskens, L. D.; Nelemans, S. A.; Rink, R.; de Vries, L.; Meter-Arkema, A.; Wang, Y.; Walther, T.; Kuipers, A.; Moll, G. N.; Haas, M. Angiotensin-(1-7) with Thioether Bridge: An Angiotensin-Converting Enzyme-Resistant, Potent Angiotensin-(1-7) Analog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328* (3), 849–854.
- (161) Kluskens, L. D. Cyclic Angiotensin Analogs. US 8,835,375 B2, 2014.
- (162) Rosenstrom, U.; Skold, C.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Nyberg, F.; Hallberg, A.; Karlen, A. Synthesis and AT2 Receptor-Binding Properties of Angiotensin II Analogues. *J. Pept. Res.* **2004**, *64* (5), 194–201.
- (163) Dale, H. H. On Some Physiological Actions of Ergot. *J. Physiol.* **1906**, *34* (3), 163–206.
- (164) Zingg, H. H.; Laporte, S. A. The Oxytocin Receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14* (5), 222–227.
- (165) Shennan, A. H.; Smith, R.; Browne, D.; Edmonds, D. K.; Morgan, B. The Elective Use of Oxytocin Infusion during Labour in Nulliparous Women Using Epidural Analgesia. *Int. J. Obstet. Anesth.* **1995**, *4* (2), 78–81.
- (166) Baribeau, D. A.; Anagnostou, E. Oxytocin and Vasopressin: Linking Pituitary Neuropeptides and Their Receptors to Social Neurocircuits. *Front. Neurosci.* **2015**, *9* (335), 1–21.
- (167) Modi, M. E.; Young, L. J. The Oxytocin System in Drug Discovery for Autism: Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Horm. Behav.* **2012**, *61* (3), 340–350.
- (168) Muttenthaler, M.; Andersson, A.; de Araujo, A. D.; Dekan, Z.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F. Modulating Oxytocin Activity and Plasma Stability by Disulfide Bond Engineering. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (24), 8585–8596.
- (169) Hruby, V. J.; Chow, M. S. Conformational and Structural Considerations in Oxytocin-Receptor Binding and Biological Activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1990**, *30* (1), 501–534.
- (170) Bussolati, G.; Chinol, M.; Chini, B.; Nacca, A.; Cassoni, P.; Paganelli, G. ¹¹¹In-Labeled 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-Tetraacetic Acid-Lys8-

- Vasotocin: A New Powerful Radioligand for Oxytocin Receptor-Expressing Tumors. *Cancer Res.* **61** (11), 4393–4397.
- (171) Lattuada, L.; Cappelletti, E.; De Miranda, M.; Umbelli, C. Solid Phase Synthesis of Oxytocin Analogues Conjugated to Polyamino Polycarboxylic Ligands. *Lett. Org. Chem.* **2009**, *6* (8), 624–629.
- (172) Mirabeau, O.; Perlas, E.; Severini, C.; Audero, E.; Gascuel, O.; Possenti, R.; Birney, E.; Rosenthal, N.; Gross, C. Identification of Novel Peptide Hormones in the Human Proteome by Hidden Markov Model Screening. *Genome Res.* **2007**, *17* (3), 320–327.
- (173) Walewski, J. L.; Ge, F.; Lobdell, H.; Levin, N.; Schwartz, G. J.; Vasselli, J. R.; Pomp, A.; Dakin, G.; Berk, P. D. Spexin Is a Novel Human Peptide That Reduces Adipocyte Uptake of Long Chain Fatty Acids and Causes Weight Loss in Rodents with Diet-Induced Obesity: Spexin Is a Novel Human Peptide. *Obesity* **2014**, *22* (7), 1643–1652.
- (174) Ma, A.; He, M.; Bai, J.; K. H. Wong, M.; Ko, W.; O. L. Wong, A. Dual Role of Insulin in Spexin Regulation: Functional Link between Food Intake and Spexin Expression in a Fish Model. *Endocrinology* **2017**, *158* (3), 560–577.
- (175) Toll, L.; Khroyan, T. V.; Sonmez, K.; Ozawa, A.; Lindberg, I.; McLaughlin, J. P.; Eans, S. O.; Shahien, A. A.; Kapusta, D. R. Peptides Derived from the Prohormone ProNPQ/Spexin Are Potent Central Modulators of Cardiovascular and Renal Function and Nociception. *FASEB J.* **2012**, *26* (2), 947–954.
- (176) Ma, A.; Bai, J.; He, M.; Wong, A. O. L. Spexin as a Neuroendocrine Signal with Emerging Functions. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2018**, *265* (17), 90–96.
- (177) Kim, D.-K.; Yun, S.; Son, G. H.; Hwang, J.-I.; Park, C. R.; Kim, J. I.; Kim, K.; Vaudry, H.; Seong, J. Y. Coevolution of the Spexin/Galanin/Kisspeptin Family: Spexin Activates Galanin Receptor Type II and III. *Endocrinology* **2014**, *155* (5), 1864–1873.
- (178) Metcalf, C. S.; Klein, B. D.; McDougale, D. R.; Zhang, L.; Smith, M. D.; Bulaj, G.; White, H. S. Analgesic Properties of a Peripherally Acting and GalR2 Receptor-Preferring Galanin Analog in Inflammatory, Neuropathic, and Acute Pain Models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, *352* (1), 185–193.
- (179) Benyamin, R.; Trescot, A. M.; Datta, S.; Buenaventura, R.; Adlaka, R.; Sehgal, N.; Glaser, S. E.; Vallejo, R. Opioid Complications and Side Effects. *Pain Physician* **2008**, *11* (2), 105–120.
- (180) Reyes-Alcaraz, A.; Lee, Y.-N.; Son, G. H.; Kim, N. H.; Kim, D.-K.; Yun, S.; Kim, D.-H.; Hwang, J.-I.; Seong, J. Y. Development of Spexin-Based Human Galanin Receptor Type II-Specific Agonists with Increased Stability in Serum and Anxiolytic Effect in Mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (21453), 1–10.
- (181) Klymchenko, A. S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (2), 366–375.
- (182) Karpenko, I. A.; Kreder, R.; Valencia, C.; Villa, P.; Mendre, C.; Mouillac, B.; Mély, Y.; Hibert, M.; Bonnet, D.; Klymchenko, A. S. Red Fluorescent Turn-on Ligands for Imaging and Quantifying G Protein-Coupled Receptors in Living Cells. *ChemBioChem* **2014**, *15* (3), 359–363.
- (183) Nadler, A.; Schultz, C. The Power of Fluorogenic Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (9), 2408–2410.
- (184) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (3), 142–155.

- (185) Rye, H. S.; Yue, S.; Wemmer, D. E.; Quesada, M. A.; Haugland, R. P.; Mathies, R. A.; Glazer, A. N. Stable Fluorescent Complexes of Double-Stranded DNA with Bis-Intercalating Asymmetric Cyanine Dyes: Properties and Applications. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (11), 2803–2812.
- (186) Karpenko, I. A.; Collet, M.; Richert, L.; Valencia, C.; Villa, P.; Mély, Y.; Hibert, M.; Bonnet, D.; Klymchenko, A. S. Fluorogenic Squaraine Dimers with Polarity-Sensitive Folding as Bright Far-Red Probes for Background-Free Bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (1), 405–412.
- (187) Breton, C.; Scala-Guenot, D. D.; Zingg, H. H. Oxytocin Receptor Gene Expression in Rat Mammary Gland: Structural Characterization and Regulation. *J. Mol. Endocrinol.* **2001**, *27* (2), 175–189.
- (188) Frangioni, J. In Vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (5), 626–634.
- (189) Soloff, M.; Alexandrova, M.; Fernstrom, M. Oxytocin Receptors: Triggers for Parturition and Lactation? *Science* **1979**, *204* (4399), 1313–1315.
- (190) Bonnet, D.; Riché, S.; Loison, S.; Dagher, R.; Frantz, M.; Boudier, L.; Rahmeh, R.; Mouillac, B.; Haiech, J.; Hibert, M. Solid-phase Organic Tagging Resins for Labeling Biomolecules by 1,3-dipolar Cycloaddition: Application to the Synthesis of a Fluorescent Non-Peptidic Vasopressin Receptor Ligand. *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14* (20), 6247–6254.
- (191) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.
- (192) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I) - Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853–2855.
- (193) Soriano, A.; Ventura, R.; Molero, A.; Hoen, R.; Casadó, V.; Cortés, A.; Fanelli, F.; Albericio, F.; Lluís, C.; Franco, R.; et al. Adenosine A2A Receptor-Antagonist/Dopamine D2 Receptor-Agonist Bivalent Ligands as Pharmacological Tools to Detect A2A-D2 Receptor Heteromers. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (18), 5590–5602.
- (194) Michalet, X. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* **2005**, *307* (5709), 538–544.
- (195) Ballou, B.; Lagerholm, B. C.; Ernst, L. A.; Bruchez, M. P.; Waggoner, A. S. Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (1), 79–86.
- (196) Das, S.; Thomas, K. G.; Thomas, K. J.; Madhavan, V.; Liu, D.; Kamat, P. V.; George, M. V. Aggregation Behavior of Water Soluble Bis(Benzothiazolyliidene)Squaraine Derivatives in Aqueous Media. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (43), 17310–17315.
- (197) Alessi, A.; Salvalaggio, M.; Ruzzon, G. Rhodamine 800 as Reference Substance for Fluorescence Quantum Yield Measurements in Deep Red Emission Range. *J. Lumin.* **2013**, *134* (47), 385–389.
- (198) Ma, Z.; Lin, Y.; Cheng, Y.; Wu, W.; Cai, R.; Chen, S.; Shi, B.; Han, B.; Shi, X.; Zhou, Y.; et al. Discovery of the First Environment-Sensitive near-Infrared (NIR) Fluorogenic Ligand for A1-adrenergic Receptors Imaging in Vivo. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (5), 2151–2162.
- (199) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, *117* (1), 147–157.
- (200) Hancock, W. S. A New Micro-Test for the Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis Using 2,4,6-Trinitrobenzene-Sulphonic Acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71* (1), 260–264.

- (201) Christensen, T. A Qualitative Test for Monitoring Coupling Completeness in Solid Phase Peptide Synthesis Using Chloranil. *Acta Chem Scand Ser B* **1979**, 33 (10), 763–766.
- (202) Iturrioz, X.; Vazeux, G.; Célérier, J.; Corvol, P.; Llorens-Cortès, C. Histidine 450 Plays a Critical Role in Catalysis and, with Ca²⁺, Contributes to the Substrate Specificity of Aminopeptidase A. *Biochemistry* **2000**, 39 (11), 3061–3068.

Développement de conjugués peptidiques fluorocarbonés pour augmenter la stabilité plasmatique de peptides visant des récepteurs couplés aux protéines G

Résumé

Afin d'améliorer la stabilité plasmatique de peptides, nous avons développé une nouvelle stratégie basée sur l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée dans la séquence d'un peptide natif. En appliquant le concept à l'apeline-17, un peptide présentant un intérêt potentiel pour le traitement de maladies cardiovasculaires, nous avons amélioré sa stabilité plasmatique de 4 min à plus de 24 h ainsi que son efficacité *in vivo*. L'étude du mécanisme de stabilisation a permis de mettre en évidence la liaison de la fluoroapeline à l'albumine, conduisant à la protection du peptide vis-à-vis de la protéolyse. Le concept a été appliqué à d'autres peptides tels que l'apeline-13, l'angiotensine II, l'ocytocine et la spexine, démontrant ainsi l'étendue et les limitations de la méthode. Enfin, nous avons également conçu des sondes fluorescentes « turn-on » originales capables de révéler leur fluorescence uniquement après liaison au récepteur ciblé. Ces sondes pourront nous servir, par la suite, pour l'étude *in vivo* de la biodistribution des fluoropeptides.

Mots-clefs : peptides, RCPG, stabilité plasmatique, chaîne fluorocarbonée, sondes fluorescentes, thérapie.

Abstract

In order to improve the plasma stability of peptides, we have developed a new strategy based on the introduction of a fluorocarbon chain in the sequence of a native peptide. By applying this concept to apelin-17, a peptide showing a potential interest for the treatment of cardiovascular diseases, we have improved its plasma stability from 4.6 min to more than 24 h as well as its *in vivo* efficacy. The mechanism leading to the increase of plasma stability has been carefully investigated demonstrating the binding of the fluoroapeline to the albumin, leading to protection towards proteolysis. The concept has been applied to other peptides such as apelin-13, angiotensin II, oxytocin and spexine, showing the extension and the limitations of this method. Finally, we have designed original fluorescent fluorogenic probes which turn on their fluorescence only after binding to the targeted receptor. These probes could be used for *in vivo* biodistribution studies of fluoropeptides.

Keywords: peptides, GPCRs, plasma stability, fluorocarbon chain, fluorescent probes, therapy.