

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
[UMR 7200 – Laboratoire d’Innovations Thérapeutiques]

THÈSE présentée par :

Sridevi M. Ramanoudjame

soutenue le : **30 Octobre 2020**

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

Discipline/Spécialité : Chimie thérapeutique

**Synthèse de nouveaux conjugués fluorocarbonés
pour augmenter la stabilité métabolique de
peptides thérapeutiques ciblant les récepteurs
couplés aux protéines G : application aux
peptides apeline et spexine, étude
mécanistique et évaluation biologique.**

THÈSE dirigée par :

M. Dominique BONNET

Docteur, CNRS/Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Philippe KAROYAN

Professeur, Université Pierre et Marie Curie

M. Gilles SUBRA

Professeur, Université de Montpellier

EXAMINATEUR :

M. Sergio MALLART

Docteur, Sanofi Aventis

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	8
LISTE DES ABBREVIATIONS	14
INTRODUCTION	18
A. Les peptides thérapeutiques	18
1. Généralités sur les peptides	18
2. Les peptides en thérapie	19
3. Limitations dans le développement des peptides comme médicaments	22
B. Stratégies de stabilisations des peptides existantes	23
1. Modifications de la séquence et du squelette peptidique	24
a. Modification de la stéréochimie	24
b. Substitution d'acides aminés	25
c. Incorporation d'acides aminés fluorés	26
d. Renforcement des extrémités du peptide	27
e. Azapeptides	27
f. Peptoides	28
g. Hybride oligourée	30
2. Renforcement de la structure secondaire des peptides	30
a. Cyclisations des peptides	30
b. Stabilisation en hélice alpha	31
3. Introduction de groupements permettant de masquer le peptide du système enzymatique	32
a. Introduction d'une chaîne polymérique	33
b. Introduction de motifs se liant à l'albumine	35
C. Limitation des stratégies de stabilisation actuelles	38
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	41
CHAPITRE 1 - Conception et développement d'une fluoro-apeline spécifique, active, stable et biocompatible	44
A. Le système APJ/apeline et son intérêt thérapeutique	44
1. Les récepteurs couplés aux protéines G	44
2. Le récepteur APJ	47
3. Le peptide apeline	48
4. Le système APJ/apeline dans un contexte thérapeutique	49
5. Stratégies de stabilisation existantes de l'apeline	52
B. Conception, synthèse et développement de fluoro-apelines	55
1. Contexte de l'étude	55
a. Utilisation du fluor dans le domaine médical	55
b. Utilisation de fluoro-peptides dans le domaine médical	56
2. Résultats préliminaires (Thèse du Dr. Lucie Esteouille)	58
a. Principe de la stabilisation plasmatique de l'apeline-17 par l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée	58
b. Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de la F8-apeline	61
3. Etude de la dégradation enzymatique de la F8-apeline <i>in vitro</i>	64
4. Influence de la longueur et de la nature de la chaîne fluorocarbonée sur la stabilité plasmatique et la pharmacologie de l'apeline.	67
a. Contexte de l'étude	67

b.	<i>Synthèse des dérivés fluoro-apelines</i>	68
c.	<i>Influence de la longueur de la chaîne et du nombre de chaînes fluorocarbonées sur la stabilité plasmatique de l'apeline</i>	71
d.	<i>Caractérisations pharmacologiques des fluoro-apelines stabilisées</i>	72
5.	Evaluation de la toxicité des fluoro-apelines optimisées	74
a.	<i>Etude de la viabilité cellulaire</i>	74
b.	<i>Etude des interactions cellulaires non spécifiques</i>	75
c.	<i>Evaluation du pouvoir hémolytique</i>	81
6.	Evaluation des propriétés de liaison aux érythrocytes	82
7.	Etude du mécanisme de stabilisation des fluoro-apelines	83
a.	<i>Etude de l'organisation en micelles ou agrégats des fluoro-apelines</i>	83
b.	<i>Etude de la liaison à l'albumine par anisotropie de fluorescence</i>	84
a.	<i>Etudes par cristallographie de la liaison à l'albumine des fluoro-apelines modifiées.</i>	87
8.	Evaluation biologique de la fluoro-apeline optimisée	89
9.	Etudes pharmacocinétiques des fluoro-apeline optimisées.	90
C.	Conclusion du chapitre 1	92
CHAPITRE 2 - Extension du concept FluoroPep à d'autres peptides ciblant des RCPG : exemple de la spexine		
A.	Le système GalR/spexine et son intérêt thérapeutique	97
1.	Les récepteurs couplés aux protéines G de la galanine (GalR)	97
2.	Le peptide spexine	99
3.	Le système GalR / spexine	100
B.	Conception, synthèse et évaluation biologique de fluoro-spexines	103
4.	Résultats préliminaires (Thèse du Dr. Lucie Esteouille)	103
a.	<i>Stabilisation de la spexine par introduction d'une chaîne fluorocarbonée</i>	103
b.	<i>Evaluation in vivo de la F8-spexine (administration intracérébroventriculaire)</i>	104
c.	<i>Evaluation in vivo de la F8-spexine (administration intrapéritonéale)</i>	105
5.	Analyse des métabolites de la spexine et F8-spexine dans le plasma de souris	106
6.	Développement de dérivés de la spexine stables, actifs et biocompatibles	109
a.	<i>Synthèse des dérivés de la spexine</i>	109
1.	Etude de l'influence de la longueur de la chaîne et du nombre de chaînes fluorocarbonées sur l'activité fonctionnelle et la stabilité plasmatique	112
2.	Conception d'une fluoro-spexine hydrosoluble	115
3.	Développement de dérivés de la RGR-spexine stables, actifs et biocompatibles	117
a.	<i>Synthèse des dérivés de la RGR-spexine</i>	117
b.	<i>Etude de l'influence de la longueur de la chaîne et du nombre de chaînes fluorocarbonées sur la spexine</i>	119
4.	Evaluation du pouvoir hémolytique	123
5.	Evaluation des propriétés de liaison aux érythrocytes	125
6.	Evaluation de l'activité biologique <i>in vivo</i> des fluoro-RGR-spexines et fluoro-spexines optimisées dans un modèle douleur	127
7.	Etudes pharmacocinétiques	131
C.	Conclusion du Chapitre 2	133
CHAPITRE 3 - Conception d'un tripeptide fluorocarboné (TPFc) afin d'augmenter la stabilité plasmatique des peptides et permettre la synthèse des fluoro-peptides en solution		
A.	Contexte de l'étude	137
1.	Introduction	137
2.	Stratégies utilisées	137

B. Conception et synthèse de TPFC fluorocarbonés hydrosolubles cationiques et anioniques	139
1. Mise en place d'un modèle fluorescent	139
2. Optimisation des propriétés de liaison du TPFC fluorescent	140
a. Stratégie de synthèse sur support solide des TPFC fluorescents	140
b. Evaluation des propriétés de liaison à l'albumine des modèles fluorescents	142
c. Optimisation de l'affinité du TPFC pour l'albumine en jouant sur la nature du tripeptide.	144
3. Optimisation du motif fluorocarboné : introduction de pinces	149
a. Synthèse de modèles fluorescents portant des pinces fluorocarbonées	149
b. Evaluation des propriétés de liaison à l'albumine des tripeptides fluorescents portant des pinces fluorocarbonées	151
4. Mesure de l'hydrophobie des TPFC optimisés	154
C. Application de la méthode de synthèse de fluoropeptides en solution sur un peptide modèle : la spexine	155
1. Contexte de l'étude	155
2. Synthèse des dérivés de la spexine	157
a. Synthèse des précurseurs pour la cyclo-addition	157
b. Optimisation de la réaction de cycloaddition et synthèse chimique des dérivés de la spexine	159
c. Evaluation de la stabilité plasmatique et de l'activité fonctionnelle in vitro des dérivés de la spexine synthétisés en solution	161
D. Conception et synthèse d'un TPFC solubilisant et neutre	162
1. Contexte de l'étude	162
2. Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OAc) ₃)-OH	163
3. Introduction de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OAc) ₃)-OH sur le TPFC fluorescent modèle.	164
4. Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OTBDMS) ₃)-OH	166
5. Synthèse des acides aminés Fmoc-Lys(CH ₂ -CH ₂ -CO-TRIS(OTBDMS) ₃)-OH et Fmoc-Lys(CH ₂ -O-CH ₂ -CO-TRIS(OTBDMS) ₃)-OH	168
6. Introduction des Fmoc-Lys(CH ₂ -CH ₂ -CO-TRIS(OTBDMS) ₃)-OH et Fmoc-Lys(CH ₂ -O-CH ₂ -CO-TRIS(OTBDMS) ₃)-OH sur un tétrapeptide modèle.	169
E. Conclusion du chapitre 3	171
CONCLUSION GENERALE	175
EXPERIMENTAL PART	182
A. General methods	182
1. Peptide synthesis	182
a. Reagents	182
b. Automated peptide synthesis	182
c. Manual peptide synthesis	183
d. Peptide acylation	183
e. Solid-phase peptide reactions monitoring	183
f. Peptide cleavage and deprotection	184
g. Peptide purification	184
2. Chemical characterization	184
a. Reverse Phase HPLC	184
b. LC-MS	185
c. NMR	185
3. Biophysical and biochemical characterization	186
a. Plasma stability assay	186
b. Albumine binding assay and free ligand fraction calculation	186

c.	<i>Evaluation of the critical micelles concentrations</i>	187
d.	<i>Solubility evaluation</i>	188
e.	<i>Hemolysis experiments</i>	188
f.	<i>Blood partitioning</i>	188
B.	Chapter 1 : Design and development of a specific, active, stable and biocompatible fluoro-apelin	189
1.	Peptides syntheses	189
2.	Chemical Synthesis	199
3.	Enzymatic assay	202
4.	Pharmacology assays	202
a.	<i>Membrane preparations and radioligand binding experiments</i>	202
b.	<i>cAMP assay</i>	203
5.	Toxicology evaluation	203
a.	<i>Cell viability assays</i>	203
6.	Fluorescence spectroscopy and microscopy	203
a.	<i>Absorbance and fluorescence spectroscopy studies</i>	203
b.	<i>Fluorescence experiments</i>	203
7.	<i>In vivo</i> evaluations	204
a.	<i>Animals</i>	204
b.	<i>Blood pressure recording in alert rats</i>	204
c.	<i>Pharmacokinetic study in mice.</i>	204
C.	Chapter 2 : Extension of the FluoroPep strategy to other GPCR peptidic ligands : application to of spexine	205
1.	Peptide Synthesis	205
2.	Agonist activity evaluation of fluorospexin compounds	213
3.	<i>In vivo</i> evaluation	214
a.	<i>Animals</i>	214
b.	<i>CFA-induced inflammatory pain model</i>	214
c.	<i>Fluoro-peptides activity evaluation in CFA-induced inflammatory pain model</i>	214
D.	Chapter 3 : Development of fluorocarbon tripeptide conjugate (TPFc) to increase the metabolic stability of peptides and ease their synthesis in solution using a bio-conjugation reaction	215
1.	Peptide synthesis	215
2.	Chemical Synthesis	233
3.	CHI measurements	240
	BIBLIOGRAPHIE	242
	TABLE DES FIGURES	255
	TABLE DES TABLEAUX	258
	TABLE DES SCHEMAS	259

*C'est en essayant encore et encore
que le singe apprend à bondir.*

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 et Pharmacognosie sous la direction du Dr. Dominique Bonnet et financés par l'Agence Nationale de la Recherche.

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Dr. Dominique Bonnet. Merci de m'avoir fait confiance à travers ces trois années et de m'avoir accordé autant d'autonomie dans mes projets de thèse, si formateurs, pluridisciplinaires et motivants. Merci de m'avoir guidé et poussé à travers la science capricieuse et les moments difficiles. Ton encadrement a été précieux et je garderai tes nombreux conseils et suggestions à travers les années.

Je souhaite remercier les membres de mon jury. Merci au Dr. Sergio Mallart (Sanofi-Aventis Chilly Mazarin), au Pr. Philippe Karoyan (Université Pierre et Marie Curie) ainsi qu'au Pr. Gilles Subra (Université de Montpellier). Merci à vous d'avoir accepté cette invitation et de me faire l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse. En ces temps extrêmement occupés pour chacun d'entre vous, merci d'avoir accordé ce précieux temps à mon manuscrit et à mon travail.

Je souhaite maintenant remercier toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont soutenu, aidé et supporté au cours de ces années de thèse.

Je remercie les membres de l'équipe, pour les moments de convivialité, les moments de fascination devant de la belle science et surtout les moments de gentillesse absolue dont vous avez fait preuve. Merci aux nombreux membres de l'équipe Bonnet pour vos conseils et votre disponibilité. Je souhaite en particulier remercier Stéphanie, Claire et Timothé pour leurs petites attentions et les moments de complicité.

Stephou, rocher de cette équipe. Merci pour ton professionnalisme et ton efficacité. Tu le sais, j'ai une confiance absolue en toi. Merci de ton aide sur les projets et de toujours réparer nos bêtises. Donc rocher de l'équipe certes mais surtout Maman du labo. J'en viens donc à te remercier pour : ta gentillesse, ton humour, les fous rires, les moments de conseils et de soutien. Merci de m'avoir toujours motivée et incité à aller de l'avant. Merci d'avoir rendu cette thèse si agréable. Cela n'aurait pas été pareil sans toi.

TimTim, co-thésard et bouffée d'air frais de la deuxième partie de ma thèse. Merci pour ton humour de normalien (c'est pour mon fond d'écran ça), pour les clips de rotas et pour les

nombreux moments de stress ou ton soutien, ton calme et ta sérénité ont été de vraies échappatoires.

Merci aux anciens de l'équipe : Lucie E., Pierre R., Damla T. et Florent P.

Ma Tic, merci d'avoir fait de ma première année de thèse la plus parfaite. Ma co-thésarde devenue mon acolyte irremplaçable ! Merci de m'avoir intégrée, de m'avoir aidée à trouver mes marques, de m'avoir portée à travers les doutes et les difficultés. Tu as été au labo et est toujours à ce jour d'un soutien d'une stabilité infinie. Merci pour tes conseils, pour ta gentillesse sans nom, et ta bonne humeur. Je n'oublierai jamais nos virées en RMN, en anisotropie, à Techmed, chez Andrey. Je n'ose même pas imaginer à quoi aurait ressemblé cette thèse sans toi.

Merci FloFlo pour ton encadrement au début de ma thèse, pour la transmission de ta rigueur et de tes techniques.

Pedrino et TORUN, merci pour votre soutien, les fous rires, les moments de partages et les conseils au labo mais surtout après. Je n'ai aucun doute que je vous garderai près de moi malgré les chemins choisis et les villes lointaines.

Je souhaite également remercier le Pr. Marcel Hibert. Merci pour ton soutien et tes précieux conseils. Merci pour ta disponibilité et les longues conversations toujours passionnantes et surtout si riches autour de petits cafés. Merci de m'avoir accordé tant de temps et de toujours remplir de joie le chemin des personnes que tu croises. Tes créations « Made by Marcel » me rappelleront à jamais ta positivité, ton calme et tes conseils.

Merci à toi François, de ta patience, de ton aide et de ta gentillesse envers moi. Merci de ta disponibilité et m'avoir laissée assister à toutes les expériences de biologie. Tu as permis à ma thèse d'avancer à un moment critique.

Je souhaite également remercier le Dr. Didier Rognan. Merci de ta disponibilité, de tes conseils et de m'avoir guidée à travers des moments difficiles.

Merci, bien sûr à ces petites perles rencontrées à travers les années et faisant ou ayant fait partie de cette belle unité de recherche : Séverine, Camille, Patrick, Momo, Safiyat, Malick, Yann.

Un remerciement spécial à Séverine qui m'a fait grandir humainement comme professionnellement. Merci pour les moments d'écoute, de partage, pour les photos d'Hanaé pendant la rédaction (source de sourires à l'infini), les proverbes parfaits et ton soutien.

Patrick, patron, merci pour tes conseils, ta sérénité et ta capacité à apaiser toute situation.

Camille Van Wesemael (yes, sans faute !), merci pour ton soutien sans faille à travers cette dernière année. Merci de t'être adaptée à tous les rebondissements et d'avoir fait preuve d'un calme et de conseils apaisants. Les amis, j'espère toujours garder contact avec vous et en réalité je n'en doute pas.

Je voudrais maintenant remercier une personne qui est au cœur de cette unité et d'une gentillesse sans nom : David. Merci, d'avoir rendu ma thèse si simple en de si nombreux points. Ton aide, ton soutien, tes conseils et ton humour m'auront facilité ces trois années comme tu ne peux l'imaginer.

Je souhaite maintenant remercier les collaborateurs. Vous avez rendu cette thèse complète, intéressante et enrichissante.

Merci à toute la plateforme PCBIS. Cela a été un immense plaisir et une chance de travailler avec vous. Merci à Pascal, Patrick, Romain, Sarah, Claire, Sophie, Christel et Valérie. Les journées passées à vos côtés ont été mémorables et extrêmement enrichissantes.

Je souhaite remercier particulièrement Patrick qui m'a encadré pour l'ADME et la biochimie mais surtout l'ami qu'il est devenu. Merci tout d'abord de ton aide, de ton apprentissage et de ta gentillesse. Tu m'as énormément appris et l'ensemble des moments de sciences et de fous rires passés à tes côtés (avec Sarah et Claire bien-sûr !) resteront gravés dans ma mémoire. Merci Patrick de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir aidée à travers bien des étapes difficiles. Merci et pardon pour les nombreux cours de boxe, ces moments ont été relaxants, défoulants et drôles au possible. Merci à Dafne et Viggo pour les super soirées et la bouffée d'air frais que vous avez représenté au cours de cette thèse.

Merci Claire, pour ton soutien, ta gentillesse et ton professionnalisme. Merci également pour les nombreux proverbes qui ont donné place à des pépites telles que l'histoire du chou-fleur.

Merci Romain pour ton aide, le déchiffrement de mes mails incompréhensibles et ta patience. Merci de ton soutien et de ton aide, je suis arrivée au bout, tu avais raison.

Un remerciement spécial à l'équipe COVID-19. Merci de m'avoir intégré, de m'avoir fait grandir, de m'avoir montré une potentielle voie d'avenir et de m'avoir tant appris en si peu de temps. Pascal, Patrick, Claire, Romain, Adeline, François, cela fut un plaisir de partager cette période on ne peut plus étrange et à la fois aussi passionnante avec vous.

Je remercie également les collaborateurs de biologie du Collège de France (Paris) de l'équipe du Dr. Catherine Llorens Cortès. Merci à vous pour ce travail fastidieux et ces résultats. Merci Catherine, Xavier, Mathilde, Pierre-Emmanuel pour votre accueil, votre gentillesse et votre investissement.

Merci également à l'équipe du Dr. Frédérique Simonin. Cette collaboration a permis de donner un aspect thérapeutique immense à ma thèse. Un immense merci à Valérie et Glenn d'avoir réalisé l'ensemble des tests biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Je souhaite remercier l'équipe pédagogique de chimie thérapeutique. Merci du fond du cœur Marcella (et Chiara pour les petits coucou par photo), Maria, Ludivine et Sonia de m'avoir transmis votre passion pour l'enseignement. Merci de votre confiance, de votre aide et de m'avoir appris à apprendre. Merci pour ces deux années d'apprentissage et de rires.

Je souhaite à présent remercier les personnes qui m'ont mené là où j'en suis actuellement : Lucie K., Christophe D., Vy D., David T., Steven C., Alexandre R. Merci à vous de m'avoir guidé à travers les années, de m'avoir transmis vos connaissances et votre passion pour la recherche et de m'avoir motivée à choisir la voie de la science. Vous avez été mes mentors et mes sources d'inspiration jusqu'ici et cela ne changera pas.

Mes remerciements particuliers vont à Alex. Merci de m'avoir formé et forgé. Merci pour ton aide et tes superbes gestions de crises. Je pense que tu es la définition même du mentor ! Merci de ta gentillesse, de ta bienveillance et de ton soutien sans nom de mon M2 à ce jour.

J'en profite pour remercier Géraldine. Le rayon de soleil le plus brillant que j'ai eu la chance de croiser. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien et tes conseils.

Pour finir, je souhaite remercier infiniment ma famille et mes amis, eux qui ont rendu cette aventure possible.

Tout d'abord merci à mes parents de m'avoir toujours inculqué l'importance des études et le bonheur qui pouvait en émaner. Merci de votre soutien. Merci de tes conseils toujours avisés, merci pour les nombreux kilomètres parcourus maintes fois et les milliards de petites attentions Papa. Merci pour ton soutien, ta douceur et tous les petits plats et petits soins Maman. Merci pour votre confiance et pour votre réconfort à tout moment.

Merci les grands frères de votre soutien à travers les pays lointains et les décalages horaires. On retiendra Chiccos que le réseau est mauvais en Chine mais qu'il a toujours su trouver son chemin vers Strasbourg. Merci pour les nombreuses séances de massages et de marches détentes.

Merci Didou et Tonton, pour les appels visio, le soutien à distance et les moments de rires et de convivialité à chaque passage à Paris. Merci à mes petits Aksheya et Karthi pour l'amour sans condition et la joie que vous provoquez à chaque moment passé à vos côtés.

Merci à mes amis, Barbara, Deborah, Marie, Sam, Kieran, Claire de votre soutien à travers bien des épreuves et bien des années. Un remerciement spécial à Barbie pour les nombreux moments de confort food, de fous rires et de conseils.

Alex, mon Vodoo. Merci pour ton soutien, ton honnêteté et ta disponibilité depuis 10 ans déjà. Merci pour les messages vocaux de soutien et d'encouragements sans faille, ton amitié, toute ta gentillesse et ta générosité.

Ma Jadou, mon âme sœur. Merci pour ton soutien, ta bienveillance, tes conseils, ton amitié. Tu as littéralement été le rocher sur lequel je me suis reposée à travers les épreuves professionnelles et de la vie ces dernières années. Merci d'avoir toujours été là à tous moments de la journée, peu importe les circonstances. Je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu m'apportes. Merci.

Last but not least, Barbara S. A special thanks to you. For your guidance in a defining moment in my life. Thank you for your advice, your kindness, your patience and for everything you taught me. Thank you for always sending positive thoughts and for your love. I will keep everything I learned from you and became thanks to you through life.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACE – angiotensin-converting enzyme
ADME – (Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination)
AMPC – adénosine monophosphate cyclique
APFO – acide polyfluorooctanoïque
APJ / ApelinR – récepteur de l'apéline
AUC – area under the curve
Boc – tert-butyloxycarbonyl
BRET – Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA – bovine serum albumin
CAC – concentration d'agrégation critique
CaCl₂ – chlorure de calcium
cAMP – cyclic adenosine monophosphate
Caco – colorectal adenocarcinoma cells
CE₅₀ – concentration effectrice médiane
CHI – chromatography hydrophoby index
CHO – chinese hamster ovary
CFA – Freund's Complete Adjuvant
CI₅₀ – concentration d'inhibition médiane
CLHP – chromatographie liquide à haute performance
CMC – concentration micellaire critique
DCM – dichloromethane
DIC – *N,N'*-diisopropylcarbodiimide
DIEA – *N,N*-diisopropylethylamine
DLS – dynamic light scattering
DMF – *N,N*-dimethylformamide
DMSO – dimethylsulfoxyde
DPP iV – dipeptidyl peptidase IV
EC₅₀ – half maximal effective concentration
EDT – ethandithiol
EFG – Epidermal Growth Factor
EFS – Etablissement français du sang
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

eq. – equivalent
EtOH – ethanol
ESI – electrospray ionization
FDA – Food and Drug Administration
Fmoc – fluorenylmethylmethyloxycarbonyl
FRET – Förster resonance energy transfer
GalR1, 2 et 3 – récepteurs de la galanine 1, 2 et 3
GLP-1 – Glucagon-like peptide 1
GR – globules rouges
HATU – *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium
HBTU – *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HEK – human embryonic kidney
HEP-G2 – Human liver carcinoma cells
HOBt – 1-hydroxybenzotriazole hydrate
HPLC – high-performance liquid chromatography
HRMS – high-resolution mass spectroscopy
HSA – human serum albumin
IRM – Imagerie par Résonance Magnétique
K17F – apeline-17
 K_d – constante de dissociation
 K_i – constante d'inhibition
KCl – chlorure de potassium
KCN – cyanure de potassium
LH-RH (Luteinizing Hormone – Releasing Hormone)
 $MgCl_2$ – chlorure de magnésium
MeCN – acetonitrile
MeOH – methanol
Mmt – 4-monomethoxytrityl
mp – melting point
MRSA – Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MS – mass spectroscopy
NaCl – chlorure de sodium
NEP – Nephilysine
NHS – N-hydroxysuccinimide
NMR – nuclear magnetic resonance
Pbf – 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl chloride
PBS – phosphate buffered saline

pE13F - forme pyroglutamylée de l'apeline-13
PEG - polyethylene glycol
PyBOP - benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
QY - quantum yield
RAW - macrophages murins
RBC - red blood cells
RCPG - récepteur couplé aux protéines G
RSA - Relation structure activité
SPPS - solid-phase peptide synthesis
TBTA - Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
tBu - *tert*-butyl
tBuOH - *tert*-Butanol
TFA - trifluoroacetic acid
TIS - triethylsilane
TNBS - 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid
TNF - tumor necrosis factor
TPFc - Tripeptide fluorocarboné
TR-FRET - time-resolved FRET
Trt - trityl
UV - ultraviolet
wt - wild-type

INTRODUCTION GÉNÉRALE

A. Les peptides thérapeutiques

1. Généralités sur les peptides

Les peptides sont des polymères naturels d'acides aminés liés les uns aux autres par des liaisons amide appelées également liaisons peptidiques. Les peptides sont de petites protéines. En effet, le nombre exact restant arbitraire, les enchainements de moins d'une centaine d'acides aminés sont appelés peptides alors que ceux plus grands sont appelés protéines. Les acides aminés constituant les peptides, appelés acides aminés protéinogènes, sont au nombre de 22 (Figure 1). Ces acides aminés sont tous de conformation L et peuvent être classés selon leur nature (hydrophobes, chargés, etc.). A l'exception de la pyrrolysine, retrouvée uniquement dans la séquence de certaines protéines chez les Procaryotes¹, tous peuvent être retrouvés dans les séquences protéiques des Eucaryotes.

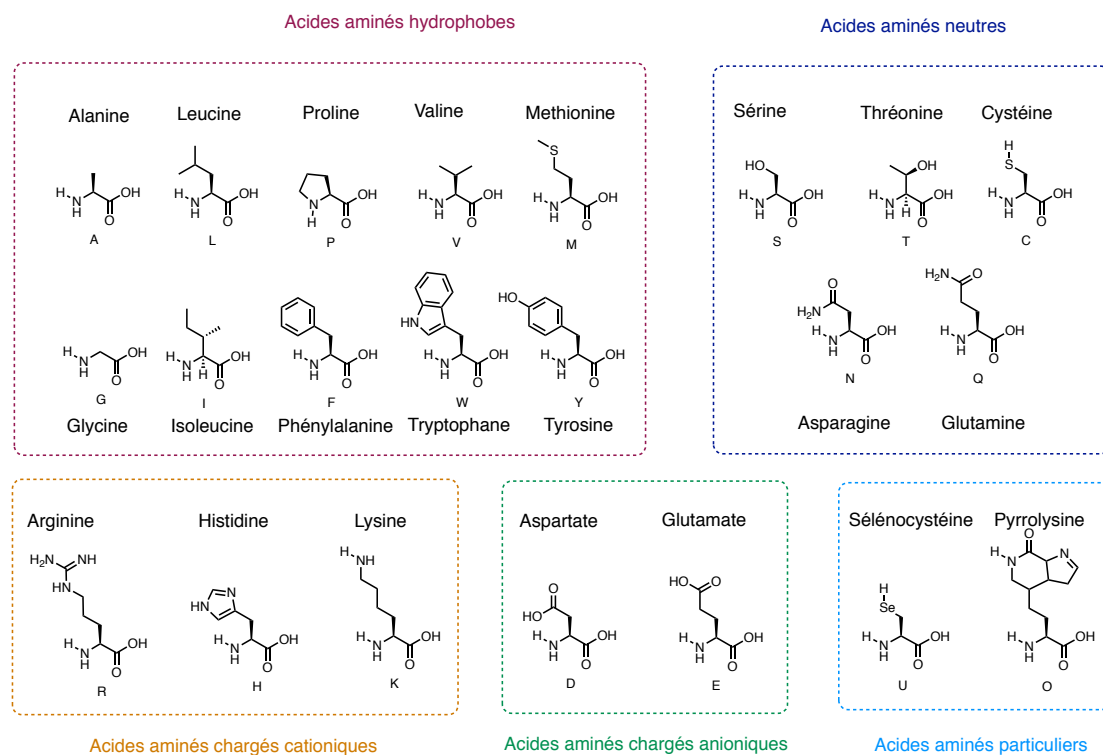


Figure 1 : Structures des acides aminés protéinogènes.

Les peptides peuvent présenter des structures secondaires (hélices alpha, feuillets beta) ou être non structurés (Figure 2) selon leur composition en acides aminés. Cette organisation en structure particulière leur est nécessaire pour remplir leurs fonctions biologiques².

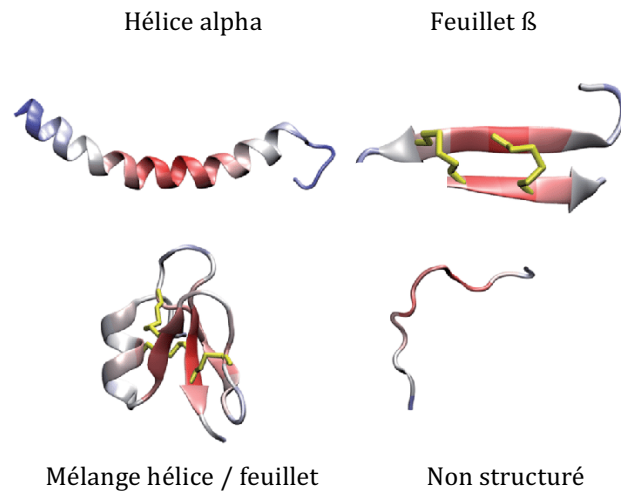


Figure 2 : Structures secondaires des peptides³.

La nature des peptides, et par conséquent leurs rôles biologiques, peuvent être variés : neurotransmetteurs⁴, hormones⁵, antimicrobiens⁶, antifongiques⁷. De par ces différents rôles, les peptides ont un intérêt grandissant dans le domaine médical.

2. Les peptides en thérapie

Les rôles variés des peptides leur ont donné une place essentielle dans le domaine thérapeutique⁸. Nombreux sont les axes thérapeutiques (inflammations associées aux cancers, maladies neurologiques, etc) dans lesquels les peptides sont utilisés comme médicaments (Figure 3).

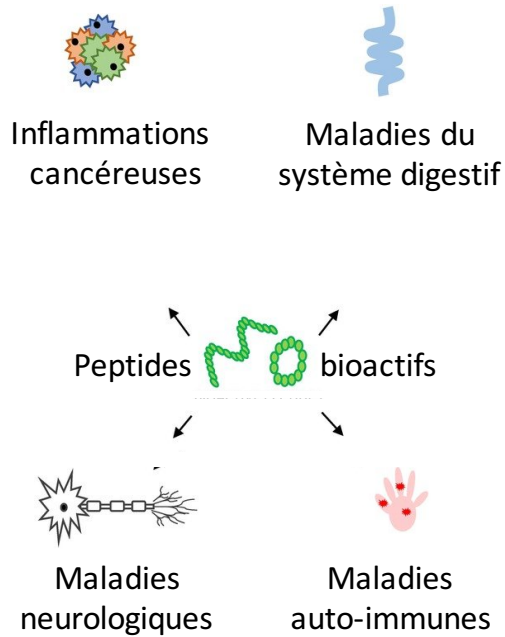


Figure 3 : Implication variée des peptides dans les maladies⁹.

Ainsi la découverte des 7000 peptides endogènes identifiés à ce jour offre une palette de peptides thérapeutique à développer dans le cadre de la recherche médicale. En effet, les peptides découverts récemment présentent de nouvelles sources de composés thérapeutiques. De ce fait, le marché des peptides médicaments est croissant et représente à ce jour 1,5 milliards de dollars américains. 400 peptides sont actuellement en cours d'évaluation clinique et 60 sont déjà approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et donc sur le marché^{10,11}. Les principaux peptides médicaments sur le marché sont indiqués en Tableau 1.

Composé actif	Indication	Entreprise
Afamelanotide	Protoporphyrine érythropoïétique	Clinuvel
Angiotensine II acetate	Hypertension réfractaire	La Jolla Pharmaceuticals
Boceprevir	Hépatite C chronique	Merck, Sharp & Dohme
Carfilzomibe	Myélome (adultes)	Amgen
Ciclosporine	Kératite (adultes)	Santen Oy
	Kerato-conjonctivite (enfants et adolescents)	
Dalbavancine	Infection bactérienne sévères de la peau	Allergan Pharmaceuticals
Etelcalcetide	Hyperparathyroïdie secondaire (adultes en insuffisance rénale)	Amgen
Exenatide	Diabète de type 2	Astrazeneca
Linaclotide	Syndrome de l'intestin irritable	Allergan Pharmaceuticals
Lixisenatide	Diabète de type 2	Sanofi Aventis
Litecium oxodotretotide	Détection de tumeurs gastropancréatiques neuroendocrine	AAA
Ombitasvir	Hépatite C chronique	Abb Vie
Oritavancine	Infection bactérienne sévères de la peau	Menarini international operations
Pasireotide	Maladie de Cushing	Novartis
Semaglutide	Diabète de type 2	Novo Nordisk
Teduglutide	Syndrome du grêle court	Shire Pharmaceuticals
Telavancine	Pneumonie nosocomiale avec MRSA	Theravance Biopharma

Tableau 1 : Noms et indications thérapeutiques des principaux peptides médicaments.

Cependant, la majorité des médicaments sur le marché sont des petites molécules. Les peptides et les petites molécules présentent des propriétés différentes (Figure 4) malgré leurs propriétés thérapeutiques communes.

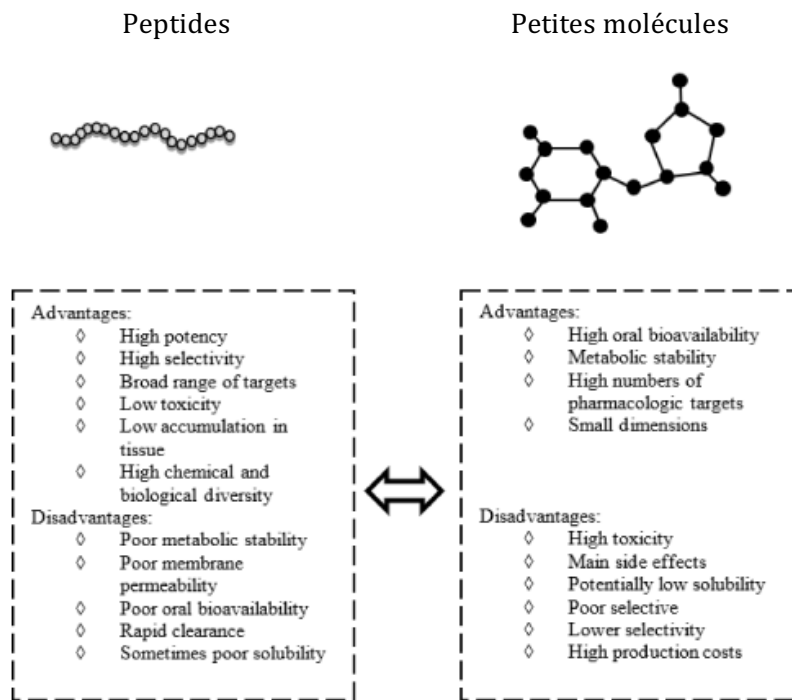


Figure 4 : Comparaison des propriétés des petites molécules et des peptides⁹.

Les petites molécules présentent par exemple des poids moléculaires plus faibles et sont plus disponibles par voie orale. En effet les peptides présentent une faible stabilité chimique et un faible passage à travers les barrières biologiques. Ces aspects les rendent peu disponibles par voie orale. Cependant, les peptides sont des molécules hautement efficaces, sélectives et s'accumulent peu dans les tissus. De plus, les peptides sont ligands de cibles très variées telles que les récepteurs couplés aux protéines G, les canaux ioniques ou encore des facteurs de transcription. Ils présentent donc des avantages certains en comparaison aux petites molécules. Ainsi le développement de peptides comme médicaments est une voie d'avenir pour la recherche médicale.

3. Limitations dans le développement des peptides comme médicaments

L'utilisation des peptides comme médicaments est prometteuse pour le développement de nouvelles thérapies dans certaines des maladies qui requièrent des traitements chroniques. Le diabète¹², les maladies neurodégénératives¹³ ou encore les polyarthrites rhumatoïdes¹⁴ en font partie. Cependant certaines limites apparaissent dans le développement des peptides en médecine. Pour certains peptides, la dénaturation physico-chimique du peptide comme la perte de la structure secondaire, la précipitation ou l'agrégation mène à la perte de l'activité biologique. Les aspects les plus problématiques pour le développement des peptides en chimie médicinale sont

cependant leur instabilité chimique, métabolique et leur clairance rénale importante¹⁵. Ils présentent généralement une stabilité métabolique relativement courte, allant de la minute à quelques heures. Ces instabilités s'expliquent par exemple par leur hydrolyse enzymatique, leur oxydation ou encore leur déamidation et conduisent alors à la formation de métabolites inactifs (Figure 5). En effet, les enzymes du système digestif et sanguin, telles que les estérases ou les protéases (exopeptidases et endopeptidases) peuvent couper les peptides à plusieurs reprises. Enfin, la taille relativement faible des peptides (< 5000 Da) les rend facilement éliminables par le système de filtration rénale.

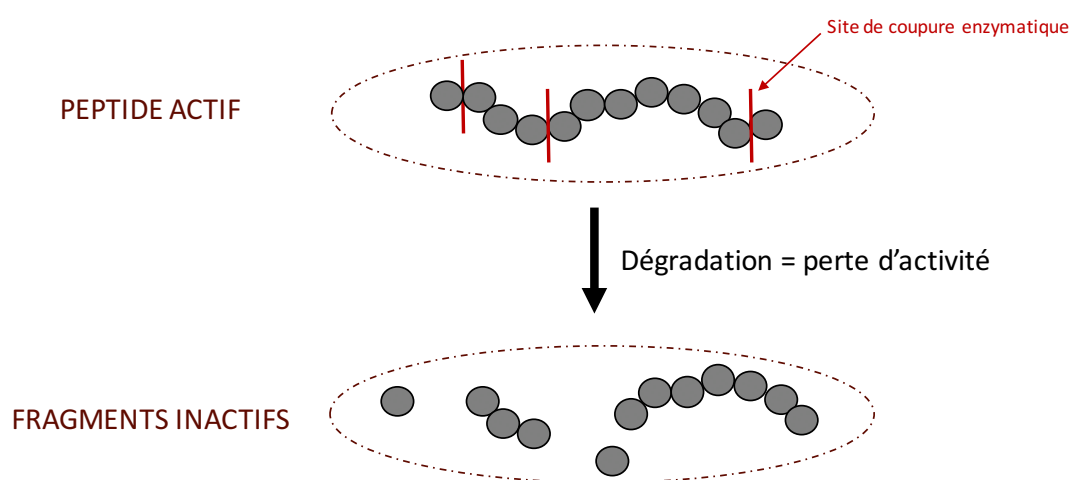


Figure 5 : Dégradation des peptides les rendant inactifs.

Afin de pallier cette instabilité, des stratégies de stabilisation des peptides ont été mises au point.

B. Stratégies de stabilisations des peptides existantes

L'objectif est de s'affranchir de cette instabilité physique et chimique des peptides les empêchant actuellement d'être exploités au maximum de leur potentiel. Les enzymes responsables de l'instabilité des peptides peuvent dégrader ces derniers par reconnaissance d'acides aminés spécifiques ou couper les liaisons amides liant les acides aminés entre eux. Différentes techniques ont été employées au cours des années pour s'affranchir de ces dégradations^{16,17,18,19} (Figure 6).

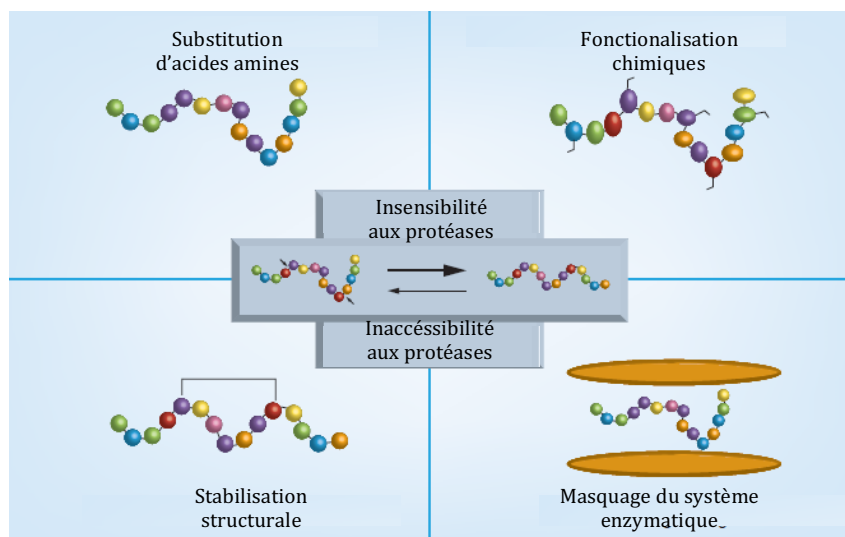


Figure 6 : Stratégies de stabilisations des peptides¹⁶.

Dans un premier temps, des modifications d'acides aminés et du squelette peptidique ont été employées. Par la suite, des méthodes de stabilisations de structures secondaires et d'introduction de polymères ou de motifs se liant à l'albumine ont été développées.

1. Modifications de la séquence et du squelette peptidique
 - a. Modification de la stéréochimie

Les peptides endogènes possèdent tous des acides aminés de la série L et les enzymes reconnaissent cette stéréochimie précise (Figure 7). Le remplacement d'acides aminés L par des acides aminés D est donc une stratégie permettant de contourner le système de dégradation de l'organisme. Ainsi la stabilité du peptide modifié est augmentée en comparaison à son analogue possédant des acides aminés naturels²⁰. Par exemple le peptide MUC-2, peptide épitope impliqué dans le cancer du côlon, présente une stabilité inférieure à un jour dans du sérum humain alors que le peptide modifié présente une stabilité supérieure à 4 jours²¹.

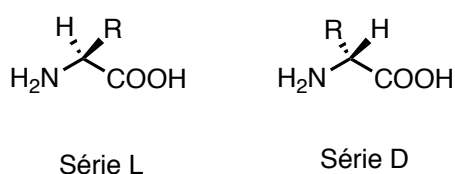


Figure 7 : Structures générales des acides aminés L et D.

Néanmoins, ce remplacement d'acides aminés peut entraîner une perte de l'activité biologique. En effet, au même titre que pour les enzymes, la stéréochimie est importante pour la reconnaissance des récepteurs et pour la liaison. Afin de pallier ce problème, des composés appelés peptides retro-inversés ont été développés (Figure 8). Tous les acides aminés sont dans un premier temps remplacés par leurs analogues de la série D. Puis la séquence des peptides est retournée (de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale).

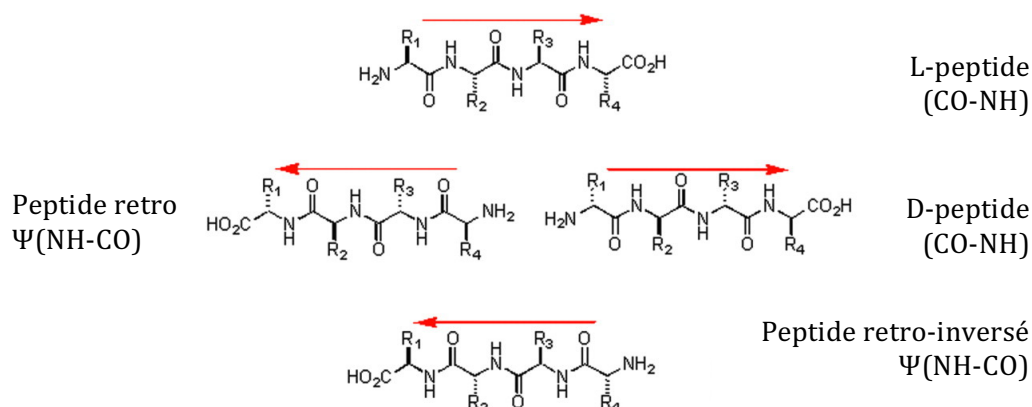


Figure 8 : Structures du L-peptide, D-peptide, retro et retro-inversé¹.

On obtient donc un peptide retro-inversé, structurellement plus proche du peptide natif que le peptide possédant uniquement des acides aminés D. Ainsi, l'activité biologique perdue peut être retrouvée^{22,23}.

b. Substitution d'acides aminés

La reconnaissance des sites spécifiques par les protéases résulte en la dégradation des peptides. La première étape consiste donc à supprimer ces sites de reconnaissance par l'introduction d'acides aminés non reconnus par le système enzymatique de l'organisme^{16,24,25}. Afin d'effectuer cette substitution d'acides aminés, il est nécessaire de réaliser plusieurs étapes préalables. Tout d'abord, les sites de coupure doivent être déterminés par incubation des composés dans le plasma et analyses des métabolites formés. Cela permet de déterminer quels acides aminés il est nécessaire de substituer. Ensuite, une étude de relation structure-activité doit être effectuée. Ces études permettent de corréliser l'activité biologique et l'acide aminé modifié. Ainsi, il est possible de déterminer quelles positions sont nécessaires pour maintenir l'activité. Enfin l'introduction d'acides aminés non naturels à la place des acides aminés aux positions

reconnues par les enzymes est effectuée. Pour cela, plusieurs familles d'acides aminés ont été développés (Figure 9).

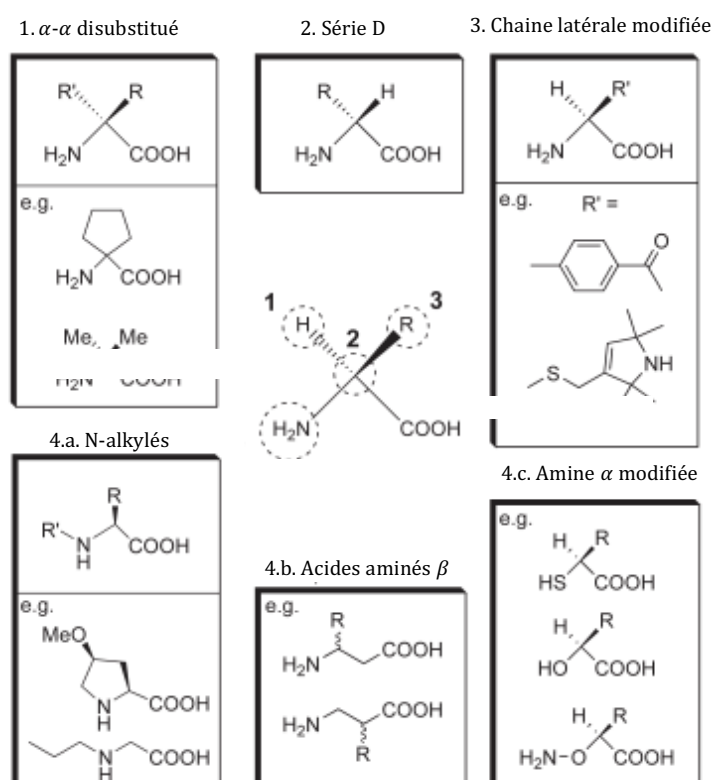


Figure 9 : Familles d'acides aminés non naturels²⁶.

L'incorporation d'acides aminés β ²⁷, N-alkylés²⁸ ou encore α - α di-substitués²⁹ est une stratégie qui a prouvé son efficacité dans l'augmentation de la stabilité plasmatique. Par exemple, le peptide I08, inhibiteur de l'agrégation de l'amyline impliquée dans le développement de maladies neurodégénératives, a pu être stabilisé par introduction d'acides aminés N-méthylés. L'analogue N-méthylé N1-I08 a montré un temps de demi-vie supérieur à 24 h dans le plasma humain alors que le peptide natif a une stabilité inférieure à 3 h^{28,28}. Cependant, des changements de nature d'acides aminés, comme indiqué précédemment, impliquent l'introduction dans l'organisme de peptides non naturels. Une toxicité peut donc potentiellement être associée à ces modifications. L'utilisation de cette méthode nécessite, comme précédemment, identifier les acides aminés importants pour la liaison au récepteur ainsi que les sites de coupure.

c. Incorporation d'acides aminés fluorés

L'incorporation d'acides aminés fluorés (Figure 11) est également une méthode de stabilisation des peptides qui permet de protéger le peptide de la reconnaissance

enzymatique^{30,31,32}. La compatibilité de ces acides aminés avec le maintien de l'activité biologique et de la structuration naturelles des macromolécules a été montrée³³. Pour le peptide GLP-1 présentant une stabilité de quelques minutes dans le plasma humain, l'introduction d'une hexafluoroleucine en position 8 et 9 a permis de s'affranchir totalement de la coupure du peptide par l'enzyme DPP IV jusqu'à 24 h³⁴. Ainsi l'introduction d'un acide aminé fluoré dans la séquence d'un peptide peut permettre de protéger le peptide vis-à-vis d'enzymes efficacement.

d. Renforcement des extrémités du peptide

Les extrémités N-terminale et C-terminale des peptides sont sujettes à des dégradations par les exopeptidases (aminopeptidases ou carboxypeptidases). En effet, ces enzymes reconnaissent les extrémités et clivent le peptide le rendant inactif. L'une des approches pour augmenter la stabilité plasmatique des peptides est donc la protection de ces extrémités^{24,25}. Pour cela différentes stratégies existent (Figure 10).

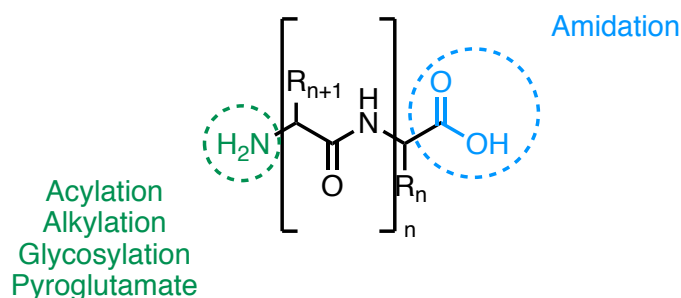


Figure 10 : Protections des extrémités du peptide.

Différentes fonctionnalisations peuvent être effectuées sur l'amine de l'extrémité C-terminale telles que les acylations³⁵, les alkylations³⁶ et l'introduction d'un glucoside³⁷ ou d'un pyroglutamate³⁸. Pour la partie C-terminale, l'amidation est la protection la plus courante qui permet de limiter les détéctions par les enzymes. Par exemple, le peptide MART-I27-35, peptide épitope des lymphocytes T cytotoxiques impliqués dans des processus cancéreux, a pu être stabilisé par acétylation de l'amine en N-terminale. Son temps de demi vie de 22 secondes dans le plasma humain a pu être amélioré à plus de 20 h³⁹. Ainsi des protections ont été développées afin de limiter la dégradation des extrémités des peptides par le système enzymatique.

e. Azapeptides

La modification du squelette peptidique est une autre stratégie utilisée pour augmenter la stabilité plasmatique des peptides. ^{40, 41, 42} En effet, si les chaînes latérales des acides aminés représentent le principal type de reconnaissance enzymatique, les liaisons peptidiques sont également reconnues, notamment par les endopeptidases. Ainsi, les peptides présentant une modification du squelette peptidique, appelés pseudopeptides, présentent une protection vis-à-vis de la dégradation enzymatique. Les azapeptides sont des pseudopeptides présentant un azote en remplacement de l'amine alpha des peptides naturels (Figure 11).

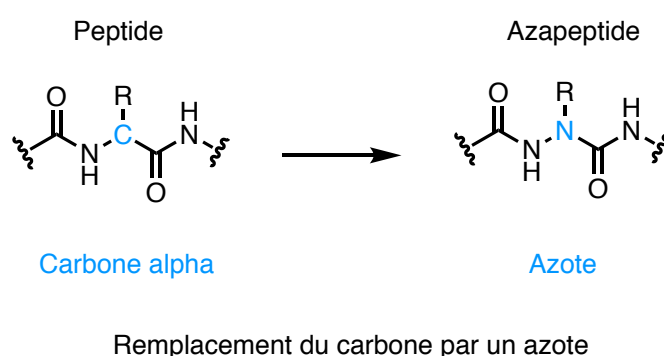
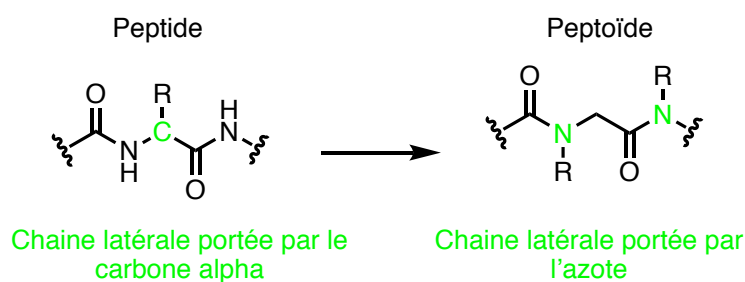


Figure 11 : Structure d'un peptide et d'un azapeptide.

Ces azapeptides développés afin de s'affranchir des problèmes de protéolyse enzymatique⁴³ ont montré un réel potentiel thérapeutique⁴⁴. Par exemple, le peptide Akt-01, inhibiteur de la protéine AKT impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, a pu être stabilisé par la modification de son squelette carboné. Le peptide natif est dégradé totalement dans le plasma humain dès 6 h alors que les azapeptides dérivés du peptide Akt-01 présentent une dégradation totale après 12 h. De plus, l'azapeptide gosereline, une hormone de la famille des LH-RH (Luteinizing Hormone – Releasing Hormone), est aujourd'hui utilisé pour traiter les cancers de la prostate et du sein⁴⁵. Cela met en avant la biocompatibilité de ces pseudopeptides développés.

f. Peptoides

Les peptoïdes sont des pseudopeptides au sein desquels les chaînes latérales des acides aminés ne sont plus portées par le carbone alpha mais par l'azote de l'amine alpha (Figure 12).



Modification de l'emplacement de la chaine latérale

Figure 12 : Structure d'un peptide et d'un peptoïde.

Les peptoïdes, ont été développés par l'équipe de Marlowe, en 1992, pour faciliter la découverte de nouveaux agents thérapeutiques⁴⁶. 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. Ainsi la stabilité plasmatique des peptoïdes est augmentée en comparaison avec le dérivé peptidique. Par exemple un peptide antimicrobien a été modifié afin d'obtenir un hybride peptide/peptoïde (Figure 13-A) et un peptoïde (Figure 13-B)

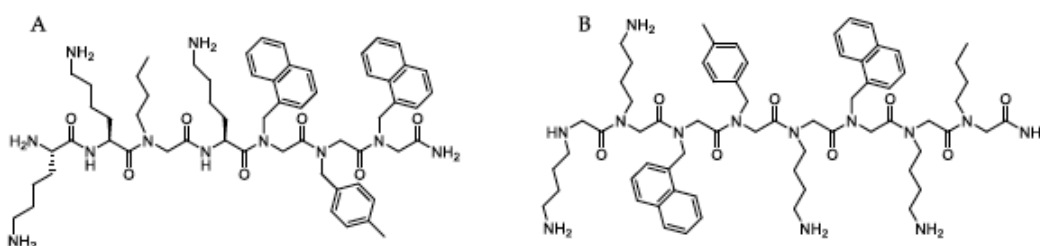


Figure 13 : structure de l'hybride peptide/peptoïde (A) et du peptoïde (B) antimicrobiens⁴⁷.

Le temps de demi-vie du composé hybride A dans le plasma isolé de chien est de 28,9 min alors que celui de peptoïde B est supérieur à 120 min. Ainsi le passage d'un composé hybride à un peptoïde permet une augmentation de la stabilité plasmatique d'un facteur supérieure à 4. De plus, la stabilité microsomale de ces deux composés a été mesurée. Cette étude a montré que 77% du composé A était retrouvé après 1 h d'incubation dans des microsomes de chien et humains. Pour le composé B, 100% de peptoïde a pu être retrouvé dans les mêmes conditions. En plus de l'augmentation de la stabilité métabolique, cette liaison amide modifié permet d'obtenir de meilleures propriétés ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination)⁴⁷. De nombreux peptoïdes ont été synthétisés à ce jour avec des applications dans des domaines thérapeutiques variées telles que les maladies neurodégénératives ou encore

l'obésité^{48,49,50}. Le développement de cette catégorie de pseudopeptide est donc prometteuse dans le domaine pharmaceutique^{51,52,53}.

g. Hybride oligourée

L'une des méthodes de modifications du squelette carboné récemment mise en avant est la présence de motifs urées en remplacement de la liaison amide classique (Figure 14). Des résidus oligourées ont ainsi été développés.

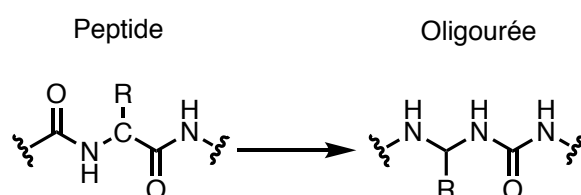


Figure 14 : Structure d'un peptide et d'un peptide-oligourée.

Ces résidus non naturels permettent de rendre le peptide-oligourée stable vis à vis de la dégradation enzymatique. Par exemple, le peptide GLP-1 dont la stabilité plasmatique est de quelques minutes dans le plasma de souris a pu être stabilisé par cette technique. En effet, le remplacement des trois résidus C-terminaux du peptide (positions 29 à 31) a permis d'augmenter la stabilité plasmatique du dérivés hybride oligourée à plus de 60 minutes⁵⁴. Cette méthode de stabilisation, qui de plus ne nécessite pas une modification complète de tous les résidus peptidiques semble prometteuse. Ces oligourées ont notamment pu mettre en avant des propriétés de stabilisation des hélices alpha.

2. Renforcement de la structure secondaire des peptides

Plusieurs méthodes permettent de stabiliser les peptides tels que les techniques de cyclisations et de stabilisations d'une hélice alpha. En effet, cela permet de limiter l'accès des enzymes aux sites de reconnaissance puisque le peptide modifié est contraint^{55,56}. Ces deux techniques permettent donc de structurer le peptide différemment afin d'éviter la reconnaissance enzymatique et ainsi augmenter la stabilité plasmatique.

a. Cyclisations des peptides

Différentes stratégies pour cycliser les peptides sont décrites à ce jour⁵⁶. Selon les fonctions chimiques présentes sur les chaînes latérales des acides aminés et la nature des extrémités du peptide, plusieurs types de cyclisations sont envisageables (Figure 15).

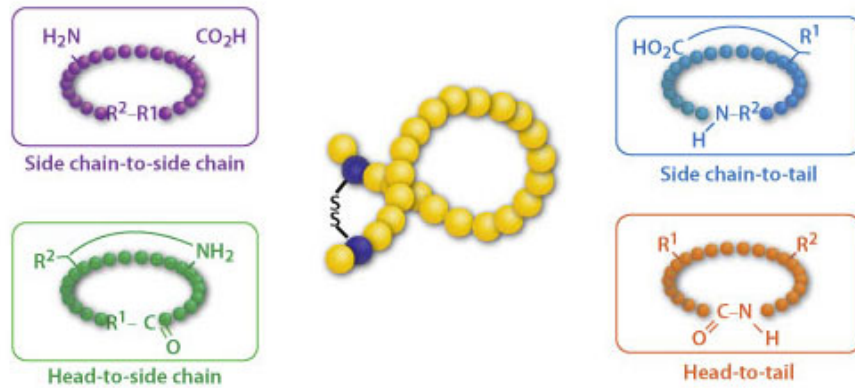


Figure 15 : Différentes stratégies de cyclisation des peptides (Bio-Synthesis).

La cyclisation entre les extrémités du peptide implique la formation d'un amide. Celui-ci permet de protéger le peptide de la coupure enzymatique par les exopeptidases reconnaissant les extrémités des peptides. La cyclisation entre deux chaînes latérales d'acides aminés naturels s'effectue généralement par formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéines ou par formation d'un pont lactame entre une lysine et un acide aspartique ou glutamique. Par exemple dans le cas du peptide Lcf1 de séquence RRWQWR, la cyclisation entre les extrémités du peptide a permis de passer d'une stabilité de 30 min dans du plasma humain isolé à plus de 24 h^{57,58}. Il est également possible d'introduire des acides aminés non naturels afin de cycliser le peptide à des positions particulières et ainsi induire une stabilisation conformationnelle.

b. Stabilisation en hélice alpha

Différentes stratégies pour structurer les peptides en hélice- α existent. L'insertion d'acides aminés permettant d'induire des liaisons hydrogène ou encore des techniques de cyclisations basées sur l'introduction d'acides aminés non naturels en font partie. Des études structurales d'hélices alpha ont mis en avant l'importance de stabiliser les résidus situés en positions $i, i+3$; $i, i+4$ ou $i, i+7$. Ainsi, il est possible de structurer le peptide en hélice- α en mimant ces liaisons hydrogènes⁵⁹. Différents types de liaison peuvent être utilisés telles que les lactames⁶⁰, les triazoles⁶¹, les groupements

biphényles⁶² ou encore les agrafes hydrocarbonées⁵⁶. Cette dernière repose sur l'utilisation d'acides aminés portant un alcène sur la chaîne latérale permettant de former des oléfines par une réaction de métathèse d'oléfine (Figure 16).

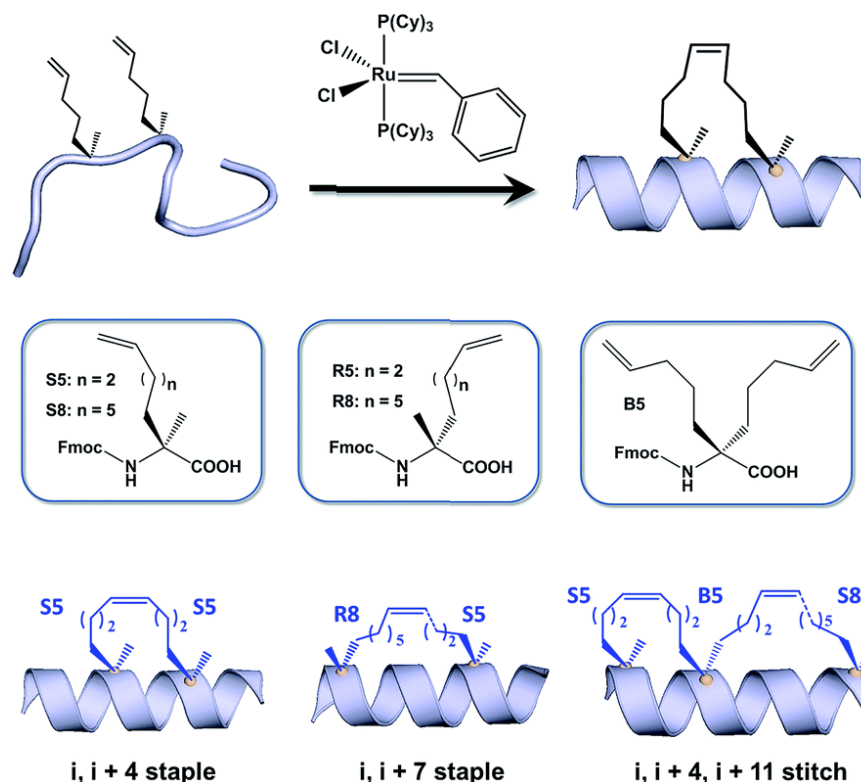


Figure 16 : Formation d'une agrafe hydrocarbonée (et résidus non naturels impliqués) pour stabiliser une hélice alpha⁶³.

Ces agrafes permettent d'une part d'augmenter la stabilité plasmatique des peptides et d'autre part leur perméabilité membranaire. De par ces propriétés, les peptides agrafés présentent un vrai intérêt dans le domaine médical et plus précisément dans le ciblage de molécules intracellulaires comme en oncologie. Par exemple le peptide BID BH3, impliqué dans les voies d'activation de l'apoptose, présentait une demi-vie dans le sérum de 3 h. Sa modification par une agrafe *i, i+4* a permis d'augmenter sa stabilité jusqu'à 29 h⁶⁴. De plus, un autre peptide ALRN 6924, développé par le laboratoire du Pr. Verdine, est actuellement en phase 2a clinique dans le cadre du développement d'un traitement pour les tumeurs solides et des lymphomes (NCT02264613). Cela met en avant la biocompatibilité des techniques de stabilisation des structures secondaires.

3. Introduction de groupements permettant de masquer le peptide du système enzymatique

L'introduction de groupements polymériques tels que les polysaccharides ainsi que la liaison covalente ou non à l'albumine sont des méthodes très utilisées dans le domaine de la stabilisation des peptides⁶⁵. En effet, ces techniques permettent de masquer le peptide du système enzymatique et ainsi augmenter leur stabilité plasmatique.

a. Introduction d'une chaîne polymérique

L'introduction d'une chaîne polymérique sur un peptide permet d'avoir un groupement induisant un encombrement stérique qui va masquer le peptide du système enzymatique de l'organisme. Cela permet donc de diminuer efficacement la dégradation des peptides par les enzymes. De plus, l'augmentation du poids moléculaire du peptide natif par cette méthode entraîne une limitation de la filtration rénale, responsable du faible temps de demi-vie pour certains peptides.

i) Introduction d'un polyéthylène glycol (PEG)

Les chaînes PEG 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 ϵ de la lysine ou la fonction thiol d'une cystéine⁶⁶. Afin de conserver l'entière activité thérapeutique du peptide, le site d'introduction des chaînes PEG sur le peptide et leurs caractéristiques (longueur, structure chimique, embranchement) doivent être précisément étudiés. Ainsi, l'encombrement stérique induit, permet de pallier la faible stabilité dans l'organisme des peptides (Figure 17). Par exemple, l'endostatine, un peptide anti-fibrotique, est éliminé chez le rat en 3,9 h. L'introduction d'un PEG 2000 a permis de stabiliser ce peptide et d'augmenter son temps de résidence dans l'organisme d'un facteur 15 (élimination après 60 h)⁶⁷. Ainsi cette méthode est très efficace pour limiter la dégradation des peptides.

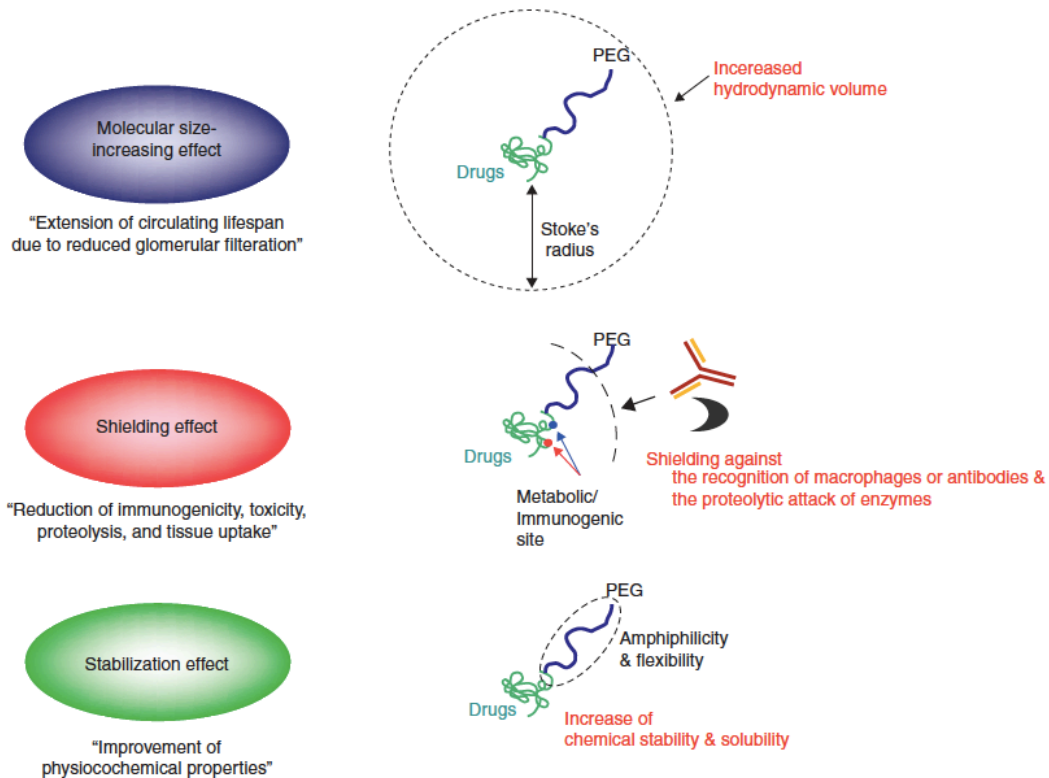


Figure 17 : Principe de l'augmentation de la stabilité des peptides par introduction de groupements PEG⁶⁸.

En plus des éléments précédemment cités, la présence des PEG permet d'augmenter l'hydrophilie des peptides induisant ainsi une augmentation de la solubilité. Enfin, des peptides stabilisés par cette stratégie sont sur le marché tels que les interféron- $\alpha 2b$ ⁶⁹ et inésatide pégylés⁷⁰.

ii) Introduction de polysaccharides

L'autre méthode basée sur l'utilisation de polymères pour augmenter la stabilité métabolique des peptides est l'introduction de polysaccharides⁶⁵. Cette méthode a été inspirée par la nature puisque 50% des protéines naturellement synthétisées dans l'organisme présentent cette modification post-traductionnelle. Celle-ci permet notamment d'augmenter la stabilité en protégeant le peptide de sites de coupures enzymatiques⁶⁵. Différents polysaccharides peuvent être introduits tels que le dextran, l'amidon d'hydroxyéthyle, les acides polysialiques ou encore l'acide hyaluronique (Figure 18).

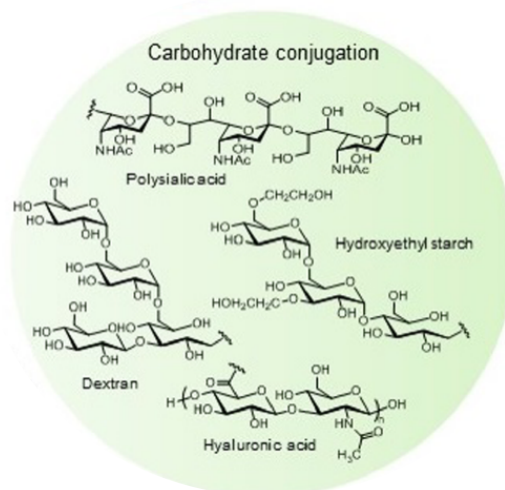


Figure 18 : Polysaccharides classiquement utilisés pour la stabilisation de peptides et protéines⁶⁵.

Le mécanisme de protection des peptides par introduction d'un polysaccharide est similaire à la chaîne pégylée. En effet, l'augmentation du rayon hydrodynamique confère une protection du peptide vis-à-vis du système enzymatique mais également une diminution de la clairance rénale. Par exemple, la protéine EGF (Epidermal Growth Factor), notamment impliquée dans la régénération cutanée, conjuguée à du dextran a permis d'obtenir une activité prolifératrice maximale à 5 jours après incubation avec des cellules Hep2 (cellules de carcinome). Sans le polysaccharide, le composé EGF a montré une activité maximale à 3 jours. De par leur origine naturelle, la majorité de ces dérivés de polysaccharides sont entièrement biocompatibles et métabolisés dans l'organisme.

b. Introduction de motifs se liant à l'albumine

La liaison à l'albumine est une stratégie de stabilisation également utilisée pour augmenter la stabilité des peptides. Cette stratégie permet de se lier covalamment ou non à l'albumine. Cette dernière est une protéine de 66 kDa, la plus abondante dans le sang. Elle représente plus de 50% des protéines plasmatiques et, de par son poids moléculaire, permet de masquer les molécules et macromolécules des éléments du plasma qui peuvent les dégrader. Son temps de demi-vie plasmatique, de l'ordre de 19 jours chez l'Homme, lui confère la capacité de protéger les composés se liant à elle pour plusieurs heures voire plusieurs jours. Elle présente donc les avantages d'un poids moléculaire important, une abondance plasmatique ainsi qu'une élimination lente de la circulation sanguine. Tous ces aspects en font une cible de choix pour véhiculer des agents thérapeutiques qui présentent une faible stabilité plasmatique. Les acides gras

notamment présentent différents sites de liaison à la HSA (FA1 à FA7). De plus, de nombreux composés actuellement sur le marché se lient à différentes poches de l'albumine (Figure 19).

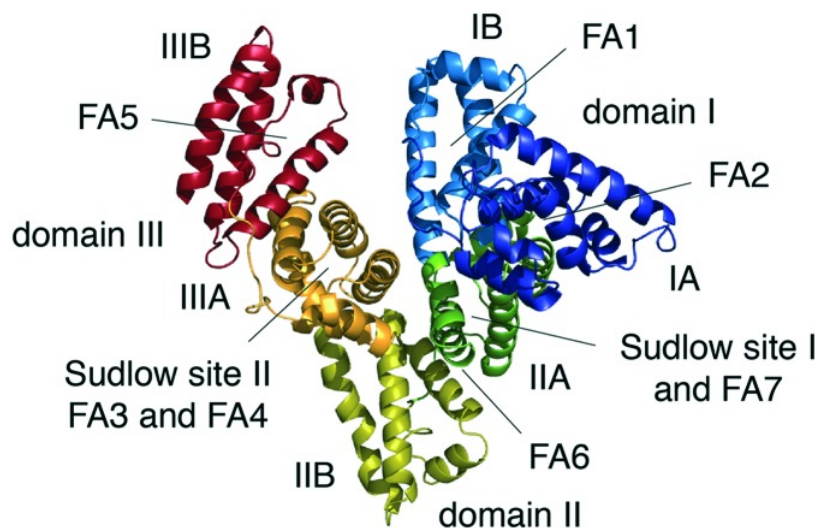


Figure 19 : Représentation tridimensionnelle de l'albumine humaine et mise en évidence des différents sous unités et sites de liaison aux médicaments⁷¹.

Cela met en avant l'aspect prometteur de cette méthode. C'est pourquoi, 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 hydrophobe réversible qui s'effectue *in vivo*.

i) Liaison covalente à l'albumine

La liaison covalente entre un composé et l'albumine fait intervenir l'unique résidu cystéine de l'albumine sérique humaine. Cette liaison est dépendante de la nucléophilie de la cystéine. Il est donc nécessaire d'introduire un groupement réactif adéquat sur le peptide. Pour cela, une fonction maléimide est généralement introduite dans la séquence du peptide. Une addition de Michael permet ensuite de lier le peptide à l'albumine de manière covalente⁷² (Figure 20).

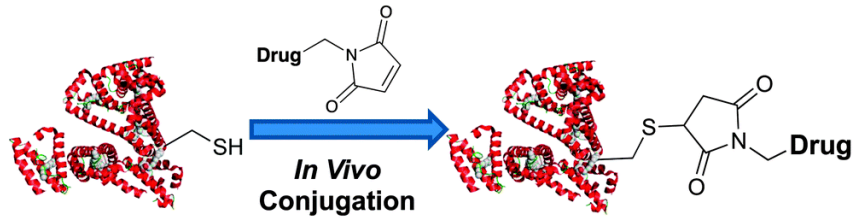


Figure 20 : Liaison covalente d'un composé actif à l'albumine⁷².

Tout comme précédemment, la gêne stérique induite par la taille de l'albumine permet de masquer le peptide de la dégradation enzymatique et une diminution de la clairance rénale⁶⁵. Par exemple, le peptide conjugué à la HSA PC-1505, inhibiteur de l'entrée du virus VIH dans les cellules hôtes, a atteint un temps de demi-vie plasmatique *in vivo* chez le rat supérieur à 24 h. En revanche, le peptide non conjugué à l'albumine (C 34) présente un temps de demi-vie de quelques minutes⁷³. Un autre peptide conjugué covalamment avec l'albumine humaine est l'albiglutide, commercialisé comme antidiabétique pour les diabétiques de type 2 en traitement hebdomadaire. Le temps de demi-vie plasmatique chez l'Homme de ce composé est de 5 jours⁷⁴ alors que ses analogues présentent un temps de demi-vie de plusieurs heures. Ainsi cette méthode de stabilisation permet de grandement améliorer la stabilité plasmatique des peptides.

ii) Liaison non covalente à l'albumine

Si des petites molécules sont décrites pour se lier à l'albumine et permettre la liaison non covalente des composés bioactifs à celle-ci^{71,75}, la méthode principale consiste en l'introduction d'une chaîne lipidée dans la séquence du peptide. La lipodation des peptides et des protéines est une modification post-traductionnelle courante. De plus, des études structurales de l'albumine ont mis en avant 7 sites de liaison aux acides gras⁷⁶. C'est pourquoi, l'augmentation de la stabilité plasmatique des peptides et protéines par introduction d'une chaîne lipidée a été développée (Figure 21).

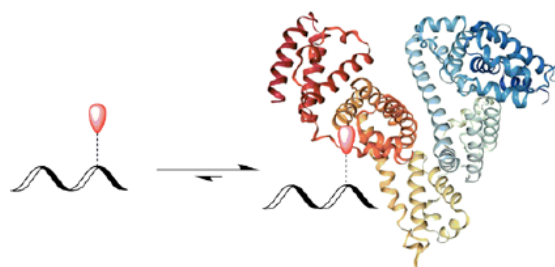


Figure 21 : Liaison non covalente des peptides à l'albumine⁷⁵.

Cette stratégie a permis par exemple au peptides GLP-1 de voir son temps de demi-vie plasmatique chez l'Homme augmenter de quelques secondes à 13 h avec le développement du liraglutide (Figure 22) ⁷⁷. Ce peptide lipidé, actuellement sur le marché, est prescrit comme traitement du diabète de type 2 en injection quotidienne.

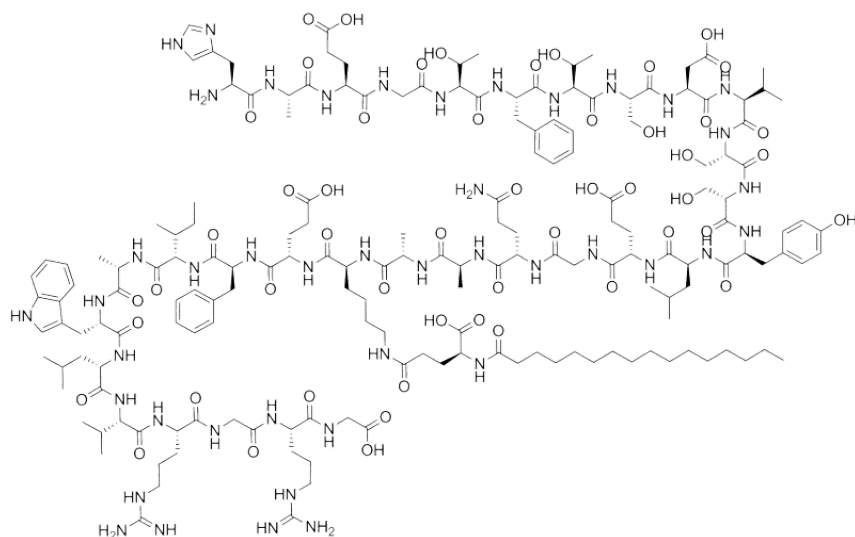


Figure 22 : Structure du liraglutide.

Ainsi, la liaison non covalente à l'albumine est une stratégie très efficace pour l'extension du temps de demi-vie plasmatique de peptides.

C. Limitation des stratégies de stabilisation actuelles

Comme indiqué précédemment, les techniques de stabilisations développées à ce jour sont nombreuses et variées. Ces techniques isolées ou en combinaison les unes avec les autres permettent d'augmenter efficacement la stabilité plasmatique des peptides. Cependant, ces techniques peuvent être coûteuses et fastidieuses notamment par les études de relations structure-activité poussées qu'il est nécessaire d'effectuer pour leur réussite (Figure 23). En effet, les modifications d'acides aminés et du squelette peptidique nécessitent de nombreuses étapes telles que des Ala-scans et des D-scans afin d'identifier les résidus essentiels à la liaison des peptides avec leur récepteur. Il est ensuite nécessaire d'identifier puis de substituer les résidus sensibles à une dégradation chimique en enzymatique tout en évaluant l'activité fonctionnelle du peptide modifié par des études de relations structure-activité. En effet, ces modifications peuvent entraîner une perte importante de l'activité biologique.

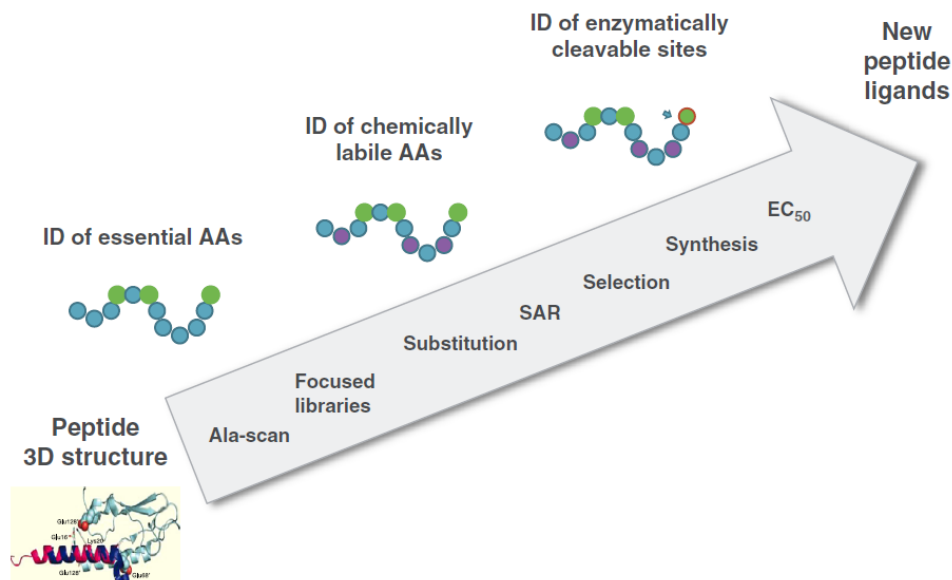


Figure 23 : Stratégie de développement classique pour la conception de peptides thérapeutiques⁷⁸.

Ces mêmes étapes sont nécessaires pour les modifications de structures peptidiques telles que les cyclisations par ponts lactames ou suite à l'introduction d'acides aminés non naturels (peptide agrafés).

Dans le cas de l'introduction d'une chaîne polymérique ou lipidique, les longues étapes décrites précédemment ne sont pas réalisées. Ces stratégies sont donc beaucoup moins coûteuses et chronophages que les précédentes. Des études de relations structure-activité (RSA) sont toutefois nécessaires, afin de vérifier l'activité du peptide modifié, mais elles restent moins poussées que précédemment. Cependant certaines réserves ont été émises concernant ces méthodes indiquant que celles-ci présentent également des limitations. Notamment le développement chez l'Homme d'anticorps anti-PEG a été mis en avant^{79,80}. Cela montre donc que la pegylation induit à long terme de l'immunogénicité chez l'Homme⁸¹. De plus, si la lipodation est un moyen efficace d'augmenter la stabilité plasmatique des peptides, les lipo-peptides antimicrobiens ont montré une forte cytotoxicité⁸² et une activité hémolytique importante⁸³.

Ainsi, bien que des techniques de stabilisations plasmatiques des peptides efficaces existent, elles peuvent montrer des limitations et une potentielle toxicité. L'objectif de cette thèse est donc de développer un outil de stabilisation peptidique alternatif à ceux existants.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

L'objectif général de ma thèse est de développer une stratégie de stabilisation des peptides biologiquement actifs, complémentaire et alternative de celles préexistantes.

La stratégie de stabilisation précédemment développée au laboratoire repose sur l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée de formule $CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-$ (chaîne F8) en partie N-Terminale de peptides biologiquement actifs. La preuve de concept de cette stratégie de stabilisation, appelée FluoroPep, a été effectuée sur un peptide modèle du laboratoire : l'apéline-17. Ce peptide a un temps de demi-vie de quelques minutes dans le plasma humain. L'apéline stabilisé par la chaîne F8, F8-apéline, a permis d'atteindre une stabilité *in vitro* de plus de 24h.

Le premier objectif de ma thèse porte sur la compréhension de la stabilisation de la F8-apéline par l'utilisation de différentes méthodes de biophysiques. L'augmentation de la stabilité accrue de l'apéline par l'utilisation de la méthode FluoroPep rend cette dernière très prometteuse. Néanmoins elle n'a jamais été étudiée auparavant et toute sa caractérisation reste à effectuer. Cette étude doit permettre de développer une fluoro-apéline active, stable, spécifique et biocompatible. Pour cela une étude de relation structure-activité autour de la chaîne fluorocarbonée sera réalisée. Cela permettra également de mieux comprendre quel est le rôle de la chaîne F8 dans la stabilisation observée. D'autre part, la chaîne F8 utilisée pour développer cette stratégie de stabilisation est déjà utilisée à l'échelle industrielle dans le domaine agro-alimentaire. Afin de s'affranchir des problèmes de bioaccumulation associés à l'utilisation de cette chaîne dans industrie, nous avons décidé de développer une fluoro-apéline biocompatible.

Le deuxième objectif de ma thèse est l'extension du concept FluoroPep à un autre peptide d'intérêt thérapeutique : la spexine. Ce peptide impliqué dans les voies de régulation de la douleur présente des propriétés intrinsèques très différentes de l'apéline. Cela mettrait en avant les multiples facettes de la stratégie FluoroPep.

Le troisième et dernier objectif de ma thèse porte sur le développement d'une stratégie de synthèse des fluoropeptides en solution. La synthèse de fluoropeptides sur support solide se déroule sans soucis majeurs lorsque les peptides sont hydrophiles et présentent une séquence courte. Dès lors que des séquences difficiles (interactions

hydrophobes ou aromatiques) sont envisagées, les rendements de ces synthèses diminuent fortement. Afin de s'affranchir de ces limitations, une approche de synthèse en solution basée sur l'introduction d'un tripeptide fluorocarboné (TPFc) sur des peptides complètement déprotégés par bioconjugaison est envisagée.

CHAPITRE 1 – CONCEPTION ET DÉVELOPPEMENT D'UNE FLUOROPELINE SPÉCIFIQUE, ACTIVE, STABLE ET BIOCOMPATIBLE

A. Le système APJ/apeline et son intérêt thérapeutique

1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la famille de récepteurs la plus vaste chez l'Homme⁸⁴ et à ce jour plus de 800 RCPG sont répertoriés dans le génome humain⁸⁵. Cette famille de récepteurs est caractérisée par la présence de sept hélices transmembranaires reliées entre elles par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires⁸⁶. Ces récepteurs sont constitués d'une unique chaîne polypeptidique possédant une partie extracellulaire (N-terminale). Ils sont capables de lier des hormones et des petites molécules. Dans le cas de molécules agonistes, capables d'activer le récepteur, cette interaction entraîne une cascade de signalisations intracellulaires menant à une réponse biologique⁸⁶. L'une des avancées majeures qui a permis de mieux comprendre la structuration et le fonctionnement des RCPG est l'obtention de leurs structures cristallographiques⁸⁷. La première cristallisation d'un RCPG a été celle de la rhodopsine bovine réalisée par l'équipe du Pr. Miyano en 2000⁸⁸ et 47 cristallisations ont été accomplies avec succès depuis⁸⁹. Il existe 6 différentes classes de RCPG, de A à F, qui permettent de les regrouper principalement selon deux critères : leur homologie de séquence et la nature de leur fonction physiologique⁹⁰. Seules les trois premières classes sont présentes chez l'Homme.

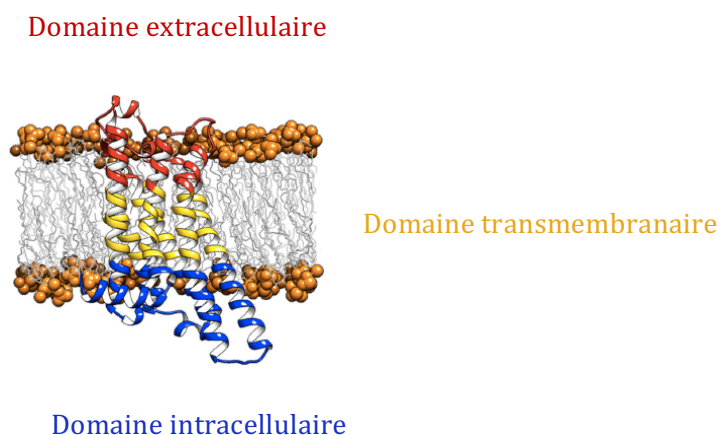


Figure 24 : Structure générale des RCPG de classe A⁹¹.

La classe A (Figure 24) représente près de 80% des RCPG découverts à ce jour et possède trois régions distinctes : le domaine extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire⁹¹. L'implication des RCPG dans des fonctions biologiques variées est corrélée à une signalisation intracellulaire complexe (Figure 25).

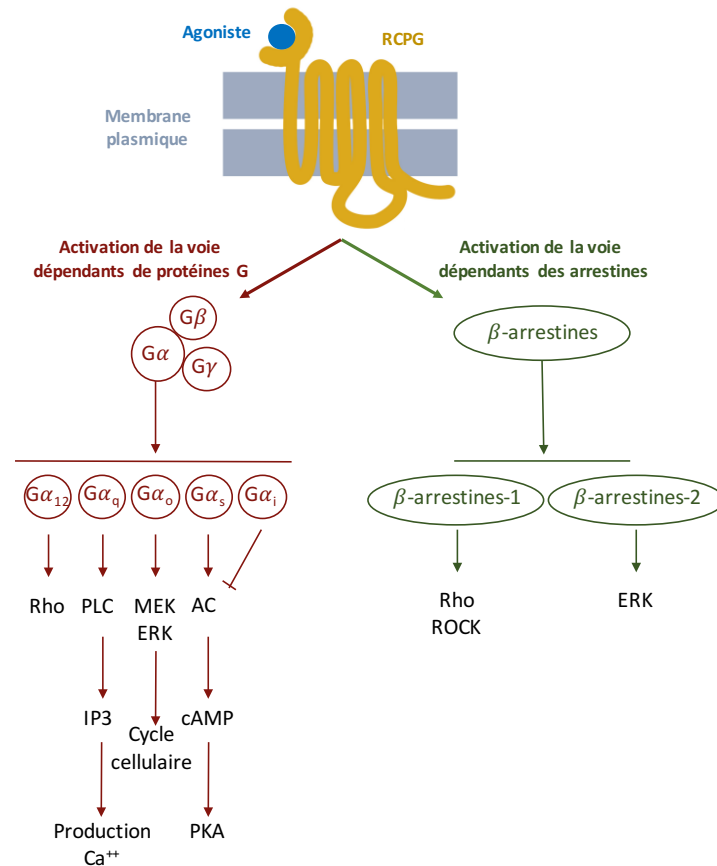


Figure 25 : Principales voies de signalisations des RCPG : les couplages aux protéines G et aux protéines arrestines.

Ces signalisations sont activées par la liaison d'un agoniste au RCPG en partie extracellulaire. Le bon fonctionnement de ces récepteurs est responsable des bonnes liaisons neuronales, d'un fonctionnement correct des systèmes sensoriels⁹² et des cycles cellulaires⁹³. En revanche, leurs dérégulations sont responsables de nombreux dysfonctionnements biologiques menant à des pathologies. Notamment, dans le cas de la prolifération cellulaire anarchique responsable des cancers, ainsi que dans la dérégulation des transmissions neuronales responsables des maladies neurodégénératives. Afin de remédier à ces dérégulations, des antagonistes bloquant ces voies de signalisations ont été développés. Ainsi, des ligands pouvant moduler la réponse biologique associée à l'activation ou l'inactivation des RCPG (Figure 26) ont été synthétisés.

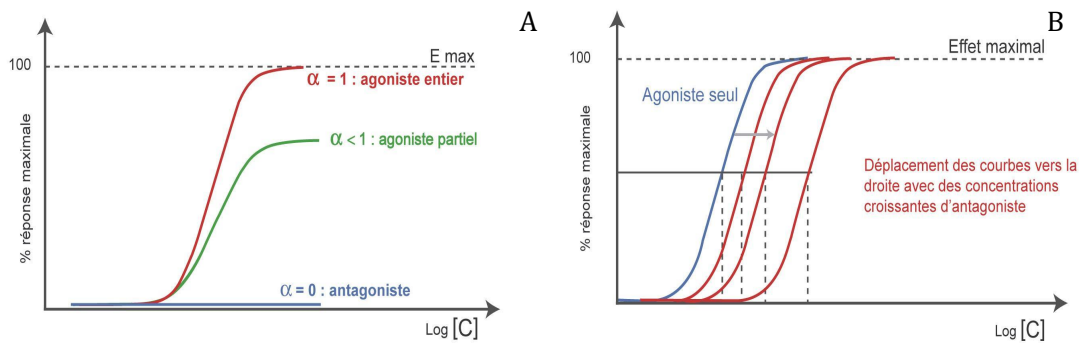


Figure 26 : Effets des agonistes, agonistes partiels et antagonistes (A) et effets d'une action simultanée d'un agoniste et antagoniste (B) sur l'activation du RCPG.

Le dysfonctionnement des RCPG dans certaines pathologies peut donc être corrigé par l'action de ces ligands. Dans certains cas, seule l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire est responsable d'effets secondaires chez l'Homme. Dans ces cas précis, le développement de ligands, appelé ligands biaisés, activant sélectivement une unique voie de signalisation permet de s'affranchir des effets indésirables. Par exemple, dans le cas de l'activation du RCPG μ opioïde par la morphine, l'effet analgésique est obtenu suite à l'activation de la voie associée au recrutement des protéines G. Les effets secondaires de ce médicament antidouleur, les nausées et les vomissements, sont eux imputés aux couplages avec les protéines arrestines. Par exemple, l'oliceridine, un ligand biaisé en développement clinique, permet l'activation de la voie des protéines G sans activer le recrutement des protéines arrestines (Figure 27).

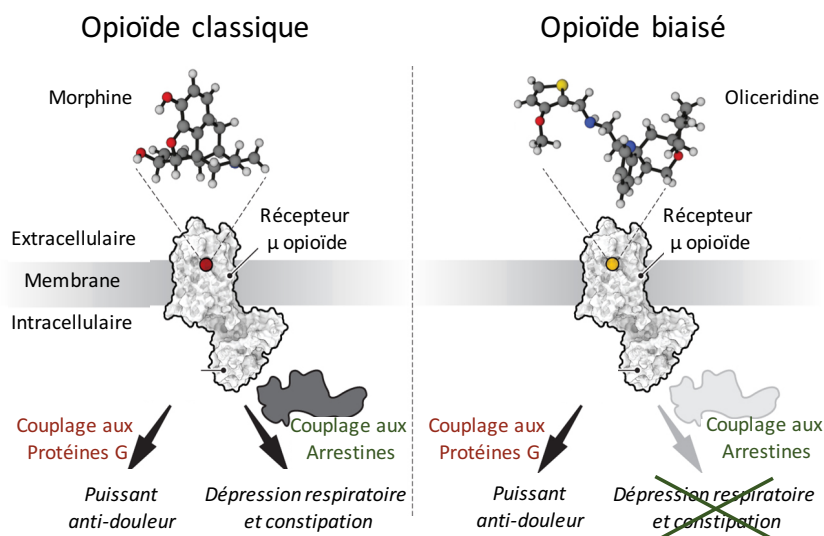


Figure 27 : Ligand classique et biaisé du récepteur μ opioïde⁹⁴.

Ainsi, l'effet antidouleur est préservé avec une diminution majeure des effets indésirables⁹⁴. En raison de ces implications dans les fonctions, pathologies et thérapies diverses chez l'Homme, les RCPG sont la cible de près de 35% des médicaments sur le marché⁹⁵. En effet, ces récepteurs sont déjà connus pour être impliqués dans de nombreuses pathologies⁹⁶. Leur étude a notamment mis en avant leur implication dans des maladies multifactorielles telles que l'asthme⁹⁷, les maladies rhumatologiques⁹⁸ ainsi que les maladies cardiaques⁹⁹. Parmi les 390 RCPG non olfactifs répertoriés dans le génome humain, 15% sont la cible de médicaments actuellement sur le marché, 60% possèdent un ligand endogène connu mais pas encore de petites molécules et 25% ne possèdent ni ligand, ni fonction et sont appelés des RCPG orphelins. Il reste donc un potentiel important pour l'industrie pharmaceutique mais également la recherche académique pour découvrir des molécules capables de réguler l'activation des RCPG, connus et orphelins.

2. Le récepteur APJ

Le récepteur APJ ou AGTRL1 (angiotensin receptor-like 1) découvert en 1993¹⁰⁰, est un RCPG constitué de 380 acides aminés et fait partie des RCPG de classe A. L'identification du peptide endogène apeline en 1998 par l'équipe du Pr. Tatemoto¹⁰¹ a permis de désorphaniser ce récepteur. Le récepteur APJ est largement exprimé au niveau du système nerveux central, des tissus cardiaques, des vaisseaux sanguins ainsi que des organes génitaux. Le rôle de l'APJ dans la régulation hydrique et les maladies cardiaques, telles que les dysfonctions endothéliales¹⁰² et l'insuffisance cardiaque¹⁰³, a été très étudié. Dans ces domaines thérapeutiques, cela en fait une cible idéale pour le développement de traitements^{104,105,106,107} et plusieurs ligands agonistes de l'APJ sont décrits. Ces agonistes sont de nature peptidique (isoformes du peptide apeline et le peptide elabela) ou sont des petites molécules (E339-3D6, azelaprag, ML233). La molécule E339-3D6, développée au sein du laboratoire, a été le premier agoniste non peptidique décrit de l'APJ¹⁰⁸. Cependant ses propriétés pharmacologiques ne permettent qu'une activation partielle du récepteur sur la voie de signalisation couplée aux protéines G (agoniste partiel). D'autres agonistes tels que les molécules ML 233 et l'azelaprag ont été développés. Ces structures, brevetées par Sanofi-Aventis¹⁰⁹ et Amgen, possèdent des affinités pour le récepteur et des propriétés pharmacologiques moins intéressantes que le peptide apeline¹⁰⁷. En effet l'apeline est le seul peptide possédant une constante de liaison au récepteur subnanomolaires^{110,111}. De plus, elle est un agoniste entier sur la voie des récepteurs couplés aux protéines G et du recrutement des protéines arrestines.

3. Le peptide apeline

Ce peptide endogène est produit dans les tissus cérébraux, digestifs et cardiaques¹¹² sous la forme de la préproapeline, un peptide de 77 acides aminés. Ce dernier est ensuite hydrolysé dans l'organisme pour former une apeline de 55 résidus (apeline-55), elle-même conduisant à quatre isoformes actifs : l'apeline-36, l'apeline-17, l'apeline-13 et la pyr-apeline-13 (pyroglutamate-apeline-13)¹¹³ (Figure 28).

Préproapeline-77

MNLRLCVQALLLWLSLTAVCGVPLMLPPDGTGLEEGSMRYLVKPRTSRTGPGAWQGRRKFRRQRPRLSHKGMPMF

Proapeline-55

VPLMLPPDGTGLEEGSMRYLVKPRTSRTGPGAWQGRRKFRRQRPRLSHKGMPMF

Isoformes actifs de l'apeline

Apeline-36

LVKPRTSRTGPGAWQGRRKFRRQRPRLSHKGMPMF

Apeline-17

KFRRQRPRLSHKGMPMF

Pyr-apeline-13

Pyr-QRPRLSHKGMPMF

Apeline-13

QRPRLSHKGMPMF

Figure 28 : Maturation et isoformes actifs du peptide apeline.

L'apeline a des propriétés pharmacologiques intrinsèques permettant d'agir notamment sur la diurèse et la contractilité cardiaque. L'effet sur la diurèse passe par la voie des protéines G (couplage $G\alpha_i$)^{114,115} alors que l'activation de la voie des protéines arrestines¹¹⁵ (β -arrestines-2) permet d'agir sur l'effet cardiovasculaire^{116,103} (Figure 29). Parmi les isoformes pharmacologiquement actifs, l'apeline-17 et la pyr-apeline-13 sont les deux formes majoritaires qui ont pu être isolées dans le plasma de rat et de souris¹¹⁷. Ces deux agonistes entiers présentent des affinités (K_i) pour le récepteur APJ de $3.6 \pm 0,2 \times 10^{-11}$ M pour l'apeline-17 et de $3.7 \pm 1,4 \times 10^{-10}$ M pour le pyr-apeline-13. L'apeline-17 présente donc de meilleures propriétés de liaison au récepteur que la pyr-apeline-13. Concernant la capacité d'inhibition de la production d'AMPc (IC_{50}), l'apeline-17 ($8,3 \pm 1,2 \times 10^{-11}$ M) présente des propriétés meilleures que la pyr-apeline-13 ($2,3 \pm 1,2 \times 10^{-10}$)¹¹⁸.

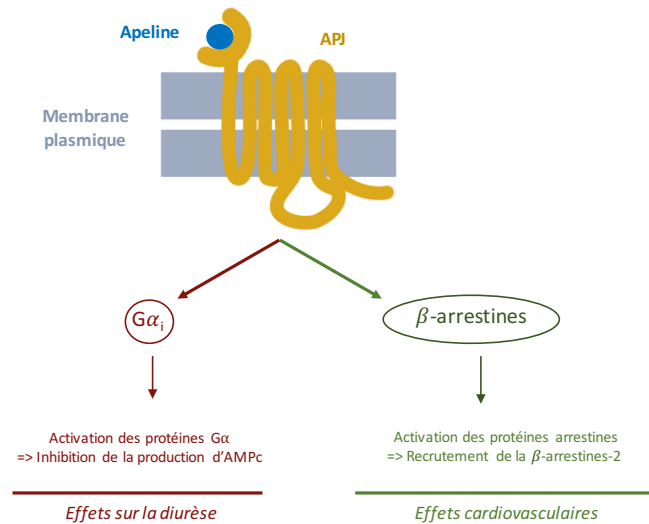


Figure 29 : Signalisation du système apeline/APJ impliqués dans la diurèse et le système cardiovasculaire.

Des études structurales des isoformes de l'apeline ont mis en avant l'importance des 12 acides aminés en partie C-terminale du peptide apeline (notamment le motif RPRL et les cinq résidus terminaux en partie C-terminale) pour la liaison au récepteur. De plus, une modification des résidus Arg2, Pro3, Leu5, Lys8, Pro10 et Met11 de l'apeline-13 induisent une diminution ou une perte de la capacité d'internalisation du récepteur. Ainsi, la modification de ces résidus entraîne une perte de l'activité partielle ou totale du peptide modifié¹¹⁹. Le rôle majeur du peptide apeline dans la contractilité cardiaque et l'hypertension artérielle a été mis en avant rapidement après sa découverte¹²⁰. Leur intérêt dans différents domaines thérapeutiques a donc été étudié.

4. Le système APJ/apeline dans un contexte thérapeutique

Le système APJ/apeline a été longuement étudié depuis la désorphanisation du récepteur APJ. Son implication dans différentes pathologies en fait un système particulièrement intéressant d'un point de vue thérapeutique^{121,122,123}. Ainsi, ce système a été étudié dans les domaines de la régulation hydrique^{124,125}, de l'axe diabète/obésité^{126,127} et des maladies cardiovasculaires qui a été le plus largement étudié^{128,129,130,131}(Figure 3).

Dans le cadre de la régulation hydrique, l'apeline est connue pour être intimement reliée au système de régulation de l'arginine vasopressine (AVP), une hormone antidiurétique et vasoconstrictrice. Synthétisée puis libérée dans la circulation générale par l'hypothalamus, l'AVP empêche la diurèse¹²⁴. Lorsque l'apeline est administrée, la

libération de l'AVP par les neurones de la neurohypophyse est fortement diminuée (Figure 30).

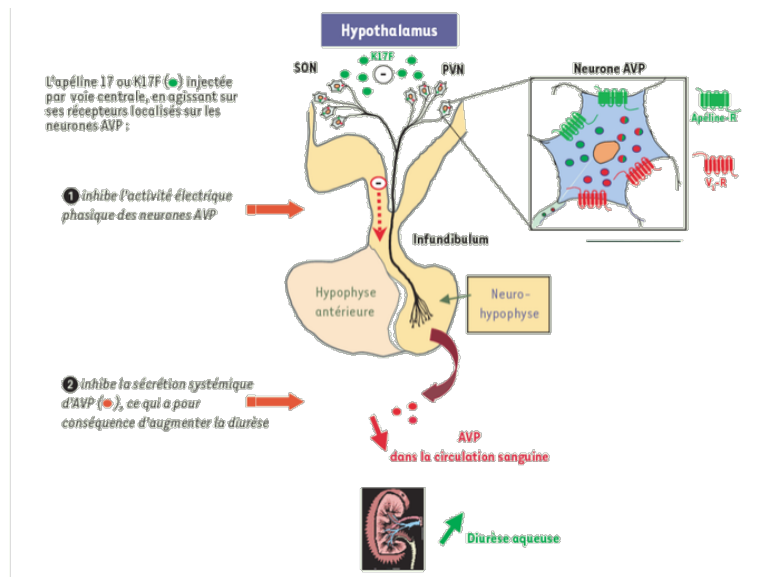


Figure 30 : Implication de l'apéline dans le mécanisme de diurèse¹³².

Cela entraîne ainsi une augmentation de la diurèse. L'apéline a donc un effet diurétique important médié par la régulation de la quantité d'AVP libérée dans le sang.

En plus de son implication dans le système de régulation hydrique, l'apéline joue un rôle important dans le domaine du diabète et de l'obésité¹²⁶. En effet, l'apéline présente un effet dose-dépendant sur la prise de poids, l'insulinémie ou encore la sensibilité à l'insuline (Figure 31).

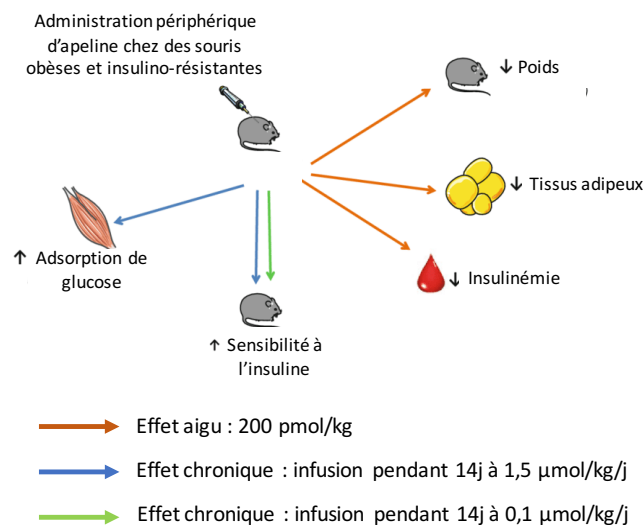


Figure 31 : Implication de l'apéline dans le diabète et l'obésité¹²⁶.

Chez des rats obèses, à la dose de 1,5 $\mu\text{mol/kg/j}$ en infusion, l'effet est porté sur la sensibilité à l'insuline et l'absorption tissulaire du glucose présent dans la circulation. Cependant, une administration chronique en infusion à des doses plus faibles de 0,1 $\mu\text{mol/kg/j}$ influe uniquement sur la sensibilité de l'animal à l'insuline. Ainsi, le rôle de l'apeline sur plusieurs facteurs impliqués dans le diabète et l'obésité a été mis en avant.

Concernant le domaine cardiovasculaire, deux propriétés de l'apeline en font un bon candidat thérapeutique : ses effets inotrope positif¹³³ et hypotenseur¹³⁰ (Figure 32). En effet, l'apeline semble être un puissant agent inotrope positif endogène sur les tissus cardiaques.

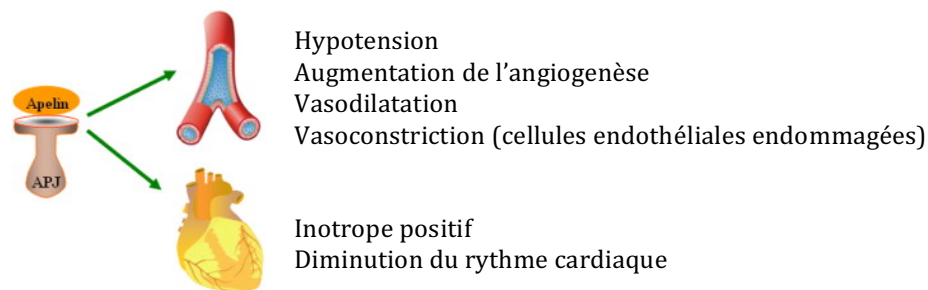


Figure 32 : Implication du système APJ/apeline dans le domaine cardiovasculaire.

Les EC_{50} sur la contractilité cardiaque sur tissus humains pour l'apeline sont compris entre 40 nM et 125 nM¹³⁴. Ces concentrations nanomolaires montrent les capacités de l'apeline à augmenter de manière considérable la contractilité cardiaque à des concentrations faibles. De plus, l'injection intraveineuse de l'apeline chez des rats normotendus anesthésiés montre une diminution de la pression artérielle¹³⁵ (Figure 33).

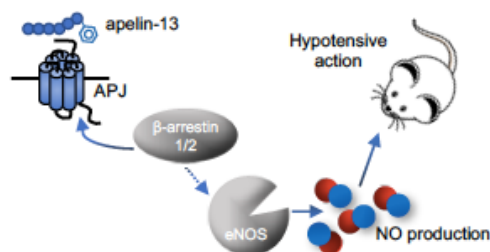


Figure 33 : Mécanisme de l'effet hypotenseur de l'apeline-13¹³⁶.

L'hypotension induite est imputée à la formation d'oxyde nitrique (NO) qui possède un effet vasodilatateur. Cette production de NO résulte de la liaison de l'apeline à son récepteur, qui entraîne l'activation de ce dernier et le recrutement de la β -arrestine au sein de la cellule. Ce recrutement induit lui-même l'activation de l'enzyme oxyde nitrique synthase (eNOS) qui produit du NO à partir de la L-arginine. Suite à la découverte de ces propriétés prometteuses de l'apeline dans le domaine cardiovasculaire, une comparaison des différentes formes actives de l'apeline a été effectuée. En comparaison aux peptides et petites molécules agonistes de l'APJ, l'apeline-17 et la pyr-apeline-13 ont des effets hypotenseurs les plus intéressants. Cependant, la pyr-apeline-13 est rapidement dégradée, notamment par une exopeptidase, l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2 (ACE-2) qui coupe le peptide en partie C-terminale entre le résidu Phe13 et Pro12¹³⁷. Cette troncation du peptide formant ainsi la pyr-apeline-12 qui montre des propriétés hypotensives moins importantes que son précurseur pyr-apeline-13. De plus, l'apeline-17 est un hypotenseur plus efficace que la pyr-apeline-13 chez les rats normotendus en raison de sa meilleure efficacité fonctionnelle¹³⁷. Le potentiel thérapeutique de l'apeline est donc majeur dans le domaine cardio-vasculaire. Cependant, au vu de sa durée de vie inférieure à 10 minutes dans le plasma isolé¹³⁸, il serait intéressant de travailler sur le développement de formes stabilisées de l'apeline. Celles-ci permettront de développer des outils pharmacologiques ou des agents thérapeutiques dans les domaines cités préalablement.

5. Stratégies de stabilisation existantes de l'apeline

Le temps de demi-vie court des dérivés de l'apeline rend difficile leur utilisation en tant que composé thérapeutique. Des stratégies de stabilisations ont donc été appliquées à l'apeline afin d'augmenter son temps de demi-vie. Tout d'abord, des méthodes d'introduction d'acides aminés non naturels ont été entreprises.

Plusieurs acides aminés non naturels (norleucine (Nle), acide aminoisobutyrique (Aib), aminoindane) ont été introduits dans la séquence de la pyr-apeline 13. Le peptide présentant la stabilité la plus intéressante est le suivant : pGlu-RPRLSHKGP-Nle-aminoindane-F. Après 1 h d'incubation dans le plasma de rat isolé, 27% de pyr-apeline-13 a pu être détecté contre 57% pour le peptide modifié. La stabilité plasmatique a donc bien été augmentée. En revanche, cette modification entraîne une perte des propriétés pharmacologiques. En effet l'affinité pour le récepteur ($IC_{50} = 20 \pm 1,1$ nM) est diminuée en comparaison au peptide natif ($IC_{50} = 5,7 \pm 0,3$ nM). De plus la capacité à recruter la β -arrestine 2 est fortement diminuée : $EC_{50} = 1204 \pm 208$ nM pour le peptide modifié et

$EC_{50} = 91 \pm 17$ nM pour l'apeline-13¹³⁹. Ainsi l'introduction d'acides aminés non naturels n'a pas permis de développer une apeline stabilisée et active.

De plus, des dérivés cycliques de l'apeline ont également été développés sur l'apeline-13¹⁴⁰. Par exemple, l'introduction de deux cystéines en positions 1 et 6 du peptide a permis de cycliser le peptide par un pont disulfure (séquence : CRPRLCHKGPMPF). La stabilité *in vivo* du dérivé cyclique de l'apeline chez le rat a pu être déterminée à $17,4 \pm 0,40$ min alors que le peptide natif présente un temps de demi-vie de $2,3 \pm 0,51$ min. Ainsi la cyclisation a permis d'augmenter la stabilité plasmatique de la pyr-apeline-13 *in vivo* d'un facteur 8. Cependant, ce peptide cyclique ne possède pas la même capacité à recruter la β -arrestine que l'apeline-13. En effet le peptide cyclique présente une capacité à recruter la β -arrestine 790 fois inférieure à la pyr-apeline-13. Ainsi la cyclisation n'a pas permis d'obtenir une stabilité améliorée en combinaison avec le maintien des propriétés pharmacologiques.

L'introduction d'une chaîne lipidée a également été évaluée pour augmenter la stabilité plasmatique de l'apeline-13¹³⁹. Par exemple, l'introduction d'une chaîne palmitoylé (palm) en position N-terminale de l'apeline 13 en combinaison avec un résidu Nle en position 11 et un Aib en position 12 a été réalisé. La séquence du peptide résultant est Palm-ERPRLCHKGP-Nle-Aib-F. Ce peptide modifié présente un temps de demi-vie dans le plasma isolé de rat de 29 h et un temps de demi-vie plasmatique *in vivo* chez le rat de 22 min¹³⁹ (2,3 min pour le peptide natif). La capacité de ce peptide lipidé à mobiliser le calcium intracellulaire est moindre ($EC_{50} = 21,6 \pm 4,6$ nM) en comparaison avec la pyr-apeline-13 ($EC_{50} = 2,3 \pm 0,3$ nM). Ainsi l'introduction d'un lipide sur l'apeline-13 a permis d'augmenter significativement la stabilité plasmatique mais à nouveau, les propriétés pharmacologiques ont été amoindries.

La même chaîne lipidée a également été introduite en partie N-terminale de l'apeline-17. Cette modification en combinaison avec des acides aminés non naturels (Figure 34) introduits en partie C-terminale (positions 15, 16 et 17) a permis d'obtenir une stabilité plasmatique dans le plasma humain isolé de 4,5 h contre 1,2 min pour l'apeline-17 et 1,8 min pour le composé modifié en partie C-terminale sans la chaîne lipidée.

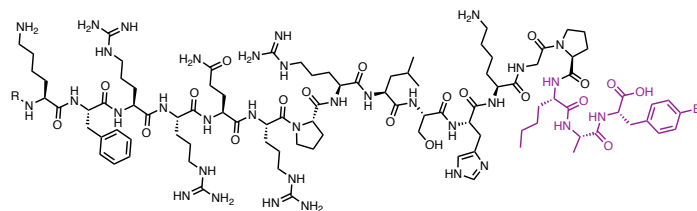


Figure 34 : Structure de l'apeline-17 modifiée en C-terminale par de résidus non naturels (violet) et par une chaîne palmitique en N-terminale (R)¹⁴¹.

Ainsi la présence de la chaîne lipidée a augmenté le temps de demi-vie dans le plasma isolé d'un facteur 150. De plus, ce composé présente une efficacité pour le récepteur APJ ($EC_{50} = 2,6 \pm 0,8$ nM) similaire à celui de l'apeline-17 ($EC_{50} = 1,9 \pm 1,0$ nM)¹⁴¹. Ainsi, dans le cas de l'apeline-17, l'introduction d'une chaîne lipidée en partie N-terminale du peptide a permis d'augmenter la stabilité plasmatique de manière importante mais également de garder une affinité nanomolaire pour l'APJ.

La dernière méthode de stabilisation de l'apeline qui a été décrite à ce jour est l'introduction d'un motif PEG. Dans le cas de l'apeline-13, un PEG₄ a été introduit en remplacement des résidus S6, H7 et K8 et une Nle a été introduite en position 11 (séquence : ERPRL-PEG₄-P-Nle-PF). Un autre dérivé pegylé possédant un PEG₆ en remplacement des résidus S6, H7, K8, G9, P10, M11 (séquence : ERPRL-PEG₆-PF) a également été synthétisé¹³⁹. Les dérivés possédant le motif PEG₄ et PEG₆ ont été incubés dans le plasma de rat et 25% et 32% respectivement de peptide restant ont pu être détectés après 2 h d'incubation contre 6 % pour le peptide natif. Cependant une perte de l'affinité pour le récepteur APJ a pu être observé d'un facteur 80 pour le composé portant le PEG₄ et 2400 pour le composé portant le PEG₆¹³⁹. L'introduction d'un groupement PEG n'est donc pas la stratégie de choix pour l'obtention d'une apeline-13 stable et active.

Un PEG₆ a également été introduit en partie N-terminale du dérivé de l'apeline-17 modifié par des acides aminés non naturels en position 15, 16 et 17 (Figure 33, R = PEG₆). L'introduction de ce PEG a permis de passer à une stabilité plasmatique dans du plasma humain isolé de 18 h contre 1,2 min pour l'apeline-17 et 1,8 min pour le composé modifié en partie C-terminale sans le motif PEG. De plus, ce composé présente une efficacité sur le récepteur APJ ($EC_{50} = 6,3 \pm 1,0$ nM) comparable à celui de l'apeline-17 ($EC_{50} = 1,9 \pm 1,0$ nM)¹⁴¹. Ainsi, dans le cas de l'apeline-17, l'introduction d'un PEG en partie N-terminale du peptide a permis d'augmenter la stabilité plasmatique de manière importante mais également de garder une affinité nanomolaire pour l'APJ.

Dans le cas de l'apeline-17, l'introduction d'une chaîne palmitoyl ou d'un PEG permet d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique et de maintenir l'affinité pour le récepteur. Cependant, ce résultat est également dû à la modification de la partie C-terminale. Au vu des limitations des stratégies de stabilisations existantes, nous avons envisagé, au laboratoire, de développer une nouvelle stratégie alternative. Celle-ci est basée sur l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée pour augmenter la stabilité plasmatique et l'activité de l'apeline.

B. Conception, synthèse et développement de fluoro-apelines

1. Contexte de l'étude

a. Utilisation du fluor dans le domaine médical

Le fluor est le neuvième élément du tableau périodique et le premier de la famille des halogènes. C'est un petit élément possédant un diamètre de seulement 1,47 Å dont le fort potentiel électroattracteur et la réactivité le rendent unique¹⁴². Le fluor est un élément très utilisé en chimie médicinale et il est responsable de l'amélioration de nombreuses propriétés des molécules organiques. Il permet notamment de moduler la lipophilie et d'augmenter la stabilité métabolique, deux aspects clés des propriétés ADME (adsorption, distribution, métabolisation et excrétion)¹⁴³. En conséquence de ces améliorations, l'incorporation d'un ou plusieurs atomes de fluor dans la structure des molécules en chimie médicinale est devenue commune. A ce jour, 30% des composés sur le marché comportent au moins un fluor¹⁴⁴. De plus, l'isotope radioactif du fluor-19, le fluor-18, a une demi-vie de 109 minutes, ce qui rend son utilisation possible pour des études de biodistribution et de pharmacocinétique. En effet, cette demi-vie relativement longue permet d'imager les petites molécules ou macromolécules dans des modèles *in vivo* et permet donc de faciliter l'accès à ces études^{145,146}.

Si quelques atomes de fluor ont déjà été intégrés au sein des molécules en chimie médicinale, l'utilisation de composés perfluorés dans ce domaine reste plus rare. Des composés perfluorés organiques (Figure 35) ont été utilisés dans le domaine médical dans le cadre du développement de substituts sanguins et de transporteurs d'oxygène^{147,148,149}.

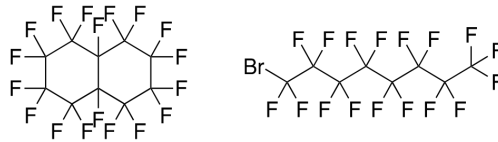


Figure 35 : Structures des molécules perfluorées utilisées dans le développement de substituts sanguins.

En effet, les propriétés tensioactives des molécules perfluorées leur permettent de s'organiser en émulsions et ainsi de dissoudre des gaz tels que l'oxygène ou le dioxyde de carbone. Une présence dans l'organisme de plusieurs jours a été mise en évidence pour ces composés perfluorés avec une excrétion efficace par les poumons, après une prise en charge par le système réticulo-endothélial¹⁵⁰. L'injection chez l'Homme pour des essais cliniques de ces substituts sanguins montre leur absence de toxicité¹⁵¹.

Le suivi cellulaire non invasif en oncologie par IRM du Fluor-19 est un autre domaine dans lequel les molécules fluorées sont très utilisées¹⁵². Cette approche est basée sur l'abondance faible du fluor dans les organes et les tissus. Des cellules dendritiques prélevées chez des donneurs sains sont marquées par des nano-émulsions contenant des molécules perfluorées (co-incubation en culture cellulaire)¹⁵³. Ces dernières sont ensuite administrées chez l'homme et le signal total du fluor par IRM permet de détecter les tumeurs et ainsi d'utiliser ces nano-émulsions comme outils de diagnostic et de suivi médical¹⁵⁴. Un essai clinique de phase 1 pour le traitement du cancer du sein est actuellement en cours (NCT02035085) mettant en avant la compatibilité à nouveau des molécules perfluorées chez l'Homme.

b. Utilisation de fluoro-peptides dans le domaine médical

Si l'utilisation de molécules fluorées est courante dans le domaine médical, l'utilisation de chaînes fluorocarbonées dans la séquence de peptides (fluoro-peptides) reste rare. L'utilisation de fluoro-peptides a été reportée dans le domaine des vaccins. Ainsi, la conjugaison d'une chaîne fluorocarbonée en partie N-terminale de peptides immunogènes a permis de développer une formulation vaccinale originale basée sur des fluoro-peptides qui permet d'augmenter la réponse immunitaire des peptides natifs¹⁵⁵. Cette amélioration de l'immunogénicité des peptides est associée à la précipitation des fluoro-peptides au niveau du site d'injection (formation d'un dépôt). Cette précipitation entraîne une augmentation du temps de résidence des fluoro-peptides dans l'organisme, une prise en charge facilitée par les cellules dendritiques et ainsi une réponse immunitaire prolongée. Ce vaccin a été testé chez l'Homme dans le cadre d'un essai

Ainsi, les exemples d'utilisation de chaînes fluorocarbonées dans le domaine des peptides sont anecdotiques et le potentiel de ces chaînes comme stabilisants plasmatiques n'a été que très peu étudié. Les chaînes fluorocarbonées ont des propriétés intrinsèques originales : elles sont hydrophobes, oléophobes et biologiquement inertes¹⁵⁸. Ainsi, au laboratoire, nous avons voulu mettre à profit ces propriétés particulières et étudier l'influence de l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée sur la stabilité plasmatique et l'activité *in vivo* de peptides ciblant les RCPG. Nous avons choisi dans un premier temps le peptide apeline-17 afin de valider la stratégie.

2. Résultats préliminaires (Thèse du Dr. Lucie Esteoulle)

a. Principe de la stabilisation plasmatique de l'apeline-17 par l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée

i) Conception et synthèse de la F8-apeline

La stratégie de stabilisation des peptides développée au laboratoire consiste à introduire une chaîne fluorocarbonée à l'extrémité d'un peptide afin de contraindre le fluoro-peptide résultant à s'organiser en micelles ou agrégats. Cette organisation doit conduire à la protection du peptide vis-à-vis d'une dégradation enzymatique dans l'organisme (Figure 37).

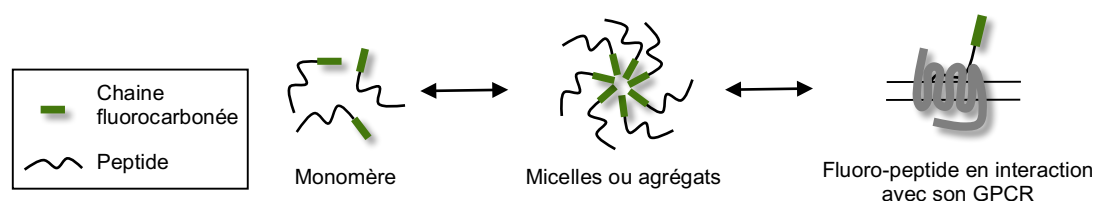


Figure 37 : Stratégie de stabilisation des peptides ligands de RCPG par introduction d'une chaîne fluorocarbonée.

Les études des interactions du peptide apeline avec son récepteur ont montré que la partie C-terminale du peptide, et plus particulièrement la phénylalanine en position 17, était primordiale pour l'activation du récepteur et des voies de signalisations qui en découlent^{159,160,161}. C'est pourquoi, l'introduction de la chaîne fluorocarbonée acide heptadécafluoro-undécanoïque (chaîne F8) a été effectuée en partie N-terminale du peptide apeline-17 (Figure 38).

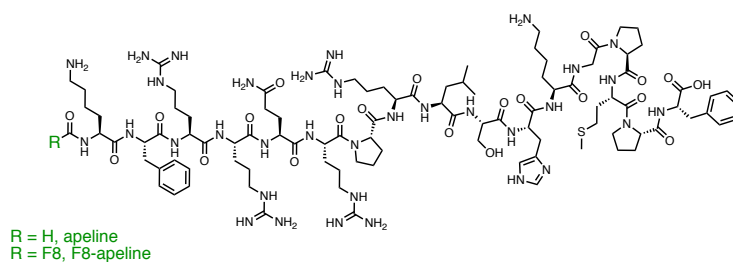


Figure 38 : Structure de l'apeline et de la F8-apeline.

Les peptides F8-apeline et apeline ont été synthétisés sur support solide afin d'évaluer et de comparer leurs propriétés physico-chimiques et pharmacologiques.

ii) Synthèse de l'apeline et de la F8-apeline

La première synthèse chimique des peptides en solution a été reportée en 1901 par Fischer et Fourneau¹⁶². Néanmoins, c'est l'essor de la synthèse peptidique sur support solide (ou Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), développée au début des années 1960 par Robert Bruce Merrifield et qui lui a valu le Prix Nobel de Chimie en 1984, qui a été un réel tournant¹⁶³. En effet, la SPPS a permis d'accéder à des synthèses rapides en évitant toute étape de purification intermédiaire et la formation de sous-produits limitée. Il est ainsi devenu possible d'accéder rapidement à des séquences peptidiques longues et complexes. Deux stratégies de protections orthogonales peuvent être utilisées en SPPS (Fmoc/tBu, Boc/Bz) mais la plus répandue à ce jour est la stratégie Fmoc/tBu. Elle permet de protéger l'amine de l'acide aminé par un groupement Fmoc et de protéger les chaînes latérales réactives des résidus par un groupement labile en milieu acide (tel que le t-Bu) (Schéma 1).

Les résines utilisées en SPPS sont formées de polystyrène, de polyéthylène glycol (PEG) ou de polyamides. L'espaceur entre ce cœur polymérique et la fonction permettant l'élongation du peptide peut différer. Les résines polystyrènes sont classiquement utilisées comme support solide en SPPS alors que les résines à base de PEG sont principalement utilisées pour les peptides longs et hydrophobes. Plusieurs types de linkers ont été développés depuis l'essor de la SPPS donnant accès à la synthèse de peptide possédant des fonctions acide carboxylique, carboxamide, ester, alcool ou encore thioester à l'extrémité C-terminale du peptide^{164,165}.

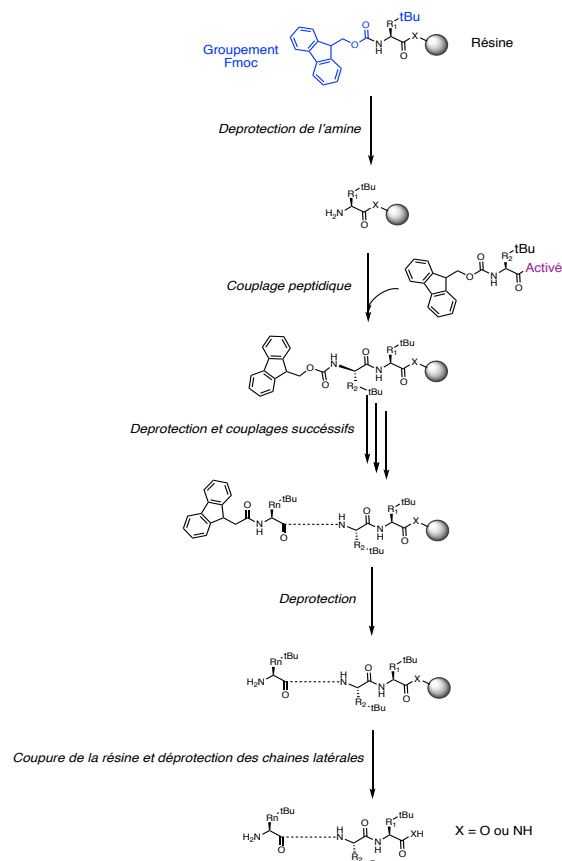


Schéma 1 : Principe de synthèse des peptides sur support solide en stratégie Fmoc/tBu.

L'autre élément essentiel en synthèse peptidique est le choix de l'activateur de l'acide aminé à introduire sur le peptide au cours de l'élongation. Au cours des années, de nombreux activateurs de fonctions carboxyliques pour la synthèse peptidique ont été développés¹⁶⁶. Parmi ceux-ci, cinq grandes familles d'activateurs sont décrites (Figure 39).

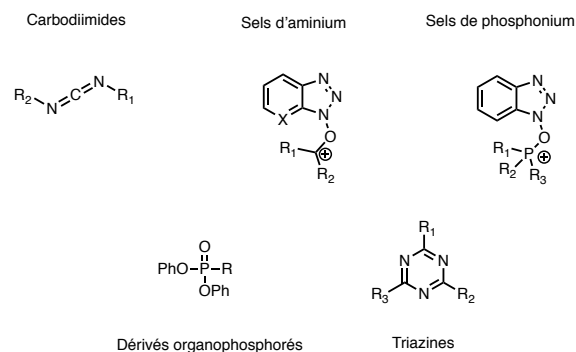
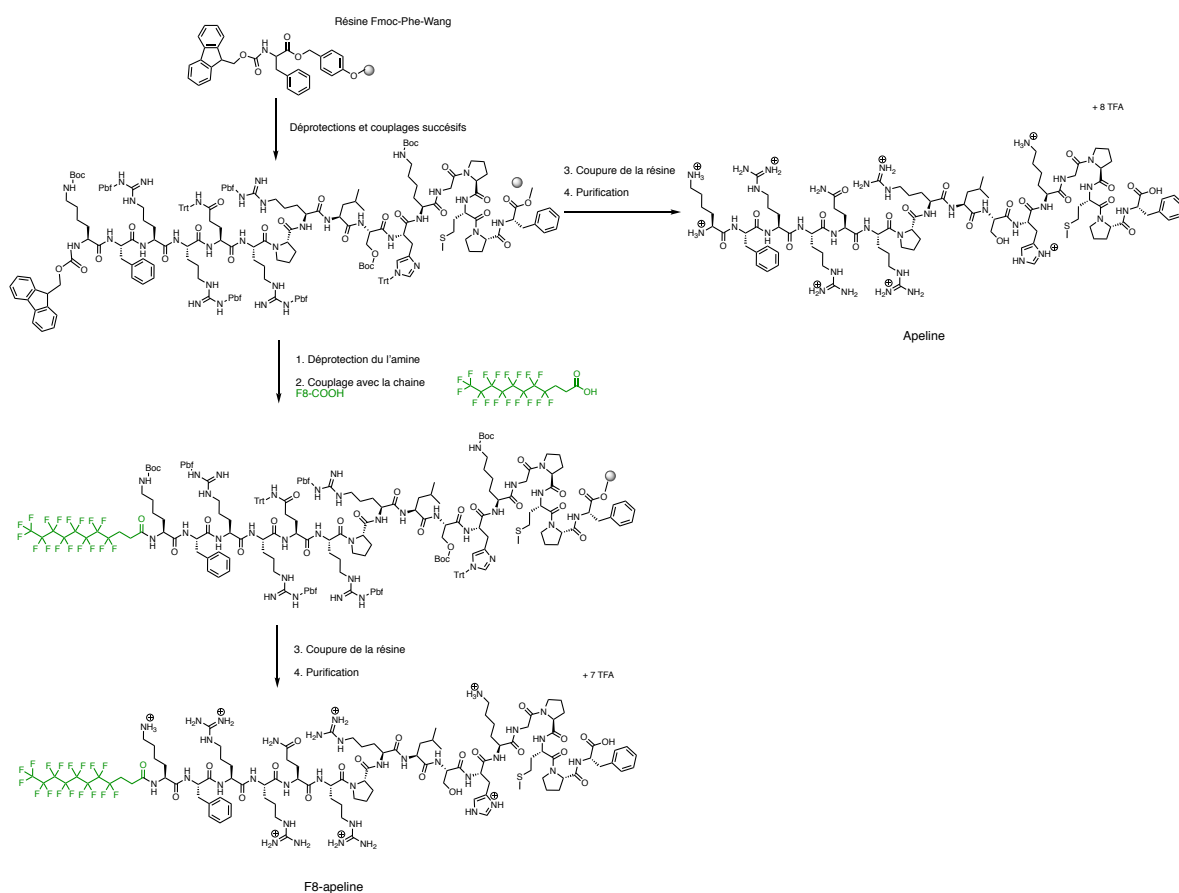


Figure 39 : Structure générale des familles principales d'agents de couplages peptidiques.

Ainsi, la synthèse de l'apeline-17 (apeline) et de la fluoro-apeline-17 (F8-apeline) a été réalisée sur support solide à partir d'une résine fonctionnalisée par un linker de Wang, selon une stratégie Fmoc/tBu (Schéma 2).



Conditions et réactifs : (1.) pipéridine 20% / DMF ; (2.) $\text{CF}_3\text{-(CF}_2)_7\text{(CH}_2)_2\text{COOH}$ (3 éq.), HBTU (2,9 éq.), DIEA (6 éq.) / DMF ; (3.) FC-COOH (2 éq.), HATU (1,9 éq.), DIEA (4 éq.) / DMF ; (4.) TFA/Phénol/Thioanisole/Ethanedithiol/ H_2O (90/3,75/2,5/1,25/2,5); (5) CLHP en phase inverse.

Schéma 2 : Schéma de synthèse de l'apeline et de la F8-apeline sur support solide.

Les peptides ainsi synthétisés ont été purifiés par CLHP et lyophilisés. La stabilité plasmatique et les propriétés pharmacologiques de ces deux peptides ont ensuite été évaluées.

b. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* de la F8-apeline

i) Caractérisation de la F8-apeline

Dans un premier temps, les stabilités plasmatiques de la F8-apeline (F8-ap) et de l'apeline (Ap) dans du plasma humain ont été déterminées. Cette évaluation a montré que l'apeline avait une stabilité plasmatique de sept minutes tandis que celle de la F8-apeline a été évaluée à plus de 24 h. Ainsi, l'introduction de la chaîne F8 a permis d'augmenter drastiquement la stabilité plasmatique. Au vu de ce résultat très intéressant, l'influence de la présence de la chaîne fluorocarbonée sur les propriétés

pharmacologiques de l'apeline a été évaluée. Ainsi, l'affinité et l'activité fonctionnelle (inhibition de la production d'AMPc, recrutement de la β -arrestine 2) de la F8-apeline pour son récepteur ont été déterminées. (Tableau 2).

Peptide	$t_{1/2}$ (min)*	Affinité récepteur APJ Ki (nM)	Inhibition de l'AMPc CI_{50} (nM)	Recrutement de la β -arrestine 2 CE_{50} (nM)
Ap	7,8 \pm 0,8	0,18 \pm 0,03	1,47 \pm 0,56	94 \pm 27
F8-ap	>1440 (80%**)	0,24 \pm 0,03	10,7 \pm 4,4	106 \pm 35

*plasma humain, 5 μ M

**pourcentage de peptide restant dans le plasma à 24 h

Tableau 2 : Caractérisations pharmacologiques de l'apeline et de la F8-apeline.

La valeur de l'affinité de la F8-apeline pour le récepteur APJ est proche de celle de l'apeline. Si les valeurs d'inhibition de la production d'AMPc et de recrutement de la β -arrestine diffèrent légèrement entre la F8-apeline et l'apeline, elles restent de l'ordre du nanomolaire. Ces résultats montrent donc des propriétés pharmacologiques de la F8-apeline similaires à l'apeline et que la chaîne fluorocarbonée a peu d'impact sur l'affinité et la fonction du peptide. Suite à ces résultats intéressants, les propriétés pro-inflammatoires des peptides ont été comparées.

ii) Etude des propriétés pro-inflammatoires

Des études des propriétés pro-inflammatoires du fluoropeptide ont été entreprises sur des macrophages murins RAW 264,7 (Figure 40).

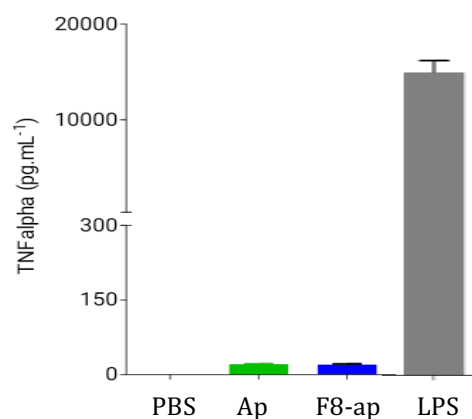


Figure 40 : Evaluation du caractère pro-inflammatoire de l'apeline et de la F8-apeline sur des cellules RAW 264,7.

Cette étude met en avant l'absence de propriété pro-inflammatoire de l'apeline et de la F8-apeline. Ce dernier possède donc une affinité, une efficacité *in cellulo* et une absence d'activité pro-inflammatoire comparable à l'apeline tout en ayant une stabilité plasmatique considérablement augmentée. Afin de valider la stratégie développée, l'activité hypotensive *in vivo* chez des rats normotendus a alors été évaluée.

iii) Evaluation de l'activité *in vivo*

L'évaluation *in vivo* de l'apeline et de la F8-apeline a été réalisée dans un modèle de rats vigiles normotendus par l'équipe du Dr. Catherine Llorens-Cortes, Collège de France. L'essai consiste à mesurer l'effet des peptides sur la pression artérielle après une administration intraveineuse de l'apeline et de la F8-apeline à différentes doses (Figure 41).

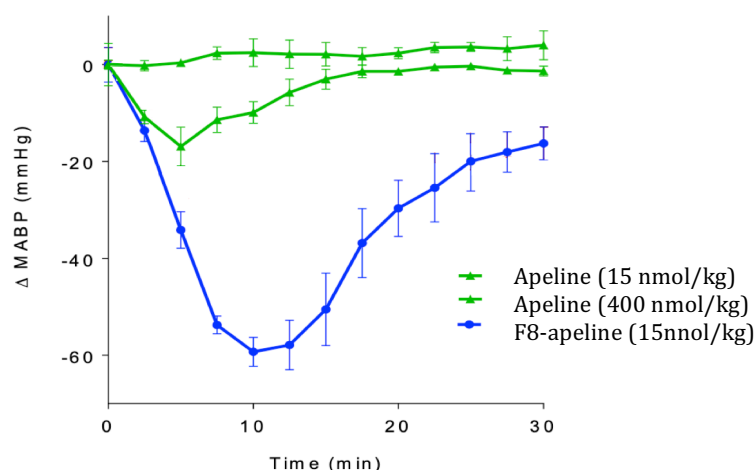


Figure 41 : Evaluation *in vivo* de la diminution de pression artérielle après administration de l'apeline et de la F8-apeline dans un modèle de rat normotendu.

Une diminution de la pression artérielle a pu être mesurée pour l'apeline à une dose de 400 nmol/kg. Dans le cas de la F8-apeline, la dose de 15 nmol/kg a été suffisante pour obtenir une diminution de la pression artérielle trois fois plus intense que celle obtenue avec l'apeline à la dose de 400 nmol/kg. L'introduction de la chaîne F8 a donc permis d'une part d'augmenter la demi-vie plasmatique (de 7 min à plus de 24h) et d'autre part d'améliorer considérablement l'effet hypotenseur du peptide d'un facteur 3 à une dose 26 fois inférieure (15 nmol/kg). Ces résultats permettent de valider l'intérêt d'introduire une chaîne fluorocarbonée sur un peptide afin d'en augmenter sa stabilité plasmatique et son efficacité *in vivo*. Ce concept a été nommé FluoroPep.

En partant de ces résultats préliminaires prometteurs, nous avons essayé, dans un premier temps, de comprendre si la présence de la chaîne F8 permettait de protéger le peptide de la coupure enzymatique par l'enzyme ACE-2. Ensuite nous avons voulu comprendre quelle était l'influence de la longueur de la chaîne fluorocarbonée sur la stabilisation plasmatique. Nous avons ensuite travaillé sur la compréhension du mécanisme de stabilisation des peptides par la méthode FluoroPep. Enfin, nous avons évalué les propriétés *in vivo* de nos composés optimisés. Ces études doivent ainsi permettre de concevoir et de développer une fluoro-apeline stable, active, spécifique et biocompatible.

3. Etude de la dégradation enzymatique de la F8-apeline *in vitro*

Les sites de dégradation enzymatique *in vitro* et *in vivo* chez la souris ont été étudiés pour l'apeline 13^{167,168}. Cette étude a mis en avant plusieurs sites de coupure (Figure 42). L'enzyme responsable de coupure entre les résidus 12 et 13 (rouge) est l'enzyme Angiotensine Converting Enzyme-2 (ACE-2). La protéase responsable de la coupure observée entre les résidus 4 et 5 et, 5 et 6 (bleu) est la neprilysine (NEP)¹⁶⁹. En revanche, la protéase coupant le peptide entre les résidus 6 et 7 (vert) n'a pas été identifiée.

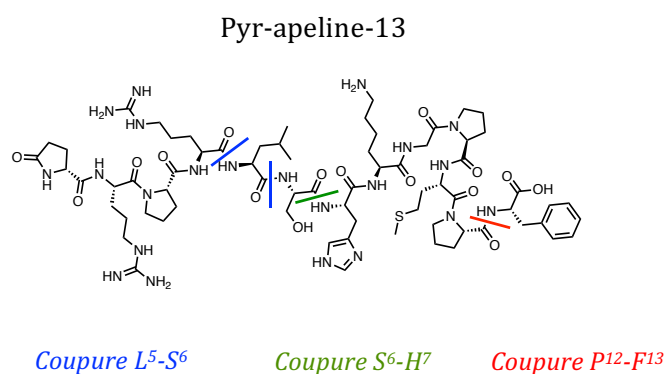


Figure 42 : Sites de coupure enzymatiques de la pyr-apelin-13 par les enzymes ACE-2 (rouge) et NEP (bleu).

Dans le cas de l'apeline-17, les coupures du peptide par les enzymes ACE-2 (rouge), NEP (bleu) et Kallikrein (violet) respectivement entre les résidus 16 et 17, 8 et 9 ainsi que 9 et 10 et enfin 3 et 4 ont été décrites^{168,141} (Figure 43).

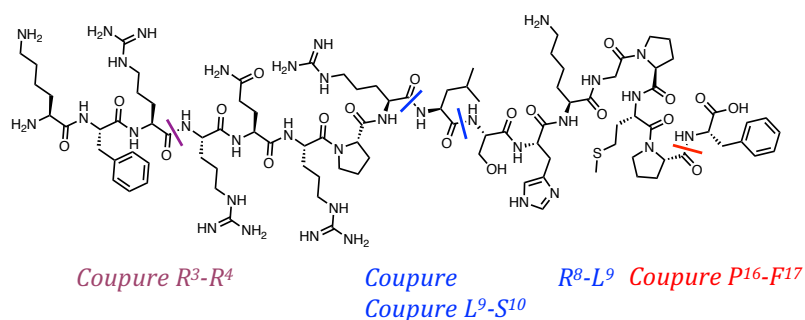


Figure 43 : Sites de coupure enzymatique de l'apeline-17 par les enzymes ACE-2 (rouge), NEP (bleu) et Kallikrein (violet).

L'enzyme ACE-2 est une exopeptidase présente *in vivo* uniquement. En effet, cette protéase n'est pas circulante mais est attachée aux membranes cellulaires du côté extracellulaire. Cette enzyme coupe la liaison amide entre la phénylalanine terminale des isoformes de l'apeline et du résidu proline suivant. Afin de déterminer si l'introduction de la chaîne fluorocarbonée F8 permettait la protection de cette coupure enzymatique, des études de dégradation en présence de l'enzyme ACE-2 de l'apeline et de la F8-apeline ont été réalisées (Figure 44). Pour cela, les peptides ont été incubés en présence de l'enzyme ACE-2 à 25 °C dans un tampon MES. La détection du signal des deux peptides est effectuée par spectrométrie de masse et les composés sont quantifiés par intégration des aires sous les courbes obtenues.

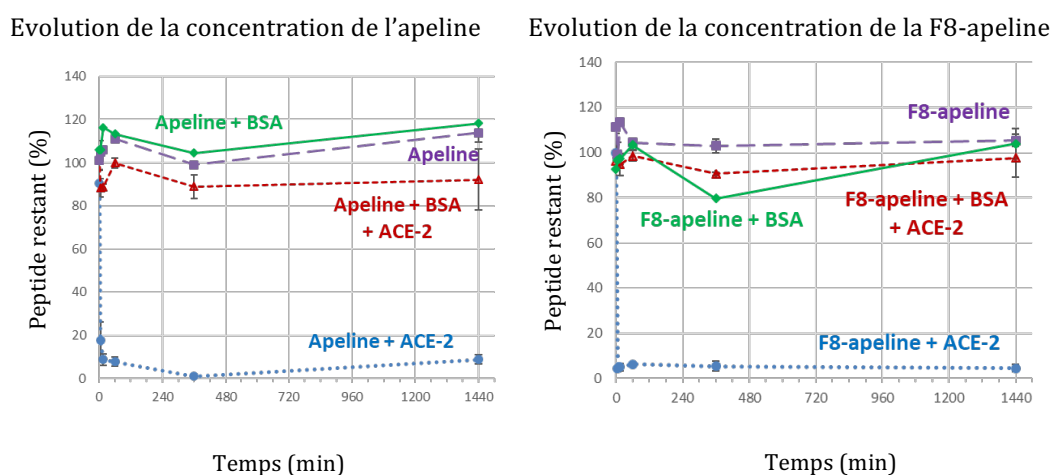


Figure 44 : Evaluation de la stabilité enzymatique de l'apeline et de la F8-apeline en présence de l'enzyme ACE-2.

Le signal de l'apeline et de la F8-apeline diminuent de manière similaire sans BSA et en présence d'ACE-2. En effet, les deux peptides sont dégradés en quelques secondes et suivent une cinétique très rapide. Cette étude indique donc que la présence de la chaîne

fluorocarbonée ne permet pas de protéger le fluoro-peptide de la dégradation par ACE-2.

Nous avons alors cherché à savoir si la liaison à la BSA pouvait permettre de protéger la F8-apeline de cette dégradation entre les deux résidus terminaux en partie C-terminale. Le signal de l'apeline et de la F8-apeline en présence de BSA ne diminue pas avec le temps jusqu'à 24 h. Nous nous sommes alors demandés si la présence de la BSA conduisait à une protection des deux peptides ou si elle n'inhibait pas tout simplement l'activité d'ACE-2. Un peptide modèle substrat de l'enzyme ACE-2 a alors été incubé en présence ou non de BSA. Ce peptide modèle (Figure 45) est un tétrapeptide hydrolysé en quelques secondes par ACE-2 dans le tampon MES.

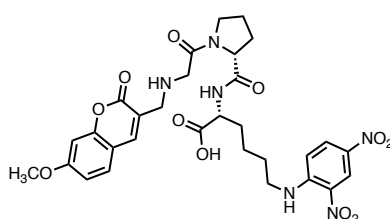


Figure 45 : Structure du peptide Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH substrat de l'enzyme ACE-2.

Ce peptide modèle a été incubé avec ACE-2 en présence et en absence de BSA (Figure 46).

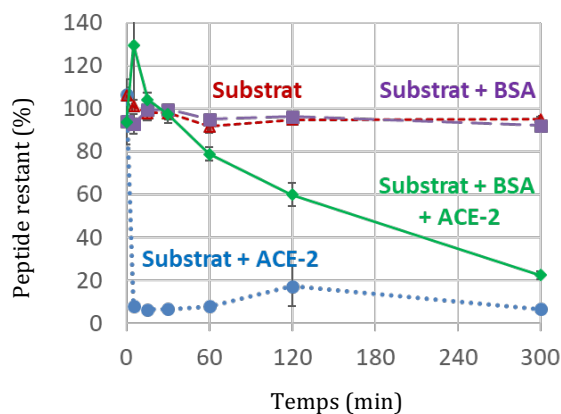


Figure 46 : Evaluation de la stabilité enzymatique du peptide substrat de l'enzyme

Comme le montre la figure 45, le tétrapeptide substrat de l'enzyme ACE-2 est effectivement dégradé en quelques secondes en absence de BSA. En revanche, en présence de BSA, sa dégradation est beaucoup plus lente indiquant que la présence de 2% de BSA entraîne une inhibition de l'activité de l'enzyme ACE-2.

Il semble donc que la présence de la chaîne F8 sur la F8-apeline ne protège pas ce dernier de la dégradation enzymatique de la partie C-terminale du peptide par ACE-2. Il était intéressant de vérifier ce résultat *in vivo*, l'enzyme ACE-2 n'étant pas présente dans le plasma pour des essais *in vitro*.

4. Influence de la longueur et de la nature de la chaîne fluorocarbonée sur la stabilité plasmatique et la pharmacologie de l'apeline.

a. Contexte de l'étude

L'aspect prometteur et novateur de la méthode de stabilisation plasmatique FluoroPep a été précédemment montré. La demi-vie plasmatique de plus de 24 h dans le plasma humain de la F8-apeline a mis en avant l'intérêt de cette méthode. Le premier objectif de ma thèse est la compréhension du mécanisme de cette stabilisation, afin de développer une fluoro-apeline active, stable, efficace et biocompatible. En effet, la chaîne F8 utilisée dans le cadre de la méthode FluoroPep fait partie de la famille des chaînes fluorocarbonées longues. De par ses propriétés intrinsèques hydrophobes et oléophobes, la chaîne APFO de cette famille de composés (Tableau 2) est très utilisée dans l'industrie du textile¹⁷⁰ et agro-alimentaire¹⁷¹. En effet, ce composé repousse l'eau mais également les huiles. Cette combinaison est donc intéressante pour le traitement des surfaces qui sont au contact des aliments. Cela inclut de nombreux objets tels que les cartons contenant les aliments et les ustensiles de cuisine¹⁷². Cette utilisation massive des chaînes fluorocarbonées a mené à une pollution de l'environnement¹⁷³, et plus précisément des eaux par celles-ci^{174,175,176,177}. En conséquence, des études de bioaccumulation de cette chaîne chez l'Homme ont été réalisées¹⁷⁸. Celles-ci mettent en évidence une absence de métabolisation de cette chaîne dans l'organisme¹⁷⁹ et une accumulation de ces composés dans des organes tels que le foie, les organes digestifs et les reins^{180,181,182}. D'autre part, une étude gouvernementale danoise (projet environnemental 1707, 2015) a montré l'influence de la longueur de la chaîne fluorocarbonée dans ce phénomène de bioaccumulation. En effet, l'augmentation de l'accumulation est corrélée à une augmentation de la longueur de la chaîne. Cette étude a également montré l'absence de bioaccumulation des chaînes plus courtes que la chaîne acide perfluorooctanoïque (APFO) (Tableau 3).

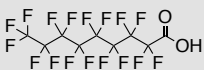

Nom de la chaîne	Structure de la chaîne	Application
Chaîne APFO		En industrie : dans le traitement de surface
Chaîne F8		En chimie thérapeutique : dans la stabilisation de peptides

Tableau 3 : Comparaison de la structure de la chaîne bioaccumulée APFO et de la chaîne F8 utilisée dans le cadre de la stabilisation plasmatique de peptides.

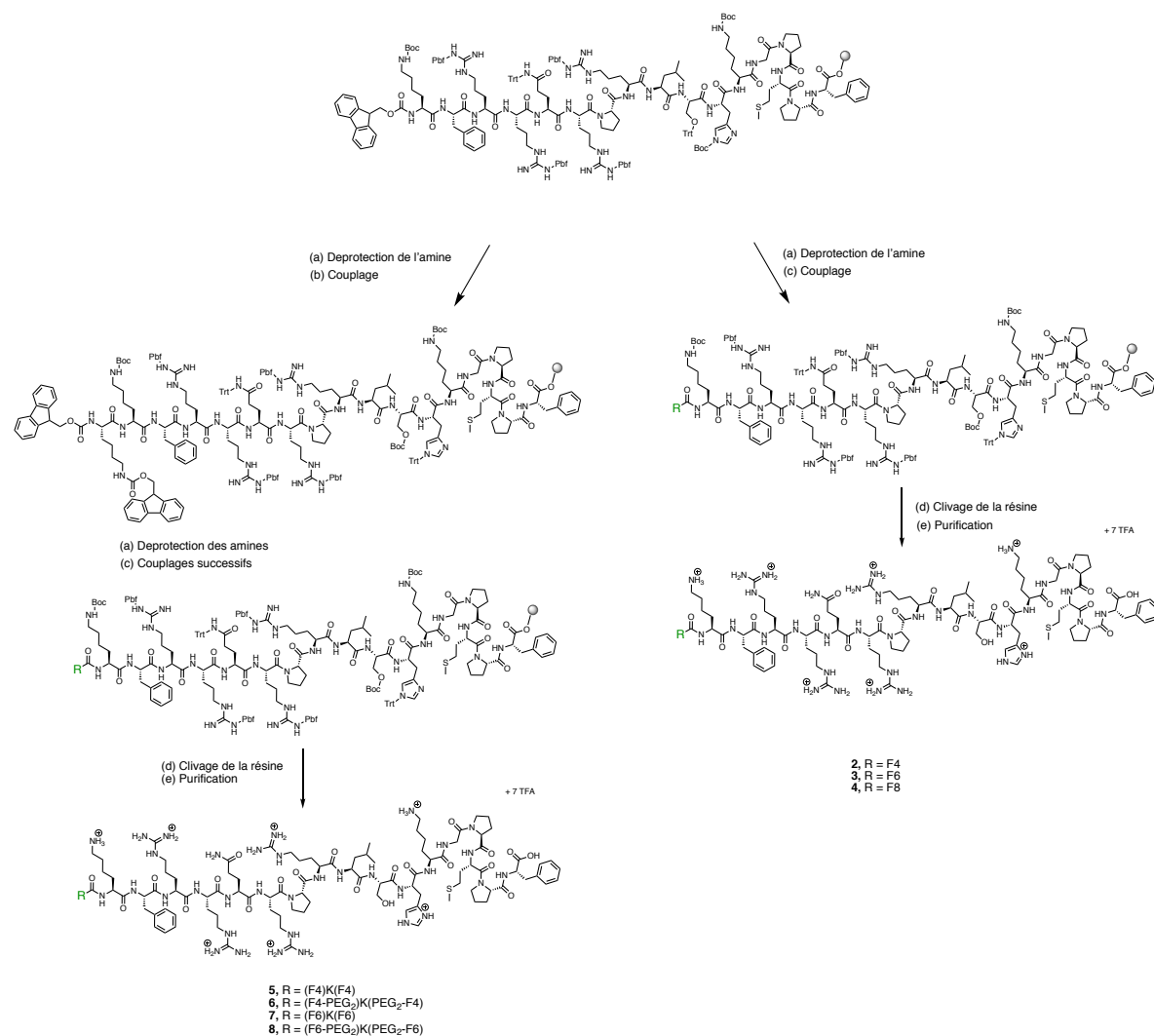
Afin de s'affranchir de ces problèmes de bioaccumulation potentiels de la chaîne F8, nous avons effectué des études de relations structure-activité dans le but de diminuer la longueur de la chaîne fluorocarbonée. La compréhension de la stabilisation de l'apeline par introduction de la chaîne fluorocarbonée F8 est également un axe important de cette étude.

b. Synthèse des dérivés fluoro-apelines

L'introduction de deux chaînes fluorocarbonées plus courtes que la chaîne F8 (acide nonafluoroheptanoïque (F4) ou acide perfluorononanoïque (F6) a été évaluée (composés **2** et **3** respectivement). Nous avons également envisagé l'incorporation de ces 2 chaînes sur le peptide via une lysine terminale pour former des composés en forme de pince (Tableau 3, composés **5** et **7**). Afin d'introduire à la fois de la solubilité et flexibilité, un linker polyéthylène glycol (PEG) a été introduit entre la lysine et les chaînes fluorocarbonées (Tableau 3, composés **6** et **8**).

Les fluoro-apelines ont été synthétisées sur support solide en utilisant la stratégie décrite pour la F8-apeline. Les différentes chaînes fluorocarbonées (composés **2** à **4**) et motifs fluorocarbonés sous forme de pince (composés **5** à **8**) ont été introduites manuellement après obtention du peptide précurseur supporté Fmoc-apeline (Schéma 3). Ce peptide précurseur a lui-même été synthétisé sur support solide assisté par micro-ondes sur le synthétiseur CEM Liberty Blue. Pour les composés **5** à **8**, une lysine (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH), protégée par un groupement Fmoc sur l'amine alpha et l'amine de la chaîne latérale, a été introduite. Un motif PEG₂ a ensuite été couplé pour les composés **6** et **8** après déprotection des deux amines de la lysine introduite

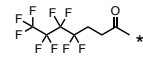

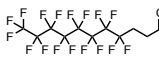
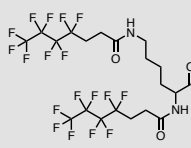
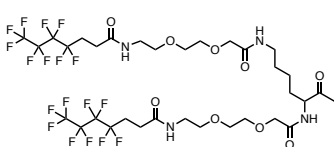
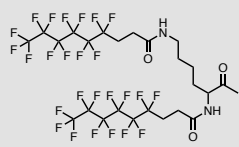
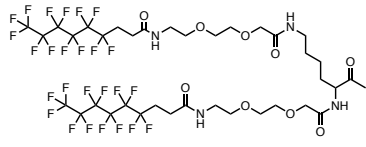
précédemment. Cela permet d'obtenir la forme de pince. Enfin, pour les composés **5** à **8**, la dernière étape de synthèse est l'introduction des deux chaînes fluorocarbonées en présence de HATU. Cet activateur, permettant d'effectuer des couplages plus rapides que son analogue HBTU, est utilisé lors de l'introduction des chaînes fluorocarbonées. L'introduction des groupements R, correspondant uniquement à une chaîne fluorocarbonée, pour les composés **2** à **4** a donc également été effectuée en présence de HATU. L'avancement des couplages effectués manuellement ont été suivi par les tests colorimétriques Kaiser et TNBS. La pureté des composés **2** à **8** ainsi obtenus a été déterminée à plus de 95% par CLHP à 220 nm. Leur caractérisation a également été effectuée par spectrométrie de masse. Les temps de rétention, obtenus suite à une analyse HPLC en phase inverse ainsi que les rendements des composés **2** à **8** ont été réunis (Tableau 4).



Conditions et réactifs : (a) pipéridine 20%, DMF ; (b) Fmoc-AA(P)-OH (3 éq.), HBTU (2,9 éq.), DIEA (6 éq.), DMF ; (c) Fmoc-AA(P)-OH du groupement R ou Fc-COOH (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (6 éq.), DMF (d) TFA/Phénol/Thioanisole/Ethanedithiol/ H₂O (90/3,75/2,5/1,25/2,5) ; (e) CLHP en phase inverse.

Schéma 3 : Synthèse des fluoro-apelines sur support solide.

Les rendements isolés des composés **2** à **4** portant une chaîne fluorocarbonée linéaire (17% à 34%) sont inférieurs au rendement du composé **1** (43%). Cela montre que l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée entraîne une diminution du rendement de synthèse. Concernant les composés **5** à **8**, nous observons le même comportement avec des rendements de synthèse compris entre 19% et 24%, également inférieurs à celui du composé **1**. L'introduction de motifs fluorocarbonés linéaires ou sous la forme d'une pince entraîne donc une diminution des rendements de synthèse.

Composé	Nom	R	Rdt (%)	t _R * (min)
1	Apeline	H	43	6.68
2	F4-apeline		34	8.37
3	F6-apeline		17	9.18
4	F8-apeline		28	10.35
5	(F4)K(F4)-apeline		19	10,54
6	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-apeline		21	10,44
7	(F6)K(F6)-apeline		22	11,42
8	(F6-PEG ₂)-K(PEG ₂ -F6)-apeline		24	11,31

*gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 15 min sur une colonne C18

Tableau 4 : Structures, rendements et temps de rétentions des composés **1** à **8**.

L'analyse des temps de rétention montre que globalement, les composés les plus hydrophobes présentent également les rendements les plus faibles. Ainsi l'hydrophobie des composés rend la purification par CLHP délicate car il faut isoler le composé attendu des sous-produits formés. Dans le chapitre 3, nous présenterons une stratégie de

synthèse en solution des fluoropeptides afin de faciliter leur préparation et caractérisation. Nous avons, suite à cette caractérisation, évalué l'influence de la modification de la nature et de la longueur du motif fluorocarbonée sur la stabilité plasmatique des composés **2** à **8**.

c. Influence de la longueur de la chaîne et du nombre de chaînes fluorocarbonées sur la stabilité plasmatique de l'apeline

Les stabilités plasmatiques des fluoro-apelines ont été évaluées en incubant les composés dans du plasma humain à 37°C et des prélèvements à différents temps ont été effectués. Les échantillons ont été analysés et quantifiés par spectrométrie de masse (SM) afin d'obtenir une courbe de disparition du composé obéissant à une cinétique du premier ordre. L'exploitation de celle-ci permet de déterminer le temps de demi-vie plasmatique des composés (Tableau 5).

Composé	Nom	$t_{1/2}$ (min)*
1	Apeline	7,8 ± 0,8
2	F4-apeline	65 ± 2,1
3	F6-apeline	342 ± 12
4	F8-apeline	>1440 (80%**)
5	(F4)K(F4)-apeline	>1440 (54%**)
6	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-apeline	>1440 (52%**)
7	(F6)K(F6)-apeline	>1440 (59%**)
8	(F6-PEG ₂)-K(PEG ₂ -F6)-apeline	>1440 (75%**)

*plasma humain, 5 µM

**pourcentage de peptide restant après 24 h d'incubation

Tableau 5 : Temps de demi-vie plasmatique des fluoro-apelines et apeline dans du plasma humain.

La diminution de la longueur de la chaîne fluorocarbonée pour les composés **2** ($t_{1/2}$ = 65 ± 2,1 min) et **3** ($t_{1/2}$ = 342 ± 12 min) entraîne une perte importante de la stabilité plasmatique en comparaison au composé **4** ($t_{1/2}$ = > 24 h). Le remplacement de la chaîne F8 par une chaîne plus courte n'est donc pas une alternative viable pour le développement d'une fluoro-apeline biocompatible et stable.

Nous avons ensuite réalisé les mesures de stabilité plasmatique pour les quatre composés portant un motif fluorocarboné sous forme de pince. Ces quatre structures originales présentent une stabilité plasmatique supérieure à 24 h. La nature de la chaîne incluse dans le motif fluorocarboné (chaîne F4 pour les composés **5** et **6** et chaîne F6 pour les composés **7** et **8**) influe donc peu sur la stabilité plasmatique. En effet, le pourcentage de peptide restant pour les peptides présentant des pinces avec des chaînes F6 (67% en moyenne) est supérieur aux peptides possédant des pinces avec des chaînes F4 (53% en moyenne). Enfin, pour les composés **7** et **8**, une différence dans le pourcentage de peptide restant après 24 h d'incubation a pu être observée. La présence du PEG n'a pas d'influence pour le composé **6** en comparaison avec le composé **5**. En revanche pour la pince possédant des chaînes F6 et le PEG (composé **8** - 75%), le pourcentage de peptide restant est supérieur à son analogue sans PEG (composé **7** - 59%).

Ainsi, en introduisant des motifs fluorocarbonés via une pince, nous avons réussi à atteindre une stabilité plasmatique similaire au composé **4**. Cet objectif atteint, nous avons évalué les propriétés pharmacologiques de nos composés présentant les meilleures stabilités plasmatiques afin d'étudier l'influence du motif pince sur l'affinité et l'activité fonctionnelle des peptides pour le récepteur APJ.

d. Caractérisations pharmacologiques des fluoro-apelines stabilisées

La caractérisation pharmacologique de ces composés porte sur trois critères : leur capacité à se lier à leur récepteur, à inhiber la production d'APMc et à recruter la β -arrestine 2 (Tableau 6). Ces deux derniers critères sont des propriétés intrinsèques du peptide apeline qui, en inhibant la production d'APMc par recrutement de la protéine $G\alpha_q$, entraîne un effet diurétique¹¹⁴. En revanche, le couplage à la β -arrestine 2 entraîne l'effet hypotenseur¹⁸³. Ces travaux de caractérisation des fluoro-apelines modifiées ont été effectués en collaboration avec l'équipe du Dr. Catherine Llorens-Cortes.

Composé	Affinité pour le récepteur de l'apeline Ki (nM)	Inhibition de l'AMPc CI ₅₀ (nM)	Recrutement de la β-arrestine 2 CE ₅₀ (nM)
1	0,18 ± 0,03	1,47 ± 0,6	94 ± 27
4	0,24 ± 0,03	10,7 ± 4,4	106 ± 35
5	0,40 ± 1,09	13,2 ± 13	113 ± 33
6	0,34 ± 0,09	18,5 ± 7,7	89 ± 21
7	0,58 ± 1,34	40 ± 17	433 ± 90
8	0,24 ± 0,05	111 ± 30	163 ± 23

Tableau 6 : Evaluations pharmacologiques des fluoro-apelines optimisées.

La liaison au récepteur APJ a été évaluée par un test de radio-liaison. Le peptide apeline-13 radioactif, marqué à l'iode-123 sur le résidu Glu1, et dont l'affinité pour le récepteur APJ est de 0.35 ± 0.08 nM¹⁸⁴, a été incubé avec des membranes (provenant de cellules CHO) exprimant le récepteur APJ. Une diminution du signal radioactif (déplacement de l'apeline-13 radioactive) a été mesurée lorsque les cellules sont incubées en compétition avec les fluoro-apelines synthétisées. Concernant l'inhibition de la production d'AMPc, une production d'AMPc maximale a été induite par incubation des cellules CHO exprimant le récepteur APJ en présence de forskoline. Les fluoro-apelines ont ensuite été ajoutées au milieu pour mesurer une diminution de la production d'AMPc. Enfin, le recrutement de la β-arrestine 2 a été mesuré par BRET après incubation des fluoro-apelines sur des cellules HEK exprimant le récepteur APJ.

Ainsi, comme le montre le tableau 5, les composés **5** à **8** présentent des affinités pour le récepteur APJ subnanomolaires proches de l'apeline native (composé **1**). La modification du peptide en partie N-terminale par ces structures en forme de pince n'influence donc pas sur la liaison de ces fluoro-peptides au récepteur APJ.

Les composés **5** à **7** (CI₅₀ comprise entre 13 ± 13 nM et 40 ± 17 nM) ont des propriétés d'inhibition de l'AMPc proche du composé **4** (CI₅₀ = $10,7 \pm 4,4$ nM). Par contre, le composé **8** présente une perte importante de cette propriété (CI₅₀ = 111 ± 30). Ainsi, les composés **5** à **7** voient leurs capacités à inhiber la production d'AMPc maintenues.

Nous avons enfin évalué l'influence de la chaîne fluorocarbonée sur la capacité des fluoropeptides à induire le recrutement de la β-arrestine-2. Le composé **1** présente une CE₅₀ de 94 ± 27 nM. En comparaison à cette valeur, le composé **7** présente une perte de la capacité à recruter la β-arrestine 2 (CE₅₀ = 433 ± 90 nM). Cependant, les composés **5** et **6** présentent une faculté à recruter la β-arrestine 2 proches du composé **1**. Les

composés **5** et **6** sous forme de pince fluorocarbonée F4 sont ainsi des alternatives prometteuses au composé **4**. Il a également été intéressant d'observer que le composé **8** maintient sa capacité à recruter la β -arrestine-2. Ce peptide pourrait donc potentiellement être un nouveau ligand biaisé du récepteur APJ permettant d'activer sélectivement le recrutement des protéines arrestines sans recruter les protéines G. Cela permettrait d'avoir un effet hypotenseur sans avoir l'effet sur la diurèse (couplage $G\alpha_q$). Ces critères pharmacologiques confirmés, des études de toxicités cellulaires sur des lignées humaines ont été menées pour les composés **5** et **6**.

5. Evaluation de la toxicité des fluoro-apelines optimisées

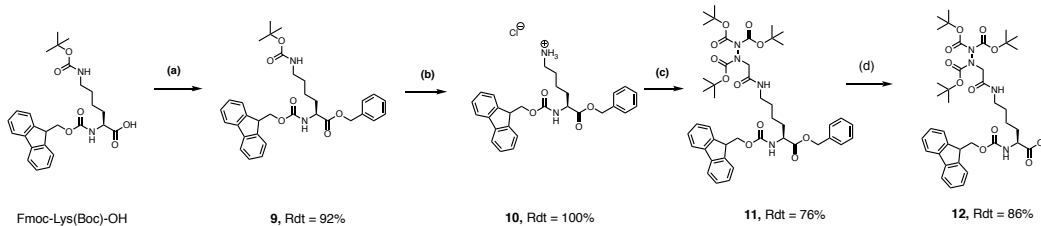
a. Etude de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire suite à une incubation avec les composés **1**, **4**, **5** et **6** a été évaluée sur des lignées cellulaires humaines HEK 293, Caco-2 et HEP-G2. Pour cela, une mesure de viabilité cellulaire suite à un test WST1, après 44 h d'incubation avec les fluoro-peptides choisis à 30 μ M, a été effectuée (Tableau 7).

Composé	Viabilité cellulaire (%)		
	HEK 293	CACO-2	HEP-G2
1	90 \pm 8	100 \pm 16	100 \pm 6
4	60 \pm 7	100 \pm 10	100 \pm 8
5	35 \pm 1	100 \pm 13	100 \pm 9
6	91 \pm 11	100 \pm 13	100 \pm 13

Tableau 7 : Viabilité cellulaire des composés **1**, **4**, **5** et **6** à 30 μ M.

Les résultats de viabilité cellulaire des lignées Caco-2 et HEP-G2 montrent une absence de toxicité de tous les composés évalués. Néanmoins, des viabilités significativement différentes entre les composés sont observées pour la lignée HEK 293. La viabilité du composé **1** sur cette lignée est de 90 \pm 8%. Ce même pourcentage de viabilité cellulaire est retrouvé pour la molécule **6** n'induisant donc pas de toxicité. En revanche, la molécule **4** (60 \pm 7% de viabilité) mais surtout la molécule **5** (35 \pm 1% de viabilité) présentent une toxicité supérieure sur la lignée HEK 293. Ainsi le fluoro-peptide le plus stable, efficace et biocompatible est le composé **6** possédant une pince fluorocarbonée composée de PEG et deux chaînes F4. Après avoir mesuré la cytotoxicité des composés,



Conditions et réactifs : (a) alcool benzylique (1,2 éq.), DCC (1,2 éq.), DMAP (0,1 éq.), DCM, 0°C, 2h puis t.a. 3 h; (b) HCl 4N/Dioxane, 30 min, t.a.; (c) Acide tri-Boc-hydrazinoacétique (1 éq.), PyBOP (1,2 éq.), DIEA (6 éq.), DMF, 1 h, t.a.; H₂, Pd/C (10% m/m), MeOH, 30 min, t.a.

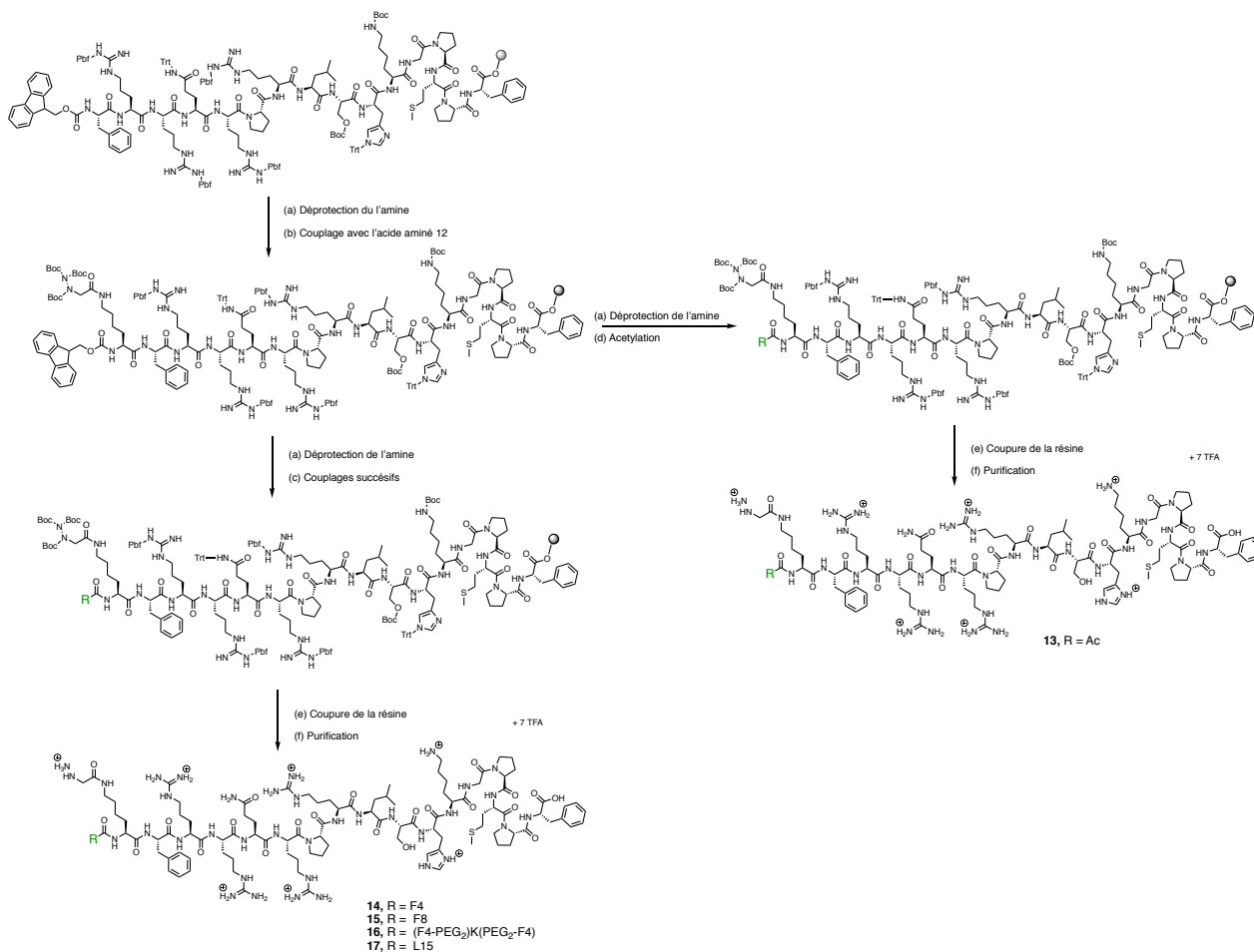
Schéma 5 : Synthèse de l'acide aminé protégé **12**.

La fonction acide de l'acide aminé commercial Fmoc-Lys(Boc)-OH est tout d'abord protégée par une fonction benzyle avec un rendement de 92%. Puis l'amine de cet intermédiaire **9** est déprotégée en milieu acide afin d'obtenir le composé **10** avec un rendement quantitatif. Le couplage de l'acide tri-boc-hydrazinoacétique est ensuite effectué pour obtenir le composé **11** avec un rendement de 76%. Enfin une déprotection de la fonction acide permet d'obtenir le composé final **12** avec un rendement de 86%. L'acide aminé **12** a donc été obtenu avec un rendement global de 60%. Cet acide aminé ainsi synthétisé va être incorporé au sein de la séquence de l'apeline afin d'accéder aux hydrazinopeptides.

iii) Synthèse des hydrazinopeptides

L'acide aminé **12** est couplé sur support solide au sein de la séquence peptidique de l'apeline afin d'obtenir des fluoro-hydrazinopeptides (Schéma 6). Après élongation du peptide apeline sur support solide assistée par micro-ondes sur un synthétiseur CEM Liberty Blue, l'acide aminé **12** est introduit manuellement en partie N-terminale du peptide supporté en utilisant comme agents de couplage HBTU/HOBt. Le couplage est contrôlé par le test colorimétrique Kaiser et TNBS. Après déprotection de l'amine terminale, les différents groupements R fluorocarbonés (composés **14** et **15**) et lipidés (composé **17**) ont été introduits en utilisant HATU comme agent de couplage. Pour le composé **13**, une acylation a été effectuée en présence d'anhydride acétique et pour le composé **16**, le résidu Fmoc-Lys(Fmoc)-OH puis le PEG₂ et enfin les chaînes F4 ont été successivement introduits. (Schéma 5). Le composé **17** possédant une chaîne hydrocarbonée a été synthétisé. Cela nous permettra de comparer les propriétés de liaison non spécifiques de nos fluoro-peptides avec le lipo-peptide. Après coupure des peptides de la résine en milieu acide et purification du brut par CLHP, les composés **13** à

17 ont été obtenus avec une pureté supérieure à 95%. Leur identité a été confirmée par analyse par spectrométrie de masse.



Conditions et réactifs : (a) pipéridine 20% / DMF, 2x10 min ; (b) Composé 13 (3 éq.), HBTU (2,9 éq.), HOBT (2,9 éq.) DIEA (6 éq.) / DMF, 40 min ; (c) Fmoc-AA(P)-OH du groupement R ou chaîne fluorocarbonée ou chaîne lipidée (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (6 éq.) / DMF, 40 min ; (d) anhydride acétique/DIEA/DCM 10/5/85, 10 min ; (e) TFA/Phénol/Thioanisole/Ethanedithiol/H₂O (90/3,75/2,5/1,25/2,5), 3 h ; (f) CLHP en phase inverse.

*Schéma 6 : Synthèse des hydrazinopeptides R-K(hdz)-apelines **13** à **17**.*

Les temps de rétention, obtenus suite à une analyse CLHP en phase inverse, ainsi que les rendements des composés **13** à **17** ont été réunis (Tableau 8). Les hydrazinopeptides acétylé **13**, fluorocarbonés **14**, **15** et **16** ainsi que l'hydrazinopeptide lipidé **17** ont ainsi été obtenus avec des rendements isolés de 14% à 23%.

Composé	Nom	R	Rdt (%)	t _R * (min)
13	Ac-K(hdz)-apeline		23	6.94
14	F4-K(hdz)-apeline		14	8.37
15	F8-K(hdz)-apeline		16	10,19
16	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-K(hdz)-apeline		14	10,42
17	L15-K(hdz)-apeline		17	11,17

*gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 15 min sur une colonne C18

Tableau 8 : Rendements et temps de rétention des hydrazinopeptides **13** à **17**.

L'ensemble des composés possédant une chaîne fluorocarbonée ou lipidée (composés **14** à **17** – 14% à 17%) ont des rendements plus faibles que le composé **13** acétylé (23%). Les temps de rétention des composés **13** à **16** suivent la même tendance que les composés **1**, **2**, **4** et **6**. Le composé **17** portant une chaîne lipidée présente un temps de rétention de 11,17 min. Ce composé possède donc le temps de rétention le plus élevé indiquant une augmentation de l'hydrophobie avec l'introduction de la chaîne lipidée en comparaison avec la chaîne fluorocarbonée F8 ou la pince. Les composés ainsi obtenus ont été mis en présence du fluorophore DY647 pour obtenir les sondes fluorescentes souhaitées.

i) Synthèse des sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes ont été obtenues par une réaction d'acylation chimiosélective en solution entre les hydrazinopeptides préparés précédemment et le DY647 activé sous la forme d'un ester de N-hydroxysuccinimide (Schéma 7). L'avancement de la réaction a été contrôlé par CLHP. Après 1 h à température ambiante, la conversion est généralement complète. Les sondes fluorescentes sont alors isolées par CLHP préparative en phase inverse et caractérisées par CL-SM.

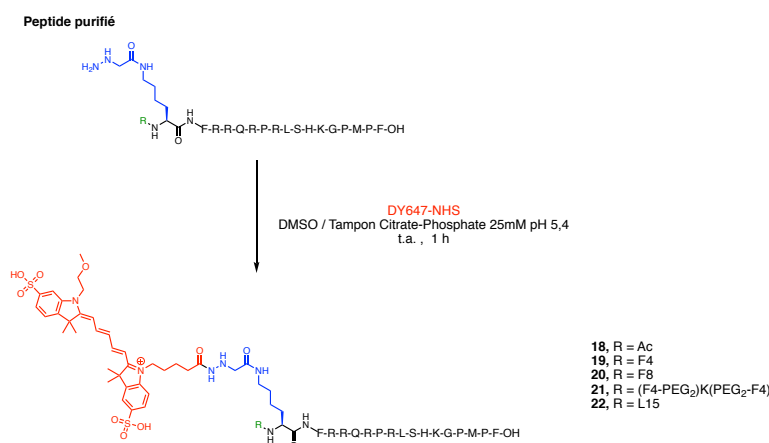


Schéma 7 : Acylation chimio-sélective des hydrazino-peptides pour former les sondes fluorescentes **18** à **22**.

La pureté des composés **18** à **22** ainsi obtenus a été déterminée à plus de 95% par CLHP et leur identité a été confirmée par spectrométrie de masse. Les temps de rétention, obtenus suite à une analyse CLHP en phase inverse ainsi que les rendements des composés **18** à **22** ont été réunis (Tableau 9).

Composé	Nom	Rdt (%)	t _R * (min)
18	Ac- K(hdz(DY647))-apeline	82	8,31
19	F4-K(hdz(DY647))-apeline	89	9,74
20	F8-K(hdz(DY647))-apeline	80	10,77
21	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-K(hdz(DY647))-apeline	92	10,71
22	L15-K(hdz(DY647))-apeline	92	11,57

* gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 15 min sur une colonne C18

Tableau 9 : Caractérisation chimique des sondes fluorescentes **18** à **22**.

Les rendements des acylations chimio-sélectives sont comparables pour l'ensemble des composés. En effet, malgré les différents groupements R, les rendements pour les sondes **18** à **22** sont compris entre 80 et 92%, montrant l'efficacité de la méthode développée. Les temps de rétention eux suivent la même tendance que celle observée précédemment. En effet, une augmentation est observée avec l'augmentation de la longueur de la chaîne fluorocarbonée. De plus, les composés **20** et **21** présentent un temps de rétention similaire. Enfin, le composé possédant le temps de rétention le plus élevé est le composé lipidé **22**, montrant que le lipopeptide est plus hydrophobe que les fluoropeptides. L'obtention de ces sondes a permis d'évaluer leurs propriétés de liaisons non spécifiques aux membranes.

ii) Evaluation de la liaison non spécifique aux membranes cellulaires

Les propriétés de liaison non spécifique aux membranes cellulaires des sondes **18** et **20** à **22** ont été évaluées par microscopie confocale. Pour cela, des cellules HEK 293 n'exprimant aucun récepteur à leur surface ont été incubées en présence des trois sondes fluorescentes. Les cellules ont été marquées au Hoechst, un colorant de l'ADN, afin de délimiter le noyau. Les cellules ainsi traitées ont été incubées avec les sondes fluorescentes à 50 nM et ont été observées en microscopie confocale (Figure 47).

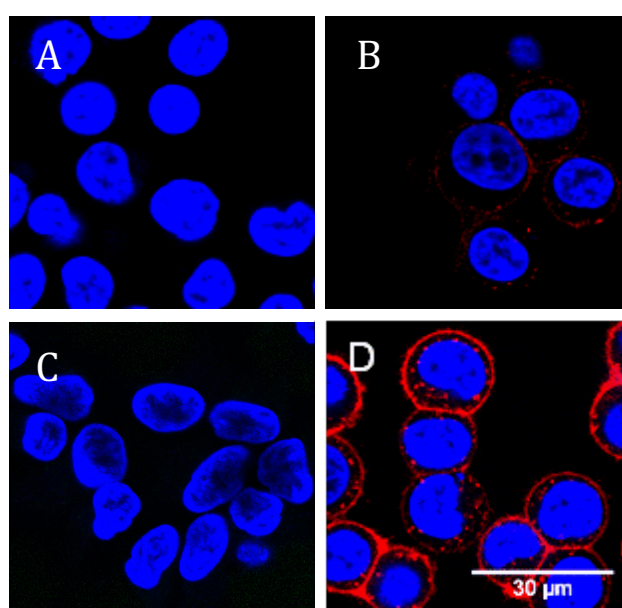


Figure 47 : Etude des interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires par microscopie confocale sur des cellules HEK 293 dont le noyau est marqué au Hoechst (bleu) et incubés avec les sondes fluorescentes (rouge) **18** (A), **20** (B), et **21** (C) et **22** (D) à 50 μ M.

La sonde **18** (Figure 47A) dérivée de l'apeline native ne montre aucune interaction non spécifique avec les membranes cellulaires. En effet, le signal fluorescent de la sonde (en rouge) est totalement absent de l'image A. La sonde **20** (Figure 47B), présente une faible liaison non spécifique aux membranes cellulaires alors qu'aucune interaction n'est observable avec la sonde **21** (Figure 47C). Enfin, la sonde **22** (Figure 47D) présente une forte interaction non spécifique aux membranes cellulaires. Ces résultats montrent que le composé possédant la pince (composé **21**) n'induit pas d'interactions avec la membrane plasmique contrairement au composé **20** (chaîne F8) qui montre une liaison à la membrane. Cette liaison est cependant bien inférieure à celle observée avec le composé lipidé **22**. L'utilisation de fluoro-peptides en alternative aux lipopeptides est donc un avantage important en termes de liaison non spécifique aux membranes

cellulaires. Le composé biocompatible **6**, duquel dérive la sonde fluorescente **21**, portant cette pince fluorocarbonée semble donc présenter des avantages vis-à-vis de la liaison non spécifique aux membranes, comparé au composé **4**, dont dérive la sonde fluorescente **20**.

Après avoir mis en évidence l'absence de liaison non spécifique à la membrane du composé pince, il était intéressant d'étudier son pouvoir hémolytique.

c. Evaluation du pouvoir hémolytique

Les médicaments peptidiques sont souvent injectés par voie intraveineuse. Il est donc intéressant d'évaluer l'interaction de ceux-ci avec les globules rouges présents dans le sang. Nous avons donc déterminé le pouvoir hémolytique des fluoro-apelines sur des globules rouges humains. Pour cela, les globules rouges ont été isolés du sang total humain et incubés en présence des composés **1**, **4** et **6** à des concentrations croissantes jusqu'à 60 μM . Après lecture des plaques d'incubation à une longueur d'onde de 550nm, le pourcentage d'hémolyse a été déterminé (Figure 48).

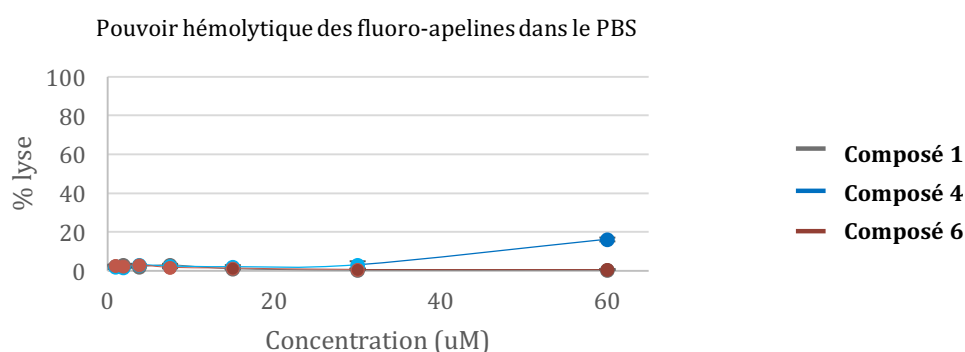


Figure 48 : Evaluation du pouvoir hémolytique des composés **1**, **4** et **6** dans le PBS sur des globules rouges humains.

Ces résultats ont mis en avant le pouvoir hémolytique du composé **4** (F8-apeline) en comparaison aux composés **1** (apeline native), **6** ((F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline) et au triton (utilisé comme composé hémolytique de référence). En effet, une lyse de 5% des globules rouges à 30 μM et de 18% à 60 μM est observée pour le composé **4**. Ainsi, ces résultats confirment les avantages de l'utilisation du composé **6** en alternative biocompatible au composé **4**.

Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un composé peuvent également être affectées par la liaison aux cellules du sang et plus précisément les

érythrocytes. C'est pourquoi cette liaison a été caractérisée pour les composés optimisés.

6. Evaluation des propriétés de liaison aux érythrocytes

Si la liaison à l'albumine est rapidement caractérisée pour les composés thérapeutiques, la liaison aux érythrocytes est souvent négligée. Il est cependant important de la mesurer car elle peut entraîner une modification des paramètres ADME *in vivo*. Une forte liaison aux globules rouges (GR) peut donner lieu à une incompréhension des paramètres obtenus lors des études pharmacocinétiques. Une évaluation de la liaison aux érythrocytes des dérivés de l'apeline intéressants a donc été réalisée.

Ainsi, la liaison des composés **4** et **6** aux érythrocytes a été déterminée (Tableau 10). Un composé décrit pour se lier fortement aux érythrocytes (le Méthazolamide) ainsi qu'un composé se liant très peu aux érythrocytes (le Verapamile) ont été également évalués afin d'obtenir des contrôles sur cette étude. Le composé **2** n'a malheureusement pas pu être évalué en raison du temps d'incubation de 1 h. En effet, le temps de demi-vie de quelques minutes de l'apeline a empêché d'étudier sa liaison aux érythrocytes. Le coefficient de partage sanguin calculé représente le rapport de la concentration retrouvée dans le compartiment cellulaire des érythrocytes divisé par la concentration retrouvée dans le compartiment plasmatique. Ainsi, plus le rapport est élevé, plus la liaison aux érythrocytes est élevée.

Cette étude a mis en avant une faible liaison aux érythrocytes du composé **4** (rapport inférieur à 1) et une liaison moyenne (rapport proche de 1) pour le composé **6**. Cela indique que la présence de la chaîne F8 induit une liaison aux érythrocytes moyenne alors que la pince n'induit pas de liaison.

Composé	Nom	Coefficient de partage sanguin
4	F8-apeline	0.9 ± 0.3
6	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-apeline	0.1 ± 0.1
-	Verapamile	0.2 ± 0.1
-	Metahzolamide	29 ± 4

Tableau 10 : Coefficient de partage sanguin des composés 4 et 6.

Dans le cas des dérivés de l'apeline, une liaison importante aux érythrocytes n'a donc pas été observée. Cependant la présence de la chaîne F8 semble augmenter cette liaison.

Après ces études de toxicité, et avant l'évaluation *in vivo* des fluoro-apelines, nous avons souhaité étudier le mécanisme menant à la stabilisation plasmatique des fluoro-apelines **4** et **6**.

7. Etude du mécanisme de stabilisation des fluoro-apelines

Nous avons d'abord fait l'hypothèse que les fluoro-apelines **4** et **6** étaient capables de s'organiser en micelles en solution, pouvant induire une protection du peptide vis-à-vis de la dégradation enzymatique par encombrement stérique.

a. Etude de l'organisation en micelles ou agrégats des fluoro-apelines

Les propriétés d'organisation des chaînes fluorocarbonées ont mené dans un premier temps à l'étude de l'organisation des fluoro-peptides en solution aqueuse. Ces propriétés ont été étudiées par fluorescence. Pour cela, le rouge du Nil, un fluorophore solvatochrome, capable de changer de propriétés spectrales selon la polarité de son environnement, a été utilisé¹⁸⁶. Notre essai est donc basé sur le solvatochromisme du rouge du Nil qui présentera des propriétés de fluorescence modifiées lorsqu'il sera en solution en présence des fluoro-peptides sous forme de monomères ou piégé au sein de micelles (Figure 49). Ces études d'organisations ont été effectuées dans les solvants et tampons utilisés lors des expériences *in vitro* et *in vivo* : l'eau, le PBS et le NaCl 0,9%.

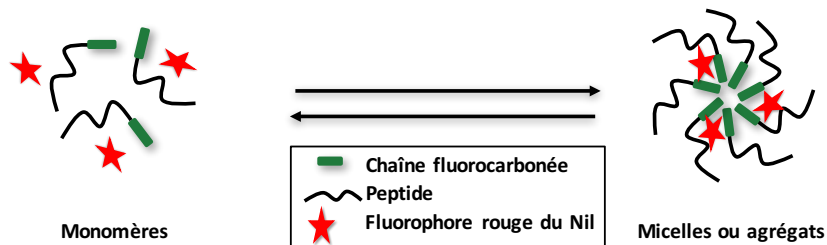


Figure 49 : Principe de l'étude de la formation de micelles ou agrégats.

Les mesures de fluorescence ont mis en avant l'absence d'organisation des molécules **1** (apeline) et **6** (pince F6) dans les tampons cités ci-dessus jusqu'à une concentration de 1 mM. La molécule **4** (chaîne linéaire F8) en revanche s'organise en solution à une

concentration de 100 μM (concentration micellaire critique). En effet, on observe un déplacement important de l'émission de fluorescence dans le bleu cette concentration.

Dans le cas des fluoro-apelines, les études de stabilité plasmatiques ont été effectuées à une concentration de 5 μM . La stabilité de la molécule **4** n'est donc pas totalement imputable à une organisation puisque la CMC est plus élevée que la concentration à laquelle l'étude a été menée. Dans le cas de la molécule **6**, présentant également une stabilité plasmatique supérieure à 24h, l'absence d'organisation du peptide semble confirmer qu'un autre mécanisme est responsable de la stabilité des fluoro-peptides **4** et **6**. Ainsi nous avons émis une autre hypothèse qui serait la liaison des fluoro-peptides à l'albumine.

b. Etude de la liaison à l'albumine par anisotropie de fluorescence

La liaison à l'albumine est une des méthodes utilisées dans le domaine des peptides médicaments pour augmenter la stabilité plasmatique des peptides. Pour démontrer une corrélation éventuelle entre la stabilité plasmatique des fluoropeptides et leur liaison à l'albumine, nous avons décidé d'évaluer l'affinité des composés **18** à **21** pour cette protéine

En effet, nous avons montré dans la première partie que la stabilité de ces composés était corrélée à la longueur de la chaîne fluorocarbonée. Pour mesurer les constantes d'affinités de ces peptides avec l'albumine, nous avons décidé de développer un essai rapide basé sur la mesure de l'anisotropie de fluorescence. Cette méthode est basée sur le changement de vitesse de rotation du fluorophore DY647 dans l'espace, qui modifie la polarisation de la lumière, en fonction de l'encombrement stérique. En effet, lorsque les fluoro-peptides sont sous forme de monomères libres, le fluorophore a une vitesse de rotation élevée qui polarise peu la lumière. Au contraire, cette vitesse de rotation est fortement diminuée lorsque le fluoro-peptide fluorescent est dans un environnement encombré, tel que lors d'une liaison à une protéine (Figure 50). Cette différence de polarisation permet de déterminer des constantes de dissociation des fluoro-peptides à l'albumine.

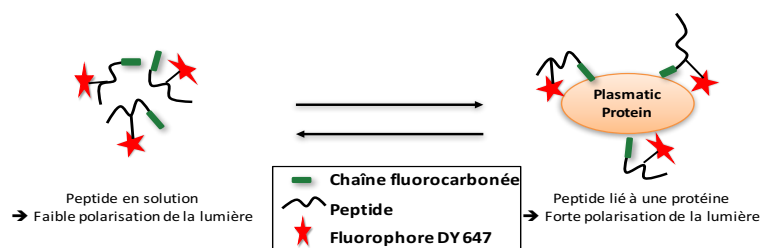


Figure 50 : Principe de l'étude de la liaison aux protéines plasmatiques des fluoro-peptides par anisotropie de fluorescence.

Ainsi nous avons utilisé les peptides fluorescents **18** à **21** dérivés des composés **1**, **2**, **4** et **6**. Les sondes fluorescentes ont été mises en présence de différentes concentrations en albumine (Figure 51).

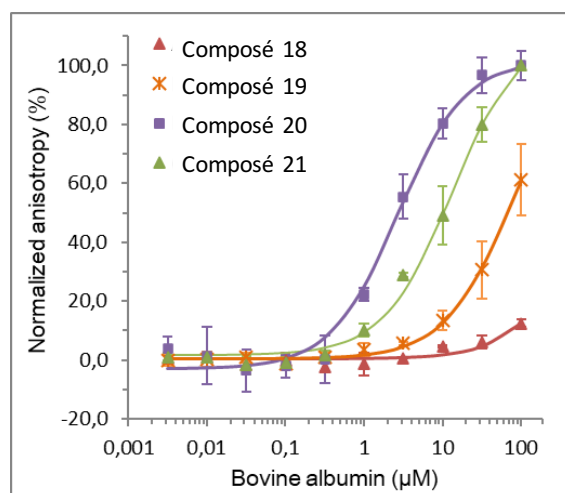


Figure 51 : Anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés **18** à **21**.

Les constantes de dissociations à la BSA pour chaque sonde étudiée ont pu être déterminées (Tableau 11).

Composé	Nom	K_d liaison à la BSA (μM)	$t_{1/2}$ (min)
18	Ac- K(hdz(DY647))-apeline	>500	$7,8 \pm 0,8$
19	F4-K(hdz(DY647))-apeline	$79,6 \pm 13,9$	$65 \pm 2,1$
20	F8-K(hdz(DY647))-apeline	$2,60 \pm 0,19$	> 1440 (80)
21	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)- K(hdz(DY647))-apeline	$10,5 \pm 1,41$	> 1440 (52)

*plasma de souris, 5 μM
**pourcentage de peptide restant dans le plasma à 24 h

Tableau 11 : Détermination des K_d de liaison à l'albumine des sondes fluorescentes **18** à **21** par anisotropie de fluorescence.

Ces résultats d'anisotropie de fluorescence mettent en avant une très faible liaison du composé **18** : K_d supérieur à 500 μM . Par contre, les composés **20** et **21** présentent une constante de dissociation à l'albumine de $2,60 \pm 0,19 \mu\text{M}$ et $10,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$. Ces constantes de dissociation, de l'ordre de la dizaine de micro-molaire, montrent la capacité des composés **4** et **6** à se lier à l'albumine. Ainsi, la liaison à l'albumine semble être le mécanisme menant à la stabilisation des fluoro-apelines.

Afin de caractériser cette liaison, les fractions liées à la BSA à la concentration de 100 μM ont été mesurées pour les composés **18**, **20** et **21** (Tableau 12).

Composé	Concentration en BSA (μM)	F _b (%)
18	100 μM	8,06
20		97,1
21		88,4

Tableau 12 : Fraction liée à l'albumine bovine des composés **18**, **20** et **21**.

Cette étude a montré la faible fraction liée (8,06%) du composé **18** confirmant la faible liaison de celui-ci à la BSA ($K_d > 500 \mu\text{M}$). Nous avons également pu confirmer que les composés **20** et **21** se liaient à la BSA puisqu'ils présentent des fractions liées respectives de 97,1% et 88,4%. De plus nous avons pu corrélérer l'augmentation de la fraction liée avec l'augmentation de l'affinité pour la BSA. La liaison à la BSA semble donc bien être le mécanisme de protection des fluoro-apelines.

Afin de confirmer que le mécanisme est bien celui-ci, la synthèse d'une fluoro-apeline fluorescente présentant une faible stabilité dans le plasma a été entreprise. En effet, si notre hypothèse est correcte, ce composé devrait présenter une moins bonne capacité à se lier à l'albumine. Ainsi, la synthèse du composé **19** (dérivé fluorescent du composé **2**) a été réalisée afin de comparer les constantes de dissociation avec des composés plus stables dans le plasma (composés **4** et **6**). Cette synthèse a été réalisée en suivant la même stratégie que décrite précédemment par une réaction d'acylation chimiosélective. Une fois obtenu, la capacité de liaison du composé **19** à l'albumine a été mesurée par anisotropie de fluorescence. Ainsi, la constante de dissociation de la molécule **19** est dix fois plus élevée que celles des composés **20** et **21** ($K_d = 79 \mu\text{M}$ vs 2.6 et 10.5 μM respectivement) montrant ainsi une capacité à se lier à l'albumine plus faible.

Ce résultat confirme que les peptides présentant une stabilité plasmatique plus faible ont également une capacité de liaison à l'albumine moindre. Nous avons de la sorte pu montrer une très bonne liaison à l'albumine des composés **20** et **21**, une liaison plus faible pour le composé **19** et enfin une liaison encore plus faible pour le composé **18**. Nous avons donc pu corrélérer la stabilité plasmatique croissante avec la capacité à se lier à l'albumine (Figure 52).

Capacité de Liaison à la BSA	Ac-K(DY647)-apeline <i>Composé 18</i>	<	F4-K(DY647)-apeline <i>Composé 19</i>	<	F8-K(DY647)-apeline <i>Composé 20</i>	≈	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ F4)-K-(DY647)-apeline <i>Composé 21</i>
t_{1/2} plasmatique	Apeline <i>Composé 1</i>	<	F4-apeline <i>Composé 2</i>	<	F8-apeline <i>Composé 4</i>	≈	(F4-PEG ₂) ₂ -K- apeline <i>Composé 6</i>

Figure 52 : Corrélation entre les propriétés de liaison à l'albumine et la stabilité plasmatique des fluoro-apelines.

En conclusion, nous avons pu montrer que le mécanisme responsable de la stabilisation plasmatique des fluoro-apelines est bien une liaison à l'albumine. Afin d'approfondir la compréhension du mécanisme, des études de cristallographie du complexe fluoro-apeline/albumine ont été effectuées afin de déterminer précisément le site de liaison du peptide et éventuellement permettre une optimisation de la liaison.

- a. Etudes par cristallographie de la liaison à l'albumine des fluoro-apelines modifiées.

L'obtention de structures cristallographiques de complexes ligand/récepteur a été un développement important dans le domaine de la chimie médicinale. Par ce biais, les interactions des molécules synthétisées avec leurs cibles ont pu être caractérisées^{187,188}. L'interaction des fluoro-peptides avec les protéines plasmatiques, nullement étudiée jusque-là, pourrait ainsi être caractérisée. L'albumine de sérum humain (HSA) est connue pour se lier à des médicaments et plusieurs sites de liaison à l'albumine ont ainsi été décrits (Figure 53).

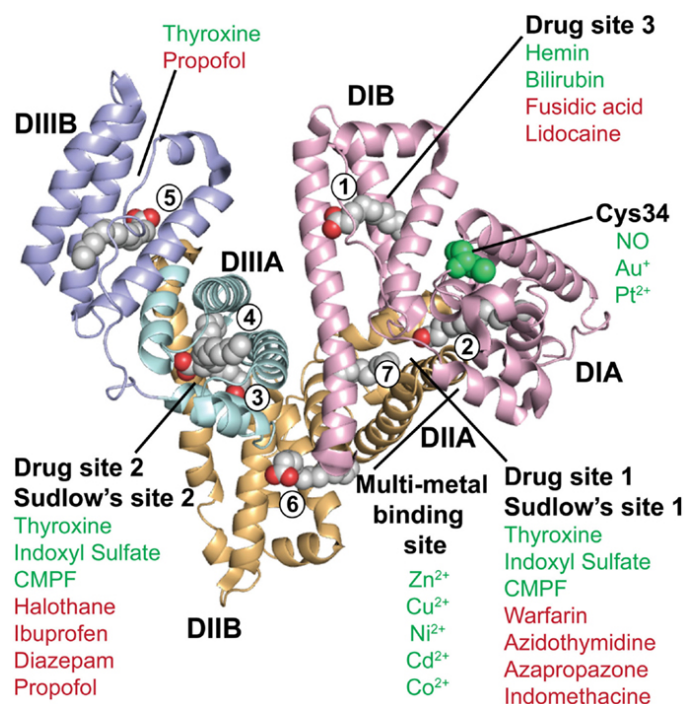


Figure 53 : Structure de la HSA et identifications des sites de liaison aux médicaments et ligands les plus fréquents¹⁸⁹.

Dans le but de confirmer la liaison des fluoro-peptides avec l'albumine de sérum humain (HSA) et de caractériser celle-ci, des co-cristallisations des composés **4** et **6** avec la HSA ont été réalisées par l'équipe du Dr. Birch (IGBMC). Pour cela, cinq équivalents de fluoro-peptides ont été incubés en présence de HSA. Après une série d'optimisations, les cristallisations ont permis d'obtenir des cristaux de résolution inférieure à 2,8 Å permettant ainsi d'obtenir des diffractions exploitables. Nous avons ainsi pu obtenir des images de diffraction aux rayons X permettant d'identifier l'interaction des fluoro-peptides **4** et **6** avec la HSA (Figure 54).

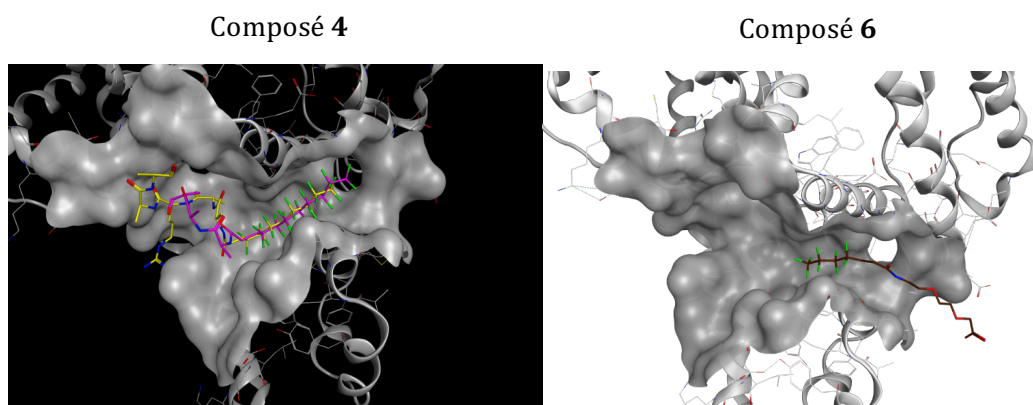


Figure 54 Structures cristallographiques des complexes fluoro-apelines **4** et **6** avec l'albumine humaine.

Les images obtenues mettent en avant l'insertion complète de la chaîne F8 du composé **4** avec le site de liaison 2 de la HSA. Les mêmes conditions de cristallisation ont permis de visualiser le composé **6** lié à l'albumine par une seule des deux chaînes fluorocarbonées présentes sur ce composé sur le même site de liaison (Figure 24). La poche de liaison est la même quelle que soit la nature de la partie fluorocarbonée des fluoropeptides **4** et **6**. D'autre part, seule une poche de liaison semble occupée par le fluoro-peptide. En effet, l'excès de fluoro-peptides lors de la cristallisation n'influe pas sur la liaison à cette unique cavité de l'albumine mettant en avant la liaison spécifique des fluoro-peptides à ce site. Ainsi les fluoro-peptides **4** et **6** se lient au même site de la HSA que l'ibuprofène et le propofol.

Nous avons donc pu montrer pour la première fois par cristallographie la liaison des fluoro-peptides à la HSA et déterminer la poche de liaison impliquée dans cette liaison. Nous avons donc réussi à déterminer le mécanisme de stabilisation des fluoro-peptides. Cet objectif atteint, nous avons souhaité évaluer les propriétés *in vivo* de notre fluoro-peptide stable et biocompatible *in vivo*.

8. Evaluation biologique de la fluoro-apeline optimisée

L'effet hypotenseur de la fluoro-apeline **4** a été précédemment évalué *in vivo* chez des rats vigiles normotendus. Cette étude a mis en avant une augmentation de l'effet hypotenseur prononcé à la dose de 15 nmol/kg après une administration intraveineuse. Les propriétés hypotensives du composé **6** ont été évaluées dans le même modèle (Figure 55).

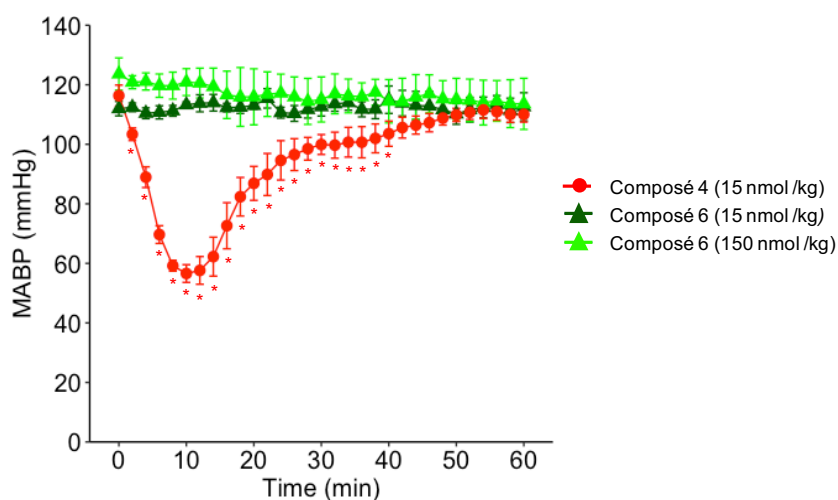
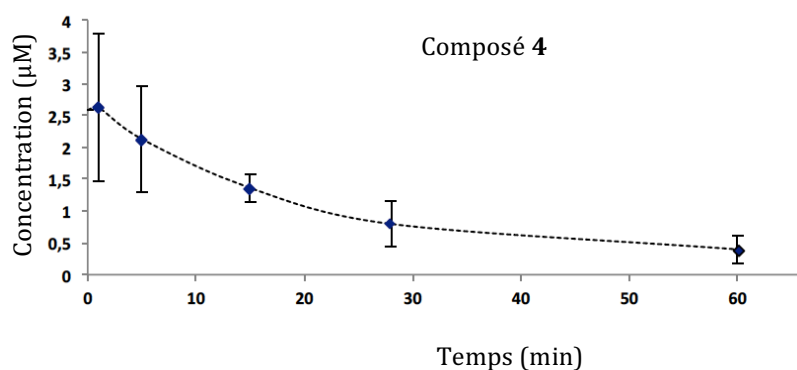
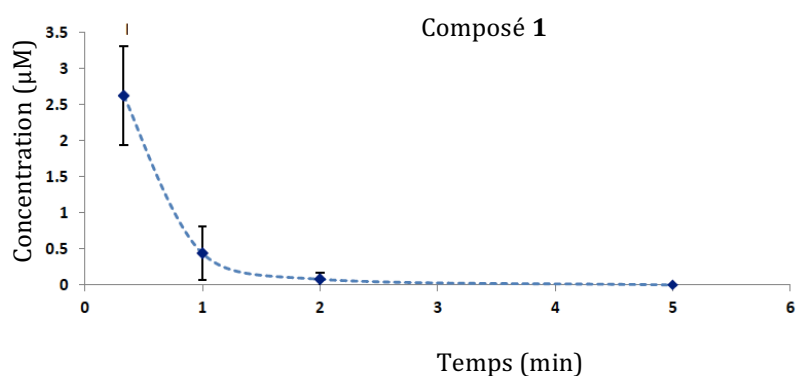


Figure 55: Evaluation *in vivo* de la diminution de pression artérielle après administration intraveineuse des composés **4** (rouge) et **6** (vert) dans un modèle de rat normotendu.

Les résultats confirment l'effet hypotenseur du composé **4** observé lors des expériences précédentes à la dose de 15 nmol/kg. En revanche, à la même dose, le composé **6** n'entraîne aucune diminution de la pression artérielle. Au vu de l'efficacité du composé **6** *in vitro* et de sa stabilité dans le plasma de souris *ex vivo*, ces résultats étaient surprenants. Nous avons donc évalué l'effet hypotenseur à la dose plus élevée de 150 nmol/kg. A nouveau, aucun effet de ce composé n'a pu être observé *in vivo*. Afin de comprendre ces résultats, des études pharmacocinétiques ont alors été entreprises.

9. Etudes pharmacocinétiques des fluoro-apeline optimisées.

Différents aspects *in vivo* tels que le temps de demi-vie plasmatique, la clairance et la distribution peuvent être déterminés par des études de pharmacocinétiques. Ces caractéristiques sont importantes pour comprendre et adapter les études d'activité *in vivo* avec les composés en question. Les composés **1**, **4** et **6** ont été injectés par voie intraveineuse à la dose de 300 nmol/kg (Figure 56). Les composés sont dosés à différents temps dans le sang et quantifiés par spectrométrie de masse.



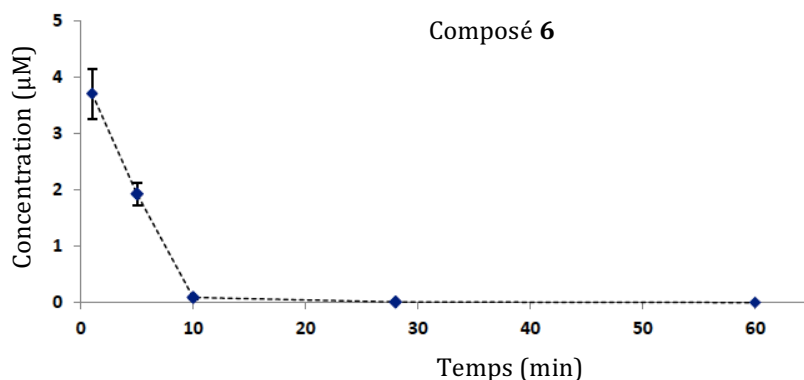


Figure 56 : Evolution de la concentration plasmatique des composés **1**, **4** et **6** chez la souris après administration intraveineuse à 300 nmol/kg.

Ces études de pharmacocinétique indiquent une disparition rapide des composés **1** et **6** en comparaison de celle du composé **4**. Afin de pouvoir comparer différents paramètres pharmacocinétiques pour ces trois composés, les temps de demi-vie, les clairances ainsi que les volumes de distribution ont été réunis (Tableau 13).

Paramètres pharmacocinétiques	Composé 1	Composé 4	Composé 6
$t_{1/2}$ (min)	$0,22 \pm 0,05$	$21 \pm 3,0$	$1,7 \pm 0,2$
Clairance (mL/min/kg)	163 ± 74	5 ± 2	13 ± 1
Volume distribution (mL/kg)	52 ± 36	142 ± 70	32 ± 7

Tableau 13 : Paramètres pharmacocinétiques du composé **1**, **4** et **6**.

Le temps de demi-vie *in vivo* du composé **1** est de quelques secondes ($0,22 \pm 0,05$ min) expliquant la nécessité de stabiliser l'apeline. L'introduction de la chaîne F8 pour le composé **4** et de la pince portant des PEG et des chaînes F4 pour le composé **6** ont permis d'augmenter cette demi-vie respectivement jusqu'à $21 \pm 3,0$ min et $1,7 \pm 0,2$ min. Ainsi la chaîne F8 permet d'augmenter le temps de demi-vie d'un facteur 100 et la pince a permis de l'améliorer d'un facteur 9. Cette différence de temps de demi-vie entre le composé **4** et **6** peut expliquer l'absence d'effet hypotenseur pour le composé **6**. En effet, si celui-ci est totalement dégradé en quelques minutes, il ne peut atteindre sa cible biologique et exercer son activité.

La comparaison des clairances entre les trois composés indique que l'apeline est très vite éliminée de l'organisme (163 ± 74 mL/min/kg) alors que les composés **4** et **6** présentent des clairances faibles et comparables (respectivement 5 ± 2 mL/min/kg et

13 ± 1 mL/min/kg). Cela indique que la chaîne F8 tout comme la pince permettent de diminuer la clairance fortement.

Une forte distribution dans les tissus peut également expliquer une disparition si rapide du produit du compartiment plasmatique. La comparaison des volumes de distribution des composés **1** (52 ± 36 mL/kg), **4** (142 ± 70 mL/kg) et **6** (32 ± 7 mL/kg) indique que seul le composé possédant la chaîne F8 se distribue fortement dans les tissus. En effet, le volume sanguin chez la souris est de 70 mL/kg. Un volume de distribution supérieur à cette valeur indique une forte distribution dans les tissus. Ainsi la présence de la chaîne F8 induit une forte distribution que la pince du composé **6** n'induit pas. La clairance et la distribution ne peuvent donc pas expliquer la disparition rapide du composé **6** du compartiment plasmatique. Enfin, la liaison aux érythrocytes de ce composé est faible. L'hypothèse la plus probable serait donc que le composé **6** présente des sites de reconnaissances enzymatiques spécifiques d'enzymes présentes *in vivo* uniquement telle que l'enzyme ACE-2 et soit ainsi rapidement dégradée.

C. Conclusion du chapitre 1

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'apeline-17, un peptide de 17 acides aminés, ligand du récepteur APJ et présentant un intérêt dans divers domaines thérapeutiques tels que le traitement des maladies cardiovasculaires ou du diabète. Ce peptide a été choisi pour effectuer la preuve de concept pour la stratégie FluoroPep. Cette dernière est basée sur l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée sur le peptide. Ainsi, l'introduction de la chaîne fluorocarbonée F8 à l'extrémité N-terminale de l'apeline a permis d'augmenter sa stabilité plasmatique de quelques minutes à plus de 24 h dans le plasma de souris *in vitro*. Les propriétés pharmacologiques de la F8-apeline sont proches du peptide natif mais son activité hypotensive chez le rat normotendu est trois fois meilleure que l'apeline à une dose 26 fois plus faible (15 nmol/kg). Ainsi la F8-apeline présente une stabilité et une activité *in vivo* très supérieures à l'apeline.

Cependant, la chaîne fluorocarbonée F8 utilisée dans le cadre de la stratégie FluoroPep a une structure chimique proche de la chaîne PFOA (de la famille des chaînes fluorocarbonées longues). Cette chaîne est utilisée massivement dans l'industrie lourde et est par conséquent accumulée dans l'environnement et chez l'Homme (contamination par les eaux). Dans le but de s'affranchir de potentiels problèmes de bioaccumulation, nous avons décidé d'entreprendre la conception, la synthèse et l'évaluation d'une alternative biocompatible à la F8-apeline.

Dans un premier temps, nous avons donc cherché à diminuer la longueur de la chaîne fluorocarbonée. Nous avons donc entrepris une étude de l'influence de la longueur de la chaîne fluorocarbonée sur la stabilité et la pharmacologie de l'apeline. Nous avons ainsi pu montrer que la diminution de la longueur de la chaîne entraînait une diminution importante de la stabilité plasmatique. Nous avons alors décidé d'introduire deux chaînes plus courtes (composés pince) au sein du même peptide (avec et sans espaceur PEG₂) afin de déterminer si la présence de deux chaînes permettait de pallier cette perte de stabilité. Ces composés sous forme de pinces ont montré une stabilité supérieure à 24 h dans le plasma de souris *in vitro*. Nous avons donc évalué les propriétés pharmacologiques de ces composés. Cette étude a permis de sélectionner le composé (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline qui présente des propriétés pharmacologiques comparables à celles de la F8-apeline. L'évaluation de sa toxicité sur les lignées humaines HEK 293, Caco-2, HEP-G2 et sur les globules rouges a mis en évidence une absence de cytotoxicité même à des concentrations de 60 µM alors que la F8-apeline entraîne la mort de 18% des cellules à la même concentration. Afin d'évaluer les interactions non spécifiques du composé pince aux membranes cellulaires, nous avons conçu et synthétisé des dérivés fluorescents originaux obtenus par une méthode d'acylation chimiosélective. Ces outils ont permis de montrer que le dérivé pince ne présentait aucune interaction avec la membrane plasmique de cellules à 50 nM, contrairement au dérivé F8-apeline et surtout à la lipo-apeline (apeline fonctionnalisée par une chaîne lipidée palmitoyl généralement utilisée pour augmenter la stabilité enzymatique des peptides). Ces résultats ont ainsi pu mettre en avant l'intérêt d'utiliser une chaîne fluorocarbonée en remplacement de la chaîne lipidée. Le composé (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline n'est pas cytotoxique, ne se lie pas de façon non spécifique aux membranes plasmiques des cellules et n'est pas hémolytique vis-à-vis des globules rouges jusqu'à 60 µM. Ainsi, nous avons développé une alternative au composé F8-apeline stable, actif *in vitro* et biocompatible.

Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre le mécanisme de stabilisation induit par la chaîne F8 et le motif pince (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4) en utilisant les sondes fluorescentes préparées par acylation chimiosélective. Ces sondes nous ont permis notamment de mesurer leur capacité à interagir avec l'albumine en déterminant des constantes de dissociations par anisotropie de fluorescence. Nous avons ainsi pu montrer que l'augmentation de la longueur de la chaîne fluorocarbonée s'accompagnait d'une augmentation de l'affinité pour la BSA. Ainsi, le composé pince ($K_D = 10,2 \pm 1,41$ µM) présente une affinité plus faible que la F8-apeline ($K_D = 2,60 \pm 0,19$ µM) mais

cependant bien meilleure que celle de l'apeline ($K_D > 500 \mu\text{M}$). Ces résultats ont donc montré que le mécanisme de stabilisation plasmatique de la méthode FluoroPep passait probablement par une liaison à l'albumine. Afin de confirmer ce résultat, des essais de co-cristallisation de la F8-apeline et de la (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline en présence d'albumine humaine ont été entrepris. Les structures cristallographiques obtenues ont montré une insertion complète de la chaîne fluorocarbonée F8 dans le site de liaison 2 de l'albumine humaine. En revanche, seule une insertion partielle d'une unique chaîne fluorocarbonée de la pince a pu être observée. Cette insertion partielle peut expliquer notamment la constante de dissociation à l'albumine plus élevée pour le composé pince. Ainsi nous avons pu confirmer que la liaison à l'albumine était le mécanisme de stabilisation des fluoro-apelines.

Suite à ces résultats, nous avons dans un troisième temps évalué les propriétés hypotensives *in vivo* du composé optimisé. Malheureusement, la mesure de la diminution de la pression artérielle chez le rat normotendu a montré une absence d'activité du composé (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline aux doses de 15 nmol/kg et de 150 nmol/kg. Ces résultats surprenants, compte tenu de la stabilité plasmatique élevée *in vitro* et des propriétés pharmacologiques proches de la F8-apeline, nous ont conduits à effectuer des études de pharmacocinétique.

Nous avons donc dans un dernier temps entrepris des études pharmacocinétiques sur l'apeline, la F8-apeline et la (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline. Ces études ont montré une disparition rapide du compartiment plasmatique pour l'apeline ($t_{1/2} = 0,22 \pm 0,05 \text{ min}$) et le composé pince ($t_{1/2} = 1,7 \pm 0,2 \text{ min}$). La F8-apeline présente quant à elle un temps de demi-vie de 21 minutes. La forte clairance permet d'expliquer cette disparition rapide pour l'apeline native. La forte distribution du composé F8-apeline permet d'expliquer le temps de demi-vie amélioré pour ce composé. En revanche, aucun paramètre pharmacocinétique ne permet d'expliquer le faible temps de demi-vie du composé (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline. En effet, la clairance tout comme le volume de distribution de ce composé sont faibles. Ainsi il est possible que le composé soit dégradé rapidement par des enzymes présentes dans le sang circulant et/ou des tissus et absentes dans le plasma *in vitro*, dans lequel le composé pince présente une stabilité de plus de 24 h.

Pour mieux comprendre le devenir du composé pince, il serait à présent intéressant d'identifier et de quantifier les métabolites qui se forment et les comparer à ceux obtenus pour l'apeline et la F8-apeline. Cela permettrait ainsi de détecter les sites de coupure *in vivo* du peptide et éventuellement de stabiliser ces positions en modifiant la

nature des acides aminés impliqués. En parallèle, l'optimisation rationnelle basée sur la structure cristallographique, de la partie s'insérant dans la poche de liaison de l'albumine humaine pourrait être réalisée en s'appuyant sur la modélisation moléculaire.

CHAPITRE 2 – EXTENSION DU CONCEPT FLUROPEP A D'AUTRES PEPTIDES CIBLANT LES RCPG : EXEMPLE DE LA SPEXINE

A. Le système GalR/spexine et son intérêt thérapeutique

1. Les récepteurs couplés aux protéines G de la galanine (GalR)

Le premier récepteur couplé aux protéines G de la galanine a été découvert en 1993 par l'équipe du Pr. Tatemoto¹⁹⁰ et a été nommé GalR1 (Galanine Receptor 1). Ce récepteur doit son nom à son ligand endogène, la galanine, qui est un peptide de 29 acides aminés (30 chez l'Homme¹⁹¹) et dont la structure a été déterminée en 1983¹⁹². L'équipe du Dr. Smith a découvert, en 1997¹⁹³ puis en 1998¹⁹⁴, deux récepteurs de la galanine possédant des structures différentes de GalR1 nommés respectivement GalR2 et GalR3¹⁹⁵¹⁹⁶. Ces trois récepteurs font partie de la classe A des RCPG et possèdent donc des structures similaires et notamment trois domaines distincts : extracellulaires, intracellulaires et transmembranaires. Néanmoins, les sites de liaison de ces 3 récepteurs sont différents et affectent la liaison à leur ligand (Figure 57). La distribution des récepteurs de la galanine est dans les tissus du système nerveux central et périphérique^{197,198}. Leur présence dans des tissus périphériques a également pu être identifiée notamment dans les tissus cardiaques, du système digestif et de la peau¹⁹⁹. L'implication de ces trois RCPG a été décrite et étudiée notamment dans le cadre de l'anxiété²⁰⁰ et la neurodégénérescence²⁰¹. De plus, les divers rôles de ces récepteurs dans des mécanismes physiologiques périphériques ont été mis en avant (Tableau 14) et rendent leurs études intéressantes dans un cadre thérapeutique.

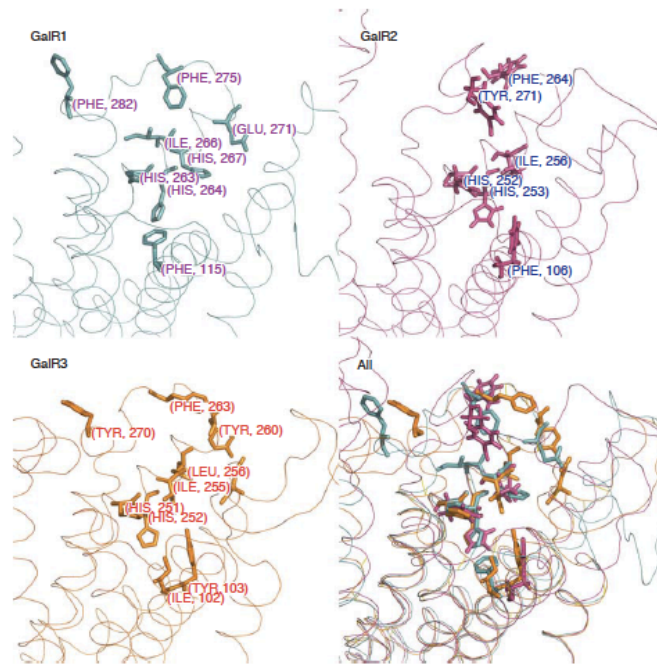


Figure 57 : Résidus clés du domaine de liaison au ligand des récepteurs GalR1, GalR2 et GalR3²⁰².

Récepteur	Effet des agonistes	Effet des antagonistes
GalR1	<ul style="list-style-type: none"> -Réduction de la libération d'acétylcholine dans les neurones cardiaques (bradycardies) -Effet anti-nociceptif dans les douleurs neuropathiques -Traitement de maladies du tractus gastro-intestinal (reflux, dyspepsie) -Effet anti-convulsif 	<ul style="list-style-type: none"> -Anxiolytique, Antidépresseur -Amélioration des troubles de la mémoire -Facilite l'apprentissage
GalR2	<ul style="list-style-type: none"> -Effet neuro-protecteur dans les maladies neurodégénératives -Anxiolytique, Antidépresseur -Anti-convulsant 	-
GalR3	<ul style="list-style-type: none"> -Inhibiteur de la production d'ocytocine 	<ul style="list-style-type: none"> -Anxiolytique, Antidépresseur -Réduit la prise d'alcool -Diminue la sévérité des pancréatites aiguës

Tableau 14 : Mécanismes physiologiques impliquant les récepteurs GalR1, GalR2 et GalR3²⁰³.

En conséquence de cet intérêt thérapeutique, différentes petites molécules et peptides ligands de ces récepteurs ont été développés. Parmi les molécules développées²⁰³, le peptide M617 est un agoniste présentant une haute sélectivité pour GalR1 ($K_i = 0,23$ nM) en comparaison à son affinité pour GalR2 ($K_i = 5,7$ nM) et GalR3 ($K_i = 49$ nM)²⁰⁴. Le peptide M1153 est lui plus sélectif du récepteur GalR2 ($K_i = 4,98$ nM) que des récepteurs GalR1 ($K_i = 1890$ nM) et GalR3 ($K_i = 230$ nM)²⁰⁵. Cependant, à ce jour, aucun agoniste sélectif du récepteur GalR3 n'a été décrit. En revanche, il existe des antagonistes décrits pour chacun des récepteurs. Le peptide M32 a été décrit comme antagoniste sélectif du récepteur GalR1 avec une affinité (K_i) de 0.18 ± 0.16 nM ($K_{i, GalR2} = 2.18 \pm 0.48$ nM et $K_{i, GalR3} = 8.22 \pm 0.11$ nM)²⁰⁶. La molécule M871 est un antagoniste sélectif du récepteur GalR2 avec une affinité de 13 nM ($K_{i, GalR1} = 420$ nM et $K_{i, GalR3} = > 10000$ nM)²⁰⁴. Enfin, la molécule SNAP 398299 est un antagoniste sélectif de GalR3 avec une affinité de 5,3 nM ($K_{i, GalR1} = > 1000$ nM et $K_{i, GalR2} = > 1000$ nM)²⁰⁷. Ainsi des modulateurs de l'activité des récepteurs de la galanine existent. Les agonistes cités ci-dessus des récepteurs de la galanine ont cependant été développés avant 2012. Un nouveau ligand peptidique des récepteurs de la galanine, la spexine, a depuis été découvert.

2. Le peptide spexine

La spexine (spx), également appelée Neuropeptide Q, est un neuropeptide hormone découvert en 2007 par une méthode de criblage bio-informatique du génome humain²⁰⁸. Ce peptide, constitué de 14 acides aminés, montre une homologie de séquence significative avec le peptide galanine. Deux peptides spexines, spexine 1 et spexine 2, présentant une forte homologie de séquence (Figure 58) ont été découverts mais seule la spexine 1 est présente chez l'Homme²⁰⁹. C'est ainsi qu'en 2014, le peptide spexine a été désorphanisé en montrant une activation des récepteurs GalR2 et GalR3²⁰⁹ et faisant donc de lui un agoniste de ces récepteurs. En revanche, aucune activation du récepteur GalR1 n'a pu être montrée par le peptide spexine²⁸. Très rapidement, son étude a été entreprise principalement dans le domaine du diabète^{211,212} et de l'obésité^{213,214}. En effet, une co-localisation de la spexine avec l'insuline a été montrée lors de la découverte de ce peptide dans les cellules β des îlots de Langerhans chez l'Homme et le cochon²¹⁴. D'autres travaux mettent en avant la fonction de la spexine dans la régulation de l'humeur²¹⁵ et de la nociception²¹⁶.

SPX2	An_SPX2	R	N	W	G	P	Q	S	M	L	Y	L	K	G	R	Y	G	R	R
	Coel_SPX2	R	N	W	G	P	Q	S	M	L	Y	L	K	G	R	Y	G	R	-
	Ch_SPX2	R	N	W	G	P	Q	S	I	L	Y	L	K	G	R	Y	G	R	R
	Zf_SPX2	K	N	W	G	P	Q	S	M	L	Y	L	K	G	K	H	G	R	R
	Xe_SPX2	R	N	W	G	P	Q	S	M	M	Y	L	K	G	R	H	G	R	R
	Md_SPX2	H	W	G	P	Q	S	M	M	Y	L	K	G	K	Y	G	K	R	R
SPX1	Zf_SPX1	R	R	N	W	T	P	Q	A	M	L	Y	L	K	G	T	Q	G	R
	To_SPX1	R	R	N	W	T	P	Q	A	M	L	Y	L	K	G	T	Q	G	R
	An_SPX1	R	R	N	W	T	P	Q	A	M	L	Y	L	K	G	A	Q	G	R
	Ch_SPX1	R	R	N	W	T	P	Q	A	M	L	Y	L	K	G	A	Q	G	R
	Hu_SPX1	R	R	N	W	T	P	Q	A	M	L	Y	L	K	G	A	Q	G	R
	Coel_SPX1	R	R	N	W	T	P	Q	A	M	L	Y	L	K	G	A	Q	G	R
	Md_SPX1	R	R	N	W	T	P	Q	A	I	L	Y	L	K	G	A	Q	G	H
	St_SPX1	R	R	N	W	S	P	Q	A	M	L	Y	L	K	G	T	Q	G	R

Figure 58 : Homologies de séquences des spexines 1 et 2 retrouvés chez l'Homme (Hu), le Léopard Anole (An), le Poulet (Ch), le Xenopus (Xe), le Cœlacanthe (Coel), le Poisson Zèbre (Zf), le Médaka (Md), l'Épinoche (St) et le Tétrodon (To)²⁰⁹.

Le peptide spexine semble donc être impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques (Figure 32). De par le potentiel de la spexine dans ces nombreux axes thérapeutiques, il est intéressant de travailler sur le développement d'une spexine comme outil thérapeutique.

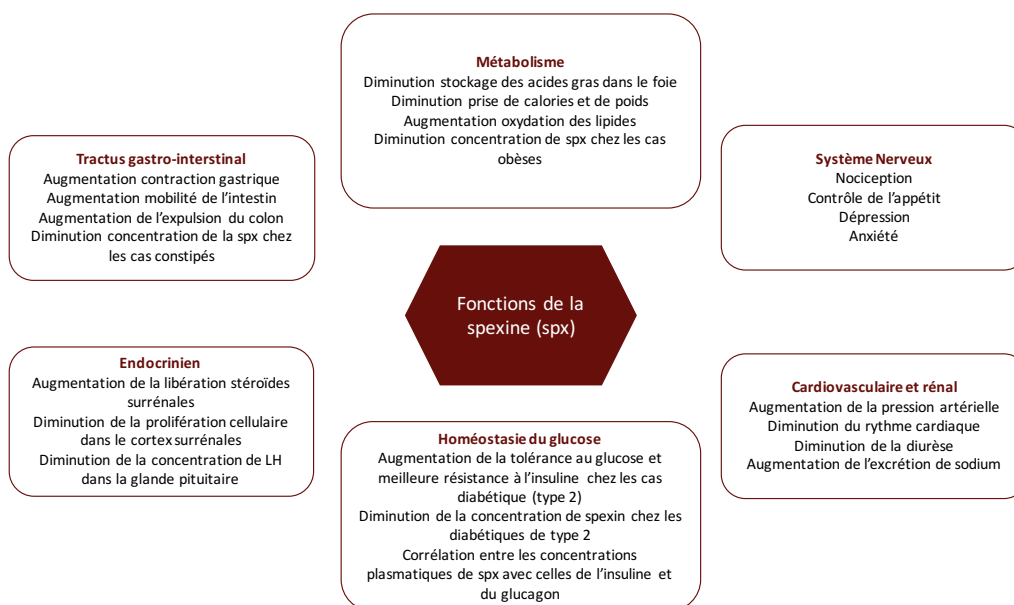


Figure 59 : Implications de la spexine dans différents axes thérapeutiques²¹⁷.

3. Le système GalR / spexine

Si l'activation des récepteurs GalR2 et GalR3 par la spexine a été démontrée, le mécanisme d'activation ainsi que les aspects moléculaires de ces activations restent

encore inconnus. Afin de mieux comprendre les résidus essentiels à l'interaction, une étude de relation structure-activité (RSA) a été menée sur ce peptide²¹⁰. La spexine présente une capacité à activer les récepteurs GalR2 avec une $EC_{50} = 49,7 \pm 5,9$ nM et GalR3 avec une $EC_{50} = 112,2 \pm 14,5$ nM. Les peptides galanine et spexine n'ont donc pas des sélectivités similaires vis-à-vis des récepteurs de la galanine (Figure 60).

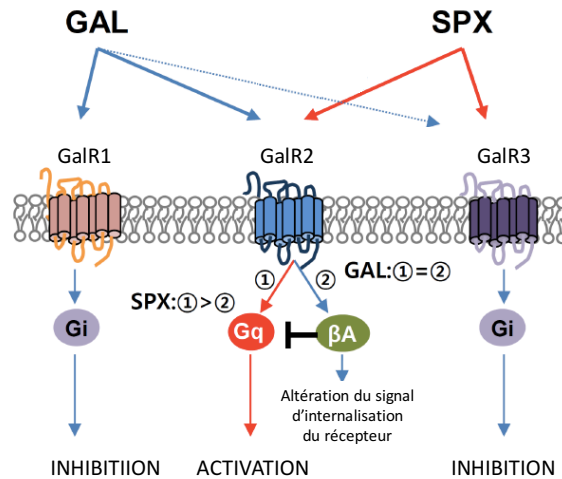
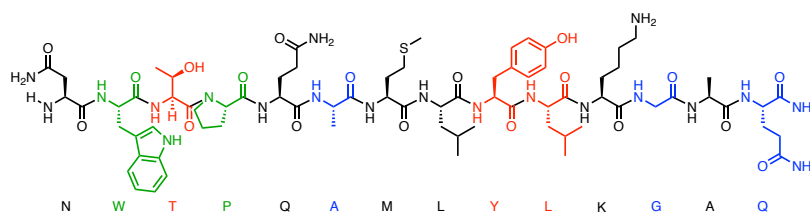


Figure 60 : Activation des signalisations intracellulaires des récepteurs de la galanine par les peptides galanine (GAL) et spexine (SPX)²¹⁵.

Cette étude de RSA a mis en avant, par le biais d'un D-scan (étude de l'influence de la configuration des acides aminés sur l'activation du récepteur) l'importance majeure de trois résidus pour l'activation des récepteurs GalR2 et GalR3 (Figure 61). Ces études ont montré que la thréonine, la tyrosine et la leucine sont indispensables pour le maintien de l'activation des récepteurs GalR2 et GalR3. La modification de ces résidus entraîne une incapacité des composés modifiés à activer ces deux récepteurs (EC_{50} non mesurables).



Perte importante de l'activation des récepteurs
Perte moyenne de l'activation des récepteurs
Perte faible de l'activation des récepteurs

Figure 61 : Identification des résidus importants de la spexine sur l'activation de GalR2 et GalR3.

Nous pouvons noter que ces résidus essentiels à l'activation du récepteur sont communs avec la séquence de la galanine (Figure 62). Les résidus 6, 12 et 14 induisent une perte moyenne de l'activité avec des EC₅₀ comprises entre 77 et 1230 nM pour GalR2 et des EC₅₀ comprises entre 316 et 1412 nM pour GalR3. Enfin, les résidus 2 et 4 induisent une perte faible de cette propriété d'activation des récepteurs GalR2 (EC₅₀ comprises entre 97 et 100 nM) et GalR3 (EC₅₀ comprises entre 112 et 138 nM). Ainsi, les premières données sur l'importance structurale de la spexine ont été obtenues.

Gal (Hu) : G W T L N S A G Y L L G P H

Spx (Hu) : N W T P Q A M L Y L K G A Q

Figure 62 : Comparaison des séquences de la galanine humaine (Gal (Hu)) et de la spexine humaine (Spx (Hu)) et résidus communs (rose)²⁰⁹.

Comme explicité précédemment, le système GalR / spexine a montré un rôle important dans de nombreuses pathologies du système nerveux central comme des organes périphériques. Les propriétés de la spexine ont été étudiées dans le domaine du métabolisme^{218,219} et de l'axe diabète/obésité^{220,221}. Cependant, son importance dans le domaine de la modulation de la nociception et de la douleur reste à approfondir. En effet, peu d'études portent sur l'activité de la spexine dans ces aires thérapeutiques^{216,222,223} et le potentiel de la spexine dans ce domaine reste à être exploré.

Ainsi, dans le but de développer des outils thérapeutiques dérivés de la spexine, une évaluation de sa stabilité plasmatique est indispensable. En ce sens, l'activité de la spexine et de ses dérivés (modifiés en partie N-Terminale) sur GalR2 dans du sérum humain a été mesurée²¹⁰. La demi-vie de l'activité de la spexine dans ce modèle est de 2 h. Cette étude met en avant l'augmentation de cette demi-vie en introduisant un groupement fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) ($t_{1/2} = 2,9$ h) ou une fonction actétyle en partie N-Terminale du peptide ($t_{1/2} = 4,9$ h) sans perte d'activité sur GalR2. Elle montre également que la modification des résidus 1, 2 et 4 par des acides aminés D permet d'augmenter cette activité dans le sérum (entre 6 h et 8,8 h)²¹⁰. De par ces résultats encourageants, le développement d'une spexine stable et active semble être prometteur. C'est pour cela que nous avons choisi ce peptide, encore peu étudié, pour étendre le concept FluoroPep mis au point au laboratoire précédemment.

meilleure liaison du peptide au récepteur. Cette amélioration importante de l'activité fonctionnelle a été accompagnée d'une augmentation de la stabilité plasmatique d'un facteur 7. Ainsi la présence de la chaîne fluorocarbonée a permis d'améliorer à la fois l'activité fonctionnelle et la stabilité plasmatique. Ces résultats très prometteurs ont mené à une évaluation de l'activité *in vivo* de ce composé.

b. Evaluation *in vivo* de la F8-spexine (administration intracérébroventriculaire)

L'activité *in vivo* de la spexine et de la F8-spexine a été évaluée dans un modèle de souris inflammatoires au sein du laboratoire du Dr. Frédéric Simonin par le Dr. Glenn-Marie Le Coz (Figure 64). Pour cela, leur activité après administration intracérébroventriculaire, a été évaluée chez des souris naïves. Le temps de retrait de la queue de l'eau à 47 °C a été mesuré afin de déterminer la réponse analgésique induite par les peptides administrés. Ces résultats intéressants ont mis en avant un effet analgésique de la spexine à 10 nmol/kg. La F8-spexine a un effet similaire mais à une dose 10 fois inférieure de 1 nmol/kg. Ainsi la présence de la chaîne F8 permet également une augmentation importante de l'effet analgésique *in vivo*.

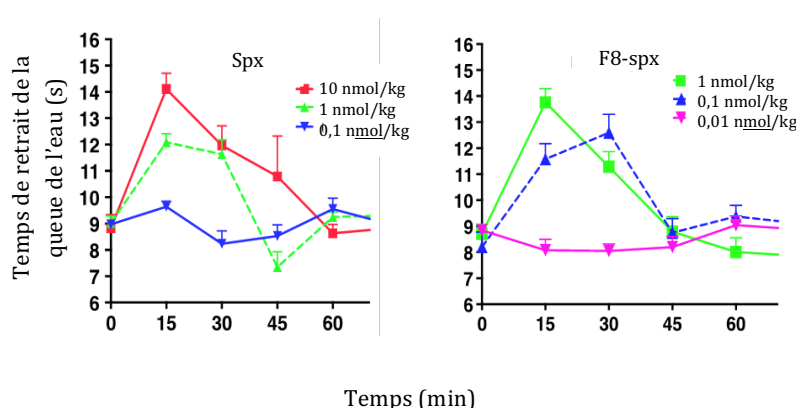


Figure 64 : Effet analgésique de la spexine et F8-spexine après administration intracérébroventriculaire.

L'introduction de la chaîne fluorocarbonée F8 dans la séquence de la spexine a donc permis à la fois d'augmenter la stabilité plasmatique du peptide et son activité fonctionnelle *in vitro* et *in vivo* en comparaison avec la spexine. Nous nous sommes alors demandés si la spexine et ses dérivés fluorocarbonés présentaient également un effet analgésique après une administration périphérique.

c. Evaluation *in vivo* de la F8-spexine (administration intrapéritonéale)

L'activité centrale intéressante des fluoro-spexines, après administration intracérébroventriculaire, nous a conduits à évaluer leur potentielle activité en périphérie (Figure 65). Pour cela, leur activité après administration intrapéritonéale sur un modèle de douleur inflammatoire a été mesurée. L'inflammation est provoquée par une injection de CFA (Freund's Complete Adjuvant). Ce mélange lipidique induit une réponse immunitaire et induit une inflammation généralisée. Le temps de retrait de la queue de l'eau à 47°C a été mesuré afin de déterminer la réponse analgésique induite par les peptides administrés.

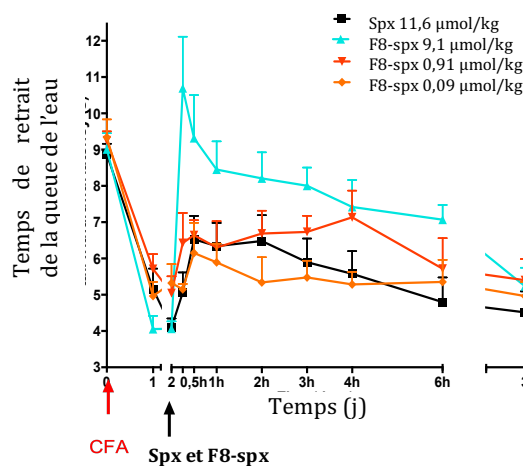


Figure 65 : Effet analgésique de la spexine (Spx) et F8-spexine (F8-spx) après administration intrapéritonéale.

Pour avoir un temps de retrait de la queue de l'eau de 6 secondes, la dose de spexine nécessaire est de 11,6 µmol/kg. Le même résultat est obtenu pour la F8-spexine mais à une dose de 0,91 µmol/kg. Ainsi l'effet analgésique suite à une administration intrapéritonéale de la F8-spexine est similaire à la spexine à des doses 10 à 100 fois moindres que celle-ci. Ces résultats *in vivo* ont donc montré le potentiel analgésique de la F8-spexine après administration de la molécule en périphérie. Suite à l'obtention de ces résultats très intéressants nous avons décidé de travailler sur différents axes autour de la spexine.

Dans un premier temps, nous avons souhaité comprendre quel était le rôle de la chaîne dans la stabilité plasmatique observée. En effet, cette dernière est augmentée mais ne permet pas d'obtenir une stabilité plasmatique supérieure à 24 h comme dans le cas de l'apeline. Ainsi il est possible que le mécanisme de stabilisation ne soit pas la liaison à

l'albumine. Nous avons donc pensé que la chaîne F8 pouvait protéger le peptide de certaines enzymes. Nous avons donc dans un premier temps effectué des études d'identifications de métabolites de la spexine et de la F8-spexine. Nos objectifs suivants sont d'étudier l'influence de la longueur et du nombre de chaînes fluorocarbonées sur la stabilité plasmatique et l'activité du peptide. Ensuite, nous nous intéresserons au développement d'une fluoro-spexine plus soluble afin d'améliorer les rendements de synthèse, de faciliter les études pharmacologiques et biologiques. Enfin, les composés optimisés les plus prometteurs seront évalués *in vivo* dans un modèle de douleur inflammatoire.

5. Analyse des métabolites de la spexine et F8-spexine dans le plasma de souris

La spexine est un peptide encore peu étudié. Si ses fonctions biologiques commencent à être de plus en plus comprises et décrites, son devenir dans l'organisme l'est peu. Nous nous sommes intéressés à la formation des métabolites de la spexine dans le plasma de souris. Cette étude a deux objectifs. Le premier est de comprendre quels sont les sites de coupures de la spexine dans le plasma. Le deuxième est de comprendre si, pour la F8-spexine, l'introduction de la chaîne fluorocarbonée induit une protection partielle ou totale du peptide vis-à-vis de la dégradation enzymatique. Les métabolites de la spexine n'ayant jamais été décrits, une première incubation de celle-ci dans le plasma de souris à une concentration élevée de 25 μM a été réalisée. La détection des composés a été réalisée par spectrométrie de masse. Les résultats de cette expérience nous ont montré que plusieurs métabolites étaient formés dans le plasma (Figure 66). Une analyse plus précise avec une méthode d'analyse spécifique (mode de quantification en LC-MS) à chaque composé potentiellement présent dans le plasma a ensuite été effectuée à la concentration de 0,25 μM (Figure 67). Par cette méthode d'identification précise, nous avons pu confirmer que les métabolites N11K, N10L, N9Y, N8L et N7M sont formés dans le plasma de souris. Les résultats de cette étude indiquent également que chaque métabolite formé possède des cinétiques d'apparition et de disparition différentes.

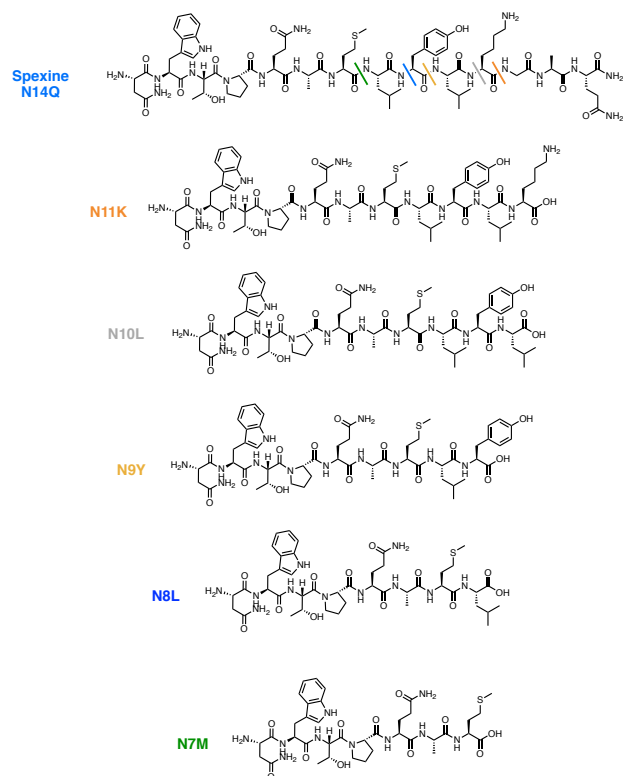


Figure 66 : Structures des métabolites de la spexine observés dans le plasma de souris à 25 μ M.

Le deuxième objectif de cette analyse de métabolites était de comprendre le rôle de la chaîne fluorocarbonée F8 dans l'augmentation de la stabilité plasmatique et notamment si la présence de la chaîne permettait de protéger certains sites de coupure identifiés avec la spexine.

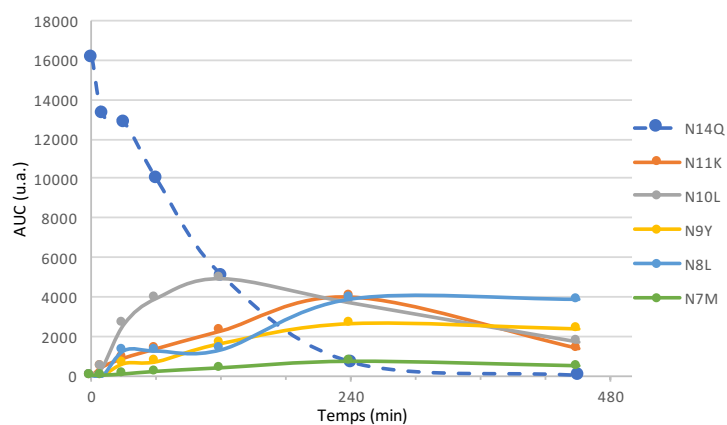


Figure 67: Formation au cours du temps des métabolites dérivés de la spexine dans le plasma de souris à 0,25 μ M.

La F8-spexine a été incubée dans du plasma de souris. Les métabolites recherchés pour ce composé sont des analogues fluorocarbonés des métabolites détectés pour la spexine : F8-N11K, F8-N10L, F8-N9Y, F8-N8L et F8-N7M (Figure 68). La détection a été

réalisée par spectrométrie de masse avec une méthode d'analyse non quantitative. L'analyse initiale de la formation de métabolites à partir de la F8-spexine a montré la détection de masses correspondantes aux métabolites F8-N10L, F8-N9Y, F8-N8L, F8-N9M. Le seul composé attendu qui n'a pas été détecté par spectrométrie de masse à la concentration de 0,25 μM est le métabolite F8-N11K. A cette concentration, une cinétique d'apparition et de disparition des métabolites n'a pas été possible. En effet, le signal observé est continuellement croissant jusqu'à 24 h. Deux hypothèses pourraient expliquer cette observation. Soit les métabolites formés présentent une stabilité de plusieurs jours dans le plasma et ils se forment continuellement. Soit des molécules plasmatiques possédant des masses similaires aux métabolites recherchés sont détectés avec cette méthode non spécifique.

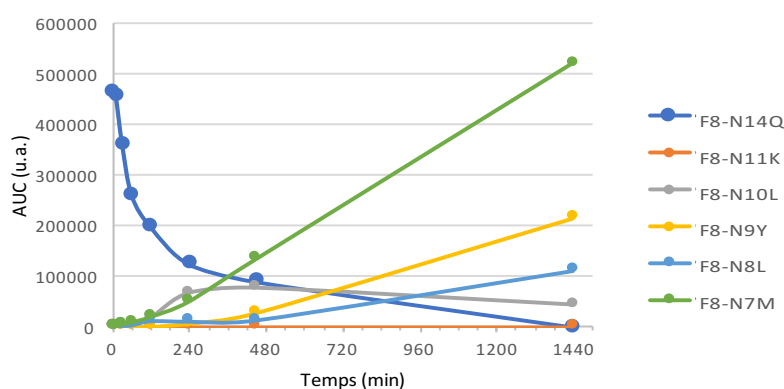


Figure 68 : Formation des métabolites dérivés de la F8-spexine dans le plasma de souris à 0,25 μM .

Afin de comprendre ces résultats, des échantillons à 0,25 μM ont été lyophilisés puis repris dans un volume faible permettant de les concentrer et ainsi d'augmenter le signal. Les résultats obtenus ayant été similaires aux précédents (Figure 41), une incubation de la F8-spexine à 25 μM dans le plasma pendant 24 h a été effectuée. Cette étude a confirmé la présence des métabolites suivants dans le plasma : F8-N8L et F8-N7M. Ainsi les composés qui ont pu être observés dans le plasma sont les métabolites les plus courts. La présence de la chaîne fluorocarbonée F8 en partie N-terminale pourrait donc protéger les sites de coupure K11-G12, L10-K11 et Y9-L10. Le signal observé précédemment est donc probablement une détection non spécifique. Afin de confirmer cette hypothèse, la synthèse de tous les métabolites dérivés de la F8-spexine devra être effectuée et une analyse quantitative devra être réalisée.

En parallèle de cette étude, nous avons initié la synthèse de nouveaux dérivés fluorocarbonés de la spexine. L'objectif est d'une part de comprendre l'influence de la

longueur de la chaîne fluorocarbonée sur la stabilité et l'efficacité de la spexine. D'autre part nous souhaitons développer une fluoro-spexine stable, active et biocompatible.

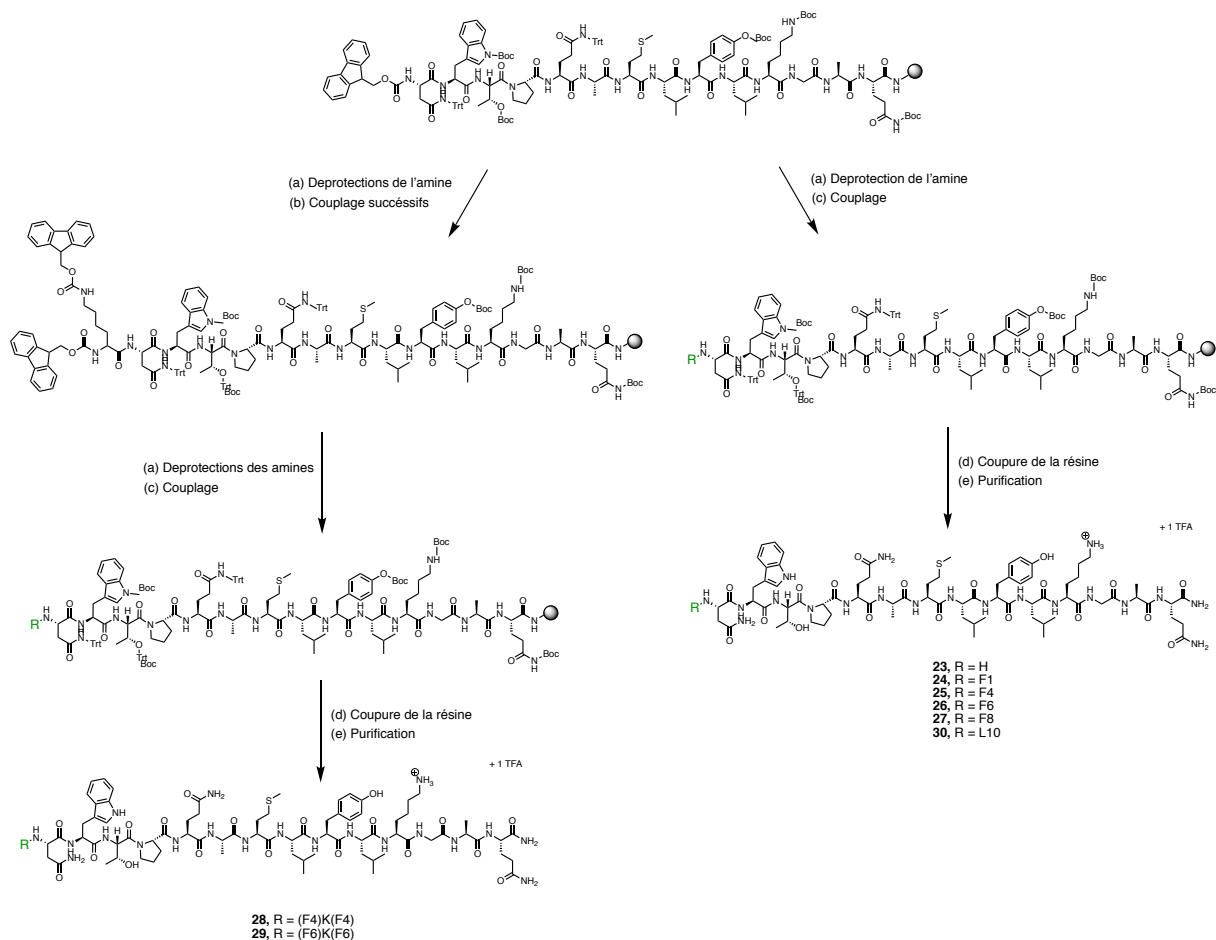
6. Développement de dérivés de la spexine stables, actifs et biocompatibles

Dans le but de développer une fluoro-spexine biocompatible, la synthèse puis les évaluations pharmacologiques de différents dérivés de la spexine ont été entreprises. Plusieurs longueurs de chaînes ainsi que des motifs pinces ont été évalués.

a. Synthèse des dérivés de la spexine

L'évaluation d'une chaîne plus courte que dans le chapitre précédent a été entreprise (composé **24**). En effet, l'augmentation de la stabilité plasmatique n'était pas aussi drastique avec l'introduction de la chaîne fluorocarbonée F8 sur le peptide spexine ($t_{1/2}$ de 56 min à 432 min) en comparaison au peptide apeline (de 7 min à plus de 24 h). La diminution de la longueur de la chaîne fluorocarbonée pourrait ne pas avoir d'impact aussi important que sur le peptide apeline. La spexine et ses dérivés ont été synthétisés sur support solide. La résine utilisée est la Rink Amide (Schéma 8).


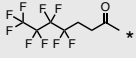
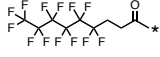

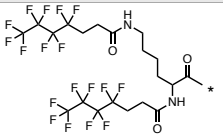
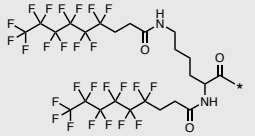
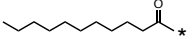
Pour cette série de composés, différentes chaînes fluorocarbonées (composés **24** à **27**), motifs fluorocarbonés sous forme de pinces (composés **28** et **29**) et également 2 chaînes hydrocarbonées (composés **30** et **31**) ont été introduits manuellement après obtention du peptide précurseur Fmoc-spexine supporté (Schéma 8). Ce peptide précurseur a lui-même été synthétisé par SPPS assistée par micro-ondes sur un synthétiseur CEM Liberty Blue. Pour les composés **28** et **29**, un résidu Fmoc-Lys(Fmoc)-OH a été introduit. Cela permet d'obtenir la forme de pince. Pour les composés **28** et **29**, la dernière étape de synthèse est l'introduction de deux chaînes fluorocarbonées en présence de HATU. Pour les composés **24** à **27** et **30**, la dernière étape de synthèse est l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée ou lipidée en présence de HATU.



Conditions et réactifs : (a) 20% pipéridine dans DMF, 2x10 min; (b) Fmoc-AA(P)-OH du groupement R (3 éq.), HBTU (2,9 éq.), DIEA (6 éq.); (c) Chaîne fluorocarbonée ou lipidée (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (6 éq.); (d) TFA/Phenol/Thioanisole/Ethanedithiol/H₂O (82,5/5/5/2,5/5), 2 h 30; (e) CLHP en phase inverse.

Schéma 8 : Synthèses des composés **23** à **30**.

Après coupure des peptides de la résine en milieu acide et purification du brut par CLHP, les composés **23** à **30** ont été obtenus avec une pureté supérieure à 95%. Leur identité a été confirmée par analyse par spectrométrie de masse. Les temps de rétention ainsi que les rendements des composés **23** à **30** ont été réunis dans le Tableau 16.

Composé	Nom	R	Rdt (%)	t _R (min)**
23	Spx	H	31	3,98
24	F1-spx		26	4,46
25	F4-spx		23	5,06
26	F6-spx		21	5,48
27	F8-spx		16	5,85
28	(F4)K(F4)-spx		15	5,85
29	(F6)K(F6)-spx		17	6,63
30	L10-spx		26	5,45

** gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 7 min sur une colonne C18

Tableau 16 : Structures, rendements et temps de rétentions des composés **23** à **30**.

Les rendements de synthèse des composés portant un groupement R en partie N-terminale du peptide (composés **24** à **30**) sont compris entre 16% et 26% et sont donc plus faibles que pour le peptide natif **23** (31%). De plus, nous pouvons observer que l'augmentation de la longueur de la chaîne fluorocarbonée entraîne une diminution du rendement. En effet, le peptide possédant la chaîne la plus courte (composé **24**) a un rendement de 26% et est le plus proche du composé **22** (31%). Les composés **25** (23%), **26** (23%), **27** (16%) ont une chaîne fluorocarbonée de plus en plus longue et des rendements décroissants. Les composés **28** et **29**, possédant une pince fluorocarbonée, présentent eux des rendements respectifs de 15% et 17% approchant ceux du composé **27** (16%). Ainsi l'introduction des motifs pince n'entraîne pas une difficulté de synthèse supplémentaire en comparaison avec l'introduction de la chaîne F8 sur la spexine. Enfin, le composé **30** possédant la chaîne hydrocarbonée L10, analogue hydrocarboné de la chaîne F8, présente un rendement de 26% supérieur au composé **27** (16%). L'introduction de cette chaîne hydrocarbonée permet donc d'obtenir un rendement similaire à celui du composé **24** (26%) possédant la chaîne fluorocarbonée la plus courte. Ainsi l'introduction de la chaîne hydrocarbonée de longueur équivalente à la

chaîne F8 permet d'obtenir de meilleurs rendements de synthèse que ceux obtenus pour cette chaîne fluorocarbonée.

Concernant les temps de rétention, les composés **24** à **27** ont des temps de rétention croissants. Nous pouvons donc observer une augmentation du temps de rétention (4,46 min, 5,06 min, 5,48 min, 5,85 min) avec l'augmentation de la longueur de la chaîne fluorocarbonée (F1, F4, F6, F8). Le composé **28**, possédant un motif pince constitué de chaînes F4 présente un temps de rétention similaire au composé **27**. En revanche, l'introduction de la pince possédant des chaînes F6 (composé **29**) entraîne, en comparaison avec la pince possédant des chaînes F4, une augmentation du temps de rétention de 5,85 min à 6,63 min. Ainsi le remplacement des chaînes F4 (composé **28**) par les chaînes F6 dans le motif pince entraîne une réelle augmentation du temps de rétention et donc de l'hydrophobie du peptide.

Suite à la synthèse et la caractérisation de ces composés, leurs activités fonctionnelles et leurs stabilités plasmatiques ont été évaluées. Nous pourrions ainsi comprendre quelle est l'influence de la nature du groupement R introduit sur les activités fonctionnelles et les stabilités plasmatiques des dérivés de la spexine.

1. Etude de l'influence de la longueur de la chaîne et du nombre de chaînes fluorocarbonées sur l'activité fonctionnelle et la stabilité plasmatique

i) Evaluations des activités fonctionnelles

L'activité fonctionnelle sur le récepteur GalR2 a été évaluée comme précédemment pour les composés **23** à **30** par Valérie Utard (Tableau 17). Les résultats de l'évaluation fonctionnelle des fluoro-spexines ont montré que pour le composé **24**, l'activation du récepteur est similaire à la spexine (88 ± 28 nM). La longueur de la chaîne F1 n'est donc pas suffisante pour améliorer l'activité fonctionnelle. En revanche pour le composé **25**, l' EC_{50} est améliorée ($14,3 \pm 2,7$ nM). La chaîne fluorocarbonée F4 est donc la longueur de chaîne minimale pour améliorer l'efficacité *in vitro* de la spexine. Concernant les autres fluoro-spexines linéaires **26** et **27**, l'efficacité est comparable et respectivement de $5,5 \pm 2,4$ nM et $6,2 \pm 0,9$ nM. Nous avons donc pu trouver un composé portant une chaîne fluorocarbonée plus courte que la F8 et possédant une efficacité *in vitro* similaire.

Spexine



Composé	Nom	EC ₅₀ GalR2 (nM)	t _{1/2} (min)*
23	Spx	95 ± 13	56 ± 5
24	F1-spx	88 ± 28	52 ± 2
25	F4-spx	14,3 ± 2,7	168 ± 48
26	F6-spx	5,5 ± 2,4	342 ± 6
27	F8-spx	6,2 ± 0,9	432 ± 6
28	(F4)K(F4)-spx	22 ± 6,0	239 ± 22
29	(F6)K(F6)-spx	10,3 ± 3,4	> 1440 (55%**)
30	L10-spx	6,7 ± 3,6	364 ± 7

*plasma de souris, 0,25 µM

**pourcentage de peptide restant dans le plasma après 24 h

Tableau 17 : Activité fonctionnelle in vitro et temps de demi-vie plasmatiques de la spexine et des fluoro-spexines.

Le composé **30** et son homologue fluorocarboné (composé **27**) présentent une activité fonctionnelle similaire. Ainsi, parmi les composés linéaires, il serait intéressant d'évaluer les stabilités plasmatiques pour les composés **25** à **27** et **30**. L'évaluation du composé **24** en stabilité plasmatique a également été réalisée afin de le comparer au composé **25**. Concernant les composés sous forme de pinces **28** et **29**, ils présentent des EC₅₀ comparables (respectivement 22 ± 6,0 nM et 10,3 ± 3,4 nM). De plus, ces valeurs sont proches de celle du composé **27**. Ces deux composés seront donc également évalués en stabilité plasmatique. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'évaluer les stabilités plasmatiques des composés **23** à **30**.

ii) Evaluations des stabilités plasmatiques

Les premiers essais de stabilité plasmatique ont été effectués à 5 µM, concentration classiquement utilisée sur la plateforme TechMed où les expériences ont été réalisées. Les résultats de ces évaluations de stabilité plasmatique pour les composés **24** à **30** n'étaient pas exploitables. En effet, l'aspect des courbes de diminution des concentrations au cours du temps étaient biphasiques avec d'abord une diminution rapide de la concentration en fonction du temps, suivie d'une phase beaucoup plus lente pour laquelle le composé semblait quasiment stable. Ce type de courbe, est

classiquement observé lors d'études pharmacocinétiques *in vivo* du fait de la décroissance rapide de la concentration lors de la phase de distribution, suivie par une diminution plus lente correspondant à la phase d'élimination. Ce type de courbe suit un modèle bicompartimental qui ne peut être observé dans le plasma (unique compartiment de l'incubation). Ces résultats peuvent s'expliquer par une hétérogénéité du milieu d'incubation. Nous avons alors émis l'hypothèse d'une précipitation des fluoro-spexines dans le plasma. En effet, l'incorporation d'une ou plusieurs chaînes fluorocarbonées (intrinsèquement hydrophobes) induit une augmentation importante de l'hydrophobie.

Afin d'étudier cette hypothèse, des stabilités plasmatiques ont été effectuées à plusieurs concentrations pour le composé **26** (Figure 69). Les courbes aux concentrations les plus élevées (5 μM et 25 μM) mettent en avant deux cinétiques de dégradations distinctes. La diminution de la concentration à 1 μM permet de se rapprocher d'une cinétique de dégradation de premier ordre avec une allure quasiment mono-exponentielle. Ce phénomène est donc corrélé à la concentration de fluoro-spexines incubées dans le plasma.

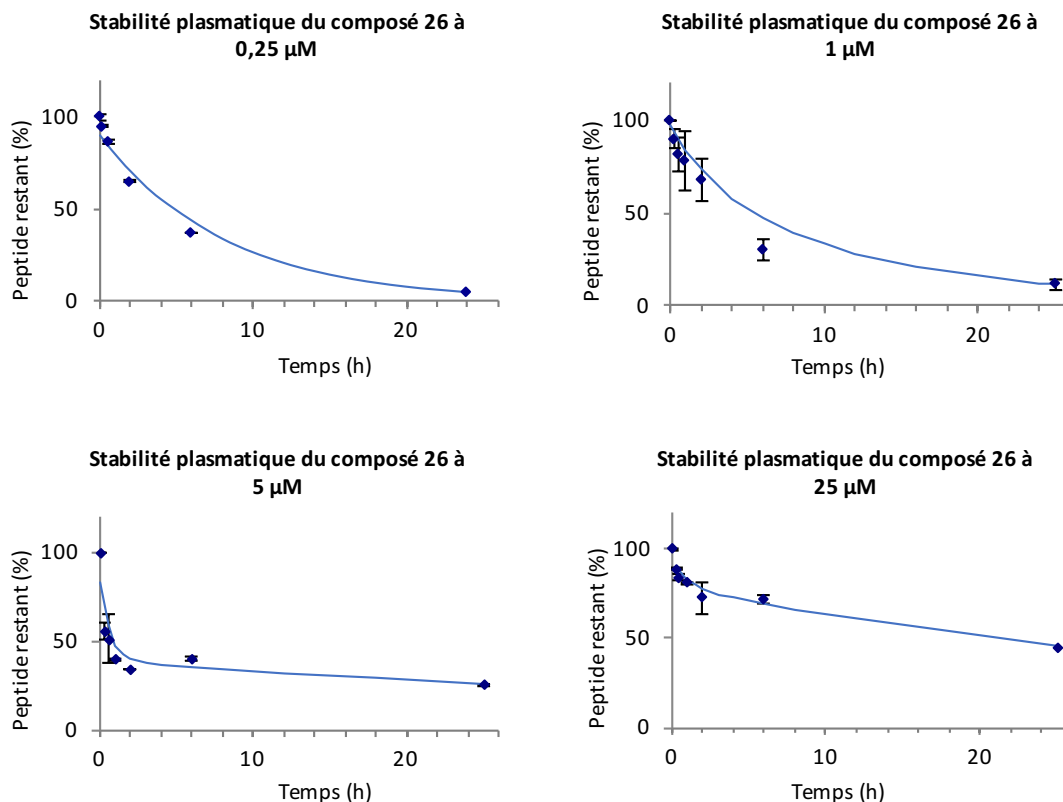


Figure 69 : Stabilités plasmatiques du composé **26** à différentes concentrations dans le plasma de souris.

Ainsi nous avons pu confirmer qu'à des concentrations supérieures à 1 μM , les fluoro-spexines s'organisent ou s'agrègent dans le plasma. Par conséquent, toutes les stabilités plasmatiques pour les dérivés de la spexine ont été effectuées à 0,25 μM . À cette concentration, la décroissance est de nouveau mono-exponentielle et les temps de demi-vie ont pu être déterminés pour les fluoro-spexines (Tableau 17).

La stabilité des composés **23** et **24** sont similaires indiquant que l'introduction de la chaîne F1 n'est pas suffisante pour induire une augmentation de la stabilité dans le plasma. Les composés **24** à **27** présentent une longueur de chaîne fluorocarbonée croissante ainsi qu'un temps de demi-vie plasmatique croissant (52 \pm 2 min à 432 \pm 6 min). L'augmentation de la longueur de la chaîne fluorocarbonée peut donc être corrélée à l'augmentation du temps de demi-vie. Cependant, la différence entre les temps de demi-vie des composés **26** (342 \pm 6 min) et **27** (432 \pm 6 min) indique que l'augmentation de la stabilité plasmatique n'est pas linéaire.

Pour les composés sous forme de pince, la comparaison des peptides **28** et **29** indique que la longueur de la chaîne fluorocarbonée introduite au niveau de la pince est primordiale pour la stabilité plasmatique. En effet, le passage des chaînes F4 (239 \pm 22 min) aux chaînes F6 (> 1440 min) induit une augmentation drastique du temps de demi-vie. Enfin, le composé **30** (364 \pm 7 min) présente une stabilité plasmatique plus faible que son analogue fluorocarboné (432 \pm 6 min) mais proche du composé **26** (342 \pm 6 min). Ainsi, les composés **26**, **27**, **29** et **30** présentent la combinaison d'une activité fonctionnelle et d'une stabilité plasmatique améliorée. Ils ont donc été choisis pour des études de toxicité (pouvoir hémolytique et de liaison aux érythrocytes).

Cependant, l'ensemble des études réalisées (analyse des rendements, des temps de rétention et difficultés lors de l'évaluation de la stabilité plasmatique) mettent en avant le caractère hydrophobe marqué de ces composés. Afin d'améliorer ce critère, l'introduction d'un motif solubilisant a été envisagé. En effet, cela permettrait de faciliter les synthèses mais surtout de rendre les composés compatibles avec des études *in vivo* (solubilité, homogénéité lors des administrations, études pharmacocinétiques) nécessaires pour le développement de composés thérapeutiques.

2. Conception d'une fluoro-spexine hydrosoluble

Les rendements de synthèse faibles obtenus avec le composé **27** (F8-spexine) ont été imputés au caractère hydrophobe de la spexine et exacerbée par l'introduction de la

chaîne fluorocarbonée F8. La faible solubilité de la F8-spexine ($12 \pm 3 \mu\text{M}$) rend également difficile ses évaluations *in vitro* et *in vivo*. Afin de déterminer si la diminution de la taille de la chaîne fluorocarbonée a une influence sur la solubilité, celle-ci a été mesurée pour le composé **26** (F6-spexine) a été mesurée. La solubilité de ce composé est de $12 \pm 3 \mu\text{M}$. La diminution de la longueur de la chaîne n'a donc pas permis d'augmenter la solubilité. Aussi, afin d'améliorer les rendements de synthèse de ce dérivé et augmenter sa solubilité aqueuse, il a été envisagé l'introduction d'un linker peptidique solubilisant (arginine-glycine-arginine, RGR) entre la chaîne fluorocarbonée et le peptide. Ainsi, la F8-RGR-spexine a été synthétisée sur support solide comme précédemment décrit pour la F8-spexine. Comme le montre le Tableau 18, le peptide a été obtenu avec un rendement isolé de 27%, un rendement proche de celui de la spexine native (31%) et supérieur à celui de la F8-spexine (16%). D'autre part, comme attendu, la solubilité du composé a été améliorée d'un facteur 40 ($469 \pm 115 \mu\text{M}$). Ainsi l'introduction du linker RGR a permis d'augmenter le rendement de synthèse ainsi que la solubilité.

Peptide	Rdt (%)	EC ₅₀ GalR2 (nM)	t _{1/2} (min)*	Solubilité (μM)
Spx	31	95 ± 13	56 ± 5	> 1000
F8-spx	16	6,2 ± 0,9	432 ± 6	12 ± 3
F8-RGR-spx	27	15,6 ± 2,7	384 ± 12	469 ± 115

*plasma de souris, 0,25 μM

Tableau 18 : Comparaison des peptides spexine, F8-spexine et F8-RGR-spexine.

Après avoir amélioré la synthèse et la solubilité, il fallait vérifier l'influence de l'introduction du linker RGR sur l'activité fonctionnelle du peptide et également sa stabilité dans le plasma.

L'activité fonctionnelle sur le récepteur GalR2 de la F8-RGR-spexine ($15,6 \pm 2,7 \text{ nM}$) a montré une activité meilleure que la spexine native ($95 \pm 13 \text{ nM}$) et proche de la F8-spexine ($6,2 \pm 0,9 \text{ nM}$). Pour le composé F8-RGR-spexine, l'amélioration importante de l'activité fonctionnelle par rapport à la spexine a été accompagnée d'une augmentation de la stabilité plasmatique (t_{1/2} = 384 ± 12 vs 56 ± 5 min). Il est intéressant de noter que cette stabilité est légèrement inférieure (48 min) à celle de la F8-spexine. Ainsi l'introduction du motif RGR a permis d'augmenter les rendements de synthèse, la solubilité aqueuse du fluoro-peptide. L'activité fonctionnelle et la stabilité plasmatique de la F8-RGR-spexine sont proches de celles mesurées pour la F8-spexine.

Ces résultats très positifs suite à cette optimisation nous ont menés à étudier l'influence de la longueur et du nombre de chaînes fluorocarbonées pour les dérivés de la RGR-spexine.

3. Développement de dérivés de la RGR-spexine stables, actifs et biocompatibles

a. Synthèse des dérivés de la RGR-spexine

Les dérivés de la RGR-spexine ont été synthétisés sur support solide comme les dérivés de la spexine précédemment décrits. L'objectif de cette étude est d'obtenir des dérivés plus solubles que la spexine afin de faciliter leurs synthèses, purifications et évaluations pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*. Comme le montre la figure 70, les groupements R introduits sur les dérivés de la RGR-spexine sont les mêmes que pour la spexine à l'exception des composés **37**, **39** et **41**. En effet, des pinces portant des PEG (composés **38** et **40**) ainsi que la chaîne hydrocarbonée L15 (composé **41**) ont été évaluées. L'introduction des motifs PEG₂ doit permettre d'améliorer encore la solubilité du composé tout en apportant de la flexibilité au niveau de la chaîne fluorocarbonée et ainsi faciliter les interactions avec l'albumine.

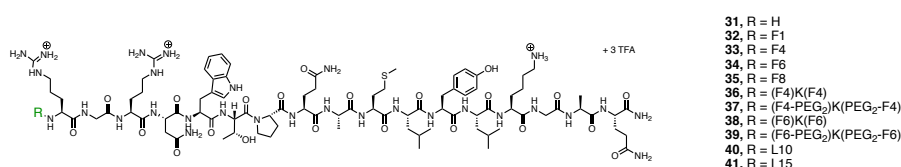
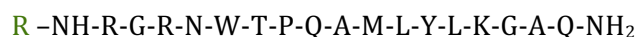



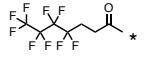
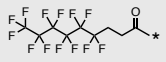
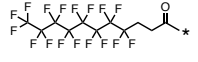
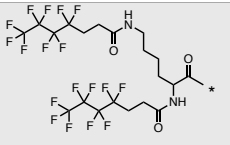
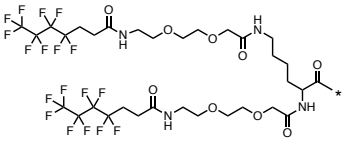
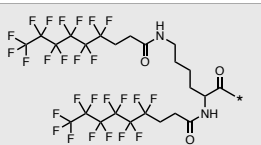
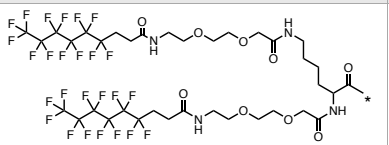
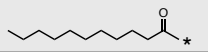
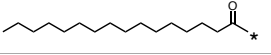
Figure 70: Structure des composés **31** à **41**.

La synthèse sur support solide du peptide précurseur Fmoc-RGR-spexine a été réalisée à partir d'une résine Rink Amide sur un synthétiseur CEM Liberty Blue assistée par micro-ondes. Pour les composés **37** et **39**, une lysine (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH) a été introduite. Cela permet d'obtenir la forme de pince. Un motif PEG₂ a ensuite été couplé pour les composés **37** et **39** après déprotection des deux amines (alpha et epsilon) de la lysine introduite précédemment. Enfin, la dernière étape de synthèse est l'introduction des deux chaînes fluorocarbonées en présence de HATU. L'introduction des groupements R, correspondant uniquement à une chaîne fluorocarbonée ou lipidée, pour les composés **32** à **35**, **40** et **41**, a été effectuée en présence de l'agent de couplage HATU également. L'avancement des couplages effectués manuellement a été suivi par les tests

colorimétriques Kaiser et TNBS. Après coupure des peptides de la résine en milieu acide et purification du brut par CLHP, les composés **31** à **41** ont été obtenus avec une pureté supérieure à 95%. Leur identité a été confirmée par analyse par spectrométrie de masse. Les temps de rétention ainsi que les rendements des composés **31** à **41** ont été réunis dans le Tableau 19.

Spexine



Composé	Nom	R	Rdt (%)	t _R (min)**
22	Spx	-	31	3,98
31	H-RGR-spx	H	37	3,69
32	F1-RGR-spx		34	3,88
33	F4-RGR-spx		38	4,26
34	F6-RGR-spx		36	4,55
35	F8-RGR-spx		27	4,85
36	(F4)K(F4)-RGR-spx		45	4,87
37	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-RGR-spx		42	4,85
38	(F6)K(F6)-RGR-spx		38	5,46
39	(F6-PEG ₂)-K(PEG ₂ -F6)-RGR-spx		44	5,43
40	L10-RGR-spx		26	4,85
41	L15-RGR-spx		24	4,99

** gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 7 min sur une colonne C18

Tableau 19 : Structures, rendements et temps de rétentions des composés **31** à **41**.

Les rendements de synthèse de ces composés ont été obtenus en considérant le chargement de la résine Rink Amide utilisée à 0,42 mmol/g. Enfin, les temps de rétention, qui reflètent l'hydrophobie relative des composés entre eux, ont été déterminés par CLHP avec un gradient d'acétonitrile dans l'eau. Ainsi, plus le temps de rétention est faible, moins la proportion en acétonitrile pour éluer le composé est importante et donc moins le composé est hydrophobe.

Les rendements de synthèse de ces composés sont compris entre 26 % et 45 %. Les rendements les plus faibles (entre 24 et 26 %) sont observés pour les composés **35**, **40** et **41**. Ces composés sont ceux portant la chaîne fluorocarbonée la plus longue et les deux chaînes hydrocarbonées. Ces rendements peuvent être expliqués par la nature hydrophobe des chaînes F8 et hydrocarbonées. Ces chaînes peuvent s'agréger et rendre la purification plus difficile et aboutir ainsi à des rendements plus faibles. Il est à noter que les rendements de synthèse obtenus pour les composés possédant un motif pince sont supérieurs à celui obtenu pour la spexine. Cela montre l'efficacité de l'introduction du linker solubilisant pour l'obtention de ces dérivés avec de bons rendements malgré leur caractère hydrophobe.

Nous pouvons observer que, comme attendu, l'introduction du motif RGR (composé **31**) induit une diminution du temps de rétention en comparaison à la spexine (composé **23**), confirmant le rôle du linker dans l'augmentation de l'hydrophilie du peptide. Nous avons également pu observer que les motifs fluorocarbonés sous forme de pinces portant des chaînes fluorocarbonées F4 (composés **36**; $t_R = 4,87$ min et **37**; $t_R = 4,85$ min) présentaient des temps de rétention proches du composé **35** ($t_R = 4,85$ min) portant la chaîne F8. En revanche, la présence des motifs pinces portant des chaînes fluorocarbonées F6 (composés **38**; $t_R = 5,46$ min et **39**; $t_R = 5,43$ min) entraîne une augmentation du temps de rétention en comparaison au composé **35**. Ces résultats montrent que la présence des pinces portant des chaînes fluorocarbonées F4 n'entraîne pas une augmentation de l'hydrophobie de la molécule en comparaison au composé portant la chaîne F8. A l'inverse, les pinces portant des chaînes fluorocarbonées F6 sont plus hydrophobes que le composé modifié par la chaîne F8.

Une fois les composés synthétisés et caractérisés, leur activité fonctionnelle et leur stabilité plasmatique ont été évaluées.

- b. Etude de l'influence de la longueur de la chaîne et du nombre de chaînes fluorocarbonées sur la spexine

i) Evaluation de l'activité fonctionnelle des dérivés fluoro-RGR-spexines

Comme précédemment décrit, l'activité fonctionnelle est déterminée par la mesure de la production d'ions Ca^{2+} intracellulaire (Tableau 20) par Valérie Utard. Cette réponse représente la capacité du composé testé à activer le récepteur GalR2 et à induire la réponse biologique associée.

Composé	Nom	EC ₅₀ GalR2 (nM)	t _{1/2} (min)*
23	Spx	95 ± 13	56 ± 5
31	H-RGR-spx	407 ± 136	4 ± 0,8
32	F1-RGR-spx	278 ± 15	9,8 ± 0,3
33	F4-RGR-spx	65 ± 3	12 ± 0,4
34	F6-RGR-spx	13 ± 2	65 ± 4
35	F8-RGR-spx	15,6 ± 2,7	384 ± 12
36	(F4)K(F4-RGR-spx	67 ± 14	179 ± 10
37	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-RGR-spx	283 ± 61	-
38	(F6)K(F6)-RGR-spx	10 ± 3	1215 ± 18
39	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-RGR-spx	72 ± 2	534 ± 1
40	L10-RGR-spx	17,4 ± 2,5	39 ± 2
41	L15-RGR-spx	213 ± 29	-

*plasma de souris, 0,25 µM

Tableau 20: Activité fonctionnelle et temps de demi-vie plasmatique des composés **31** à **41**.

L'évaluation de l'activité fonctionnelle des fluoro-RGR-spexines a montré une activité meilleure que la spexine pour les composés **33** à **36**, **38** et **40**. La chaîne courte (composés **32**) ne permet pas d'obtenir une efficacité similaire à la spexine (278 nM contre 95 nM, respectivement), au minimum, la chaîne F4 (composé **33**) est nécessaire pour maintenir cette activité fonctionnelle comme dans le cas des dérivés ne possédant pas le linker solubilisant. L'analogue hydrocarboné du composé **35** (composé **40**) a également été évalué. Son EC₅₀ est similaire à celle mesurée pour le composé **35** (17 nM vs 15 nM). Ce résultat montre que la présence des fluors n'est pas essentielle pour améliorer l'activité du peptide. En revanche, l'introduction d'une chaîne hydrocarbonée

plus longue telle qu'un groupement palmitoyle (C16) sur le peptide (composé **41**) entraîne une diminution de l'EC₅₀ (213 nM). L'introduction de la chaîne L15 n'est donc pas compatible avec une amélioration de l'efficacité *in vitro*.

Concernant les fluoro-RGR-spexines sous forme de pince, le composé **38** avec 2 chaînes F6 présente une meilleure EC₅₀ que le composé **36** avec 2 chaînes F4 (10 nM vs 67 nM). Par contre, l'introduction d'un motif PEG₂ entre la chaîne fluorocarbonée et le peptide (composés **37** et **39**) entraîne une diminution de l'efficacité des peptides en comparaison avec leurs analogues sans PEG d'un facteur 4 et 7, respectivement.

En conclusion de cette étude, nous avons pu montrer que pour maintenir une activité similaire à la spexine, il fallait introduire au minimum la chaîne F4 et que pour les composés sous forme de pince, la présence du motif PEG n'est pas favorable à une efficacité optimale. Ainsi, les composés **34**, **35** et **38**, dont les EC₅₀ respectives sont de 13 nM, 15 nM et 10 nM, présentent une meilleure efficacité que la spexine (95 nM). A ce stade, nous avons donc réussi à augmenter la solubilité d'une part tout en maintenant une efficacité meilleure que la spexine. Suite à l'étude de l'activité fonctionnelle, la stabilité plasmatique des composés présentant une EC₅₀ similaire ou meilleure que celle de la spexine a été évaluée.

ii) Evaluations des stabilités plasmatiques

La stabilité plasmatique des composés optimisés a été évaluée dans le plasma de souris à 0,25 µM. La disparition du composé au cours du temps a été mesurée par spectrométrie de masse. Pour les composés modifiés par une seule chaîne fluorocarbonée, les résultats (Tableau 15) montrent que les dérivés ayant une chaîne fluorocarbonée de longueur inférieure à la chaîne F8 (peptides **31** à **34**) ont une stabilité plasmatique équivalente ou inférieure à celle mesurée pour la spexine. Pour les composés **32** à **33**, le temps de demi-vie mesuré est même inférieur à celui de la spexine. Pour expliquer ce résultat, nous avons fait l'hypothèse que des sites de coupures enzymatiques supplémentaires étaient présents avec notamment l'introduction du motif solubilisant RGR. Afin de confirmer cette hypothèse, une étude de la dégradation des composés **33** à **35**, présentant une différence de stabilité plasmatique significative, a été menée.

Le composé **33** possédant une chaîne fluorocarbonée et présentant une stabilité faible ($t_{1/2} = 12$ min) a dans un premier temps été incubé dans le plasma de souris afin de

déterminer quels étaient les sites de coupure enzymatique principaux (Figure 71). L'analyse LC-MS de cette incubation a montré que le métabolite principal formé était la spexine.

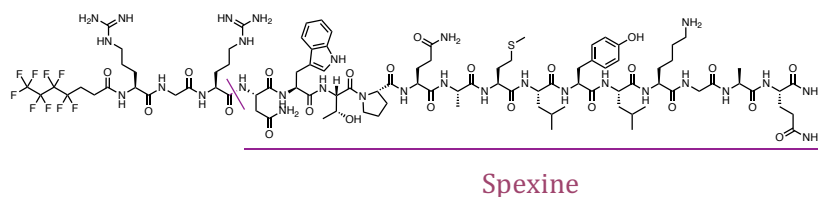


Figure 71 : Site de clivage principal de la F4-RGR-spexine (composé 33) é dans le plasma de souris.

Les incubations des composés **34** et **35**, plus stables ($t_{1/2} = 65$ et 384 min, respectivement), ont été ensuite réalisées afin de comparer les cinétiques d'apparitions de la spexine lors de la dégradation plasmatique des peptides précurseurs. L'analyse en masse de cette incubation a également mis en avant la formation de la spexine. Cependant les vitesses d'apparition et de disparition de ce métabolite sont différentes selon les composés et peuvent être corrélés avec les temps de demi-vie décroissants des composés **35**, **34** et **33** (Figure 72). Le composé **35**, possédant le temps de demi-vie le plus long présente, en effet, le signal d'apparition de la spexine le plus faible.

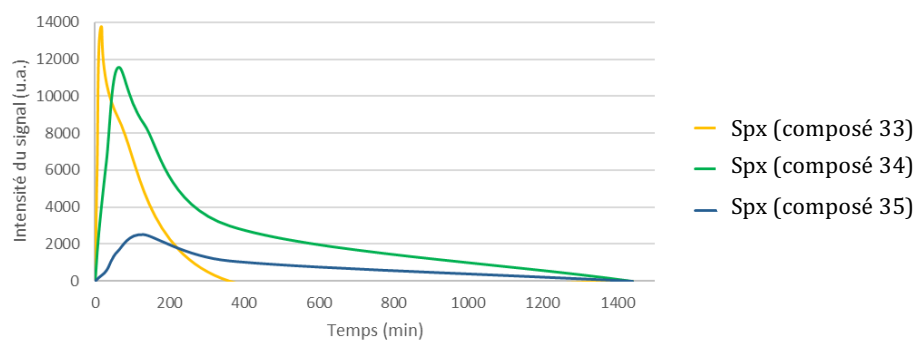


Figure 72 : Formation de la spexine à partir des fluoro-RGR-spexines **33** à **35** dans le plasma de souris.

Ces résultats tendent à montrer qu'il est nécessaire d'introduire une chaîne F8 en partie N-terminale du peptide pour protéger le site de coupure R-N du linker. La mesure du temps de demi-vie des dérivés pinces montrent que l'introduction d'une seconde chaîne fluorocarbonée permet d'améliorer la stabilité du peptide et de protéger le site de coupure R-N du linker. En effet, pour le composé **36**, l'introduction d'une deuxième chaîne F4 conduit à une amélioration d'un facteur 15 de la stabilité plasmatique. La

même tendance est observée avec les composés **38** et **39** pour lesquels l'ajout d'une deuxième chaîne F6 permet une augmentation du temps de demi-vie d'un facteur 18. Par contre, l'introduction d'un motif PEG₂ entre les chaînes F6 de la pince et le peptide entraîne une perte d'un facteur 2 de la stabilité en comparaison au composé **38**. La présence du motif PEG₂ favorise donc la dégradation enzymatique du peptide. La meilleure stabilité est obtenue pour le dérivé pince F6 sans PEG (peptide **38**) qui présente un temps de demi-vie de 1215 ± 18 min soit une amélioration d'un facteur 22 par rapport à la spexine native.

Ainsi, l'unique fluoro-RGR-spexine possédant des chaînes fluorocarbonées plus courtes que la chaîne F8 permettant d'allier une stabilité plasmatique élevée et une activité fonctionnelle meilleure que la spexine est le composé **38**. Ce composé a donc été sélectionné pour évaluer son efficacité *in vivo*. Cependant, avant d'effectuer cette évaluation, nous avons décidé d'entreprendre des études de toxicité telles que l'évaluation du pouvoir hémolytique et de la capacité de liaison aux érythrocytes.

4. Evaluation du pouvoir hémolytique

Le pouvoir hémolytique de certains dérivés de la spexine a été évalué. Pour cette étude, un composé des catégories suivantes a été choisi : fluoro-RGR-spexine, fluoro-spexine, lipo-spexine. Afin d'avoir des composés ayant une structure proche, nous avons choisi les composés **27**, **30** et **35** (Tableau 21).

Composé	Nom
23	Spx
27	F8-spx
30	L10-spx
35	F8-RGR-spx

Tableau 21 : Formation de la spexine à partir des fluoro-RGR-spexines **33** à **35** dans le plasma de souris.

L'évaluation du pouvoir hémolytique (Figure 73) des composés sélectionnés a mis en avant les propriétés d'hémolyse importantes du composé **30** (L10-spexine) dès 3,75 µM et une hémolyse des GR du composé **27** à partir de 15 µM. Par contre, la spexine (composé **23**) et F8-RGR-spexine (composé **35**) n'induisent aucune hémolyse jusqu'à 60 µM. Il est possible que la chaîne lipidée se lie fortement aux membranes cellulaires

induisant ainsi une déstabilisation de la membrane et donc potentiellement une rupture de celle-ci.

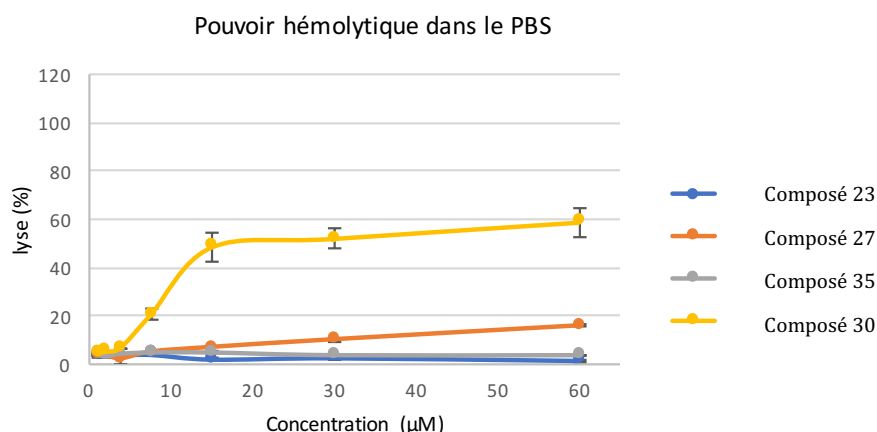


Figure 73 : Evaluation des propriétés hémolytiques des composés **23**, **27**, **35** et **30** dans le PBS.

L'utilisation d'une chaîne fluorocarbonée en comparaison de la chaîne hydrocarbonée est donc un avantage vis-à-vis du pouvoir hémolytique. Par conséquent le composé **30** présentant une capacité hémolytique à de faibles concentrations a été éliminé des composés à évaluer *in vivo*. La comparaison des capacités hémolytiques des composés **27** et **35** indique que la présence du motif RGR (composé **35**) induit une diminution de l'hémolyse. Il est donc possible que l'hydrophobie du composé **27** supérieure en comparaison au composé **35** soit responsable de cette propriété hémolytique.

La mesure de l'activité hémolytique a été menée dans un tampon ne contenant pas d'albumine. Nous nous sommes alors demandé si, en présence d'albumine, le pouvoir hémolytique des composés était modifié. Afin d'évaluer l'influence de la BSA sur ce critère, les expériences ont été réalisées à nouveau en présence de 1% de BSA. Ainsi, nous avons constaté qu'en présence de BSA (Figure 74), les composés **23** et **35** ne présentaient toujours aucun caractère hémolytique. Pour les composés **27** et **30**, qui sans albumine présentaient un caractère hémolytique respectivement à partir de 15 et 3,75 µM, aucune hémolyse n'a pu être observée jusqu'à 60 µM en présence de BSA. Cela met en avant une protection des GR vis-à-vis de l'hémolyse. Ces résultats tendent à montrer que les composés **27** et **30** se lient à l'albumine en induisant par conséquent une protection des GR. En effet, si ces composés se lient à la BSA, ils ne sont plus disponibles pour lyser les cellules du sang. Ainsi de façon indirecte, nous avons pu mettre en avant une interaction des composés **27** et **30** avec la BSA. La mise en évidence de cette interaction est importante car l'albumine est la protéine la plus représentée dans le plasma. Cette liaison à l'albumine et aux autres protéines plasmatiques a un effet sur la durée d'action d'une substance pharmacologique.

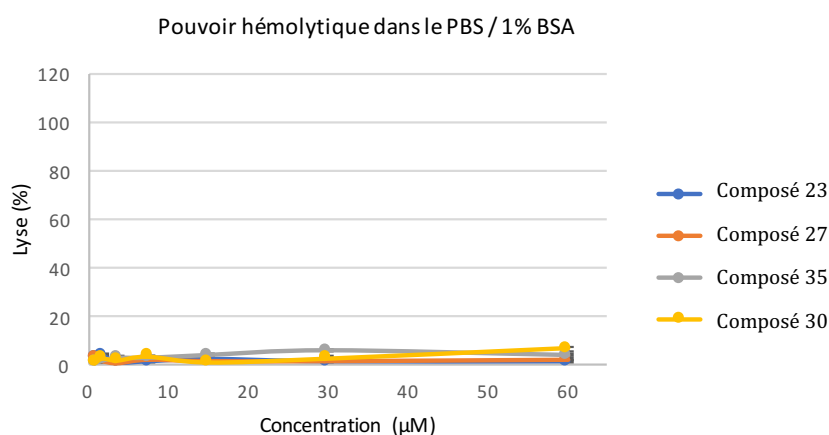


Figure 74 : Evaluation des propriétés hémolytiques des composés **23**, **27**, **35** et **30** dans le PBS / 1% BSA.

Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un composé peuvent également être affectées par la liaison aux cellules du sang et plus précisément les érythrocytes. C'est pourquoi cette liaison a été caractérisée pour l'ensemble des composés optimisés.

5. Evaluation des propriétés de liaison aux érythrocytes

L'accumulation potentielle de composés dans les érythrocytes doit être mesurée car elle peut entraîner une hématotoxicité. De plus, une forte liaison aux globules rouges (GR) peut donner lieu à une mauvaise interprétation des données obtenues lors d'études pharmacocinétiques, généralement obtenues par la mesure de concentrations plasmatiques. Une évaluation de la liaison aux érythrocytes des dérivés de la spexine intéressants pour une évaluation de l'activité *in vivo* a été réalisée. Ainsi, la liaison des composés **23**, **26**, **27**, **29** et **38** aux érythrocytes a été déterminée (Tableau 22). Un composé décrit pour se lier fortement aux érythrocytes (le Méthazolamide) ainsi qu'un composé se liant très peu aux érythrocytes (le Vérapamile) ont été également évalués afin d'obtenir des contrôles sur cette étude. Le coefficient de partage sanguin calculé représente le rapport de la concentration retrouvée dans le compartiment cellulaire des érythrocytes divisé par la concentration retrouvée dans le compartiment plasmatique. Ainsi, plus le rapport est élevé, plus la liaison aux érythrocytes est élevée. Cette étude a mis en avant une faible liaison aux érythrocytes des composés **34** et **37** (rapport inférieur à 1). Nous pouvons remarquer que ces composés présentant les plus faibles liaisons aux érythrocytes sont les composés possédant le motif solubilisant RGR. La spexine (composé **22**) et le composé **25** montrent, eux, une liaison moyenne aux

érythrocytes avec un coefficient de partage sanguin proche de 1. Ce résultat indique que l'introduction de la chaîne F6 sur la spexine n'induit pas une liaison aux érythrocytes spécifique.

Composé	Nom	Coefficient de partage sanguin	Solubilité (μM)
23	Spx	1.4 ± 0.2	> 1000
26	F6-spx	1.4 ± 0.6	7 ± 2
27	F8-spx	20 ± 2	12 ± 3
29	(F6)K(F6)-spx	$10,3 \pm 3,4$	< $10 \mu\text{M}$
35	F8-RGR-spx	0.7 ± 0.3	469 ± 115
38	(F6)K(F6)-RGR-spx	0.6 ± 0.1	-
-	Verapamile	0.2 ± 0.1	-
-	Methazolamide	29 ± 4	-

Tableau 22 : Coefficient de partage sanguin des composés **23**, **26**, **27**, **29**, **35** et **38**.

Nous avons alors pu constater que les composés qui se lient le plus fortement aux érythrocytes sont les plus hydrophobes. Les composés **27** et **29** se lient fortement aux érythrocytes avec un coefficient de partage sanguin supérieur à 10. Ces résultats indiquent que ces deux composés se lient 10 fois (composé **29**) et 20 fois (composé **27**) plus aux érythrocytes qu'ils ne sont présents en solution dans le compartiment plasmatique. Il est cependant intéressant de noter que dans le cas de l'apeline, le peptide F8-apeline (composé **4**) ne se lie pas intensément aux érythrocytes (0.9 ± 0.3). Cela indique que la présence de la chaîne F8 n'est pas responsable à elle seule de la liaison aux érythrocytes importante du composé **27**. La nature du peptide influe donc également sur cette liaison. L'utilisation des érythrocytes comme moyen de transport²²⁴ des composés dans le sang ou encore comme moyen d'administration^{225,226} de composés bioactifs est décrite. Cependant, cette liaison doit être caractérisée et maîtrisée. La liaison non spécifique aux érythrocytes peut, elle, engendrer des problèmes de biodisponibilité et ainsi influencer sur l'accumulation dans certains compartiments et par conséquent sur l'activité biologique. En effet, la dose administrée n'est plus la dose disponible si les composés sont fortement liés aux érythrocytes. Il est donc important de retenir cette propriété des composés **27** et **29** lors des expériences de pharmacocinétiques.

Après ces différentes propriétés *in vitro* caractérisées, nous avons décidé d'évaluer les propriétés *in vivo* des fluoro-peptides optimisés **26**, **29** et **38**.

6. Evaluation de l'activité biologique *in vivo* des fluoro-RGR-spexines et fluoro-spexines optimisées dans un modèle douleur

L'activité biologique de la fluoro-RGR-spexine **38** ainsi que des fluoro-spexines **26** et **29** ont été évaluées dans un modèle murin de douleur après administration par voie intrapéritonéale (Figure 75). Ces composés optimisés ont été choisis car ils présentent une efficacité et une stabilité *ex vivo* intéressantes ainsi que des chaînes plus courtes que la chaîne F8 et donc moins susceptibles d'être bioaccumulées. Afin de pouvoir comparer les résultats des composés optimisés **26**, **29** et **38**, le composé **27** a été administré comme référence. Les souris ont été, au préalable, traitées avec du CFA afin d'induire une inflammation. La mesure de l'effet analgésique des composés évalués en mesurant le temps que mettent les souris à retirer la queue de l'eau préalablement chauffée à 47°C. Trois doses ont été évaluées pour ces quatre composés. Le temps de retrait de la queue de l'eau a été représenté en fonction du temps. Le CFA a été injecté 3 jours avant les composés pour que la douleur inflammatoire se développe à son maximum. Les composés ont été administrés aux différentes doses à J3 après mesure du temps de retrait de la queue de l'eau des souris sous inflammation (CFA J3). Ces expériences ont été effectuées par le Dr. Glenn-Marie Le Coz au sein du laboratoire du Dr. Frédéric Simonin. Des mesures ont été effectuées à différents temps le jour de l'injection (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h) et les jours suivants (J4 et J5). Pour chaque composé, les courbes de doses réponses ainsi que les aires sous la courbe des activités sur l'ensemble de la période de mesure (AUC totale) sont indiquées. Afin de faciliter la comparaison des AUC totales, elles ont également été réunies dans le Tableau 23.

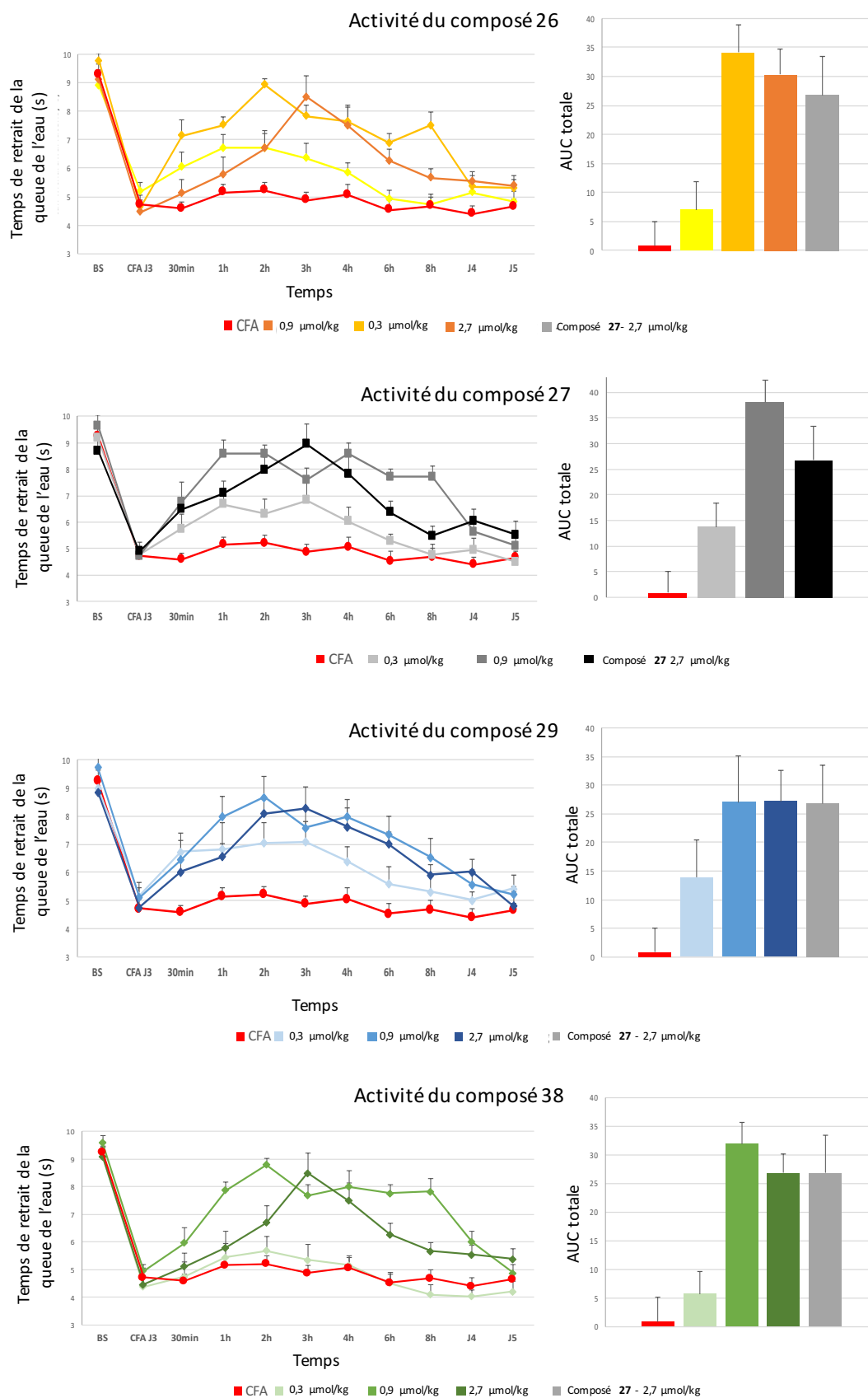


Figure 75 : Evaluation de l'activité in vivo des composés 26 (orange), 27 (gris), 29 (bleu) et 38 (vert) et AUC (aires sous la courbe) des quatre composés à chaque dose, de la référence à 0,9 $\mu\text{mol/kg}$ (gris) et des animaux traités au CFA uniquement (rouge) dans un modèle de douleur inflammatoire après administration intrapéritonéale.

Composé	Nom	AUC totale moyenne (u.a.)		
		0,3 µmol/kg	0,9 µmol/kg	2,7 µmol/kg
26	F6-spx	7	34	30
27	F8-spx	14	37	26
29	(F6)K(F6)-spx	14	27	27
38	(F6)K(F6)-RGR-spx	5	32	26

Tableau 23: Moyennes des AUC totales de l'efficacité in vivo des composés **26**, **27**, **29** et **38**.

Globalement nous pouvons observer que les composés optimisés **26**, **29** et **38** présentent des effets analgésiques comparables en termes de puissance et de durée. Ces paramètres sont d'ailleurs comparables au composé de référence **27**. Le pic d'analgésie est observé à 3 h après l'administration des quatre composés. De plus, nous pouvons observer que le retour à l'hyperalgésie basale (groupes d'animaux traités au CFA uniquement) est observé après 2 jours pour l'ensemble des composés.

À la dose de 0,3 µmol/kg, les composés **26** (7 u.a.) et **38** (5 u.a.) montrent des AUC totales comparables et plus faibles que les composés **27** (14 u.a.) et **29** (14 u.a.). Ainsi à la dose la plus faible, les composés **27** et **29** semblent plus efficaces que les composés **26** et **38**.

Afin de déterminer si la différence de puissance observée est dépendante de la dose, nous l'avons augmentée à 0,9 µmol/kg. A cette dose, les quatre composés présentent des puissances plus élevées qu'à la dose de 0,3 µmol/kg. A 0,9 µmol/kg, l'intensité des réponses analgésiques sont similaires pour les quatre composés en prenant en compte l'erreur statistique (27 u.a. < AUC < 37 u.a., Tableau 24). Les composés **26**, **27**, **29** et **38** présentent également une cinétique d'analgésie similaire. Nous avons donc encore augmenté la concentration administrée aux animaux.

A la dose de 2,7 µmol/kg, les quatre composés évalués présentent des efficacités similaires. En revanche, nous pouvons observer une diminution globale de l'efficacité de tous les composés (26 u.a. < AUC < 30 u.a.) en comparaison à la dose de 0,9 µmol/kg (27 u.a. < AUC < 37 u.a.). De plus, à cette dose la cinétique d'analgésie pour les composés **26**, **27** et **38** est différente en comparaison aux doses de 0,3 µmol/kg et 0,9 µmol/kg. Cela indique une modification de l'efficacité des fluoro-peptides **26**, **27** et **38** à la dose la plus élevée. Seul le composé **29** présente une cinétique d'analgésie similaire aux trois doses évaluées.

Composé	Nom	EC ₅₀ GalR2 (nM)	t _{1/2} (min)*
26	F6-spx	5,5 ± 2,4	342 ± 6
27	F8-spx	6,2 ± 0,9	432 ± 6
29	(F6)K(F6)-spx	10,3 ± 3,4	> 1440 (55%**)
38	(F6)K(F6)-RGR-spx	10 ± 3	1215 ± 18

*plasma de souris, 0,25 µM

**pourcentage de peptide restant dans le plasma après 24 h

Tableau 24: Caractérisation *in vitro* des composés **26**, **27**, **29** et **38**.

Ces résultats indiquent donc que, à la dose la plus faible, les composés **27** et **29** sont plus actifs que les composés **26** et **38**. Cependant l'activité fonctionnelle *in vitro* vis à vis du récepteur GalR2 des quatre composés est similaire (tableau 20). Cette différence d'efficacité analgésique des composés entre eux pourrait s'expliquer par une différence d'activité de ces composés vis à vis du récepteur GalR3. En effet, la spexine est également très active sur le récepteur GalR3 qui pourrait également être impliqué dans la modulation de la nociception. Par conséquent, si les activités fonctionnelles des composés **27** et **29** sont plus faibles pour le récepteur GalR3 que les composés **26** et **38**, les différences de puissances à 0,3 µmol/kg pourraient être expliquées. Aux doses plus élevées, une saturation des deux récepteurs GalR2 et GalR3 pourrait expliquer l'activité comparable des quatre composés. La mesure *in vitro* de la capacité d'activation du récepteur GalR3 des composés **26**, **27**, **29** et **38** pourrait donc être effectuée pour expliquer cette observation.

L'augmentation de la dose permet de retrouver une activité *in vivo* comparable des quatre composés (0,9 µmol/kg). Cela indique que la différence de stabilité plasmatique observée *in vitro* n'influe pas sur l'efficacité des produits *in vivo*. En effet, les composés **29** et **38** présentent une stabilité plasmatique proche de 24 h. Une activité prolongée de ces deux composés aurait donc été attendue *in vivo*. Les résultats indiquent pourtant une cinétique similaire des trois composés. Il est donc possible que le mode d'administration induise une diffusion lente dans la circulation sanguine empêchant ainsi de voir les conséquences de cette différence de stabilité plasmatique. L'autre option est la formation rapide de métabolites qui sont tout aussi actifs que le composé de départ

En revanche, à la dose la plus élevée de 2,7 µmol/kg, les quatre composés présentent globalement une diminution de l'efficacité *in vivo*. Il est possible que cette observation soit corrélée à un problème lors de l'injection : adsorption des fluoro-peptides aux plastiques (seringue notamment). Afin d'essayer de répondre à ces questions et de

mieux comprendre l'effet maximal observé à 3 h ainsi que l'effet prolongé sur plusieurs jours pour l'ensemble des composés, des études pharmacocinétiques ont été entreprises.

7. Etudes pharmacocinétiques

Les études pharmacocinétiques permettent de déterminer dans un modèle *in vivo* différents aspects tels que : le temps de demi-vie plasmatique, la clairance et la distribution. Afin de déterminer ces caractéristiques, le composé est dosé à différents temps dans le sang et quantifié par spectrométrie de masse. Les propriétés analgésiques des composés **26**, **27**, **29** et **38** étaient comparables aux doses de 0,9 $\mu\text{mol/kg}$. Dans le but de corrélérer l'efficacité des composés dans un modèle de douleur inflammatoire chez la souris et les propriétés de pharmacocinétiques, le composé de référence **27** a dans un premier temps été évalué (Figure 76). L'évolution de la concentration plasmatique chez la souris à 4,5 $\mu\text{mol/kg}$ a été déterminée pour ce composé (Figure 76). La concentration au temps 0 min a été indiquée à une concentration nulle en raison du mode d'administration. En effet, une administration intrapéritonéale implique, contrairement à une administration intraveineuse, une concentration de composé nulle dans le plasma à l'injection.

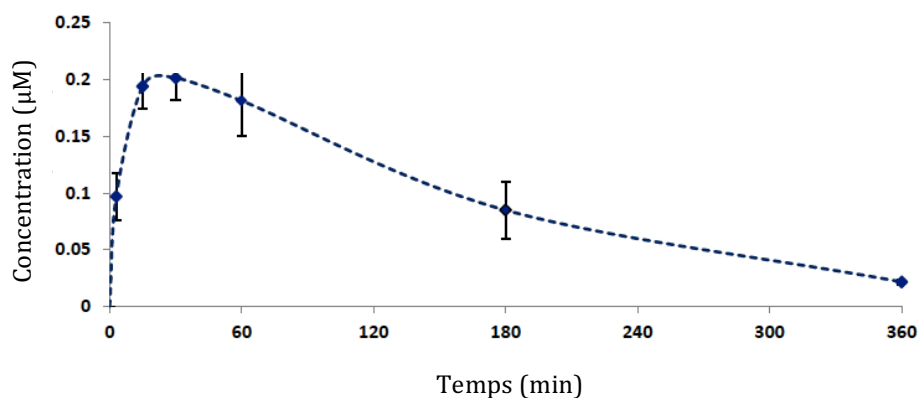


Figure 76 : Evolution de la concentration plasmatique du composé **27** chez la souris après une administration intra-péritonéale à 4,5 $\mu\text{mol/kg}$.

Cette étude a permis de déterminer les paramètres pharmacocinétiques du composé **27** (Tableau 25). Le temps de demi-vie plasmatique du composé **27** *in vivo* est de 101 ± 7 min avec une concentration maximale (C_{max}) de 0,2 μM atteinte dès 30 min (t_{max}). Ces résultats conduiraient à une activité maximale de ce composé à 30 min avec une diminution progressive de l'effet jusqu'à une disparition complète du composé de la circulation sanguine. Cependant, l'effet analgésique maximal observé à 2 h de ce

composé indique une activité du fluoro-peptide plus longue que le temps de demi-vie. Il est donc possible qu'un métabolite issu du composé **27**, et dont le temps de demi-vie est significativement supérieur à celui-ci, soit responsable de l'activité observée.

Paramètres pharmacocinétiques du composé **27**

$t_{1/2}$ (min)	101 ± 7
Clairance (mL/min/kg)	115 ± 21
Volume distribution (mL/kg)	16810 ± 4192
C_{max} (μ M)	0,2
t_{max} (min)	30

Tableau 25 : Paramètres pharmacocinétiques du composé **27**.

Concernant les autres paramètres de pharmacocinétique, la valeur de la clairance (115 ± 21 mL/min/kg) est très élevée. En effet, une clairance élevée chez la souris correspond à une valeur de 70 mL/min/kg. Le composé serait donc éliminé rapidement de l'organisme. Enfin, l'analyse du volume de distribution indique également une distribution très importante du composé dans les tissus. En effet, un volume de distribution élevé correspond à un volume supérieur au volume sanguin de l'animal. Le volume sanguin moyen d'une souris est de 70 mL/kg. Pour le composé **27**, le volume de distribution obtenu est de 16810 ± 4192 mL/kg. Le composé se distribuerait donc massivement dans les tissus.

Globalement ces résultats indiquent que le composé **27** est éliminé très rapidement de l'organisme et distribué fortement dans les tissus. Ces observations contradictoires avec l'effet analgésique prolongé observé peuvent être expliqués par la forte liaison aux érythrocytes que présente ce composé (coefficient de partage sanguin 20 ± 2). En effet, si le composé est fortement lié aux cellules sanguines, celui-ci ne sera pas retrouvé dans le compartiment plasmatique lors des analyses de spectrométrie de masse. Ainsi, la caractérisation *in vitro* nous a permis de comprendre les résultats des études pharmacocinétiques étudiées. En effet, sans le coefficient de partage sanguin, des conclusions erronées telles qu'une élimination et une distribution dans les tissus très importantes, auraient pu être tirées. Seul le paramètre du temps de demi-vie ne peut actuellement être corrélé avec l'activité *in vivo* observée. Afin de comprendre si un métabolite peut être responsable de l'effet analgésique prolongé observé, il est

important d'entreprendre leur synthèse et leur quantification *in vitro* et *in vivo*. Ce travail est en cours au laboratoire.

C. Conclusion du Chapitre 2

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la spexine, un peptide découvert en 2014, ligand des récepteurs GalR2 et GalR3 et présentant un intérêt dans divers domaines thérapeutiques. Ce peptide de 14 acides aminés et de nature hydrophobe a été choisi pour ses propriétés analgésiques peu étudiées. La stratégie de stabilisation FluoroPep a été appliquée à ce peptide et le fluoro-peptide F8-spexine a été synthétisé. Le temps de demi-vie de ce fluoro-peptide est de 432 min. La stabilité plasmatique de la spexine a donc été augmentée d'un facteur 8. Ce peptide a également montré une efficacité *in vivo* sur un modèle de douleur inflammatoire de 10 à 100 fois meilleure que pour la spexine. Au vu de ces résultats extrêmement prometteurs, nous avons décidé de travailler sur des dérivés de la spexine fluorocarbonés stables, solubles, actifs et biocompatibles.

Pour cela nous avons dans un premier temps étudié l'influence de la longueur de la chaîne fluorocarbonée et du nombre de chaînes sur l'activité fonctionnelle des peptides vis-à-vis de GalR2, leur stabilité plasmatique et leur toxicité. Ainsi nous avons pu montrer la longueur de chaîne fluorocarbonée minimale nécessaire pour obtenir une amélioration de l'activité fonctionnelle est la chaîne F4. Les composés sous forme de pince ainsi que le composé présentant une chaîne hydrocarbonée (L10) ont montré des activités fonctionnelles améliorées et proches de la F8-spexine. Nous avons alors évalué les stabilités plasmatiques de tous les composés. Cette étude a montré que la stabilité plasmatique augmentait avec la longueur de la chaîne fluorocarbonée. La chaîne L10 permet également de stabiliser la spexine de manière similaire à la chaîne F6. Pour les composés sous forme de pince, seul la pince possédant des chaînes F6 présente une stabilité plasmatique optimale. Trois composés ont donc montré des propriétés intéressantes : F6-spexine, (F6)K(F6)-spexine et L10-spexine. Nous avons ensuite évalué la toxicité des composés qui a mis en avant le pouvoir hémolytique de la L10-spexine. Ce composé a donc été éliminé pour l'étude *in vivo*. Nous avons donc retenu deux composés actifs, stables et biocompatibles pour des évaluations *in vivo* : la F6-spexine (composé **25**) et la (F6)K(F6)-spexine (composé **29**).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à améliorer la solubilité des fluoro-spexines afin de faciliter leur synthèse et purification mais également leur évaluation *in vitro* et leur biodisponibilité *in vivo*. Pour cela, le motif RGR solubilisant a été introduit afin d'augmenter le rendement de synthèse et la solubilité des fluoro-peptides. Pour les dérivés portant le motif RGR, les rendements de synthèse sont similaires à celui de la spexine alors que ceux-ci sont plus faibles pour la série de composés sans linker. D'autre part la solubilité de la F8-spexine et de la F8-RGR-spexine a été mesurée et nous avons observé une augmentation d'un facteur 8 de la solubilité pour le composé avec linker. Nous avons pu montrer que l'introduction du RGR a donc permis d'une part d'augmenter le rendement de synthèse mais également la solubilité. La présence de ce linker solubilisant est donc justifiée dans le cas de la spexine. Suite à la synthèse de ces composés, les stabilités plasmatiques ainsi que les évaluations fonctionnelles *in vitro* ont été mesurées. L'activité fonctionnelle de plusieurs composés étaient intéressantes mais seul le composé pince (F6)K(F6)-RGR-spexine a montré une activité fonctionnelle améliorée et une stabilité plasmatique optimale. De plus, ces études ont mis en avant l'apparition d'un site de clivage sur cette série de composés en raison de l'introduction du tri-peptide RGR. Ainsi seul le peptide (F6)K(F6)-RGR-spexine (composé **37**) a été choisi pour des études *in vivo*.

Dans un troisième temps, les dérivés optimisés (F6-spexine, (F6)K(F6)-spexine et (F6)K(F6)-RGR-spexine) ont été évalués *in vivo* sur le modèle de douleur inflammatoire. L'effet analgésique de ces trois nouveaux composés est similaire au composé de référence (F8-spexine) avec une efficacité maximale à 3 h à 0,9 µmol/kg. Ainsi nous avons développé trois composés alternatifs à la F8-spexine présentant des chaînes fluorocarbonées plus courtes que la chaîne F8.

Enfin, afin de mieux comprendre la relation entre l'activité *in vivo* des fluoro-spexines et leur devenir dans l'organisme, la pharmacocinétique du composé de référence F8-spexine (composé **27**), a été évaluée chez la souris. Ces résultats ont mis en avant une demi-vie plasmatique *in vivo* de 101 min. Ces résultats n'ont pas pu être corrélés avec l'activité maximale observée à 3 h. Ainsi un autre phénomène explique l'effet maximal décalé. L'étude de la liaison des dérivés de la spexine aux érythrocytes a montré que le composé **27** était le seul à se lier 20 fois plus aux cellules du sang qu'à être sous forme circulante dans le compartiment plasmatique (coefficient de partage sanguin = 20 ± 2). Il est donc possible qu'une quantité importante du composé **27** soit liée aux cellules du sang et, en conséquence, ne soit pas retrouvé dans le plasma suite aux prélèvements lors de l'étude pharmacocinétique. L'autre hypothèse est que l'un des métabolites de ce

fluoro-peptide soit actif et que ce soit son activité qui soit maximale à 3 h. Afin d'évaluer cette hypothèse la synthèse des métabolites du composé **27** ainsi que leurs quantifications *in vivo* doit être effectuée.

A présent, afin de conclure que les composés **26**, **29** et **38** sont de réelles alternatives au composé **27**, de sélectivité sur les récepteurs GalR2 et GalR3 devront être effectuées. Cela permettra de confirmer que l'introduction des motifs portant des chaînes fluorocarbonées plus courtes n'influe pas sur la sélectivité des composés vis-à-vis du récepteur. Si les fluoro-peptides optimisés lors de cette thèse ont une sélectivité sur GalR2 et GalR3 comme la spexine et la F8-spexine, des études complémentaires devront être réalisées pour déterminer l'activation de quel récepteur est responsable de l'effet analgésique. En complément des études *in vivo* réalisées, la caractérisation en pharmacocinétique des trois composés optimisés évalués *in vivo* doit être effectuée.

De plus, la stabilité plasmatique des composés synthétisés varie en fonction de la longueur de la chaîne fluorocarbonée ainsi que le motif pince introduit. Cette variation est cependant moins importante que ce qui a pu être observé avec les peptides dérivés de l'apeline. A la différence de l'apeline, l'hydrophobie de la spexine et de ses dérivés n'a pas permis d'utiliser des sondes fluorescentes pour déterminer l'affinité de ces composés pour l'albumine par anisotropie de fluorescence. Si les résultats de l'expérience de pouvoir hémolytique en présence de BSA laissent penser qu'une liaison à l'albumine est possible, elle reste à prouver. Afin de comprendre le mécanisme de stabilisation plasmatique des dérivés de la spexine, il est important d'effectuer des expériences complémentaires. L'albumine présente des tryptophanes dans sa structure et ceux qui sont à la surface de la structure émettent une fluorescence caractéristique. Des expériences d'extinction de fluorescence du tryptophane en présence de dérivés de la spexine pourraient être réalisées^{227,228}. Cela permettrait de confirmer une liaison et potentiellement déterminer une constante de liaison à l'albumine.

CHAPITRE 3 – CONCEPTION D’UN TRIPEPTIDE FLUOROCARBONE (TPF_C) AFIN D’AUGMENTER LA STABILITE PLASMATIQUE DE PEPTIDES ET PERMETTRE LA SYNTHESE DES FLUORO-PEPTIDES PAR BIOCONJUGAISON

A. Contexte de l’étude

1. Introduction

La synthèse de fluoro-peptides a précédemment été effectuée sur support solide. Cette approche est la plus rapide puisqu'elle permet d'introduire la chaîne ou le motif fluorocarboné directement sur le peptide et n'avoir ainsi qu'une unique étape de coupure et purification. En revanche, cette méthode n'est applicable qu'aux peptides courts et peu hydrophobes. La synthèse de fluoro-protéines par exemple ne peut être envisagée qu'en solution car l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée sur support solide entraîne une précipitation de la fluoro-protéine rendant la purification impossible. De plus, la synthèse de fluoro-peptides de nature hydrophobe entraîne une diminution des rendements de synthèse en raison des purifications difficiles (séparation du fluoro-peptide des sous-produits également fluorocarbonés). Nous avons pu observer les limitations de la synthèse sur support solide pour la synthèse des fluoro-peptides, notamment avec la F8-spexine (Chapitre 2, tableau 18), peptide plus hydrophobe que l'apeline par exemple. L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est de concevoir un tripeptide fluorocarboné (TPFc), capable de se lier à l'albumine et qui pourrait être conjugué en solution à un peptide ou une protéine afin d'augmenter leur solubilité et leur stabilité dans le plasma.

2. Stratégies utilisées

La stratégie de synthèse des fluoro-peptides en solution est basée sur une réaction de bioconjugaison entre un peptide, pré-purifié et totalement déprotégé, et un TPFc. Parmi les différentes méthodes de bioconjugaison existantes^{229,230,231}, nous avons choisi

d'utiliser la réaction de cycloaddition 1,3 catalysée par le cuivre entre un alcyne et un azoture (Figure 77).

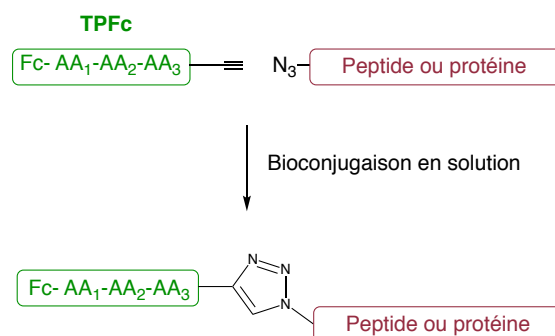


Figure 77 : Stratégie de synthèse des fluoro-peptides en solution.

Afin de concevoir un TPFc capable de se lier à l'albumine, nous allons mettre à profit l'essai d'anisotropie de fluorescence développé dans le chapitre 1 qui permet de mesurer la liaison d'un fluoro-peptide fluorescent à l'albumine. Ainsi, cet essai va permettre d'évaluer rapidement l'influence de la nature du TPFc sur les propriétés de liaison à l'albumine.

Le TPFc comporte 1) une chaîne fluorocarbonée (Fc) ; 2) un tripeptide (TP) possédant des acides aminés chargés qui va permettre d'augmenter la solubilité dans l'eau du TPFc tout en contribuant à la liaison de celui-ci à l'albumine ; 3) une fonction alcyne pour permettre au TPFc de réagir en solution avec les peptides et/ou protéines. Ainsi, cette stratégie pourrait permettre de développer un TPFc « universel », original et brevetable capable d'augmenter la stabilité des peptides/protéines quelque soit leur nature.

Pour atteindre notre objectif, nous avons dans un premier temps développé un modèle TPFc fluorescent qui va nous permettre de quantifier la liaison du TPFc à l'albumine et ainsi optimiser ses propriétés, en jouant notamment sur la nature des acides aminés du tripeptide. Un heptapeptide acylé fluorescent capable de se lier à l'albumine a récemment été décrit dans la littérature²³². La capacité de ce peptide à se lier à l'albumine a été mesurée par anisotropie de fluorescence. Nous pourrions de la même manière évaluer la capacité de nos TPFc fluorescents à se lier à l'albumine.

Une fois cette séquence définie, la réactivité du TPFc sera évaluée en présence du peptide spexine. Pour cela, le TPFc sera introduit par réaction de click en solution. Enfin les propriétés physico-chimiques du TPFc-spexine ainsi que l'activité fonctionnelle du dérivé seront évaluées. Enfin, en parallèle de cette étude, la synthèse d'un acide aminé neutre à pH physiologique sera développé.

B. Conception et synthèse de TPFc fluorocarbonés hydrosolubles cationiques et anioniques

1. Mise en place d'un modèle fluorescent

Afin de faciliter le développement de ce TPFc et d'évaluer ses propriétés de liaison à l'albumine, l'azido-peptide a dans un premier temps été remplacé par un modèle fluorescent (Figure 78).

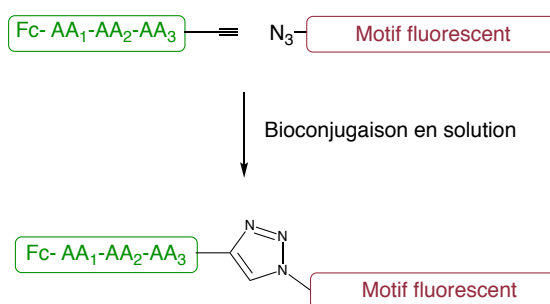


Figure 78 : Utilisation d'un motif fluorescent en remplacement du peptide.

Le tripeptide solubilisant RGR ayant précédemment montré ses capacités de solubilisation, nous avons décidé de concevoir nos premiers TPFc avec ce motif. Le TPFc possède également une partie fluorocarbonée. Nous avons décidé d'évaluer des chaînes fluorocarbonées de longueur différente (F8 et F4) ainsi qu'un dérivé tripeptidique contrôle sans Fc comportant un acétyle à la place. Concernant le motif fluorescent, il comporte un fluorophore (la lissamine rhodamine B) et un espaceur dont la fonction est d'éloigner le fluorophore du TPFc tout en augmentant sa solubilité aqueuse. Ce fluorophore a été choisi car il est peu coûteux et compatible avec l'anisotropie de fluorescence. Nous avons choisi d'utiliser un espaceur PEGylé pour augmenter la solubilité aqueuse du fluorophore (Figure 79).

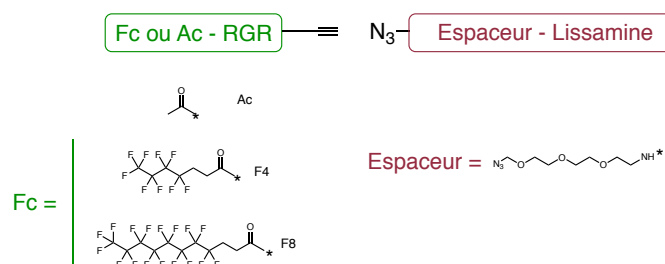


Figure 79 : Optimisation du TPFc et du motif fluorescent.

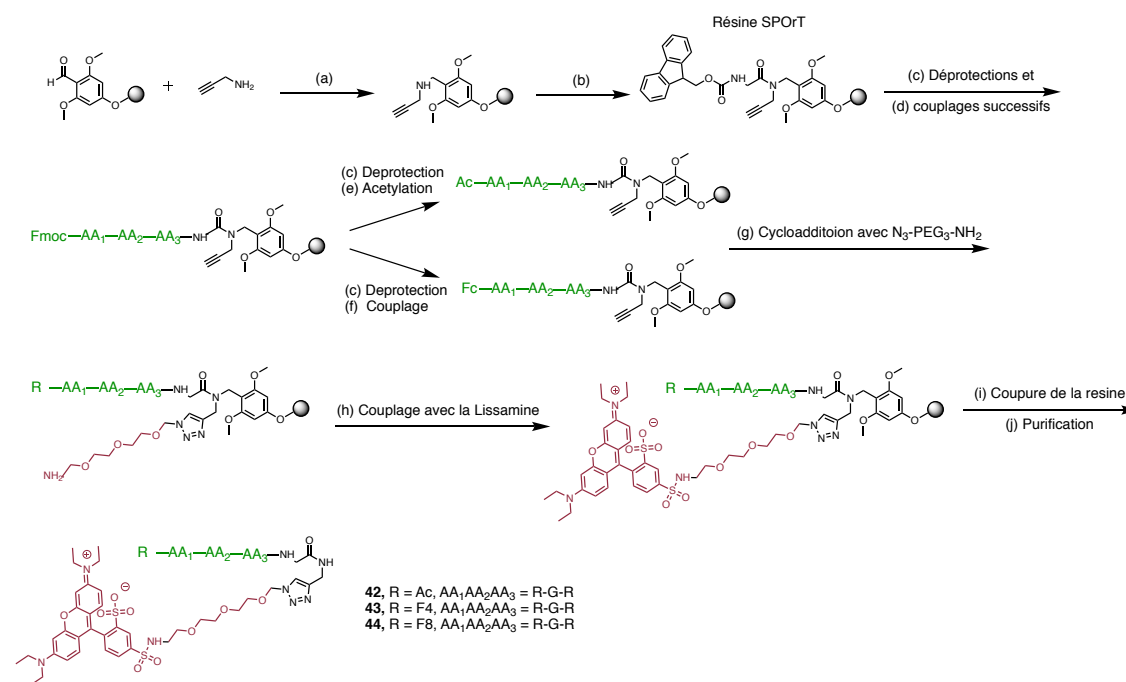
La synthèse de ces trois composés a donc été entreprise afin d'évaluer leur capacité à se lier à l'albumine.

2. Optimisation des propriétés de liaison du TPFc fluorescent

L'objectif de cette étude est de trouver le Fc permettant une liaison optimale à l'albumine.

a. Stratégie de synthèse sur support solide des TPFc fluorescents

La stratégie de synthèse des 3 TPFc fluorescents (Figure 46) est décrite dans le schéma 9. Les dérivés fluorescents ont été synthétisés sur support solide à partir d'une résine SPOT, développée précédemment au laboratoire²³³ et permettant l'obtention d'une fonction alcyne en partie C-terminale d'un peptide (Schéma 9).



Conditions et réactifs : (a) NaBH₃CN (10 éq.), MeOH/H₂O/ CH₃COOH (80/19/1), 60°C, 6h; (b) Fmoc-Gly-OH (4 éq.), PyBOP (3,9 éq.), DIEA (12 éq.), DMF, t.a., 16h ; (c) 20% pipéridine dans DMF, 2x10 min; (d) Fmoc-AA(P)-OH (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA, (12 éq.), 40 min ; (e) anhydride acétique (10 éq.), DIEA (10 éq.), DMF, 30 min ; (f) Fc-COOH (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (12 éq.), 40 min; (g) CuI (3 éq.), N₃-PEG₃-NH₂ (2,5 éq.), 20% pipéridine dans DMF, 5 h; (h) Composé **45** (2,5 éq.), DIEA (12 éq.), DCM; (e) TFA/Phénol/Thioanisole/Ethandithiol/H₂O (82,5/5/5/2,5/5), 2h30; (f) CLHP en phase inverse.

Schéma 9 : Synthèse sur support solide des dérivés fluorescents **42** à **44**.

La charge de la résine SPOrT a été évaluée par un dosage UV de l'adduit dibenzofluvène formé lors de la déprotection du groupement Fmoc. La synthèse des composés **42** à **44** a ensuite été entreprise sur cette résine.

Ainsi, les trois acides aminés choisis AA₁, AA₂ et AA₃ sont couplés successivement sur support solide en utilisant une stratégie Fmoc/tBu et les activations réalisées en présence de HATU, qui s'est avéré supérieur à l'HBTU, pour le couplage des résidus arginine. Ensuite, l'acétylation en présence d'anhydride acétique ou, l'introduction des chaînes fluorocarbonées en présence de HATU ont été réalisées. Puis, la cycloaddition 1,3-dipolaire sur support solide entre la fonction azido du N₃-PEG₃-NH₂ et l'alcyne du TPFc a été entreprise en présence du cuivre (CuI) et de pipéridine. Enfin le couplage du peptide sur support entre l'amine libre de l'espaceur PEG₃ et le chlorure de sulfonyle de la lissamine rhodamine B a été réalisé sur support également (Schéma 10). La coupure des composés de la résine a été réalisée en présence du mélange K. Les composés **42** à **44** ont ensuite été isolés par CLHP avec une pureté supérieure à 95 % et caractérisés par spectrométrie de masse. Les rendements de synthèses ont été calculés par rapport à la charge de la résine précédemment déterminé et les temps de rétention ont été obtenus en phase inverse (Tableau 26).

Composé	Nom	Rdt (%)	t _R *
42	Ac-RGR-(PEG ₃)-Lissamine	19	9,88
43	F4-RGR-(PEG ₃)-Lissamine	24	11,58
44	F8-RGR-(PEG ₃)-Lissamine	12	13,45

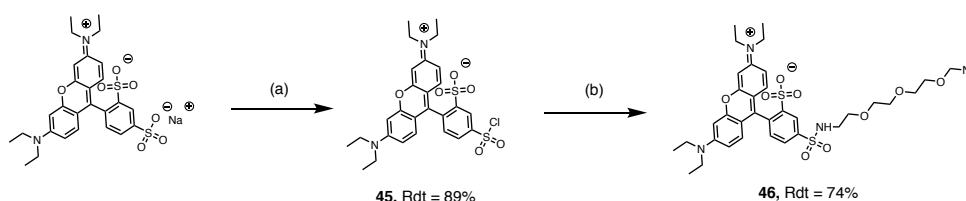
* gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 15 min sur une colonne C18

Tableau 26 : Rendements et temps de rétention des composés **42** à **44**.

Les rendements des composés **42** (19%) et **43** (24%) sont proches indiquant que l'introduction de la chaîne fluorocarbonée F4 (composé **43**) ne rend pas la synthèse ou la purification plus difficile. Seul le composé **44** présente un rendement de synthèse plus faible (12%). L'introduction de la chaîne F8 entraîne donc une diminution du rendement de synthèse du modèle fluorescent. Enfin, la corrélation entre l'augmentation de la longueur de la chaîne fluorocarbonée et l'augmentation des temps de rétentions observés pour les peptides apeline et spexine est retrouvée ici.

Afin de disposer d'un contrôle dans les essais d'anisotropie de fluorescence avec l'albumine, nous avons également préparé le composé fluorescent **46** ne comportant

que le fluorophore et l'espaceur PEG₃ azoture (Schéma 10). Ainsi le dérivé **46** est synthétisé en solution en 2 étapes à partir de la lissamine rhodamine B commerciale. Cette dernière est tout d'abord activée sous la forme de chlorure de sulfonyle en présence de chlorure d'oxalyle dans un mélange DMF/DCM avec un rendement de 89%. Le composé activé est ensuite couplé avec le N₃-PEG₃-NH₂ en présence de Et₃N et de DMAP dans le dichlorométhane conduisant au composé **46** attendu.



Conditions et réactifs : (a) (COCl)₂ (5 éq.), DCM/DMF (99,5/0,05), -10°C/25°C, 18 h; (b) NEt₃ (3 éq.), DMAP (0,1 éq.), DCM/DMF (50/50), t.a., 16 h.

Schéma 10 : Synthèse du composé **46**²³⁴.

L'étape de purification de **46** a été difficile en raison de la présence du motif PEG₃. Ce composé a d'abord été purifié par CLHP mais il s'est avéré que la méthode de choix était la purification sur silice traitée avec de la triéthylamine. Dans ces conditions, le composé a été isolé avec un bon rendement de 74%.

Une fois les 3 TPFc fluorescents **42**, **43** et **44** ainsi que le contrôle **46** préparés, leur capacité à se lier à l'albumine a été évaluée.

b. Evaluation des propriétés de liaison à l'albumine des modèles fluorescents

La capacité de liaison à l'albumine bovine (BSA) des 4 dérivés préparés précédemment a été évaluée par anisotropie de fluorescence (Figure 80). Les anisotropies en fonction de la concentration en BSA des composés **42** à **45** et **46** ont été déterminées (Figure 81).

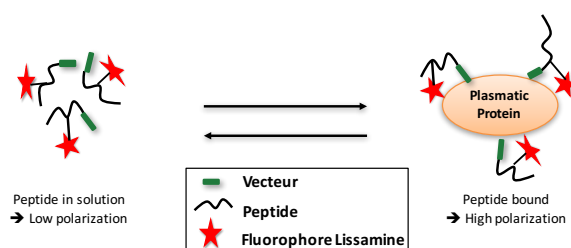


Figure 80 : Evaluation des modèles fluorescents par anisotropie de fluorescence.

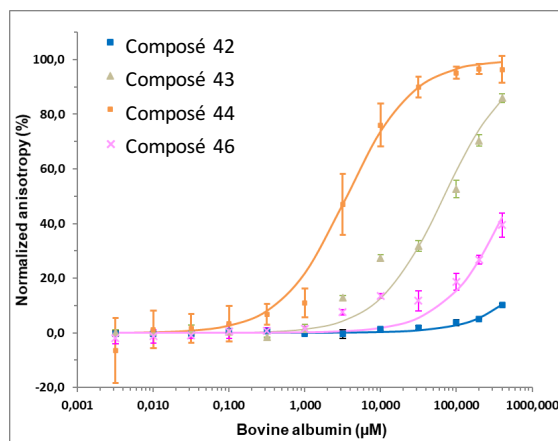


Figure 81 : Anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés **42** à **44** et **46**.

Les constantes de dissociation (K_d) des composés **42** à **44** et **46** ont été déterminées (Tableau 27). Cette constante indique l'affinité des composés à l'albumine.

Composé	Nom	Kd BSA (μM)
42	Ac-RGR-(PEG ₃)-Liss	3531 ± 126
43	F4-RGR-(PEG ₃)-Liss	68 ± 3
44	F8-RGR-(PEG ₃)-Liss	$3,5 \pm 0,7$
46	(PEG ₃)-Liss	545 ± 43

Tableau 27 : Affinité des composés **42** à **44** et **46** pour la BSA.

Le composé **42**, ne possédant pas de chaîne fluorocarbonée, présente une constante de dissociation de $3531 \pm 126 \mu\text{M}$. Les composés **43** et **44**, possédant respectivement les chaînes fluorocarbonées F4 et F8, présentent des constantes de dissociation bien plus faibles. En effet les composés **43** et **44** présentent respectivement des constantes de dissociation de $68 \pm 3 \mu\text{M}$ et $3,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$. Ces valeurs indiquent d'une part que l'augmentation de la longueur de la chaîne fluorocarbonée permet d'augmenter l'affinité pour la BSA. D'autre part, ces résultats montrent que la présence d'une chaîne fluorocarbonée (composés **43** et **44**) entraîne une augmentation importante de l'affinité pour la BSA en comparaison avec le composé **42**. Ainsi, en utilisant cet essai de fluorescence, nous avons pu conclure que la présence de la chaîne fluorocarbonée F8 était nécessaire pour que le tripeptide fluorescent se lie à l'albumine. Nous avons donc conservé cette chaîne pour la suite de l'étude. De plus, nous avons pu valider que le fluorophore utilisé présentait une affinité faible sans la présence du tripeptide et de la

chaîne F8 comme le montre la mesure de la liaison du composé **46** à la BSA ($545 \pm 43 \mu\text{M}$). La partie espaceur et le fluorophore permettent d'obtenir des constantes de dissociation à la BSA exploitables pour notre étude. En effet, ce modèle nous permet de discriminer les composés présentant une bonne affinité pour la BSA (composé **44**), une affinité moyenne (composé **43**) et une affinité faible (composé **42**). Après avoir validé l'essai d'anisotropie pour la mesure de l'affinité des dérivés fluorescents à l'albumine, nous avons cherché à optimiser la partie tripeptidique des TPFc.

c. Optimisation de l'affinité du TPFc pour l'albumine en jouant sur la nature du tripeptide.

i) Synthèse des modèles fluorescents PEGylés, cationiques et anioniques

Suite aux résultats précédents encourageants, l'influence de la nature peptidique du TPFc sur son affinité à la BSA a été étudiée. Pour cela la synthèse de composés possédant des PEGs, des acides aminés cationiques (arginine et lysine) et anioniques (acides glutamique et aspartique) à la place des arginines du tripeptide RGR a été réalisée (Figure 82). En effet, ces motifs sont connus pour améliorer la solubilité des composés^{235,236,237,238,239}. D'autre part, l'albumine possède des poches de liaison hydrophobes mais également des résidus cationiques en surface²⁴⁰. Il était donc intéressant d'introduire des acides aminés anioniques dans le tripeptide comme l'acide aspartique ou glutamique^{240,241}. Les résultats précédents ont montré que des résidus anioniques combinés avec la chaîne F8 pouvaient également conduire à une liaison du TPFc à l'albumine. Nous avons donc envisagé l'utilisation de résidus arginine (comme précédemment) et lysine. L'acide aminé central choisi est la tyrosine afin d'une part de favoriser des interactions hydrophobes avec l'albumine. D'autre part cet acide aminé permet d'avoir un chromophore dans sa structure pour pouvoir suivre plus facilement le TPFc par CLHP lors des réactions de bioconjugaison. Enfin il était intéressant d'inclure à la place du tripeptide une simple chaîne pégylée (composés **47** et **48**) neutre qui apporte uniquement de la solubilité au TPFc.

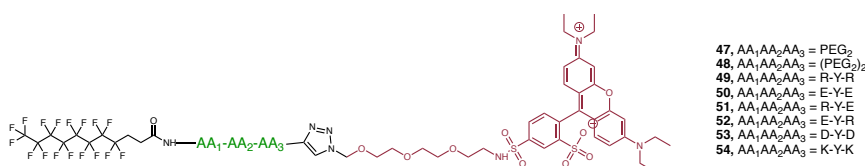


Figure 82 : Structure des composés **47** à **54**.

La synthèse des composés **47** à **54** (Figure 82) a été réalisée comme précédemment (Schéma 9) sur support solide. Les composés **55** à **62** ont été obtenus avec une pureté CLHP supérieure à 95% et leur identité a été confirmée par analyse par spectrométrie de masse. Afin de confirmer la nécessité d'avoir un tripeptide, les composés possédant une (composé **47**) ou deux (composé **48**) chaînes pégyliées ont également été préparés. Les rendements ainsi que les temps de rétention des composés **47** à **54** ont été réunis (Tableau 28).

Composé	Nom	AA ₁ -AA ₂ -AA ₃	Rdt (%)	t _R **
44	F8-RGR-(PEG ₃)-Liss	R-G-R	12	5,87
47	F8-PEG ₂ -(PEG ₃)-Liss	PEG ₂	25	7,52
48	F8-(PEG ₂) ₂ -(PEG ₃)-Liss	PEG ₂ -NH-CO-PEG ₂	22	7,33
49	F8-RYR-(PEG ₃)-Liss	R-Y-R	8	5,76
50	F8-EYE-(PEG ₃)-Liss	E-Y-E	9	6,99
51	F8-RYE-(PEG ₃)-Liss	R-Y-E	17	6,20
52	F8-EYR-(PEG ₃)-Liss	E-Y-R	21	6,22
53	F8-DYD-(PEG ₃)-Liss	D-Y-D	10	7,06
54	F8-KYK-(PEG ₃)-Liss	K-Y-K	12	5,58

** gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 7 min sur une colonne C18

Tableau 28 : Rendements et temps de rétention des composés **44** et **47** à **52**.

Les rendements de synthèse de ces deux composés sont proches du composé **44** possédant le tripeptide RGR. Cependant, une augmentation significative du temps de rétention est observée pour les composés **47** et **48** en comparaison du composé **44**. Cela met en avant l'intérêt du tripeptide quant à l'hydrophilie apportée par les acides aminés notamment celle des arginines. Nous avons ensuite entrepris la synthèse de composés possédant tous une tyrosine (Y) en remplacement de la glycine (G) centrale du tripeptide RGR (composés **49** à **54**). Nous avons tout d'abord synthétisé le composé **49**, analogue du composé **44**, possédant le tripeptide RYR. Le rendement de synthèse du composé **49** (8%) et du composé **44** (12%) sont proches. La même observation a pu être effectuée pour les temps de rétention de ces deux composés (5,87 min pour le composé **44** et 5,76 min pour le composé **49**). Nous avons ensuite entrepris la synthèse du composé **50** possédant un tripeptide anionique constitué d'acides glutamiques (E) : EYE. Le rendement de synthèse de ce composé (9%) est similaire au composé **49** (8%)

indiquant que le remplacement des arginines (R) par des acides glutamiques (E) n'a pas d'influence sur la synthèse chimique de ce modèle fluorescent.

Nous avons ensuite effectué la synthèse des composés **51** et **52** possédant respectivement les tripeptides RYE et EYR. Les deux combinaisons ont été effectuées en raison des potentielles interactions avec l'albumine. En effet, la présence de l'arginine ou de l'acide glutamique à proximité de la chaîne fluorocarbonée F8 (AA₁) pourrait influencer sur les propriétés de liaison à l'albumine du modèle fluorescent. Les rendements de synthèse de ces deux composés sont supérieurs aux composés **49** et **50** possédant des tripeptides symétriques (RYR et EYE). La présence simultanée de l'arginine et de l'acide glutamique semble faciliter la synthèse de ces modèles fluorescents. Concernant leur temps de rétention, les composés **51** (6,20 min) et **52** (6,22 min) présentent des temps de rétention identiques.

Enfin, nous avons synthétisé les composés **53** et **54** possédant respectivement les tripeptides DYD et KYK. Les rendements de synthèse des composés **53** (10%) et **54** (12%) sont similaires aux composés **49** (8%) et **50** (9%). Ainsi, le remplacement des arginines (composé **49**) par des lysines (composé **54**) et des acides glutamiques (composé **50**) par des acides aspartiques (composé **53**) n'influe pas sur les rendements de synthèse. Les temps de rétention des composés **49** (5,76 min) et **54** (5,58 min) d'une part et des composés **50** (6,99 min) et **53** (7,06 min) d'autre part sont très proches. Cela indique que le remplacement des arginines par des lysines, et, des acides glutamiques par des acides aspartiques ne modifie pas les temps de rétention et donc les propriétés d'hydrophobie.

Un fois ces composés caractérisés, nous avons pu évaluer leur capacité de liaison à l'albumine.

ii) Evaluation des propriétés de liaison à l'albumine des modèles fluorescents pégylés, cationiques et anioniques

Les propriétés de liaison à l'albumine des composés **47** à **54** ont été évaluées par anisotropie de fluorescence comme précédemment (Figure 83).

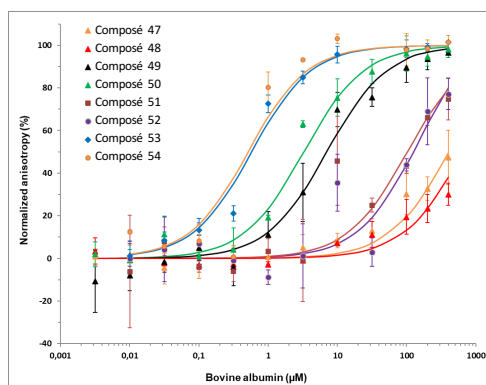


Figure 83 : Anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés **47** à **54**.

Nous avons pu déterminer, comme pour les composés **42** à **44**, des constantes de dissociation à la BSA (Tableau 29).

Composé	Nom	Kd BSA (μM)
44	F8-RGR-(PEG ₃)-Liss	$3,5 \pm 0,7$
47	F8-PEG ₂ -(PEG ₃)-Liss	268 ± 34
48	F8-(PEG ₂) ₂ -(PEG ₃)-Liss	438 ± 69
49	F8-RYR-(PEG ₃)-Liss	$0,9 \pm 0,2$
50	F8-EYE-(PEG ₃)-Liss	$0,6 \pm 0,1$
51	F8-RYE-(PEG ₃)-Liss	150 ± 28
52	F8-EYR-(PEG ₃)-Liss	103 ± 29
53	F8-DYD-(PEG ₃)-Liss	$0,6 \pm 0,1$
54	F8-KYK-(PEG ₃)-Liss	$0,5 \pm 0,1$

Tableau 29 : Affinité des composés **44** et **47** à **52** pour la BSA.

La valeur des constantes de dissociation pour la BSA des composés **47** ($268 \pm 34 \mu\text{M}$) et **48** ($438 \pm 69 \mu\text{M}$) indiquent une affinité faible pour la BSA. Ces résultats indiquent donc que la présence du tripeptide, en combinaison avec la chaîne F8, est nécessaire pour obtenir une bonne affinité pour le BSA. La comparaison des constantes de dissociation des composés **44** ($3,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$) et **49** ($0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$) indique que le remplacement de la glycine centrale du tripeptide RGR par la tyrosine permet une amélioration de l'affinité du composé pour l'albumine d'un facteur 4 (Figure 84).

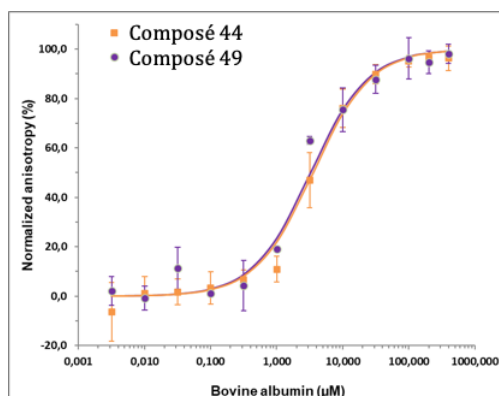


Figure 84 : Comparaison des anisotropies normalisée en fonction de la concentration en BSA des composés **44** et **49**.

La nature cationique ou anionique du tripeptide, elle, ne semble pas influencer sur la capacité de liaison à la BSA puisque les composés **49** ($0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$) et **50** ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) présentent des constantes de dissociation à la BSA proches.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux propriétés de liaison à la BSA des composés possédant des tripeptides asymétriques : RYE (composé **51**) et EYR (composé **52**). Les capacités de liaison à l'albumine des composés **51** ($150 \pm 28 \mu\text{M}$) et **52** ($103 \pm 29 \mu\text{M}$) sont proches et sont cent fois moins importantes que les composés **49** et **50**. Cela indique que la combinaison d'une arginine et d'un acide glutamique au sein du tripeptide rend la liaison à la BSA difficile. Ainsi, la présence de deux acides aminés de la même nature (cationiques ou anioniques) de part et d'autre de la tyrosine sont nécessaires à une bonne liaison à l'albumine.

Enfin, l'évaluation de la capacité de liaison à l'albumine des composés **53** et **54** a été réalisée. Les constantes de dissociation à la BSA sont similaires pour les composés **49** et **50**. En effet, les composés **49** ($0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$), **50** ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$), **53** ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) et **54** ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$) ont des affinités pour l'albumine similaires. Ainsi nous avons pu montrer que la nature de l'acide aminé cationique ou anionique du tripeptide symétrique n'influe pas sur la liaison à la BSA.

En résumé de ces résultats, nous avons par cette méthode pu sélectionner quatre tripeptides intéressants qui, en combinaison de la chaîne fluorocarbonée F8, permettent d'obtenir une liaison intéressante pour l'albumine. Les TPFc F8-RYR, F8-EYE, F8-DYD et F8-KYK sont donc les TPFc optimisés de cette étude. Dans le but de s'affranchir des questions de bioaccumulations potentielles de chaînes fluorocarbonées longues, des

modèles fluorescents portants des motifs fluorocarbonés sous forme de pince ont été synthétisés et évalués.

3. Optimisation du motif fluorocarboné : introduction de pinces

a. Synthèse de modèles fluorescents portant des pinces fluorocarbonées

L'objectif de cette partie est de s'affranchir des problèmes de bioaccumulation environnementale potentiels des longues chaînes fluorocarbonées. Les analogues des composés **49**, **50**, **53** et **54** portant des pinces fluorocarbonées possédant des chaînes fluorocarbonées F6 ou F4 ont donc été synthétisés (Figure 85, Tableau 30) comme précédemment par SPPS (Schéma 9). Ainsi, les pinces sont obtenues par introductions successives d'une Fmoc-Lys(Fmoc)-OH et d'un Fmoc-PEG₂-OH en présence de HBTU puis, de deux chaînes fluorocarbonées F4-COOH ou F6-COOH en présence de HATU.

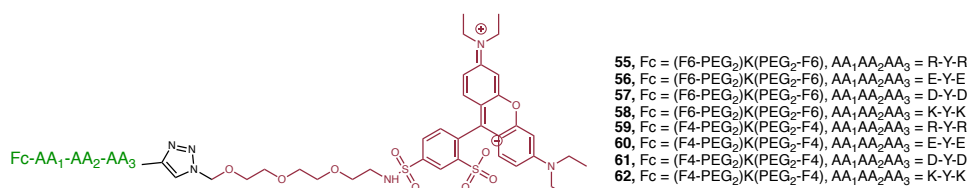


Figure 85 : Structure des composés **55** à **62**.

Après coupure du support et purification par CLHP, les composés **55** à **62** ont été obtenus avec une pureté CLHP supérieure à 95%. Leur identité a été confirmée par analyse par spectrométrie de masse. Les rendements de synthèse ainsi que les temps de rétention des huit composés pince ont été réunis (Tableau 30)

Les rendements de synthèse des composés **55** à **58** (portant des motifs pinces avec des chaînes fluorocarbonées F6) et **59** à **62** (portant des motifs pinces avec des chaînes fluorocarbonées F4) sont tous similaires. En effet, ils fluctuent entre 13% et 17%. L'introduction de pinces portant des chaînes F6 ou F4 n'influe donc pas sur les rendements de synthèse. En comparaison avec les composés **49**, **50**, **53** et **54** (portant une chaîne fluorocarbonée F8), les composés **55** à **62** présentent des rendements de synthèse plus élevés. Les composés portant la chaîne F8 ont des rendements compris entre 8% et 12 %. L'introduction de la chaîne F8 rend donc les synthèses plus difficiles que l'introduction des motifs pinces.

Composé	Nom	Rdt (%)	t _R (min)**
49	F8-RYR-(PEG ₃)-Liss	8	5,76
50	F8-EYE-(PEG ₃)-Liss	9	6,99
53	F8-DYD-(PEG ₃)-Liss	10	7,06
54	F8-KYK-(PEG ₃)-Liss	12	5,58
55	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-RYR-(PEG ₃)-Liss	14	6,35
56	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-EYE-(PEG ₃)-Liss	13	7,49
57	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-DYD-(PEG ₃)-Liss	17	7,54
58	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-KYK-(PEG ₃)-Liss	14	6,28
59	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-RYR-(PEG ₃)-Liss	14	6,05
60	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-EYE-(PEG ₃)-Liss	17	7,18
61	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-DYD-(PEG ₃)-Liss	14	7,22
62	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-KYK-(PEG ₃)-Liss	16	5,98

** gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 7 min sur une colonne C18

Tableau 30 : Rendements et temps de rétention des composés **49**, **50**, **53**, **54** et **55** à **62**.

Nous avons ensuite comparé les temps de rétention des composés **55** (6,35 min), **56** (7,49 min), **57** (7,54 min) et **58** (6,28 min), avec respectivement les composés **59** (6,05 min), **60** (7,18 min), **61** (7,22 min) et **62** (5,98 min). Cette analyse permet de mettre en avant que les composés possédant un motif pince et portant des chaînes F6 (composés **55** à **58**) présentent des temps de rétention supérieurs à leurs analogues possédant un motif pince portant des chaînes F4 (composés **59** à **62**). Enfin, les composés portant la chaîne F8 (composés **49** (5,76 min), **50** (6,99 min), **53** (7,06 min) et **54** (5,58 min) ont des temps de rétention plus faibles que leurs analogues possédant le même tripeptide mais des motifs fluorocarbonés sous forme de pince. Ainsi nous avons pu établir une corrélation entre l'augmentation du temps de rétention des composés en CLHP en phase inverse et la nature du motif fluorocarboné introduit (Figure 86).

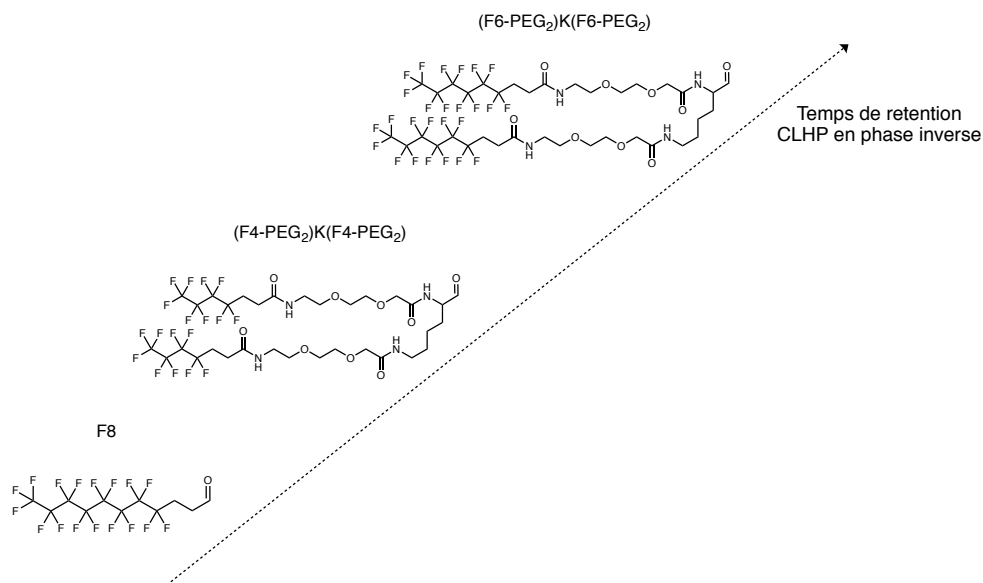


Figure 86 : Corrélation entre les temps de rétention et la nature du motif fluorocarboné.

Suite à ces comparaisons des composés portant des motifs pinces entre eux ainsi qu'avec ceux possédant une chaîne F8, nous avons évalué la capacité à se lier à l'albumine des composés **55** à **62**.

b. Evaluation des propriétés de liaison à l'albumine des tripeptides fluorescents portant des pinces fluorocarbonées

Les propriétés de liaison à l'albumine des composés **55** à **62** ont à nouveau été évaluées par anisotropie de fluorescence (Figure 87).

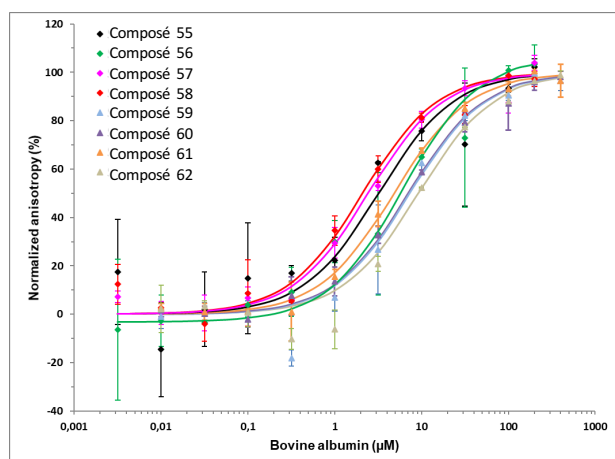


Figure 87 : Comparaison des anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés **55** et **62**.

Les constantes de dissociation à la BSA, reflétant l'affinité des composés, portant un motif fluorocarboné sous forme de pince ont ainsi pu être déterminées (Tableau 31). De manière générale nous pouvons observer que les composés possédant une chaîne fluorocarbonée F8 ($0,5 \mu\text{M} > K_d > 0,9 \mu\text{M}$) présentent des constantes de dissociation à la BSA plus faibles que les composés possédant un motif fluorocarboné sous forme de pince ($2,6 \mu\text{M} > K_d > 9,2 \mu\text{M}$). Les composés portant une chaîne fluorocarbonée F8 (composés **49**, **50**, **53** et **54**) sont donc globalement plus affins pour la BSA que les composés portant un motif fluorocarboné sous forme de pince (composés **55** à **62**). Nous avons ensuite effectué une comparaison des composés possédant un motif fluorocarboné sous forme de pince portant des chaînes F6 (composés **55** à **58**) et F4 (composés **59** à **62**). Cette comparaison a montré que, pour les composés possédant le même tripeptide mais des chaînes fluorocarbonées différentes (F4 ou F6) au sein du motif pince, les constantes de dissociation à la BSA sont légèrement modifiées. En effet, les comparaisons entre les composés **55** ($2,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$) et **59** ($7,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$), **56** ($2,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$) et **60** ($9,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$), **57** ($5,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$) et **61** ($6,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$) et enfin, **58** ($4,9 \pm 1,6 \mu\text{M}$) et **62** ($4,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$) mettent en avant une affinité des composés **55** à **57** sensiblement meilleure à la BSA que les composés **59** à **61**.

Composé	Nom	Kd BSA (μM)
49	F8-RYR-(PEG ₃)-Liss	$0,9 \pm 0,2$
50	F8-EYE-(PEG ₃)-Liss	$0,6 \pm 0,1$
53	F8-DYD-(PEG ₃)-Liss	$0,6 \pm 0,1$
54	F8-KYK-(PEG ₃)-Liss	$0,5 \pm 0,1$
55	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-RYR-(PEG ₃)-Liss	$2,7 \pm 0,3$
56	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-EYE-(PEG ₃)-Liss	$2,6 \pm 1,0$
57	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-DYD-(PEG ₃)-Liss	$5,8 \pm 1,4$
58	(F6-PEG ₂)K(PEG ₂ -F6)-KYK-(PEG ₃)-Liss	$4,9 \pm 1,6$
59	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-RYR-(PEG ₃)-Liss	$7,3 \pm 0,9$
60	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-EYE-(PEG ₃)-Liss	$9,2 \pm 0,5$
61	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-DYD-(PEG ₃)-Liss	$6,9 \pm 0,5$
62	(F4-PEG ₂)K(PEG ₂ -F4)-KYK-(PEG ₃)-Liss	$4,7 \pm 0,6$

Tableau 31 : Affinités des composés **49**, **50** et **53** à **62** pour la BSA.

Les composés **58** et **62** présentent eux une affinité similaire pour la BSA. Les motifs pinces composés de chaînes F6 (composés **55** à **58**) permettent ainsi d'augmenter de deux à trois fois la liaison à la BSA en comparaison avec les motifs pinces composés de

chaines F4 (composés **59** à **62**). Ainsi nous avons pu établir une corrélation entre l'augmentation de l'affinité pour la BSA et la nature du motif fluorocarboné (Figure 88).

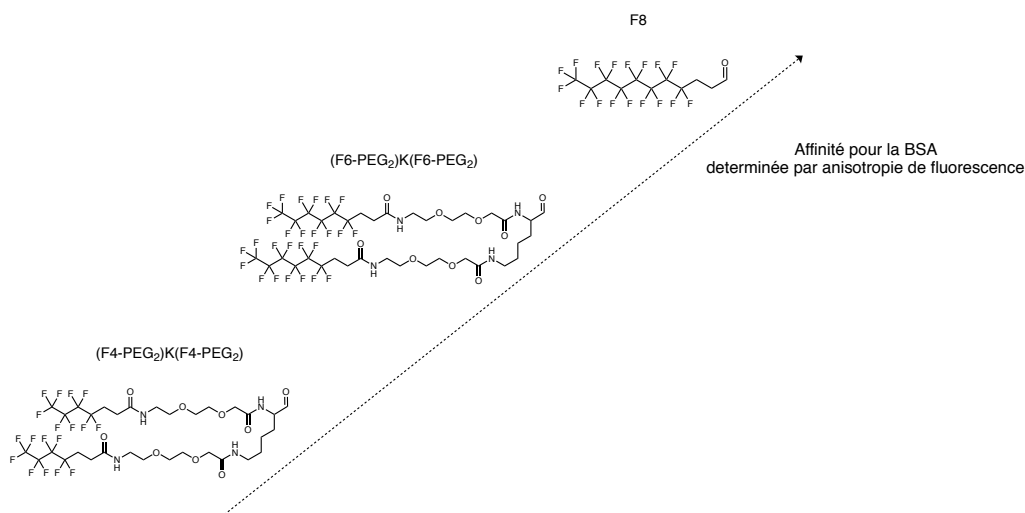


Figure 88 : Corrélation entre l'affinité pour la BSA et la nature du motif fluorocarboné.

La différence d'affinité entre les sondes fluorescentes possédant un motif fluorocarboné constitué de chaînes F6 ou F4 n'étant pas majeure, l'ensemble de ces TPFc (8 dérivés) ont été sélectionnés pour être introduits sur le peptide modèle spexine. Les TPFc possédant la chaîne F8 seront également introduits sur ce peptide modèle (Figure 89). En effet, nous souhaitons, avec les motifs sous forme de pinces, obtenir des propriétés pharmacologiques et biologiques proches des composés possédant la chaîne F8. Les TPFc possédant la chaîne fluorocarbonée F8 représentent donc des références.

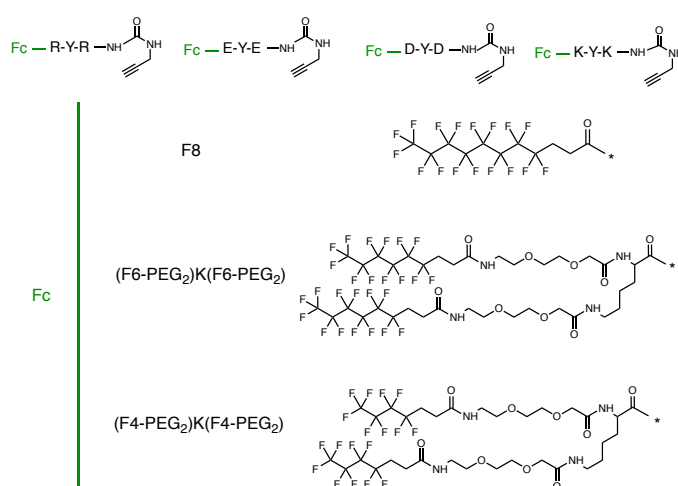


Figure 89 : Structures des TPFc choisis pour être introduits sur un peptide modèle.

Après avoir obtenus ces résultats de liaison à l'albumine, des études d'hydrophobie ont été réalisées pour comparer les quatre séquences tripeptidiques développés (RYR, EYE, DYD, KYK).

4. Mesure de l'hydrophobie des TPFc optimisés

Afin d'évaluer la solubilité en milieu aqueux des TPFc optimisés, nous avons réalisé une mesure de leur hydrophobie relative afin de les classer entre eux et ainsi d'affiner la sélection effectuée précédemment. Si les temps de rétention reflètent l'hydrophobie des composés, des méthodes de mesure plus directes telles que la mesure de solubilité, du coefficient de partage (Log P), du coefficient de partage à un pH donné (Log D) et de l'index d'hydrophobie en chromatographie existent²⁴². Elles permettent d'avoir une idée plus précise de l'hydrophobie des composés synthétisés. Nous avons choisi la technique de l'index d'hydrophobie en chromatographie (CHI) pour caractériser l'hydrophobie apportée par les différents tripeptides. Pour cela un mélange de dix molécules, dont les CHI sont connus et décrits²⁴³, sont injectés en CLHP avec un gradient en acétate d'ammonium (pH = 7,4) et acétonitrile²⁴⁴. Cela permet d'obtenir la droite d'étalonnage (Figure 90) afin de déterminer le CHI des composés synthétisés. La mesure des CHI a été effectuée sur une série de composés possédant une même motif fluorocarboné et les quatre tripeptides à cribler. Cette étude a été effectuée pour les composés possédant la chaîne fluorocarbonée F8 : composés **49**, **50**, **53** et **54** (Tableau 32).

Molécules de référence	Moyenne des t_R (min)	CHI
Théophylline	1,26	18,4
Phényltétrazole	1,36	23,6
Benzimidazole	1,51	34,3
Colchicine	1,74	43,9
Phénylthéophylline	1,89	51,7
Acétophénone	2,08	64,1
Indole	2,25	72,1
Propiophénone	2,34	77,4
Butyrophénone	2,54	87,3
Valérophénone	2,72	96,4

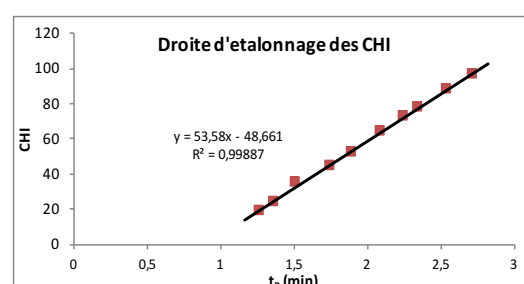


Figure 90 : Droite d'étalonnage des CHI obtenue à partir des molécules de référence.

L'application d'une formule faisant intervenir la valeur du CHI, et la somme des fonctions possiblement impliqués dans des liaisons hydrogènes ($\Sigma\alpha$) permet de déterminer un coefficient de partage :

$$\text{Log } D_{\text{CHI}} = 0.054 \text{ CHI} + 1.319 \Sigma\alpha - 1.877$$

La valeur du Log D est un bon indicateur des propriétés ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination) des composés. Une valeur de log D comprise entre 1 et 3 est représentative de propriétés pharmacologiques idéales. Plus la valeur est proche de 1 et plus le composé est hydrosoluble. Plus la valeur est proche de 3 et plus le composé est liposoluble.

Composé	Moyenne des t_R (min)	CHI	Log D _{CHI}
49	2,35	76,9	2,7
50	2,18	68,1	2,3
53	2,20	68,9	2,3
54	2,28	73,6	2,5

Tableau 32 : CHI des composés **49**, **50**, **53** et **54**.

Ainsi, les valeurs des log D pour les composés **49** (LogD= 2,7), **50** (Log D= 2.3), **53** (LogD= 2,3) et **54** (LogD= 2,5) indiquent d'une part que les log D sont compris entre 1 et 3. D'autre part que les composés sont plutôt lipophiles puisque les valeurs sont proches de 3. Une comparaison des Log D des deux composés comportant des tripeptides cationiques (composés **49** et **54**) et anioniques (composés **50** et **53**) a été effectuée. Cette comparaison a montré que les composés **49** (LogD= 2,7) et **54** (Log D= 2,5) ont des valeurs de Log D proches et que les composés **50** (LogD= 2.3) et **53** (LogD= 2,3) avaient des valeurs de Log D identiques. Ainsi nous n'avons pas pu éliminer un tripeptide anionique et un tripeptide cationique. Les TPFc précédemment sélectionnés (Figure 88) ont donc été synthétisés et introduits sur le peptide modèle.

C. Application de la méthode de synthèse de fluoropeptides en solution sur un peptide modèle : la spexine

1. Contexte de l'étude

L'objectif de synthétiser des fluoro-peptides en solution a été motivé par la difficulté à produire des fluoro-peptides hydrophobes sur support solide. Afin de valider notre méthode de synthèse en solution, nous avons choisi un peptide modèle hydrophobe : la spexine. Le choix du peptide s'est porté sur celui-ci en raison des données obtenues sur ce peptide dans le chapitre 2 que nous pourrions par conséquent comparer aux composés de notre méthode. En effet, les résultats de stabilité plasmatique et d'activité fonctionnelle obtenus sur la spexine précédemment nous permettront d'évaluer l'influence du tripeptide fluorocarboné sur ces paramètres. En effet, l'introduction d'une tyrosine ainsi que du triazole, formé lors de la cycloaddition, pourrait influencer sur les propriétés pharmacologiques des composés. Nous avons donc conçu une spexine portant une fonction azido (Figure 91) qui permettra d'introduire le TPFc en solution par cycloaddition 1,3-dipolaire.

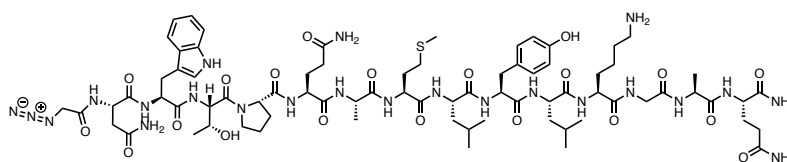


Figure 91 : Structure de l'azido-spexine.

Les différentes études, relatives à la conception des TPFc à introduire sur la spexine, menées précédemment ont mis en avant l'importance du motif fluorocarboné ainsi que de la partie tri-peptidique du TPFc. Afin de valider la stratégie de synthèse, nous avons donc décidé de synthétiser dans un premier temps les quatre TPFc possédant la chaîne fluorocarbonée F8 (Figure 92).

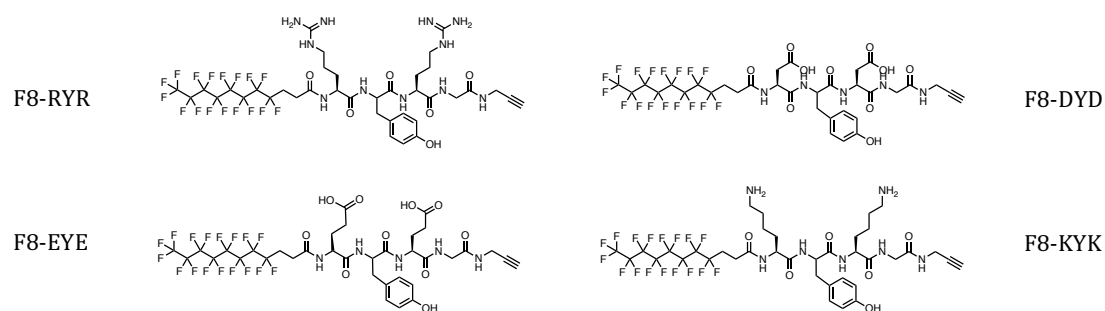


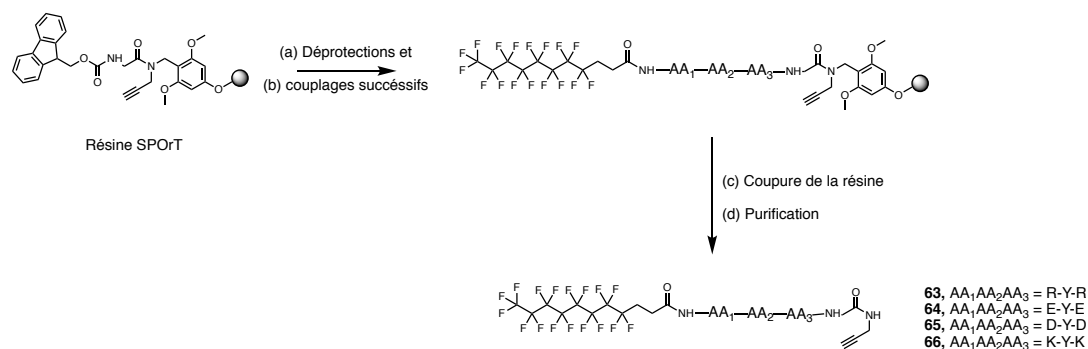
Figure 92 : Structure des quatre TPFcs à introduire sur la spexine.

La synthèse de ces cinq composés a été entreprise afin de valider la stratégie de synthèse de fluoro-peptides en solution.

2. Synthèse des dérivés de la spexine

a. Synthèse des précurseurs pour la cyclo-addition

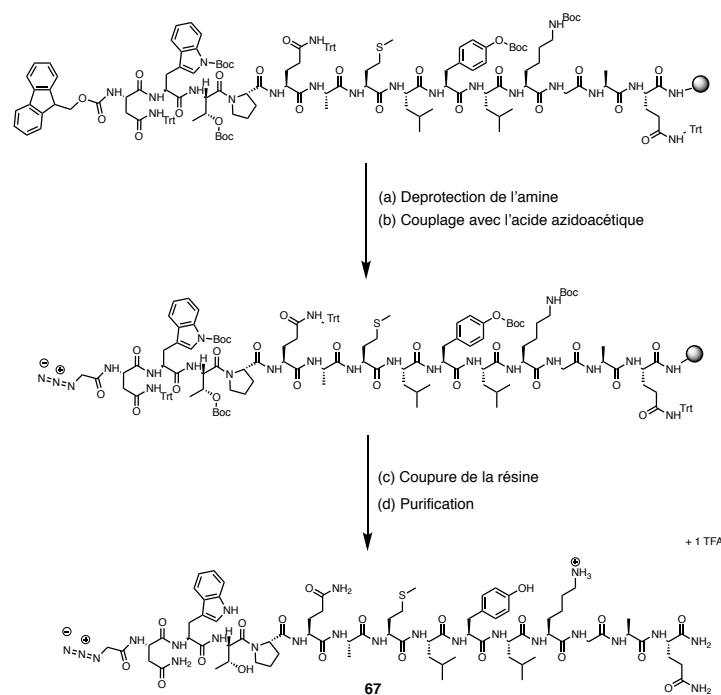
La synthèse des précurseurs pour la cyclo-addition a été entreprise sur support solide. Nous avons tout d'abord synthétisé les TPFcs fluorocarbonés (composés **63** à **66**) à partir de la résine SPOrT (Schéma 11).



(a) 20% pipéridine dans DMF, 2x10 min; (b) Fmoc-AA(P)-OH ou F8-COOH (3 équ.), HATU (2,9 équ.), DIEA (12 équ.), 40 min; (c) TFA/Phénol/Thioanisole/Ethandithiol/H₂O (82,5/5/5/2,5/5), 2h30; (d) CLHP en phase inverse.

Schéma 11 : Synthèse des quatre TPFc à introduire sur la spexine.

Puis nous nous sommes intéressés à la synthèse de l'autre partenaire à savoir l'azido-spexine. La synthèse de la Fmoc-spexine supportée a été réalisée par SPPS automatisée assistée par micro-ondes sur un synthétiseur Liberty Blue de CEM. L'amine terminale a été déprotégée puis l'acide azidoacétique a ensuite été introduit en présence de HBTU sur support solide afin d'obtenir le composé **67** d'intérêt (Schéma 12).



Conditions et réactifs : (a) 20% pipéridine dans DMF, 2x10 min; (b) Acide azidoacétique (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (12 éq.), 40 min; (c) TFA/Phénol/Thioanisole/Ethandithiol/H₂O (82,5/5/5/2,5/5), 2h30; (d) CLHP en phase inverse.

Schéma 12 : Synthèse de l'azido-spxine 67.

La résine a été traitée en milieu acide et le peptide obtenu en solution a été purifié en phase inverse. Les rendements de synthèse des composés **63** à **66** ont été calculés à partir de la charge de la résine SPoRT et de la résine Rink Amine pour le composé **67**. Ces composés ont été caractérisés par CLHP en phase inverse (Tableau 33).

Composé	Nom	Rdt (%)	t _R (min)**
63	F8-RYR	36	5,38
64	F8-EYE	10	6,57
65	F8-DYD	37	6,58
66	F8-KYK	43	5,14
22	Spx	31	3,98
67	Azido-spx	28	4,32

** gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 7 min sur une colonne C18

Tableau 33 : Rendements et temps de rétention des composés 63 à 67.

Les rendements des composés **63**, **65** et **66** sont comparables. Le rendement faible du composé **64** s'explique par un problème technique sur l'appareil lors de la purification en CLHP en phase inverse semi-préparative. Globalement, les rendements de synthèse

des composés **63** à **66** sont donc similaires indiquant que la nature du tripeptide n'influe pas sur la synthèse du TPFc fluorocarboné.

Le composé **67** présente un rendement (28%) proche de celui de la spexine native (31%). L'introduction de l'acide azidoacétique n'influence donc pas sur le rendement de synthèse du composé **67**. Nous pouvons noter que le composé **67** présente un temps de rétention de 4,32 min, supérieur à celui du composé **22** (3,98 min). Cela peut s'expliquer par la perte de la fonction amine en partie N-terminale dans le cas du composé **67** qui entraîne une diminution de la solubilité et donc une augmentation de l'hydrophobie. Les composés ainsi caractérisés ont ensuite été mis en jeu dans la réaction de cyclo-addition en solution afin d'obtenir les fluoro-spexines.

b. Optimisation de la réaction de cycloaddition et synthèse chimique des dérivés de la spexine

De nombreuses réactions de cyclo-additions métallo-catalysées telles que les réactions de Diels-Alder^{245,231,246} de métathèse d'oléfines^{247,248,249} et de cyclo-additions 1,3 dipolaires^{250,229,251} existent. Nous avons décidé, parmi les réactions de cyclo-additions 1,3 dipolaires, d'utiliser celle assistée par le cuivre et permettant la formation d'un triazole. En effet, les propriétés du triazole sont proches de celles d'une liaison peptidique^{252,253}. C'est pourquoi, cette réaction connue sous le nom de cycloaddition de Huisgen décrite en 1961²⁵⁴, a depuis été appliquée maintes fois dans le cadre de la synthèse de peptidomimétiques^{230,255,256}.

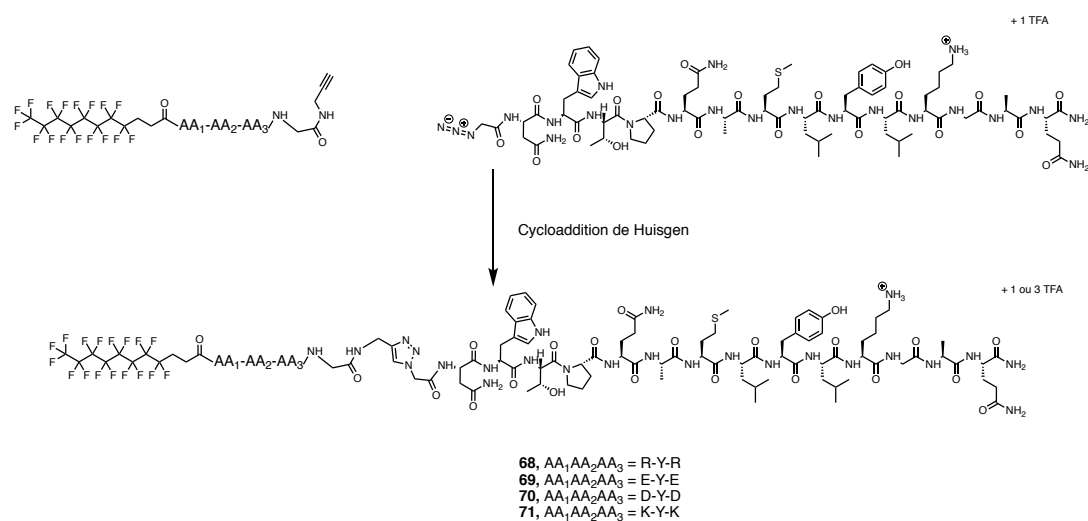


Schéma 13 : Synthèse des fluoro-peptides **68** à **71** en solution.

La synthèse des dérivés de la spexine a donc été entreprise et le premier TPFc introduit sur la spexine a été le composé **63** pour former le composé final **68** (Schéma 13). Des

conditions classiquement utilisées au laboratoire ont tout d'abord été appliquées pour cette première synthèse (Tableau 34). En présence de de CuSO₄ (2 éq.), d'ascorbate de sodium (3 éq.) et de de TBTA (2 éq.) (condition 1), aucune conversion n'a pu être observée au bout de 2 h de réaction. Cependant, lors de l'ajout du mélange de réactifs CuSO₄, l'ascorbate de sodium et TBTA sur le TPFC **63**, la précipitation de celui-ci a pu être observée en raison notamment de la quantité importante d'eau, nécessaire à la dissolution du CuSO₄ et l'ascorbate de sodium. La diminution de la quantité de cuivre (1,3 éq.) (condition 2) a donc permis de pallier cette précipitation. Une conversion de 55% au bout de 2 h a ainsi pu être atteinte. Nous avons ensuite fait varier le ratio DMF/H₂O final, mélange de solvant dans lequel la réaction est effectuée. En augmentant le volume d'eau de 5% (condition 3), nous avons observé une diminution de la conversion à 35% au bout de 2 h. Au contraire, en diminuant le volume d'eau de sorte à atteindre un ratio DMF/H₂O (85/15), nous avons pu atteindre 100% dès 15 min d'agitation (condition 4).

Condition	CuSO ₄ (eq.)	Ascorbate de sodium (eq.)	TBTA (eq.)	Ratio DMF/H ₂ O	Conversion CLHP à 2 h (%)
1	2	3	2	80/20	0
2	1,3	2,6	1,3	80/20	55
3	1,3	2,6	1,3	75/25	35
4	1,3	2,6	1,3	85/15	100 (15 min)
5	1,3	2,6	0	85/15	10

Tableau 34 : Optimisation de la cycloaddition entre le composé **63** et **67** pour former le composé **68**.

Dans ces conditions, nous nous sommes demandés si la présence du TBTA, stabilisant du cuivre (I) était nécessaire. En supprimant le TBTA (condition 5), nous avons observé un taux de conversion de 10 % seulement après de 2 h d'agitation. Avec les conditions optimisées (condition 4), nous avons pu accéder aux composés **68** à **71** avec une cinétique similaire. Ces composés ont été caractérisés (Tableau 35) et leur pureté en CLHP a été estimée à plus de 95%.

Composé	Nom	AA ₁ -AA ₂ -AA ₃	Rdt (%)	t _R **
68	F8-RYR-triazole-spx	R-Y-R	50	4,70
69	F8-EYE-triazole-spx	E-Y-E	46	5,17
70	F8-DYD-triazole-spx	D-Y-D	51	5,18
71	F8-KYK-triazole-spx	K-Y-K	51	4,61

** gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 7 min sur une colonne C18

Tableau 35 : Rendements et temps de rétention des composés **68** à **71**.

Les rendements de synthèse des composés **68** à **71** sont compris entre 46% et 51% indiquant que la nature du TPFc (composés **63** à **66**) n'influe pas sur la cycloaddition en solution. Ces rendements mettent en avant l'efficacité de la cycloaddition et donc de l'obtention des fluoro-peptides en solution même en présence d'un peptide hydrophobe tel que la spexine.

c. Evaluation de la stabilité plasmatique et de l'activité fonctionnelle *in vitro* des dérivés de la spexine synthétisés en solution

Les fluoro-peptides dérivés de la spexine ainsi synthétisés ont été évalués en stabilité plasmatique dans le plasma de souris afin de comparer les résultats avec la F8-RGR-spx (composé **28**) évaluée précédemment. L'évaluation fonctionnelle des composés **68** à **71** a également pu être effectuée sur le récepteur GalR2 (Tableau 36).

Composé	Nom	t _{1/2} (min) plasma de souris	EC ₅₀ GalR2 (nM)
22	Spx	56 ± 5	95 ± 13
28	F8-RGR-spx	384 ± 12	15,6 ± 2,7
68	F8-RYR-triazole-spx	245 ± 39	23 ± 7
69	F8-EYE-triazole-spx	> 24 h (35%*)	99 ± 54
70	F8-DYD-triazole-spx	> 24 h (67%*)	74 ± 19
71	F8-KYK-triazole-spx	243 ± 32	162 ± 81

*plasma de souris, 0,25 µM

** pourcentage de peptide restant après 24 h

Tableau 36 : Stabilité plasmatique et activité fonctionnelle des dérivés de la spexine synthétisés en solution.

La comparaison des composés **28** et **68** indique une diminution du temps de demi-vie plasmatique du composé **68** (245 ± 39 min) par rapport au composé **28** (384 ± 12).

L'introduction du motif triazole et le remplacement de la glycine (composé **28**) par une tyrosine (composé **68**) entraîne donc une diminution de la stabilité plasmatique.

La comparaison des temps de demi-vie des composés **68** (245 ± 39 min) et **71** (243 ± 32 min) possédant des TPFC cationiques, a montré que ceux-ci étaient très proches. Cela montre que la nature de l'acide aminé cationique du TPFC (arginine pour le composé **68** et lysine pour le composé **71**) n'entraîne pas de modification de la stabilité plasmatique. Pour les peptides **69** et **70**, des stabilités plasmatiques de plus de 24 h ont pu être observées. Le pourcentage de peptide restant est cependant supérieur (67%) pour le composé **70** par rapport à celui du composé **69** (35%). La présence des acides aspartiques (composé **70**) permet donc d'obtenir une stabilité plasmatique meilleure que la présence des acides glutamiques (composé **69**). Ainsi, nous avons pu conclure que le remplacement des acides aminés cationiques (composés **68** et **71**) par les acides aminés anioniques (composés **69** et **70**) permettait d'augmenter drastiquement la stabilité plasmatique.

Concernant l'activité fonctionnelle du composé **68** (23 ± 7 nM), elle est similaire à celle du composé **28**. Cette tendance amène à penser que la présence du triazole et le remplacement de la glycine par la tyrosine n'influe pas sur l'activité fonctionnelle. Pour les composés **69** (99 ± 54 nM), **70** (74 ± 19 nM) et **71** (162 ± 81 nM), les activités fonctionnelles sont en moyennes plus faibles que le composé **69**. Cependant, les écarts-types étant importants, il est difficile de conclure sur l'efficacité des composés **69** à **71**. Globalement ces composés présentent des valeurs d'EC₅₀ comprises entre celle de la spexine (composé **22**) et du composé **28**. Ainsi les composés présentant les stabilités plasmatiques les plus élevées (composés **69** et **70**) ne présentent pas une activité fonctionnelle aussi importante que les peptides **28** et **68** possédant des arginines.

Dans un souci d'améliorer l'activité fonctionnelle du peptide tout en conservant une bonne stabilité plasmatique et solubilité pour ce dernier, nous avons envisagé, dans la dernière partie de ce travail, de développer un TPFC possédant des acides aminés neutres en remplacement des acides aminés chargés.

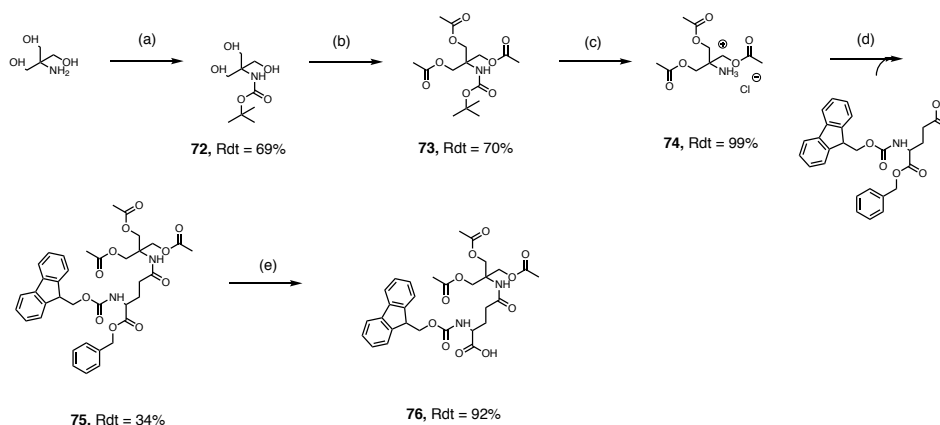
D. Conception et synthèse d'un TPFC solubilisant et neutre

1. Contexte de l'étude

L'ensemble des études précédentes ont montré que la présence d'acides aminés chargés permettait d'augmenter l'hydrophilie des peptides. Cependant, les acides aminés chargés ont des propriétés particulières. En effet, les acides aminés cationiques sont connus pour interagir avec les membranes cellulaires et permettre l'internalisation dans les cellules de ces composés. Les acides aminés anioniques ont des propriétés d'interaction avec les membranes cellulaires. Afin de s'affranchir de la charge sur la chaîne latérale des acides aminés solubilisant utilisés précédemment, nous avons entrepris la synthèse d'un acide aminé neutre. Pour cela, nous avons décidé d'introduire un groupement trihydroxyméthyle aminométhane (TRIS). L'ajout de ce composé dans la séquence d'un peptide permettrait d'introduire trois fonctions hydroxyles en un résidu et permettrait ainsi d'augmenter la solubilité du composé tout en préservant la neutralité de la chaîne latérale à pH physiologique.

2. Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OAc)₃)-OH

La stratégie adoptée pour la synthèse d'un acide aminé possédant une chaîne latérale neutre a été l'introduction du TRIS protégé **74** sur l'acide carboxylique de la chaîne latérale du Fmoc-Glu-OBz (Schéma 14). Le composé **74** est obtenu en 3 étapes à partir du TRIS commercial. Dans une première étape, l'amine primaire du TRIS est protégé par un groupement Boc, en présence de dicarbonate de di-tert-butyle dans un mélange tBuOH/MeOH (7:3) à température ambiante avec un rendement de 69%. Les hydroxyles du dérivé **72** est ensuite protégé par des acétates avec un rendement de 70%. L'amine est ensuite déprotégée en milieu acide avec un rendement de 99% afin d'obtenir le composé **74**.



Conditions et réactifs : (a) Boc₂O (1,3 éq.), terbutanol/méthanol (70/30), t.a., 16h; (b) anhydride acétique (10 éq.), NaHCO₃ (6 éq.), ACN/EtOAc (67/33), t.a., 24h; (c) HCl 4N/dioxane, t.a., 1h; (d) DIC (1 éq.), Oxyma (1 éq.), DMF, t.a., 2h; (e) Pd/c, MeOH, t.a., 1h.

Schéma 14 : Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OAc)₃)-OH **77**.

Une fois obtenu, le dérivé **74** a été couplé au résidu Fmoc-Glu-OBz. L'activation de l'acide en ester a été envisagée en utilisant 3 agents de couplage différents : HATU, PyBOP et DIC/Oxyma (Tableau 37).

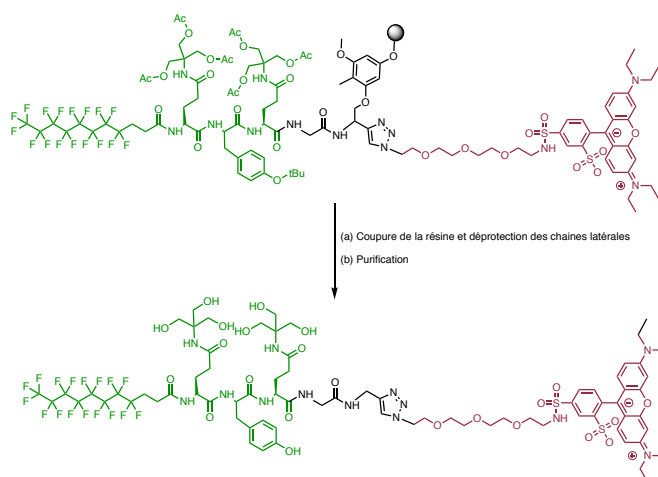
Composé	Nom	Activateur de la fonction acide	Rdt (%)
75	Fmoc-Glu(TRIS(OAc) ₃)-OBz	HATU	15
		PyBOP	27
		DIC, Oxyma	34

Tableau 37 : Conditions de synthèse du composé **75**.

Ainsi, le couplage de l'acide aminé protégé commercial Fmoc-Glu-OBz avec le PyBOP a permis d'obtenir un rendement de 27 %. L'utilisation du PyBOP en remplacement de HATU a donc déjà permis une amélioration du rendement. Cependant, c'est l'activation avec le DIC et Oxyma qui a permis d'obtenir le meilleur rendement de 34% à cette étape. Le composé **75** a pu être obtenu en quantité suffisante pour la dernière étape de déprotection de l'ester benzylique en acide carboxylique par hydrogénation. L'acide aminé final **76** a ainsi été obtenu avec un rendement de 92%. Ainsi le rendement total de cette synthèse en 5 étapes a été de 15%. L'acide aminé ainsi obtenu a été introduit sur support solide afin dans la séquence du TPFc afin d'évaluer ses propriétés de liaisons à l'albumine mais également son pouvoir solubilisant.

3. Introduction de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OAc)₃)-OH sur le TPFc fluorescent modèle.

Un TPFc fluorescent (Figure 60) possédant deux acides aminés Fmoc-Glu(TRIS(OAc)₃)-OH, a été synthétisé sur support solide comme précédemment (Figure 92). La déprotection des acétates a été réalisée en présence d'acide fort lors de l'étape de coupure du peptide de la résine. Cependant l'analyse CL-SM du peptide final attendu, après coupure de la résine et purification dans des conditions classiques, a mis en avant de multiples masses difficilement attribuables.



Condition et réactifs : (a) TFA/TIPS/H₂O (82,5/2,5/2,5), 2h; (b) CLHP en phase inverse.

Figure 93 : Structure du TPFC fluorescent attendu.

Nous avons alors émis l'hypothèse que les conditions de cycloaddition et de couplage avec la lissamine rhodamine B n'étaient pas compatibles avec les groupement acétates de l'acide aminé **76**. Nous avons alors décidé de ne pas introduire la partie fluorescente afin de déterminer si la synthèse du TPFC seul permettait d'obtenir le composé attendu (Figure 94).

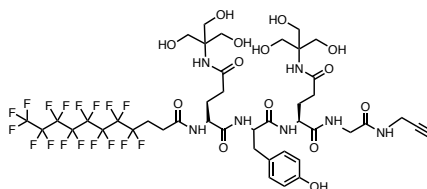
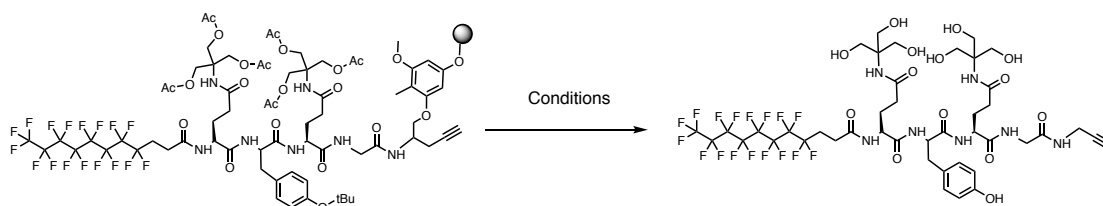


Figure 94 : Structure du TPFC F8-Glu(TRIS)-Tyr-Glu(TRIS).

La synthèse TPFC a été réalisée sur support solide en suivant la même stratégie que précédemment (Figure 57). La coupure de la résine ainsi que la purification ont été réalisées classiquement. L'analyse de CL-SM résultante a montré un chromatogramme complexe avec, à nouveau, plusieurs sous-produits de dégradation. Différentes conditions de déprotections ont alors été évaluées (Tableau 38).



Nom	Déprotection	Condition de déprotection	Résultat
F8-Glu(TRIS)-Tyr-Glu(TRIS)	Sur résine	NaOMe dans MeOH 0,5M	Peptide de départ
		NaOMe dans MeOH 0,5M	Peptide de départ
		TFA/TIS/H ₂ O) (95/2,5/2,5)	Dégradation

Tableau 38 : Conditions de déprotection du TPFc F8-Glu(TRIS)-Tyr-Glu(TRIS).

Lorsque les déprotections des groupements acétates en présence de NaOMe dans du méthanol ont été effectuées sur support solide, avant coupure du peptide de la résine, seul le peptide de départ a été obtenu. En présence de TFA, des produits de dégradation sont observés.

Les conditions utilisées sur support solide n'ont donc pas permis une déprotection des fonctions hydroxyles du TRIS. Cette stratégie de synthèse de l'acide aminé neutre a donc été abandonnée et nous avons entrepris une nouvelle approche pour la synthèse d'un tel acide aminé.

4. Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OTBDMS)₃)-OH

Précédemment, la déprotection des hydroxyles, protégés sous forme d'acétates, n'a pas été possible. Afin de s'affranchir de ce problème, nous avons choisi de protéger les trois fonctions hydroxyles par des groupements tert-butyldiméthylsilyle (TBDMS) (Figure 95).

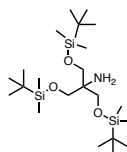


Figure 95 : Structure du TRIS protégé par des TBDMS 77.

Contrairement à la précédente, cette stratégie de synthèse ne nécessite pas de protection de l'amine. Ainsi cette nouvelle stratégie permet d'obtenir l'acide aminé protégé Fmoc-Glu(TRIS(TBDMS)₃)-OH en 3 étapes (Schéma 15).

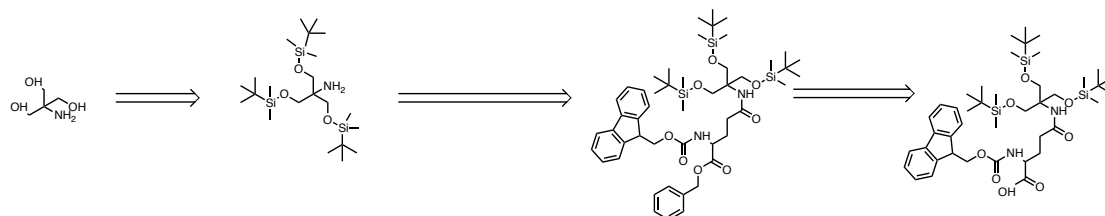


Schéma 15 : Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OTBDMS)₃)-OH.

Contrairement à la stratégie précédente, la protection des hydroxyles par le TBDMS a pu être effectuée sans passer par la protection initiale de l'amine. Ainsi deux étapes, la protection de l'amine par le groupement Boc ainsi que la déprotection de celui-ci, ont pu être évitées. La protection des alcools a ainsi pu être effectuée en une unique étape avec un rendement de 89%. Le couplage avec l'acide aminé commercial Fmoc-Glu-OBz a ensuite été réalisé mais le composé attendu n'a pas été obtenu avec la condition DIC/Oxyma choisie précédemment. Nous avons alors décidé d'évaluer d'autres agents de couplage. Malheureusement, aucun des trois activateurs n'a permis d'effectuer le couplage. Nous nous sommes alors demandé si le composé **77** était stable dans les conditions de couplage évaluées (Tableau 39).

Composé	Nom	Activateur de la fonction acide	Solvant	Stabilité (CCM)
78	Tris(OTBDMS) ₃	HATU	DCM	Stable
			DMF	
		PyBOP	DCM	Stable
			DMF	
		DIC, Oxyma	DCM	Stable
			DMF	

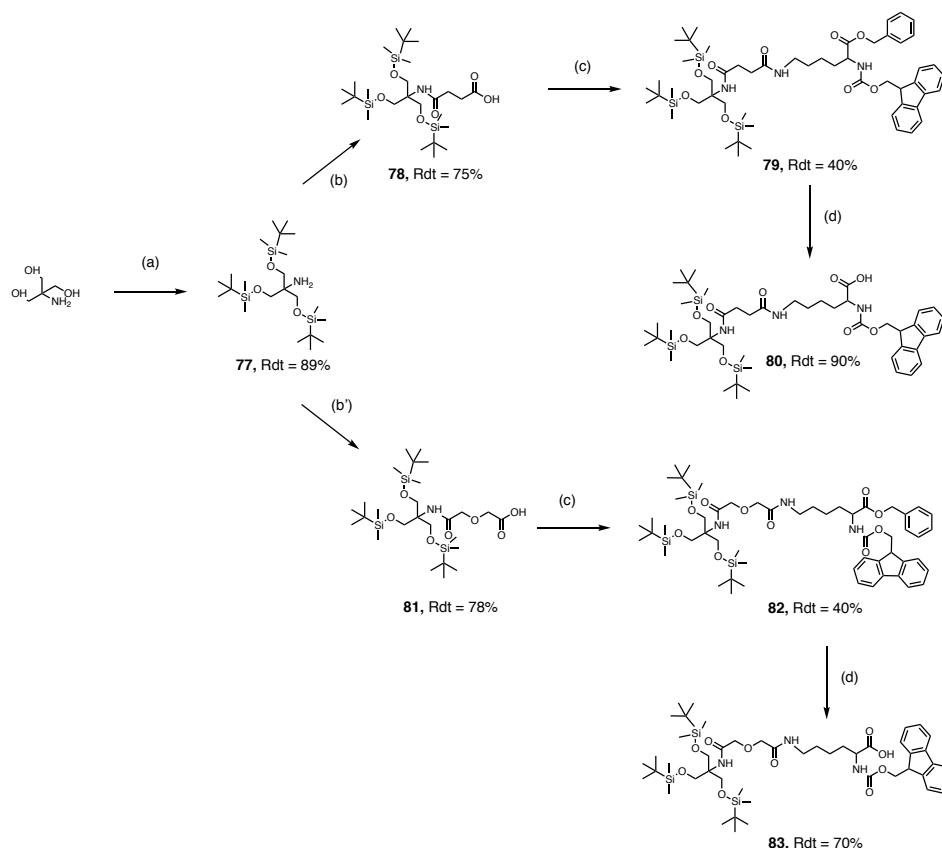
Tableau 39 : Evaluation de la stabilité du composé **78** dans les conditions de couplage avec le Fmoc-Glu-OBz.

La stabilité de ce composé a été évaluée en présence des activateurs évalués ainsi que dans les solvants DMF et DCM. Le composé **77** présente une stabilité dans l'ensemble

des conditions évaluées. La deuxième hypothèse émise a alors été que l'encombrement stérique était responsable de l'absence de réactivité du composé **77**. Nous avons alors changé de stratégie de synthèse afin d'introduire un espaceur sur la fonction amine du composé **77** afin d'éloigner les hydroxyles protégés par les TBDMS de la fonction chimique qui va permettre le couplage de la Fmoc-Glu-OBz.

5. Synthèse des acides aminés Fmoc-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH et Fmoc-Lys(CH₂-O-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH

Dans le but de valider notre hypothèse sur l'encombrement stérique de la molécule **77**, deux espaceurs, succinamide (CO-CH₂-CH₂-CO) et diglycolamide (CO-CH₂-O-CH₂-CO), ont été introduits sur ce composé (Schéma 16).



Conditions et réactifs : (a) TBDMS-Cl (3 éq.), Imidazole (4,5 éq.), DCM, 48 h; (b) Anhydride succinique (1 éq.), DCM, t.a., 2 h; (b') Anhydride diglycolique (1 éq.), DCM, t.a., 2 h; (c) Fmoc-Lys-OBn (1 éq.), PyBOP (1,1 éq.), DIEA (6 éq.), DMF, t.a., 1 h; (d) Pd/c, MeOH, t.a., 1 h.

Schéma 16 : Schéma de synthèse des acides aminés **80** et **83**.

Les deux espaceurs ont été introduits par une ouverture d'anhydride succinique pour le composé **78** ou diglycolique pour le composé **81** dans le dichlorométhane. Après une

agitation de 2 h la disparition complète a pu être observée. Les composés **78** et **81** ont été obtenus respectivement avec un rendement de 75% et 79%. Ces deux composés ont ensuite été mis en présence de l'acide aminé **11** (Fmoc-Lys-OBz) synthétisé au laboratoire. Ainsi l'introduction du TRIS protégé a été effectué sur la chaîne latérale d'une lysine. Les composés **79** et **81** ont ainsi été obtenus avec des rendements identiques de 40%. Après hydrogénolyse de l'ester benzylique, les acides aminés protégés **80** et **83** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 90 et 48%. Ainsi les acides aminés Fmoc-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH (**80**) et Fmoc-Lys(CH₂-O-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH (**83**) ont été obtenus avec des rendement globaux respectifs de 24% et 20% (4 étapes). Avant d'utiliser ces dérivés pour la synthèse de TPFc hydrosolubles, nous avons souhaité préparer les tétrapeptides modèles ci-dessous contenant les nouveaux acides aminés **80** et **83** (Figure 96).

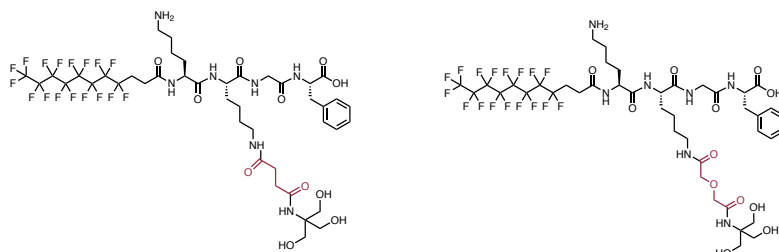
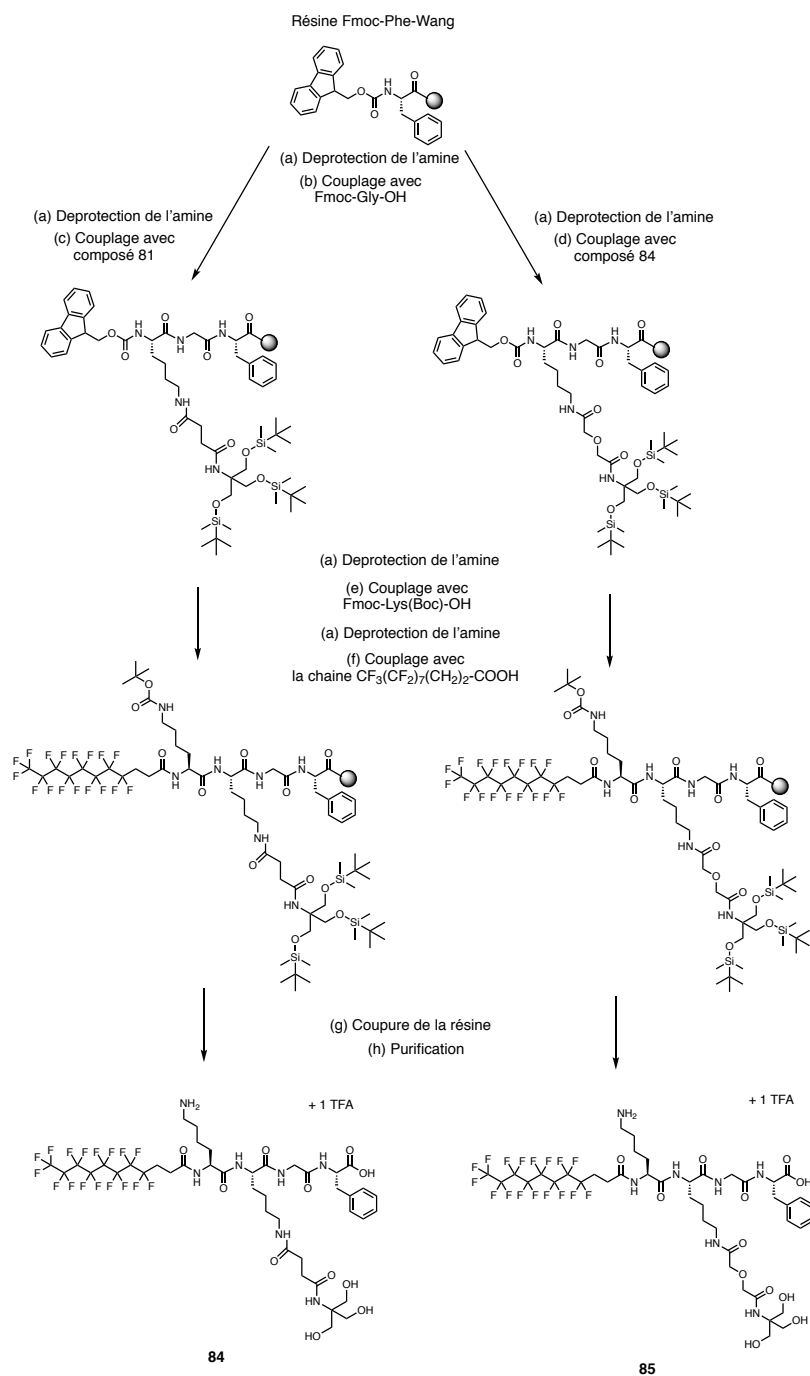


Figure 96 : Structures des tétrapeptides modèles.

6. Introduction des Fmoc-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH et Fmoc-Lys(CH₂-O-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH sur un tétrapeptide modèle.

Les acides aminés **80** et **83** synthétisés précédemment ont été introduits manuellement au sein d'un peptide fluoré (Figure 97). Les peptides modèles **85** et **86** ont été synthétisés sur support solide manuellement à partir de la résine Fmoc-Phe-Wang permettant d'obtenir une extrémité C-Terminale sous forme d'acide carboxylique. Par déprotection du groupement Fmoc puis couplages peptidiques successifs, nous avons pu accéder aux peptides **85** et **86** avec des rendements de 30 et 18 % respectivement. Ces composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse. Leur temps de rétention ainsi que le rendement ont été réunis dans le Tableau 40 afin de les comparer.



Conditions et réactifs : (a) 20% pipéridine dans DMF, 2x10 min; (b) Chaîne Fmoc-Gly-OH (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (12 éq.), 40 min; (c) Composé 81 (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (12 éq.), 40 min; (d) Composé 84 (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (12 éq.), 40 min; (e) Chaîne Fmoc-Lys(Boc)-OH (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (12 éq.), 40 min; (f) Chaîne $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ (3 éq.), HATU (2,9 éq.), DIEA (12 éq.), 40 min; (g) TFA/Phénol/Thioanisole/Ethandithiol/ H_2O (82,5/5/5/2,5/5), 2h30; (h) CLHP en phase inverse.

Schéma 17 : Schéma de synthèse des peptides modèles 84 et 85.

Composé	Acide aminé utilisé	Rdt (%)	t _R **
85	81	30	4,85
86	84	18	5,23

** gradient linéaire de 5% à 100% d'acétonitrile en 7 min sur une colonne C18

Tableau 40 : Rendements et temps de rétention des composés **84** et **85**.

L'introduction de l'acide aminé **80** (peptide **84**) permet donc d'obtenir un rendement supérieur à ceux obtenus par l'introduction de l'acide aminé **83** (peptide **85**).

Les temps de rétention des composés **84** (4,85 min) et **85** (5,23 min) indiquent que la nature de l'acide aminé introduit influe sur les temps de rétention. En effet le composé **84** semble plus hydrophile que le **85** mettant en avant la capacité d'un unique acide aminé à modifier les temps de rétention. L'espaceur diglycolamide permet donc de diminuer l'hydrophobie du tétrapeptide. Les rendements seuls différents pour les peptides **84** et **85**, nous avons décidé d'utiliser l'acide aminé **80** présent dans la séquence du peptide **84**.

Ainsi nous avons réussi à synthétiser deux nouveaux acides aminés et valider leur utilisation sur support solide pour la préparation de peptides hydrosolubles. A présent, l'acide aminé **80** va être introduit au sein d'un tripeptide fluorocarboné fluorescent (comme décrit précédemment). Son affinité pour l'albumine sera évaluée par anisotropie de fluorescence. En fonction de ces résultats, le nouveau TPFC sera introduit par chimie click sur le peptide spexine. La stabilité plasmatique du composé résultant ainsi que son activité fonctionnelle seront évaluées et comparées aux dérivés anioniques et cationiques déjà obtenus.

E. Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au développement d'une méthode de synthèse de fluoro-peptides par bioconjugaison entre un peptide ou une protéine déprotégé et un tripeptide fluorocarboné (TPFC). Cette stratégie a été envisagée pour faciliter la synthèse de fluoro-peptides hydrophobes ou de fluoro-protéines. L'un des objectifs est que le TPFC se lie à l'albumine afin d'augmenter la stabilité plasmatique du peptide résultant. Afin de faciliter l'optimisation de l'affinité pour la BSA de ce TPFC, un

modèle fluorescent a été mis au point. Pour cela la synthèse des TPFc fluorescent puis la mesure de leur liaison à la BSA par anisotropie de fluorescence ont été effectuées.

Dans un premier temps, l'étude de l'influence de la partie fluorocarbonée du TPFc sur l'affinité pour la BSA a été réalisée. Nous avons donc préparé 3 TPFc fluorescents qui ont permis de confirmer que la chaîne fluorocarbonée présentant la meilleure affinité pour la BSA était la chaîne F8. Ensuite, nous avons optimisé la partie tri-peptidique. Nous avons synthétisé 8 TPFc et pu déterminer que le tripeptide était nécessaire à une bonne liaison à l'albumine (les PEG sont insuffisants). De plus, quatre tripeptides ont été choisis suite à cette étude : RYR, EYE, DYD et KYK. Dans le but de s'affranchir des problèmes potentiels de bioaccumulation de la chaîne F8 (de structure similaire à la chaîne APFO accumulée), des TPFc portant des pinces fluorocarbonées ont été évaluées. 8 TPFc possédant des pinces fluorocarbonées ont été synthétisés et leur affinité pour la BSA a été évaluée par anisotropie de fluorescence. Ces études ont montré que les modèles fluorescents portant des pinces avec des chaînes F6 ou F4 présentaient des affinités comparables à la BSA. En revanche, les modèles possédant la chaîne F8 présentent des affinités meilleures.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité valider notre méthode. Nous avons donc décidé d'introduire les TPFc portant les chaînes F8 sur un peptide modèle hydrophobe : la spexine étudiée dans le chapitre 2. L'introduction des quatre TPFc F8-RYR, F8-EYE, F8-DYD et F8-KYK sur le peptide azido-spexine a été réalisée en solution par une réaction de cycloaddition 1,3 catalysée par le cuivre. L'optimisation des conditions de réaction de click a permis d'obtenir une conversion totale en 15 minutes. Les composés ainsi synthétisés ont été évalués en stabilité plasmatique. Les résultats ont montré que les composés anioniques (F8-EYE-triazole-spexine et F8-DYD-triazole-spexine) présentaient un temps de demi-vie supérieur à 24 h alors que les composés cationiques présentent un temps de demi-vie proche de 245 min. Ainsi nous avons pu montrer que la nature des acides aminés influait fortement sur la stabilité plasmatique. Cependant, l'évaluation de l'activité fonctionnelle de ces quatre dérivés de la spexine a montré une diminution de la capacité à activer le récepteur GalR2 pour les composés F8-EYE-triazole-spexine, F8-DYD-triazole-spexine et F8-KYK-triazole-spexine en comparaison à la F8-RGR-spexine. Toutefois, cette diminution de l'activité fonctionnelle n'a pas été drastique ($23 \pm 7 \mu\text{M}$ à $162 \pm 81 \mu\text{M}$) en comparaison avec le composé F8-RGR-spexine ($15,6 \pm 2,7$). Deux perspectives sont possibles pour récupérer cette activité fonctionnelle. Premièrement, l'utilisation d'autres réactions de cycloaddition pour modifier le lien entre le TPFc et la spexine et potentiellement retrouver une activité

fonctionnelle proche du peptide F8-spexine. Deuxièmement, l'introduction d'acides aminés non-naturels pourrait être envisagée pour de nouveaux TPFc qui présenteraient une bonne stabilité plasmatique ainsi qu'une bonne activité fonctionnelle.

Dans un troisième temps, nous avons souhaité synthétiser un acide aminé neutre et solubilisant. Pour cela, nous avons choisi le TRIS, une molécule possédant trois groupements hydroxyles. La synthèse de différents acides aminés a été entreprise. En effet, la protection avec un acétate n'a pas permis d'obtenir le composé final attendu à cause de problèmes de déprotection de ce groupement. Le passage à l'utilisation du groupement protecteur TBDMS a permis d'accéder à deux acides aminés : Fmoc-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH et Fmoc-Lys(CH₂-O-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH. La comparaison de l'efficacité d'introduction de ces acides aminés sur un peptide modèle a été réalisé sur support solide. Cela a permis de sélectionner l'acide aminé Fmoc-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH.

A présent, il est nécessaire de synthétiser un TPFc possédant l'acide aminé neutre Fmoc-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH. Si la mesure de sa capacité à se lier à l'albumine est similaire aux composés chargés, celui-ci devra être introduit sur la spexine puis la stabilité plasmatique ainsi que l'activité fonctionnelle de ce dérivé de la spexine devront être mesurées. Enfin, la méthode développée au cours de cette thèse a notamment pour objectif de faciliter la synthèse de fluoro-protéines. La synthèse d'une fluoro-protéine en solution puis son évaluation biologique pourrait ainsi permettre de valider pleinement notre méthode.

CONCLUSION GENERALE

La place des peptides en thérapie est grandissante de par leur implication dans divers mécanismes physiologiques. En effet, ces macromolécules sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisations et de mécanismes de régulation cellulaire. De plus, ces molécules sont sélectives et efficaces et se lient de manière spécifique aux récepteurs cibles tels que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPG représentent des cibles de choix pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Actuellement, 30% des médicaments sur le marché ciblent ces récepteurs impliqués eux-mêmes dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques de l'organisme. Cependant, le développement des peptides comme médicaments reste difficile en raison de leur faible temps de demi-vie dans l'organisme. Afin d'augmenter leur stabilité métabolique, différentes stratégies ont été développées. Parmi celles-ci, les modifications par des acides aminés non reconnus par le système enzymatique, des méthodes de cyclisations, les peptides agrafés ainsi que les méthodes de liaison à l'albumine sont les plus utilisées. L'ensemble de ces méthodes ont montré leur efficacité mais elles présentent cependant des limitations. En effet, le potentiel très prometteur des peptides dans le domaine médical motive le développement de nouvelles techniques de stabilisation plasmatique des peptides. C'est dans cette thématique que s'inscrit ma thèse.

Précédemment au laboratoire, une méthode de stabilisation des peptides basée sur l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée sur le peptide a été envisagée. Pour cela, la chaîne fluorocarbonée ($\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{COOH}$, chaîne F8) a été introduite en partie N-terminale du peptide apeline-17. Ce peptide de 17 acides aminés et ligand du RCPG APJ est notamment impliqué dans les maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'incorporation de la chaîne F8 a permis d'augmenter la stabilité du peptide natif dans le plasma humain isolé de quelques minutes à plus de 24 h. L'évaluation du composé dans un modèle de rats normotendus a montré une augmentation de l'efficacité hypotensive du composé F8-apeline trois fois supérieure à celle de l'apeline à une dose 16 fois plus faible (15 nmol/kg). Cette preuve de concept a mis en avant l'aspect prometteur de cette méthode. Cependant, une chaîne fluorocarbonée ($\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-COOH}$, chaîne APFO) très utilisée en industrie alimentaire et de traitement de surface présente une structure chimique proche de la chaîne utilisée précédemment. Si la chaîne F8 n'a pas montré directement de toxicité ou de bioaccumulation, nous avons souhaité adresser cette question en amont et développer des dérivées biocompatibles. Des études environnementales ont

mis en avant l'absence de bioaccumulation des chaînes fluorocarbonées plus courtes que la chaîne F8.

Ainsi, ce travail de thèse avait plusieurs objectifs: 1) la compréhension du mécanisme conduisant à l'augmentation de la F8-apeline; 2) la conception et le développement d'une fluoro-apeline biocompatible et stable; 3) l'extension du concept au peptide spexine et l'évaluation de ses propriétés analgésiques; 4) la conception d'un tripeptide fluorocarboné (TPFc) permettant à la fois d'améliorer le procédé de synthèse des fluoropeptides tout en permettant d'augmenter leur stabilité métabolique.

Afin d'atteindre le premier objectif, nous avons développé des dérivés de l'apeline portant des chaînes plus courtes ($\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_3\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{COOH}$, chaîne F4 et $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_5\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{COOH}$, chaîne F6) que la chaîne F8. Les composés ont été préparés par synthèse peptidique sur support solide et l'étude de leur stabilité dans le plasma de souris a montré que la diminution de la longueur de la chaîne s'accompagnait d'une perte importante de leur stabilité. L'introduction de chaînes plus courtes, en remplacement de la chaîne F8, n'est donc pas une stratégie viable pour le développement d'une apeline stable. Nous avons alors envisagé d'introduire deux chaînes fluorocarbonées F4 ou F6 sous forme de pince. Ces composés ont montré des stabilités plasmatiques comparables à la F8-apeline. Leur évaluations pharmacologiques ont mis en avant les propriétés intéressantes du peptide (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline qui présente une affinité et une activité fonctionnelle proches du peptide apeline et ce malgré la présence de la pince fluorocarbonée. Des études de toxicité du composé ont alors été entreprises. Pour étudier les interactions potentielles des fluoropeptides avec les membranes plasmiques et leur pouvoir hémolytique, nous avons conçu et synthétisé des dérivés fluorescents en utilisant une méthode originale d'acylation chimiosélective. Les sondes ainsi préparées ont montré l'absence de liaison non spécifiques aux membrane cellulaires du composé (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline en comparaison au composé F8-apeline. De plus, le composé (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline ne présente pas de toxicité sur les lignées humaines et globules rouges humains en comparaison avec la F8-apeline.

Afin de comprendre le mécanisme conduisant à l'augmentation de la stabilité des composés F8-apeline et (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline, leur capacité à s'organiser en micelles a été évaluée. Ces travaux ont montré que seul le peptide F8-apeline s'organisait en agrégats à des concentrations plus élevées (100 μM) que celle utilisée lors des études de stabilité dans le plasma *in vitro* (5 μM). Nous avons alors cherché à savoir si la stabilité des composés était corrélée à une liaison aux protéines

plasmatiques. Ainsi, l'étude de la liaison à la BSA a été réalisée avec les sondes fluorescentes précédemment préparées par anisotropie de fluorescence. Cette étude a mis en avant la liaison des deux composés F8-apeline ($K_d = 2,60 \pm 0,19 \mu\text{M}$) et (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline ($K_d = 10,5 \pm 1,41 \mu\text{M}$) à la BSA avec des constantes de dissociations bien inférieures à celle de l'apeline ($K_d > 500 \mu\text{M}$). Afin de mieux caractériser cette liaison, des études cristallographiques ont été réalisées. Les structures cristallographiques des deux composés en complexe avec l'albumine humaine ont permis de confirmer que les deux fluoro-apelines se liaient au site de liaison 2 de l'albumine (site de liaison de l'ibuprofène notamment). Cependant le composé pince se lie par une unique chaîne fluorocarbonée et s'insère partiellement dans la poche de liaison alors que la pénétration complète de la chaîne fluorocarbonée de la F8-apeline est observable. Ainsi nous avons pu, au cours de ces travaux, caractériser la liaison des fluoro-apelines avec la HSA.

Suite à ces résultats, les propriétés hypotensives du peptide (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline ont été évaluées dans un modèle de rats normotendus en collaboration avec l'équipe de Catherine Llorens Cortes (Collège de France). Malheureusement cette étude a montré que le peptide optimisé sous forme de pince ne présentait pas d'activité hypotensive jusqu'à une dose de 150 nmol/kg, contrairement à la F8-apeline. Afin d'expliquer ce résultat, nous avons alors effectué des études pharmacocinétiques pour comprendre cette absence d'activité. Les résultats ont mis en évidence une clairance ainsi qu'une distribution faible dans les tissus de la (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apeline. En revanche, le temps de demi-vie était faible ($1,7 \pm 0,2 \text{ min}$) par rapport à celui de la F8-apeline ($21 \pm 3,0 \text{ min}$) expliquant l'absence d'activité du composé *in vivo*. Il est donc probable qu'une enzyme présente uniquement *in vivo* coupe le peptide rapidement l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible biologique.

Il serait intéressant d'étudier la formation des métabolites après administration du composé pince *in vivo* afin de déterminer les sites de coupure enzymatique. En s'appuyant sur la structure cristallographique, nous pourrions également envisager de concevoir un motif fluorocarboné permettant d'optimiser la liaison à l'albumine.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes intéressés à l'extension du concept FluoroPep à d'autres peptides ciblant les RCPG. Nous avons pour cela choisi la spexine, un peptide de 14 acides aminés et ligand des RCPG GalR2 et GalR3, impliqués dans la modulation de la douleur. Ainsi, l'introduction de la chaîne F8 en partie N-terminale de la spexine a permis d'augmenter sa stabilité de 1 h à 7 h dans le plasma de souris isolé.

De plus, l'activité analgésique de la F8-spexine dans un modèle de douleur inflammatoire a mis en évidence une augmentation de l'efficacité de ce composé d'un facteur 10 à 100 en comparaison avec la spexine. Afin de s'affranchir des potentiels problèmes de bioaccumulation de la chaîne F8, une stratégie similaire à celle développée précédemment pour l'apeline a été appliquée à la spexine. Des dérivés de la spexine possédant des chaînes hydrocarbonées, fluorocarbonées plus courtes que la chaîne F8 et des pinces ont été synthétisés sur support solide. Cette étude a permis d'identifier la F6-spexine, L10-spexine et (F6)K(F6)-spexine qui présentent à la fois une stabilité plasmatique supérieure à 6 h et une activité fonctionnelle *in vitro* sur le récepteur GalR2 proche de la F8-spexine ($EC_{50} = 6,2 \pm 0,9$ nM). Nous avons également mis en évidence les propriétés hémolytiques du peptide lipidé L10-spexine contrairement à la F6-spexine et F8-spexine.

Ainsi, les F6-spexine et (F6)K(F6)-spexine ont été sélectionnées pour être évaluées *in vivo*. Cependant la limitation principale de l'utilisation *in vivo* de ces composés est leur faible solubilité aqueuse (12 μ M). D'autre part, les rendements de synthèse pour les fluoro-spexine sont systématiquement plus faibles que la spexine. Nous avons alors décidé de concevoir des fluoro-spexines solubles dans le but de faciliter leur synthèse et leur évaluation *in vivo*. Un linker solubilisant tripeptidique, arginine-glycine-arginine (RGR) a été introduit entre la chaîne fluorocarbonée et le peptide. Ainsi, cela a permis d'augmenter la solubilité de la F8-spexine d'un facteur 40 tout en maintenant une stabilité plasmatique supérieure à 6 h et une efficacité *in vitro* proche de la F8-spexine. Dans un souci de diminuer la longueur de la chaîne F8, une série de dérivés de la spexine comportant tous le linker RGR a été préparée. Cette étude a permis d'identifier le composé (F6)K(F6)-RGR-spexine qui présente à la fois une stabilité plasmatique proche de 24 h, une activité fonctionnelle intéressante ($EC_{50} = 10 \pm 3$ nM).

Les composés ainsi optimisés *in vitro*, F6-spexine, (F6)K(F6)-spexine et (F6)K(F6)-RGR-spexine, ont été ensuite évalués *in vivo* dans un modèle murin de douleur inflammatoire par le laboratoire du Dr. Frédéric Simonin. L'évaluation de l'activité analgésique de ces composés a mis en avant une activité des trois composés similaires à la F8-spexine à la dose de 0,9 μ mol/kg. Ainsi nous avons réussi à atteindre nos objectifs de développer un dérivé de la spexine portant des chaînes plus courtes que la F8 mais également un composé présentant une solubilité améliorée.

Dans le troisième chapitre, nous avons travaillé sur le développement d'une méthode de synthèse en solution de fluoro-peptides. Cette stratégie est basée sur l'introduction d'un

tripeptide fluorocarboné (TPFc), à la fois solubilisant et se liant à l'albumine, sur un peptide ou une protéine totalement déprotégé par une réaction de bioconjugaison. Le développement d'une telle méthode permettrait d'avoir un TPFc « universel » et donc de s'affranchir de la séquence du peptide et ainsi de remédier aux potentiels problèmes de synthèse et de solubilité comme observés pour la spexine. Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons dans un premier temps remplacé le peptide/protéine par une modèle fluorescent. En effet, l'une des propriétés de ce TPFc doit être de se lier à l'albumine afin de stabiliser efficacement le peptide. Cet essai nous a ainsi permis d'évaluer rapidement l'affinité de différents TPFc pour l'albumine en utilisant la chaîne F8 comme référence mais également les pinces (F4-PEG₂)K(PEG₂-F4) et (F6-PEG₂)K(PEG₂-F6) comme alternative biocompatible. Par cette approche originale, nous avons identifié quatre tripeptides chargés qui se lient efficacement à l'albumine avec une affinité micromolaire : arginine-tyrosine-arginine (RYR), acide glutamique-tyrosine- acide glutamique (EYE), acide aspartique-tyrosine- acide aspartique (EYE) et lysine-tyrosine-lysine (KYK).

Nous avons décidé d'introduire les TPFc optimisés sur un peptide modèle hydrophobe : la spexine. Les TPFc portant des chaînes F8 ont été dans un premier temps introduits en partie N-terminale de la spexine par une cycloaddition catalysée par le cuivre. Après optimisation de cette réaction, les dérivés de la spexine ont été obtenus avec des rendements proches de 50%. Leur stabilité dans le plasma de souris a été évaluée *in vitro* ainsi que leur activité fonctionnelle sur le récepteur GalR2. Ces études ont mis en avant des temps de demi-vie inférieurs à 6 h des composés possédant les TPFc cationique (F8-RYR-triazole-spexine et F8-KYK-triazole-spexine). En revanche, les composés possédant un TPFc anionique (F8-EYE-triazole-spexine et F8-DYD-triazole-spexine) ont présenté des stabilités plasmatiques supérieures à 24 h. L'évaluation fonctionnelle des composés a montré une efficacité sur GALR2 proche de celle mesurée pour la spexine mais inférieure à celle déterminée pour la F8-spexine. Une variabilité importante sur les mesures d'activités fonctionnelles a cependant été observée pour les composés anioniques et vont nécessiter de reproduire les mesures afin de conclure.

En parallèle de ces travaux, le développement d'un TPFc possédant des acides aminés neutres et solubilisants de part et d'autre d'une tyrosine a été envisagé. Pour cela la synthèse d'un acide aminé original dérivé du TRIS (possédant trois hydroxyles) a été entreprise. Différentes stratégies de protections de ces fonctions hydroxyles ont été évaluées, le TBDMS étant le groupement protecteur choisi. Après optimisations sur un peptide vecteur, l'introduction de cet acide aminé sur support solide ainsi que sa

déprotection ont été validées. A présent, il reste à introduire cet acide dans la séquence du TPFc afin d'évaluer ses propriétés physico-chimiques (solubilité) et de liaisons à l'albumine.

L'ensemble de ces travaux et résultats ont permis de concevoir des nouveaux dérivés fluorocarbonés de la spexine, possédant des propriétés analgésiques intéressantes. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence le mécanisme conduisant à l'amélioration de la stabilité plasmatique de la F8-apeline. Enfin, en utilisant une méthode originale d'anisotropie de fluorescence pour évaluer rapidement la liaison d'un composé à l'albumine, nous avons identifié quatre tripeptide fluorocarboné avec une affinité micromolaire pour l'albumine. Ces TPFc ont été introduit en solution sur la spexine totalement déprotégée dans des conditions douces, permettant ainsi de faciliter la préparation des fluoro-peptides. La stratégie FluoroPEP représente ainsi une alternative intéressante aux méthodes de stabilisation existantes. Le TPFc développé sera appliqué à la modification de différents peptides/protéines afin de découvrir de nouvelles sondes pharmacologiques et/ou candidats médicaments visant les RCPG.

EXPERIMENTAL PART

A. General methods

1. Peptide synthesis

a. Reagents

Reagents were obtained from commercial sources and used without any further purification. Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-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, 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 (0.42 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, 4,4,5,5,5-Pentafluoropentanoic Acid and 4,4,4-trifluorobutyric acid were purchased from Apollo Scientific. Undecanoic acid and nonanoic acid were purchased from Acros Organics. DY647-NHS-Ester was purchased from Dyomics GmbH. Acid Red 52 was purchased from TCI.

All small molecules have been characterized by ¹H NMR and ¹³C NMR. For all peptidic compounds, yields (%), retention time (min) obtained following either general procedure 2.a.i (*) or 2.a.ii (**), chemical formula, calculated mass (calc mass), found mass obtained following either general procedure 2.b.i (*) or 2.b.ii (**), and HPLC purity at 220 nm have been indicated as characterization.

b. Automated peptide synthesis

Automated solid-phase peptide synthesis (SPPS) was performed using a Liberty Blue synthesizer (CEM, 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 (0.42 mmol.g⁻¹

1) using DMF as solvent. The coupling of each amino acid (2 M) was carried out using DIC (0.5 M) and Oxyma (1M). Fmoc groups were removed using a 20% v/v solution of piperidine in DMF. Washing steps were performed using DMF. At the end of peptide synthesis, the resin was washed with DCM and MeOH and then dried in DCM.

c. Manual peptide synthesis

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 eq.) was swollen for 1 h in DCM 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 10 min). All Fmoc-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 (3 eq.) were coupled in DMF (2 mL per 0.1 mmol of resin) for 45 min using HATU (2.9 eq.) and DIEA (12 eq.) as activating agents. The excess of solvent was removed by filtration and the resin was washed three times with successively DMF, DCM and MeOH.

d. Peptide acylation

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.

e. Solid-phase peptide reactions monitoring

The completion was monitored with the colorimetric tests^{257,258,259} (Kaiser test, TNBS test, or the chloranil) 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% DIEA 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.

f. 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.

g. Peptide purification

Crude peptides were purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μ m, 19 \times 150 mm) using a linear gradient (5% to 60% 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). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired peptide were freeze-dried.

2. Chemical characterization

a. Reverse Phase HPLC

i) Method A, RP-HPLC ()*

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); 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.

*ii) Method B, RP-HPLC (**)*

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 15 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); 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.

b. LC-MS

*i) LR-MS**

Low resolution mass spectra (LRMS) were obtained on a Shimadzu LCMS 8030 apparatus equipped with a Kinetex C18 column (2.6 μm , 50 \times 2.1 mm) using electrospray ionization (ESI) and a triple-quadrupole analyzer (TQ).

*ii) HR-MS***

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).

c. NMR

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.

3. Biophysical and biochemical characterization

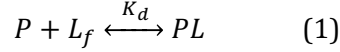
a. Plasma stability assay

Plasmatic stability was determined in human plasma for apelin and fluoro-apelin and in mouse plasma for spexine and fluoro-spexines. Peptide final concentration in plasma for apelin and fluoro-apelin is 5 μM and 0.25 μM for spexine and fluoro-spexines with a final DMSO concentration of 1 % in plasma. Plasma was prewarmed at 37°C for 5 min, followed by addition of the tested compound. The mixture was incubated at 37°C for 24 h. An aliquot of the incubation mixture was transferred to ice-cold MeCN (3 volumes) at different times. Samples were then frozen at -80°C, unfrozen, mixed and centrifuged. Supernatants were used for HPLC-MS/MS analysis without further dilution. The percentage of remaining peptide at each time 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 remaining compound (%), assuming there is a first-order kinetics.

b. Albumine binding assay and free ligand fraction calculation

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. The polarization degree was measured with an excitation wavelength set at 620 nm for DY647 fluorophore and 570nm for Lissamine Rhodamine, and an emission wavelength set respectively at 688 nm and 570 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 using the following equations:



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

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

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

$[P]$, $[L_f]$ 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:

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

$[P]$, $[L_f]$ 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 (to be fitted with the binding affinity previously obtained).

c. Evaluation of the critical micelles concentrations

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 μ M) and Nile Red (30 μ M) 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 °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.

d. Solubility evaluation

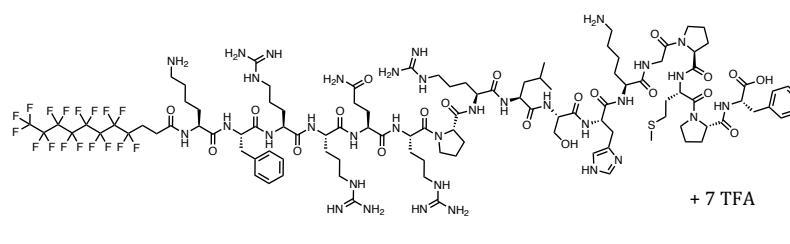
Solubility of spexin derivatives was measured by dissolving the compounds in DMSO to obtain stock solutions at 10 mM. The stock solutions were diluted to a final concentration of 100 μ M in a pH 7.4 HEPES/0.1% BSA buffer with the following composition: 10 mM Hepes, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 10 mM Glucose, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ BSA. Samples were stirred for 5 min on an orbital agitator at room temperature and then centrifuged 2 min at 13 000 rpm. 500 μ L of supernatant were taken and 500 μ L of MeCN 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.

e. Hemolysis experiments

Prior to the experiment, human blood cells (RBC) (EFS, Strasbourg, France) were recovered by centrifugation at 700 rpm 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 μ L) 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.

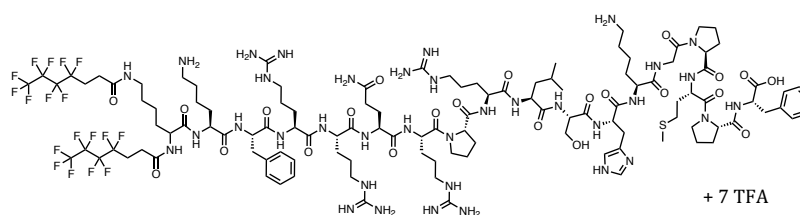
f. Blood partitioning

F8-apelin: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO-KFRRQRPLSHKGMPF-OH}$, 7 TFA (**4**)



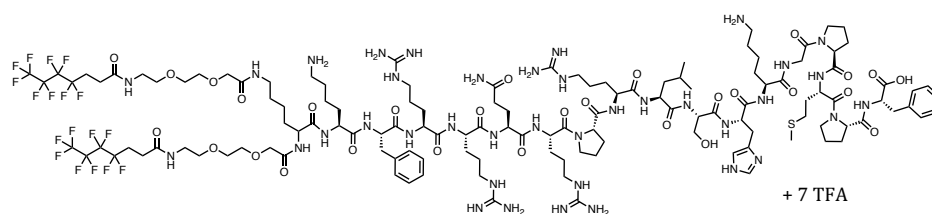
Fmoc-K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide (51 μmol) following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the title compound as a white solid (48 mg, 28%). $t_{\text{R}}^{**} = 10.35$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{107}\text{H}_{159}\text{F}_{17}\text{N}_{34}\text{O}_{21}\text{S}$: 2611.1868; found: 2611.1867.

(F4)K(F4)-apelin: $(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO})\text{K}(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO})$ -KFRRQRPLSHKGMPF-OH, 7 TFA (**5**)



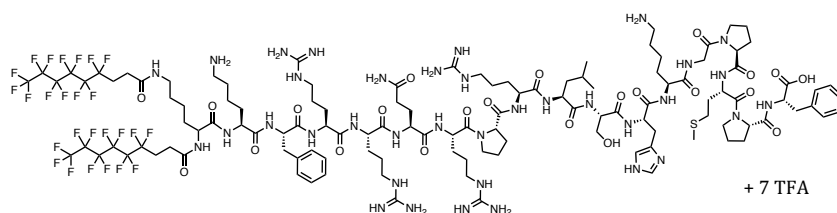
Fmoc-K(Fmoc)K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid were introduced on the resin-bound peptide (12 μmol) following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (6.4 mg, 19%). $t_{\text{R}}^{**} = 10.54$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{116}\text{H}_{174}\text{F}_{18}\text{N}_{36}\text{O}_{23}\text{S}$: 2813.3; found: 2813.3.

(F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-apelin: $(CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-PEG_2)K(CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-PEG_2) - KFRRQRPRLSHKGMPF-OH$, 7 TFA (**6**)



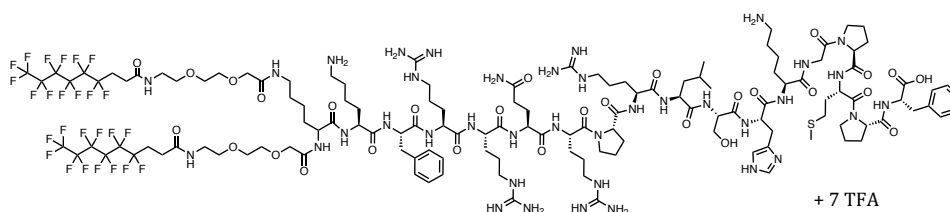
Fmoc-K(Fmoc)K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid then 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid were introduced on the resin-bound peptide (12 μ mol) following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (7.8 mg, 21%). $t_R^{**} = 10.44$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{128}H_{196}F_{18}N_{38}O_{29}S$: 3104.4537; found: 3104.4529.

(F6)K(F6)-apelin: $(CF_3(CF_2)_5(CH_2)_2CO)K(CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO) - KFRRQRPRLSHKGMPF-OH$, 7 TFA (**7**)



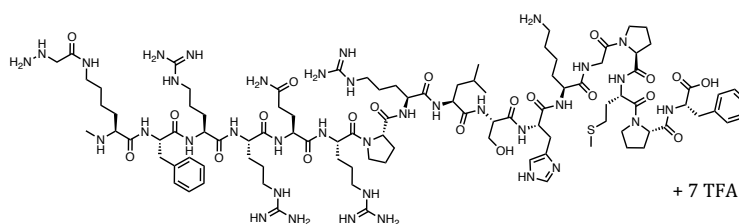
Fmoc-K(Fmoc)K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid were introduced on the resin-bound peptide (12 μ mol) following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (7.9 mg, 22%). $t_R^{**} = 11.42$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $C_{120}H_{174}F_{26}N_{36}O_{23}S$: 3013.3; found: 3013.3.

(F6-PEG₂)K(PEG₂-F6)-apelin: (CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO-PEG₂)K(CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO-PEG₂) - KFRRQRPLSHKGMPF-OH, 7 TFA (**8**)



Fmoc-K(Fmoc)K(Boc)FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid then 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid were introduced on the resin-bound peptide (12 μmol) following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (8.7 mg, 22%). t_R^{**} = 11.42 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₁₃₂H₁₉₆F₂₆N₃₆O₂₉S: 3303.4; found: 3303.4.

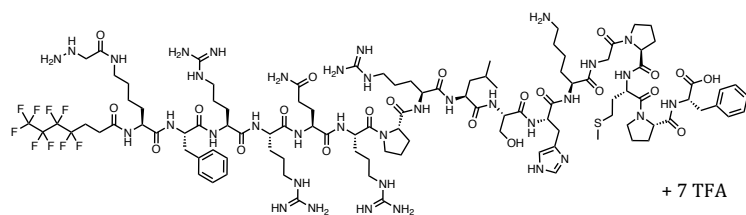
Ac-K(hdz)-apelin: CH₃CO-K(COCH₂NH-NH₂)-FRRQRPLSHKGMPF-OH, 7 TFA (**13**)



Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (12 μmol) 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(Aza-Gly(Boc₃))-OH **11** (2 eq.) was performed using HBTU (1.9 eq.), HOBT (2 eq.), and DIEA (8 eq.) 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 1.d., 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (9.1 mg, 23%). t_R^{**} = 6.94 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): [M+H]⁺ calcd 2252.2; found 2252.2.

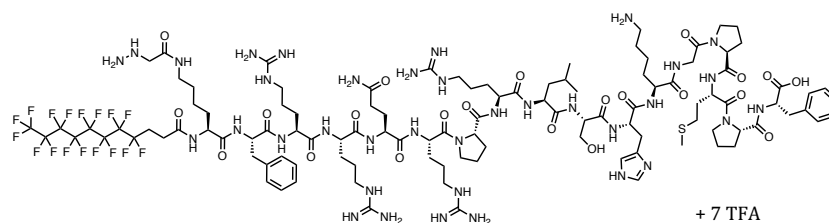
F4-K(hdz)-apelin: $CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-K(COCH_2NH-NH_2)-FRRQRPRLSHKGPMPF-OH$, 7 TFA

(14)



Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. 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(Aza-Gly(Boc₃))-OH (2 eq.) was performed using HBTU (1.9 eq.), HOBT (2 eq.), and DIEA (8 eq.) 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 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the title compound as a white solid (8.9 mg, 15%). t_R^{**} = 8.61 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): [M+H]⁺ calcd 2485.7; found 2485.7

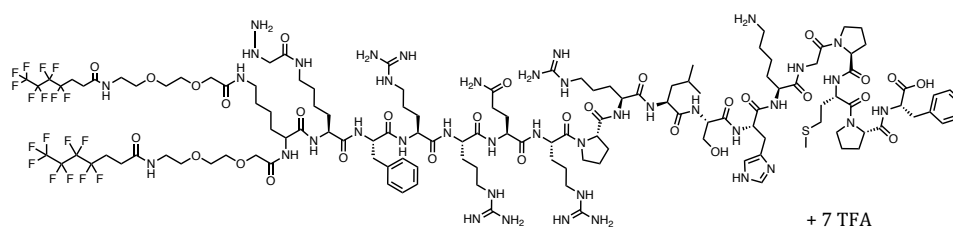
F8-K(hdz)-apelin: $CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-K(COCH_2NH-NH_2)-FRRQRPRLSHKGPMPF-OH$, 7 TFA **(15)**



Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (12 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(Aza-Gly(Boc₃))-OH (2 eq.) was performed using HBTU (1.9 eq.), HOBT (2 eq.), and DIEA (8 eq.) 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

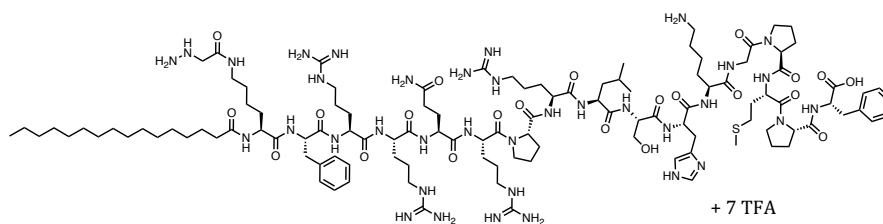
and MeOH. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (6.2 mg, 16%). $t_R^{**} = 10.19$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd 2684.2; found 2684.2.

(F4-PEG₂)K(F4-PEG₂)-K(hdz)-apelin: $(CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-PEG_2)K(CF_3(CF_2)_3(CH_2)_2CO-PEG_2) - K(COCH_2NH-NH_2)-FRRQRPRLSHKGPMPF-OH$, 7 TFA **(16)**



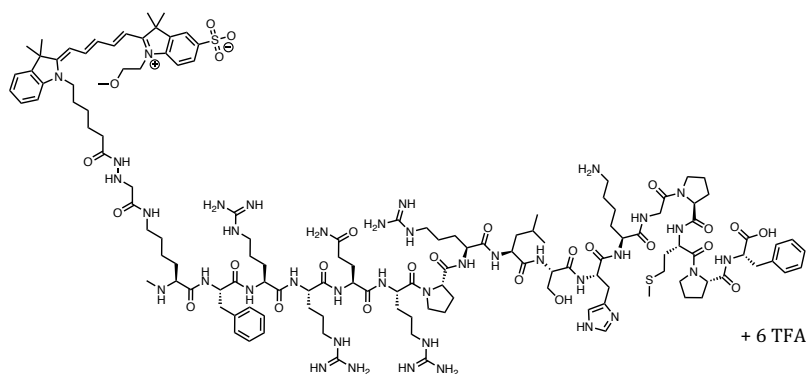
Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (12 μ mol) was swollen in DMF and the excess of solvent was removed by filtration. N-Fmoc group was removed using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Washing steps were performed with DMF, DCM and MeOH. The coupling of the Fmoc-Lys(Aza-Gly(Boc₃))-OH (2 eq.) was performed using HBTU (1.9 eq.), HOBT (2 eq.), and DIEA (8 eq.) 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. Fmoc-K(Fmoc)-OH, then 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and finally 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid were introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (5.3 mg, 14%). $t_R^{**} = 10.42$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₁₃₀H₂₀₀F₁₈N₄₀O₃₀S: 3175.5; found: 3175.5.

L15-K(hdz)-apelin: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-K}(\text{COCH}_2\text{NH-NH}_2)\text{-FRRQRPRLSHKGMPF-OH}$, 7 TFA
(17)



Fmoc-FR(Pbf)R(Pbf)Q(Trt)R(Pbf)PR(Pbf)LSHK(Boc)GPMPF-Wang sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (13 μmol) 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(Aza-Gly(Boc₃))-OH (2 eq.) was performed using HBTU (1.9 eq.), HOBT (2 eq.), and DIEA (8 eq.) 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 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the title compound as a white solid (7.3 mg, 17%). $t_{\text{R}}^{**} = 11.17$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd 2448.4; found 2448.4.

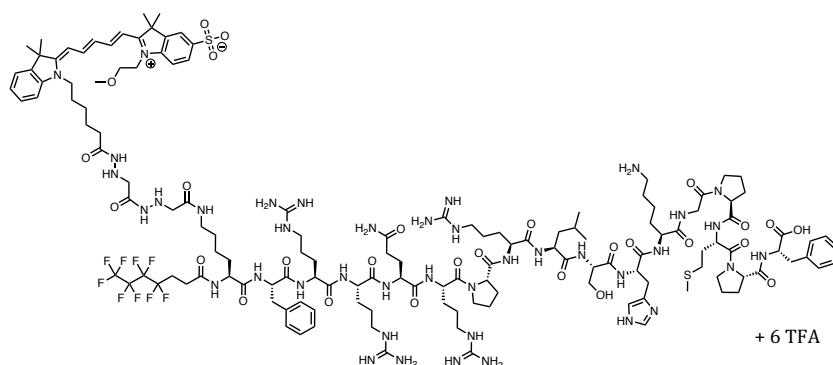
Ac-K(hdz(DY647))-apelin: $\text{CH}_3\text{CO-K}(\text{COCH}_2\text{NH-NH-DY647})\text{-FRRQRPRLSHKGMPF-OH}$, 6 TFA (18)



Compound 13 (0.37 μmol , 1 eq.) 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 eq.) 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 as a blue solid (1.1 mg, 82%). t_{R}^{**} = 8.31 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{141}\text{H}_{204}\text{N}_{38}\text{O}_{30}\text{S}_3$: 2919.5; found: 2919.5.

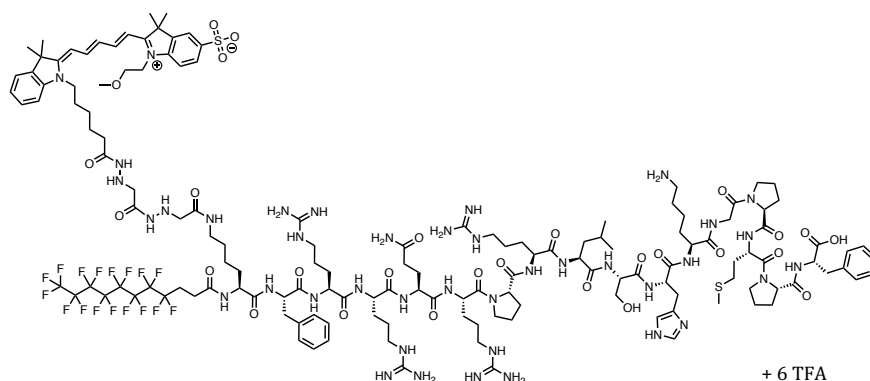
F4-K(hdz(DY647))-apelin: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ -K(COCH₂NH-NH-DY647)-
FRRQRPRLSHKGPMPF-OH, 6 TFA (**19**)



Compound **14** (0.37 μmol , 1 eq.) 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 eq.) 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 as a blue solid (0.21 mg, 15%). t_{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.

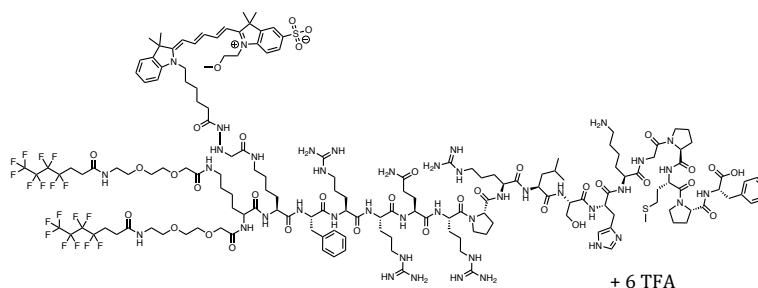
F8-K(hdz(DY647))-apelin:
FRRQRPRLSHKGMPF-OH, 6 TFA (**20**)

$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO-K}(\text{COCH}_2\text{NH-NH-DY647})-$



Compound **15** (0.37 μmol , 1 eq.) 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 eq.) 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 as a blue solid (1.2 mg, 80%). $t_{\text{R}}^{**} = 10.77$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{143}\text{H}_{203}\text{F}_{17}\text{N}_{38}\text{O}_{30}\text{S}_3$: 3351.4; found: 3351.4.

(F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-K(hdz(DY647))-apelin:
 $(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-PEG}_2)\text{K}(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-PEG}_2)-\text{K}(\text{COCH}_2\text{NH-NH-DY647})-\text{FRRQRPRLSHKGMPF-OH}$,
6 TFA (**21**)



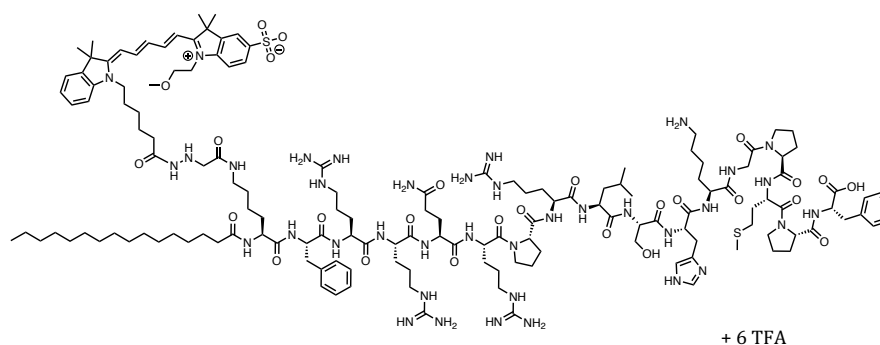
Compound **16** (0.37 μmol , 1 eq.) was dissolved in a citrate-phosphate buffer (25 mM, pH 5.2), and the pH of the mixture was re-adjusted to pH 5.2 with Na_2HPO_4 0.2 M. A solution of DY-647P1-NHS-Ester (1.1 eq.) in DMSO was added to finally get a 3/1 (v/v) buffer/DMSO. The mixture was stirred 1 h at 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 (0.1% TFA in MeCN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H_2O , v/v), affording the expected compound as a blue solid (1.2 mg, 92%). $t_{\text{R}}^{**} = 10.71 \text{ min}$ (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{164}\text{H}_{240}\text{F}_{18}\text{N}_{42}\text{O}_{35}\text{S}_2$: 3763,7; found: 3763.7.

L15-K(hdz(DY647))-apelin:

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-K}(\text{COCH}_2\text{NH-NH-DY647})-$

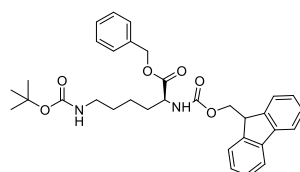
FRRQRPRLSHKGMPF-OH, 6 TFA (22)



Compound **17** (0.37 μmol , 1 eq.) 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 eq.) 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 as a blue solid (1.3 mg, 92%). $t_{\text{R}}^{**} = 11.57 \text{ min}$ (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{148}\text{H}_{230}\text{N}_{38}\text{O}_{30}\text{S}_3$: 3115.7; found: 3115.7.

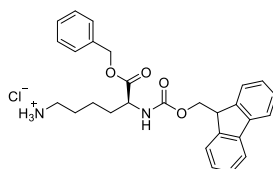
2. Chemical Synthesis

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



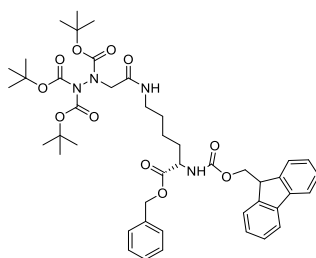
Fmoc-Lys(Boc)-OH (1 g, 1.54 mmol) and benzyl alcohol (192 μ L, 1.85 mmol) were mixed in DCM (3 mL). The mixture was cooled to 0 $^{\circ}$ C before the addition of DCC (381 mg, 1.85 mmol) and DMAP (18.8 mg, 0.154 mmol). The reaction mixture was stirred for 2 h at ice-water temperature, then warmed to room temperature and stirred for 3 h. The crude mixture was filtered and 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%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 7.61 (br d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.45 - 7.28 (m, 9 H), 5.45 - 5.34 (m, 1 H), 5.20 (q, *J* = 12.1 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* = 9.8 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 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 (**10**)



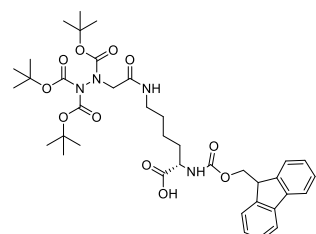
Compound **9** (500 mg, 1.07 mmol) was dissolved in 4N HCl in dioxane (10 mL). The mixture was stirred during 1 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, the residue washed three times with toluene and concentrated under reduced pressure. The crude was dried under vacuum to give a clear oil (432 mg, 1.07 mmol, 100%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.95 - 7.80 (m, 4 H), 7.72 (br d, *J*=7.0 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*=5.5 Hz, 1 H), 1.81 - 1.17 (m, 5 H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 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-butoxycarbonyl)hydrazinyl)acetamido)hexanoic acid (**11**)



Compound **10** (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 μ L, 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%). mp 67-69 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.93 - 7.84 (m, 2 H), 7.80 (br d, $J=6.5$ Hz, 1 H), 7.71 (br d, $J=6.8$ 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}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 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 (**12**)



Compound **11** (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 filtered 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%). mp 108-110 °C, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.89 (d, $J=7.3$ Hz, 3 H), 7.72 (br d, $J=6.8$ 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, $J=6.0$ Hz, 1 H), 1.60 (br d, $J=4.3$ 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, $J=6.6$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 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.

3. Enzymatic assay

Peptide stock solutions were prepared at 1 mM in water and then diluted in either MES buffer 2x (100 mM MES, 600 mM NaCl, 20 μM ZnCl_2 , 0.02% Brij-35, pH 6.5) or MES 2x with 2% BSA in order to obtain a 100 μM peptide solution. ACE-2 stock solution was prepared at 100 nM in MES buffer x2.

50 μL peptide solution with or without BSA were incubated with 50 μM ACE-2 solution. The mixture was incubated at 25°C for 1 h. An aliquot of the incubation mixture was transferred to ice-cold MeCN (2.5 volumes) at different times. Samples were then frozen at -80°C, unfrozen, mixed and centrifuged. Supernatants were used for HPLC-MS/MS analysis without further dilution. The percentage of remaining peptide at each time was determined by monitoring the peak area of the chromatogram.

4. Pharmacology assays

a. Membrane preparations and radioligand binding experiments

Membrane preparations from CHO cells stably expressing the wild-type human apelin receptor were purchased from PerkinElmer (Wellesley, MA, USA). Membranes from CHO cells stably expressing the rat apelin receptor-EGFP were prepared. Membrane preparations (1-5 g total mass of membranes/assay) were incubated for 1 h at 20 °C with 0.2 nM [^{125}I]-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 [^{125}I]-pE13F at different concentrations.

b. cAMP assay

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.

5. Toxicology evaluation

a. Cell viability assays

The cytotoxic effects of apelin derivatives on HEK 293, CACO-2 and HEP G2 cells were evaluated by measuring cell metabolic activity using a WST-1 assay (Takara MK400). Cells were observed using an Incucyte S3 (Essen Bioscience). After 24 h, compounds to test (0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M) were added to cells and the incubation was continued for 48 h at 37 °C (5% CO₂). The WST-1 test was then completed.

6. Fluorescence spectroscopy and microscopy

a. 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.

b. Fluorescence experiments

For confocal microscopy studies, ApelinR-EGFP HEK293 and wild-type HEK293 cells were seeded onto 35 mm ibiTreat IbiTreat 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 μ M 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, 405/415-490 for the Hoechst fluorescence and 488/500-580 nm for the GFP fluorescence.

7. *In vivo* evaluations

a. 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.

b. Blood pressure recording in alert rats

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).

c. Pharmacokinetic study in mice.

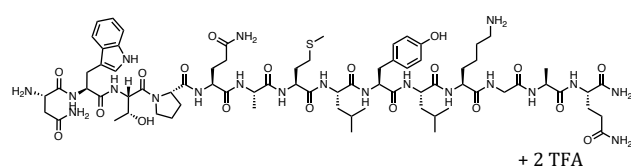
6 weeks old CD-1 mice were injected with 15 nmol/kg of LIT01-196 (corresponding to around 15nM) via the tail vein (three animals per time point). Blood samples (400 μ L) were collected at different time points (5min, 15min, 28min and 60min) by intracardiac puncture and placed into EDTA-coated tubes, centrifuged at 4°C, 12,000 g during 10 min and the plasma was stored at -80°C. Peptide injection and blood sample collection were performed by TechMedILL reviewed and approved by the agriculture ministry

regulating animal research in France (Ethics regional committee for animal experimentation Strasbourg, APAFIS 1341#2015080309399690). The samples were analyzed by UHPLC-MS/MS (LC-MS 8030. Shimadzu, electrospray ion source) using a C18 column (Phenomenex 2.6 μm Kinetex, 50 X 2.1 mm) and a linear gradient of solvent B 5-95% v/v over 1.2min at a flow rate of 0.5mL/min (solvent A: H₂O and 0.05% formic acid; solvent B: MeCN). Plasma samples were processed before RP-HPLC analysis as follows. 400 μL of each plasma sample were then mixed with 1 mL of acetonitrile for protein precipitation and compound extraction. Samples were vortex-stirred for 5 min, sonicated for 1 min and centrifuged at 10.000g for 5min. 400 μL of supernatants were lyophilized and then dissolved in 20 μL of water/acetonitrile 1/1. Peptides were quantified by integrating the area under the peaks, and normalization was based on the standard and compared to standard curves. Standard curves were obtained by analyzing known peptide quantities that were dissolved in plasma and processed as well as analyzed using the same procedure. Pharmacokinetics parameters were calculated using a one-compartment model.

C. Chapter 2 : Extension of the FluoroPep strategy to other GPCR peptidic ligands : application to of spexine

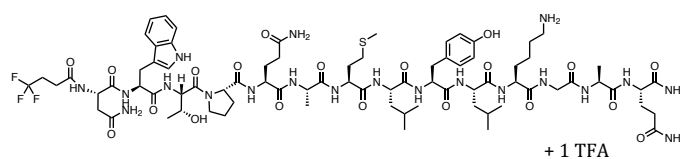
1. Peptide Synthesis

Spexin: H-NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 2 TFA (**23**)



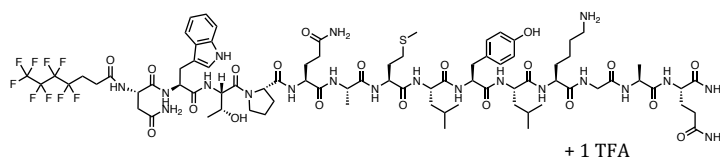
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (46 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f and 1.g, affording the title compound as a white solid (25 mg, 31%). $t_{\text{R}}^* = 3.98$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₇₄H₁₁₄N₂₀O₁₉S: 1618.8290; found: 1618.8303.

F1-spexin: $\text{CF}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}-\text{NWTPQAMLYLKGAQ}-\text{NH}_2$, 1 TFA (**24**)



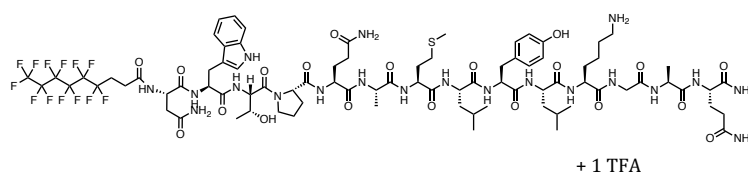
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,4-trifluorobutyric acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (26.3 mg, 42%). $t_{\text{R}}^* = 4.46$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{78}\text{H}_{117}\text{F}_3\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}$: 1742.8; found: 1742.8.

F4-spexin: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}-\text{NWTPQAMLYLKGAQ}-\text{NH}_2$, 1 TFA (**25**)



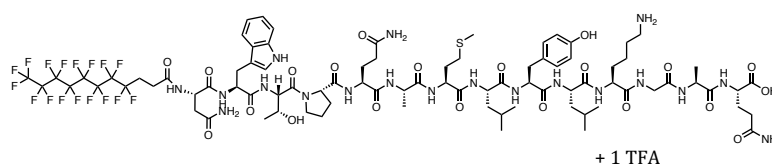
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (15.6 mg, 23%). $t_{\text{R}}^* = 5.06$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{81}\text{H}_{117}\text{F}_9\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}$: 1892.8; found: 1892.8.

F6-spexin: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{CO}-\text{NWTPQAMLYLKGAQ}-\text{NH}_2$, 1 TFA (**26**)



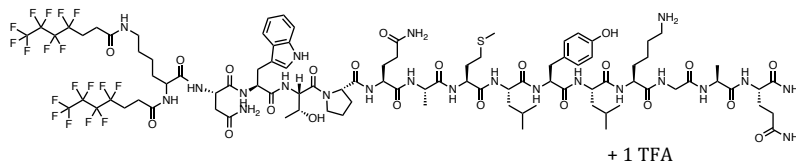
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (15.0 mg, 21%). $t_{\text{R}}^* = 5.48$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{83}\text{H}_{117}\text{F}_{13}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}$: 1993.8338; found: 1993.8309.

F8-spexin: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO}-\text{NWTPQAMLYLKGAQ}-\text{NH}_2$, 1 TFA (**27**)



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. 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 (46 μmol) following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f and 1.g, affording the title compound as a white solid (16 mg, 16%). $t_{\text{R}}^* = 5.85$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{85}\text{H}_{117}\text{F}_{17}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}$: 2092.8202; found: 2092.8187.

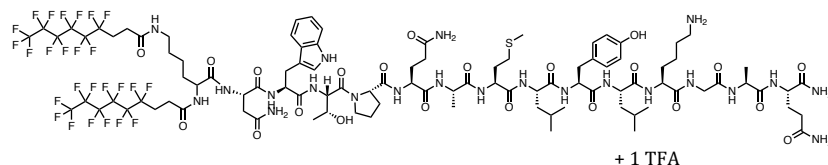
(F4)K(F4)-spexin: $(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO})\text{K}(\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO})-\text{NWTPQAMLYLKGAQ}-\text{NH}_2$, 1 TFA (**28**)



Fmoc-K(Fmoc)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid were introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected

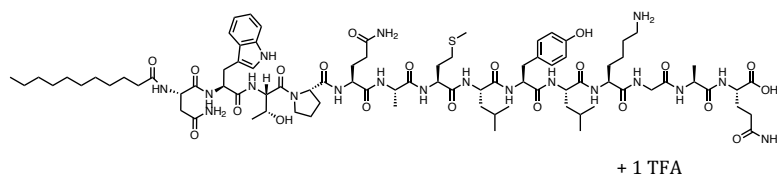
compound as a white solid (13.2 mg, 16%). $t_R^* = 5.85$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{94}H_{132}F_{18}N_{22}O_{22}S$: 2294.9; found: 2294.9.

(F6)K(F6)-spexin: $(CF_3(CF_2)_5(CH_2)_2CO)K(CF_3(CF_2)_5(CH_2)_2CO)$ - NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 1 TFA (**29**)



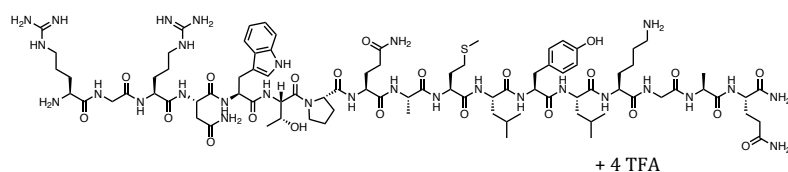
Fmoc-F(Fmoc)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μ mol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (15.2 mg, 17%). $t_R^* = 6.63$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{98}H_{132}F_{26}N_{22}O_{22}S$: 2495.9265; found: 2493.9192.

L10-spexin: $CH_3(CH_2)_9CO$ - NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 1 TFA (**30**)



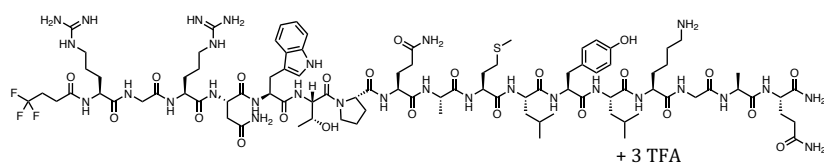
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μ mol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Undecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (16.5 mg, 26%). $t_R^* = 5.45$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $C_{85}H_{134}N_{20}O_{20}S$: 1767.0; found: 1767.0.

RGR-spexin: H-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 4 TFA (**31**)



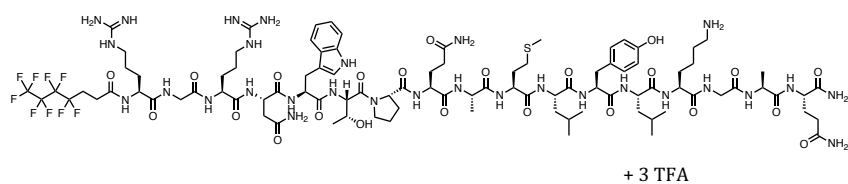
Fmoc-R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (46 μ mol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (33.8 mg, 37%). t_R^* = 3.69 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₈₈H₁₄₁N₂₉O₂₂S: 1988.1; found: 1988.1.

F1-RGR-spexin: CF₃(CH₂)₂CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**32**)



Fmoc-R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μ mol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,4-trifluorobutyric acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (25.8 mg, 34%). t_R^* = 3.88 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₉₂H₁₄₄F₃N₂₉O₂₃S: 2112.1; found: 2112.1.

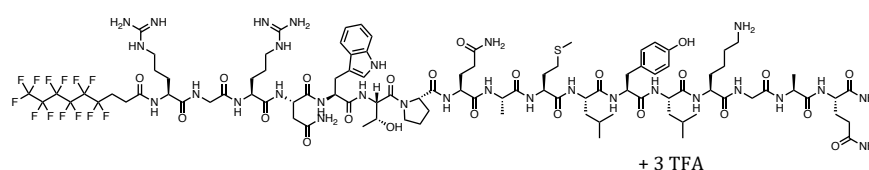
F4-RGR-spexin: CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**33**)



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH and

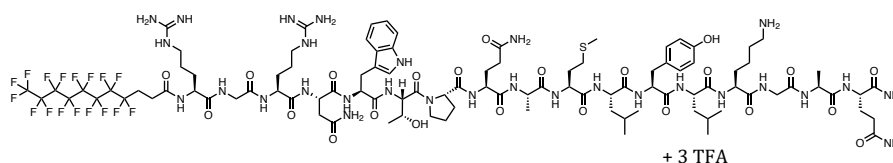
Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (36 μmol) following the general method 2.3. 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f and 1.g, affording the title compound (30.9 mg, 38%) as a white solid. $t_{\text{R}}^* = 4.26$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{144}\text{F}_9\text{N}_{29}\text{O}_{23}\text{S}$: 2262.0567; found: 2262.0547.

F6-RGR-spexin: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH}_2$, 3 TFA (**34**)



Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (39 μmol) 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 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f and 1.g, affording the title compound (33.1 mg, 36%) as a white solid. $t_{\text{R}}^* = 4.55$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{97}\text{H}_{144}\text{F}_{13}\text{N}_{29}\text{O}_{23}\text{S}$: 2362.0503; found: 2362.0477.

F8-RGR-spexin: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH}_2$, 3 TFA (**35**)

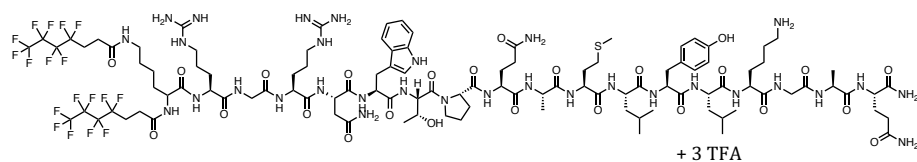


Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-OH were introduced on the resin-bound peptide (50 μmol) following the general method 1.c. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoic 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 1.f and 1.g, affording the title compound (33.2 mg, 27%) as a white solid. $t_{\text{R}}^* = 4.85$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{99}\text{H}_{144}\text{F}_{17}\text{N}_{29}\text{O}_{23}\text{S}$: 2462.0439; found: 2462.0502.

(F4)K(F4)-RGR-spexin:

(CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)-

RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**36**)

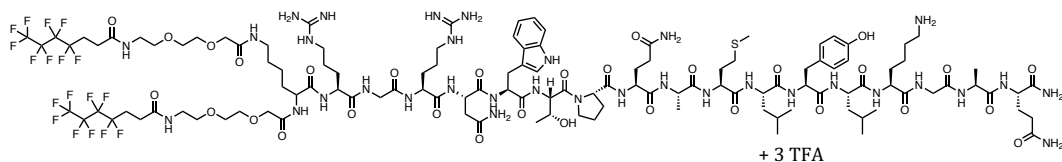


Fmoc-K(Fmoc)R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid were introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (43.1 mg, 45%). t_R^* = 4.87 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₀₈H₁₅₉F₁₈N₃₁O₂₅S: 2664.2; found: 2664.2.

(F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-RGR-spexin:

(CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)-

RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**37**)

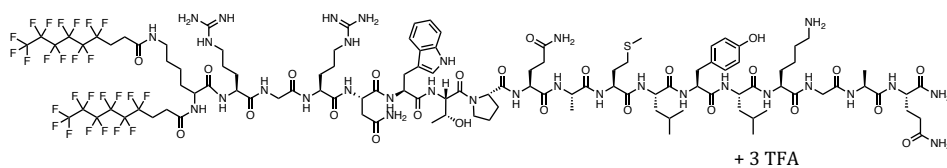


Fmoc-K(Fmoc)R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid then 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid were introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (44.6 mg, 42%). t_R^* = 4.85 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₂₀H₁₈₁F₁₈N₃₃O₃₁S: 2954.3; found: 2954.3.

(F6)K(F6)-RGR-spexin:

(CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)-

RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**38**)

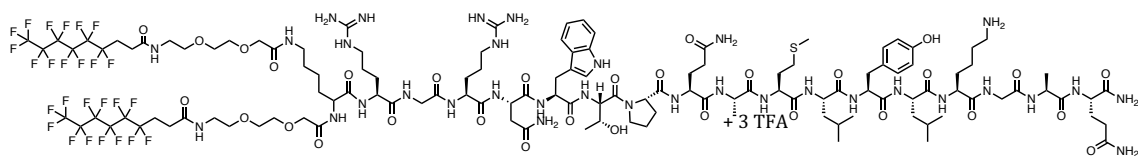


Fmoc-K(Fmoc)R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μ mol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid were introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g, affording the expected compound as a white solid (39.1 mg, 38%). t_R^* = 5.46 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₁₂H₁₅₉N₂₆O₃₁S: 2865.1502; found: 2865.1536.

(F6-PEG₂)K(PEG₂-F6)-RGR-spexin:

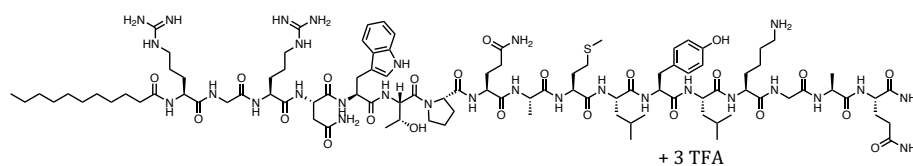
(CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)-

RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**39**)



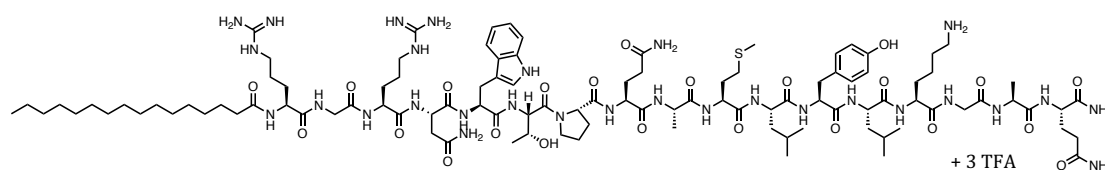
Fmoc-K(Fmoc)R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μ mol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid then 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid were introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g, affording the expected compound as a white solid (49.9 mg, 44%). t_R^* = 5.43 min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for C₁₂₄H₁₈₁F₂₆N₃₃O₃₁S: 3154.3; found: 3154.3.

L10-RGR-spexin: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH}_2$, 3 TFA (**40**)



Fmoc-R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Undecanoic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f and 1.g., affording the expected compound as a white solid (20.2 mg, 26%). $t_{\text{R}}^* = 4.85$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{99}\text{H}_{161}\text{N}_{29}\text{O}_{23}\text{S}$: 2156.2; found: 2156.2.

L15-RGR-spexin: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-RGRNWTPQAMLYLKGAQ-NH}_2$, 4 TFA (**41**)



Fmoc-K(Fmoc)R(Pbf)GR(Pbf)N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink-PS sequence was synthesized following the general method 1.b. Palmitic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f and 1.g, affording the title as a white solid compound (19.2 mg, 24%). $t_{\text{R}}^* = 4.99$ min (>95% purity [220.8 nm]); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{171}\text{N}_{29}\text{O}_{23}\text{S}$: 2226.3; found: 2226.3

2. Agonist activity evaluation of fluorospexin compounds

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 Ca^{2+} 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 probenidicid. 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.

3. In vivo evaluation

a. Animals

Animal experiments were performed on adult male C57BL/6N male mice (25-30 g weight; Janvier labs, France). Animals were housed in groups of three to five per cage and kept under a 12 h/12 h 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 before starting behavioral experiments. Every animal was used only once.

b. CFA-induced inflammatory pain model

Tail inflammation in C57BL/6N mice was induced by injecting subcutaneously 20 µl of a Complete Freund's Adjuvant (CFA) solution or saline (control mice), 3 cm from the tip of the tail [41]. Twenty-four hours after CFA injection (day 1), inflammation was confirmed by measuring thermal and mechanical hyperalgesia. Compounds were tested at day 3, when the hyperalgesia was established. Experiments for acute drug effect were designed according to a protocol enabling the evaluation of the time course of the antinociception response of test compounds. Nociceptive latencies were determined before (baseline) and after drug or saline (control) ip. administration (i.e. 30 min, and every hour up to 8 h, 24 h and more if necessary).

c. Fluoro-peptides activity evaluation in CFA-induced inflammatory pain model

The nociceptive sensitivity to thermal stimulation was determined in mice using 47.5°C warm-water tail immersion tests. In the tail immersion test, C57BN/6N mice were restrained in a grid pocket and their tail was immersed in a thermostated water bath. The latency (in sec) for tail withdrawal from hot water (47.5 ± 0.5 °C) was taken as a measure of the nociceptive response. In the absence of any nociceptive reaction, a cut-off value of 20 sec was set to avoid tissue damage.

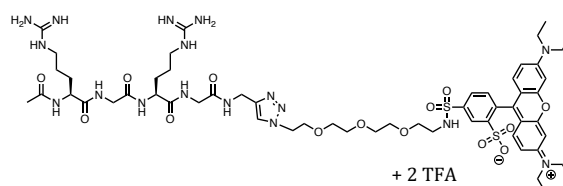
In vivo data are expressed as mean values ± SEM for 6 to 12 mice per group. Antinociception was quantified as the area under the curve (AUC) calculated by the trapezoidal method. Data were analyzed using one-way or two-way analysis of variance

(ANOVA). Post-hoc analyses were performed with Bonferroni tests. The level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism software.

D. Chapter 3 : Development of fluorocarbon tripeptide conjugate (TPFc) to increase the metabolic stability of peptides and ease their synthesis in solution using a bio-conjugation reaction

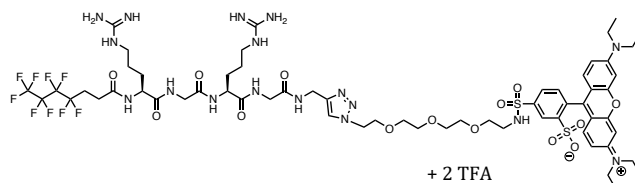
1. Peptide synthesis

Ac-RGR-(PEG₃)-Lissamine: $\text{CH}_3\text{CO-RGRG-NH-(CH}_2\text{)-triazole-PEG}_3\text{-NH-Lissamine}$, 2 TFA
(42)



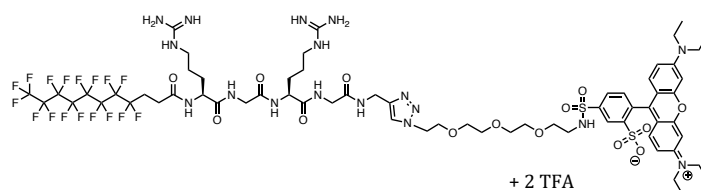
SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)GR(Pbf)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and acylated according to the general method 1.d. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (8.4 mg, 11%). $t_{\text{R}}^{**} = 9.88$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₅₆H₈₃N₁₇O₁₄S: 1281.6; found: 1281.6.

F4-RGR-(PEG₃)-Lissamine: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-RGRG-NH-(CH}_2\text{)-triazole-PEG}_3\text{-NH-Lissamine}$, 2 TFA **(43)**



SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)GR(Pbf)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (21.8 mg, 24%). t_{R}^{**} = 11.58 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₆₁H₈₄F₉N₁₇O₁₄S₂: 1513.6; found: 1513.6.

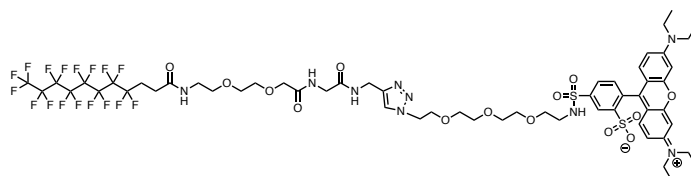
F8-RGR-(PEG₃)-Lissamine: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-RGRG-NH-(CH₂)-triazole -PEG₃-NH-Lissamine, 2 TFA (**44**)



SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)GR(Pbf)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the

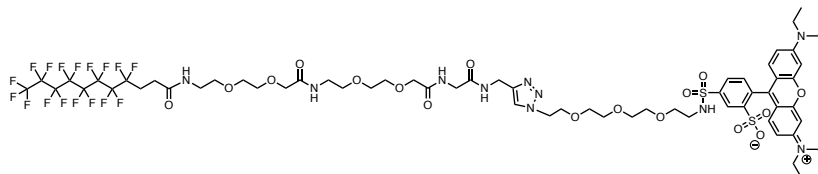
resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (12.3 mg, 12%). $t_{\text{R}}^{**} = 13.42$ min, $t_{\text{R}}^* = 5.87$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{84}\text{F}_{17}\text{N}_{17}\text{O}_{14}\text{S}_2$: 1713.6; found: 1713.6.

F8- PEG₂-(PEG₃)-Lissamine: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO}-(\text{PEG}_2)\text{G}-\text{NH}-(\text{CH}_2)\text{-triazole-PEG}_3\text{-NH-Lissamine}$ (**47**)



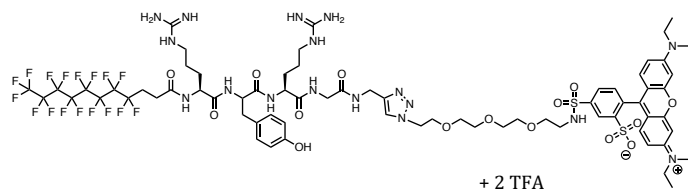
SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-D(tBu)Y(tBu)D(tBu)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and then 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (22.3 mg, 25%). $t_{\text{R}}^* = 7.52$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{68}\text{F}_{17}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_2$: 1489.4; found: 1489.4.

F8-(PEG₂)₂-(PEG₃)-Lissamine: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-(PEG₂)₂G-NH-(CH₂)-triazole -PEG₃-NH-Lissamine (**48**)



SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-D(tBu)Y(tBu)D(tBu)G-NH(CH₂)C ≡ CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled twice with 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and then with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (21.5 mg, 22%). t_R* = 7.33 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₆₃H₇₉F₁₇N₁₀O₁₇S₂: 1634.5; found: 1634.5.

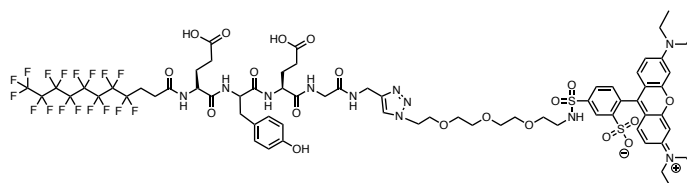
F8-RYR-(PEG₃)-Lissamine: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-RYRG-NH-(CH₂)-triazole -PEG₃-NH-Lissamin, 2 TFA (**49**)



SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)Y(OtBu)R(Pbf)G-NH(CH₂)C ≡ CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine

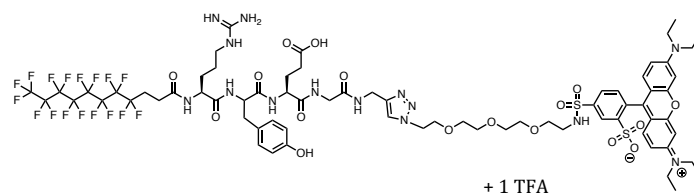
in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (8.7 mg, 8%). t_R* = 5.76 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₇₂H₉₀F₁₇N₁₇O₁₅S₂: 1819.6; found: 1819.6.

F8-EYE-(PEG₃)-Lissamine: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-EYEG-NH-(CH₂)-triazole -PEG₃-NH-Lissamine, 2 TFA (**50**)



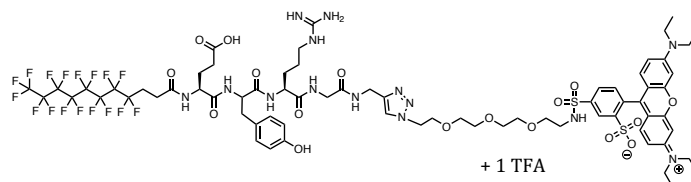
SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-E(tBu)Y(tBu)E(tBu)G-NH(CH₂)C ≡ CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (9.5 mg, 9%). t_R* = 6.99 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₇₁H₈₀F₁₇N₁₁O₁₉S₂: 1765.5; found: 1765.5.

F8-RYE-(PEG₃)-Lissamine: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-RYEG-NH-(CH₂)-triazole -PEG₃-NH-Lissamine, 1 TFA (**51**)



SPOrT resin (60 μ mol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)Y(OtBu)E(tBu)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μ mol) was added to the resin in presence of CuI (300 μ mol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μ mol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μ mol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (18.2 mg, 17%). t_R^* = 6.20 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₇₁H₈₅F₁₇N₁₄O₁₇S₂: 1792.5; found: 1792.5.

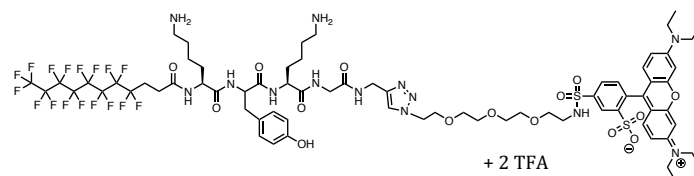
F8-EYR-(PEG₃)-Lissamine: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-EYRG-NH-(CH₂)-triazole -PEG₃-NH-Lissamine, 1 TFA (**52**)



SPOrT resin (60 μ mol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-E(OtBu)Y(OtBu)R(Pbf)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH following the general

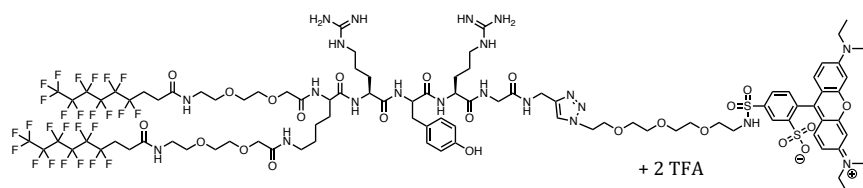
general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (10.4 mg, 10%). t_R^* = 7.06 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $C_{68}H_{76}F_{17}N_{11}O_{19}S_2$: 1737.5; found: 1737.5.

F8-KYK-(PEG₃)-Lissamine: $CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2CO-KYKG-NH-(CH_2)$ -triazole -PEG₃-NH-Lissamine, 2 TFA (**54**)



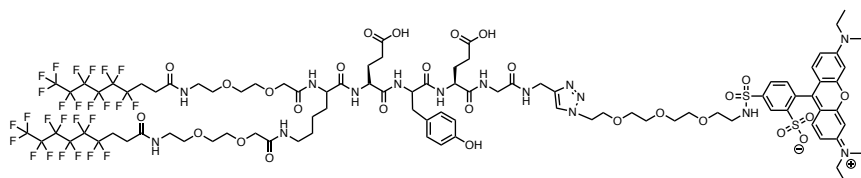
SPOrT resin (60 μ mol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-K(Boc)Y(tBu)K(Boc)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μ mol) was added to the resin in presence of CuI (300 μ mol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μ mol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μ mol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (12.6 mg, 12%). t_R^* = 5.58 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $C_{72}H_{90}F_{17}N_{13}O_{15}S_2$: 1763.6; found: 1763.6.

(F6-PEG₂)K(PEG₂-F6)-RYR-(PEG₃)-Lissamine: $(CF_3(CF_2)_5(CH_2)_2CO)K(CF_3(CF_2)_5(CH_2)_2CO)$ -RYRG-NH-(CH₂)-triazole-PEG₃-NH-Lissamine, 2 TFA (**55**)



SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)Y(OtBu)R(Pbf)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled successively with Fmoc-Lys(Fmoc)OH, 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (21.0 mg, 14%). $t_{\text{R}}^* = 6.35$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₉₇H₁₂₇F₂₆N₂₁O₂₃S₂: 2511.8; found: 2511.8.

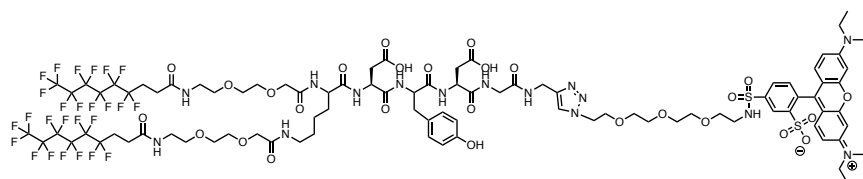
(F6-PEG₂)K(PEG₂-F6)-EYE-(PEG₃)-Lissamine: (CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)-EYEG-NH-(CH₂)-triazole-PEG₃-NH-Lissamine (**56**)



SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-E(tBu)Y(tBu)E(tBu)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled successively with Fmoc-Lys(Fmoc)OH, 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then

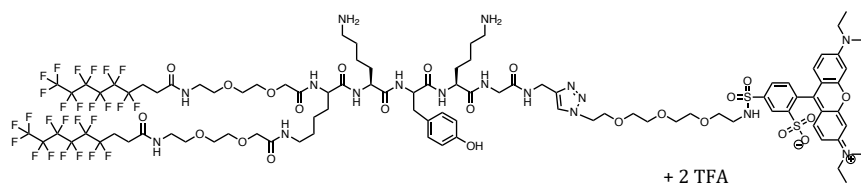
coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (19.2 mg, 13%). $T_R^* = 7.49$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{117}\text{F}_{26}\text{N}_{15}\text{O}_{27}\text{S}_2$: 2467.9; found: 2467.9.

(F6-PEG₂)K(PEG₂-F6)-DYD-(PEG₃)-Lissamine: (CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)-DYDG-NH-(CH₂)-triazole-PEG₃-NH-Lissamine (57)



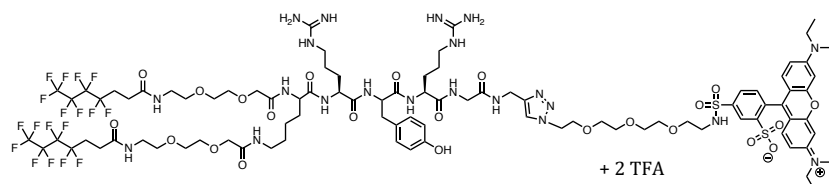
SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-D(tBu)Y(tBu)D(tBu)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled successively with Fmoc-Lys(Fmoc)OH, 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (24.7 mg, 17%). $T_R^* = 7.54$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{89}\text{H}_{104}\text{F}_{26}\text{N}_{14}\text{O}_{27}\text{S}_2$: 2429.7; found: 2429.7.

*(F6-PEG₂)K(PEG₂-F6)-KYK-(PEG₃)-Lissamine: (CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₅(CH₂)₂CO)-KYKG-NH-(CH₂)-triazole-PEG₃-NH-Lissamine, 2 TFA **(58)***



SPOrT resin (60 μ mol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-K(Boc)Y(tBu)K(Boc)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled successively with Fmoc-Lys(Fmoc)OH, 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μ mol) was added to the resin in presence of CuI (300 μ mol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μ mol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μ mol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (20.6 mg, 14%). t_R^* = 6.28 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₉₇H₁₂₇F₂₆N₁₇O₂₃S₂: 2455.8; found: 2455.8.

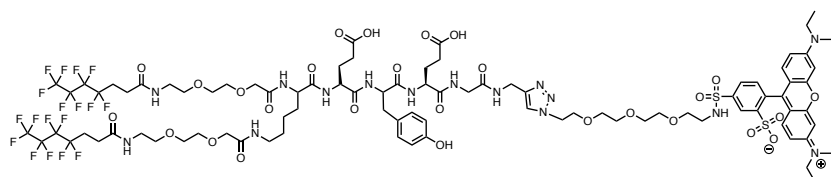
*(F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-RZR-(PEG₃)-Lissamine: (CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)-RZR-NH-(CH₂)-triazole-PEG₃-NH-Lissamine, 2 TFA **(59)***



SPOrT resin (60 μ mol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)Y(OtBu)R(Pbf)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c.

The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled successively with Fmoc-Lys(Fmoc)OH, 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (19.4 mg, 14%). $t_R^* = 6.05$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₉₃H₁₂₇F₁₈N₂₁O₂₃S₂: 2311.9; found: 2311.9.

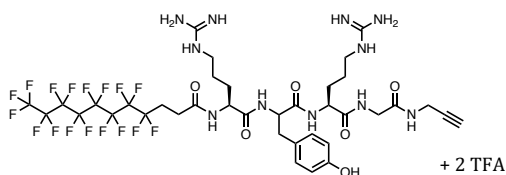
(F4-PEG₂)K(PEG₂-F4)-EYE-(PEG₃)-Lissamine: (CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)K(CF₃(CF₂)₃(CH₂)₂CO)-EYEG-NH-(CH₂)-triazole-PEG₃-NH-Lissamine (**60**)



SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-E(tBu)Y(tBu)E(tBu)G-NH(CH₂)C ≡ CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled successively with Fmoc-Lys(Fmoc)OH, 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the

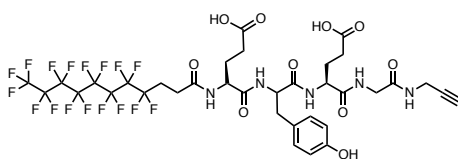
SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-K(Boc)Y(tBu)K(Boc)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled successively with Fmoc-Lys(Fmoc)OH, 2,2-fmoc-amino-ethoxy-ethoxy acetic acid and 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid according to the general method 1.c. The peptide bound resin was then swollen in a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF and N₃-PEG₃-amine (120 μmol) was added to the resin in presence of CuI (300 μmol). The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Compound 45 (150 μmol) was then coupled to the peptide bound resin in presence of DIEA (720 μmol) in DCM. The mixture was shaken at room temperature for 6 hours. The solution was drained, and the fluorescent resin-bound peptide was washed with DMF, DCM and MeOH. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a purple solid (21.6 mg, 16%). t_{R}^* = 5.98 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₈₉H₁₀₈F₁₈N₁₆O₂₃S₂: 2255.8; found: 2255.8.

F8-RYR: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-RYRG-NH(CH₂)C \equiv CH, 2 TFA (**63**)



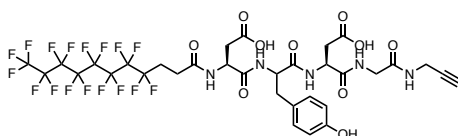
SPOrT resin (500 μmol) was prepared as previously described² and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-R(Pbf)Y(OtBu)R(Pbf)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (23.1 mg, 36%). t_{R}^* = 5.38 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₃₇H₄₄F₁₇N₁₁O₆: 1071.3; found: 1071.3.

F8-EYE: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-EYEG-NH(CH₂)C ≡ CH (**64**)



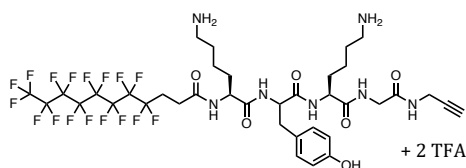
SPOrT resin (600 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-E(OtBu)Y(OtBu)E(OtBu)G-NH(CH₂)C ≡ CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (6.0 mg, 10%). *t_R** = 6.57 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₃₅H₃₄F₁₇N₅O₁₀: 1007.2; found: 1007.2.

F8-DYD: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-DYDG-NH(CH₂)C ≡ CH (**65**)



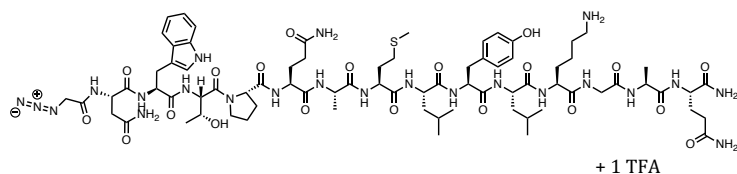
SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-D(tBu)Y(tBu)D(tBu)G-NH(CH₂)C ≡ CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (21.7 mg, 37%). *t_R** = 6.58 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₃₃H₃₀F₁₇N₅O₁₀: 979.2; found: 979.2.

F8-KYK: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO-KYKG-NH}(\text{CH}_2)\text{C} \equiv \text{CH}$, 2 TFA (**66**)



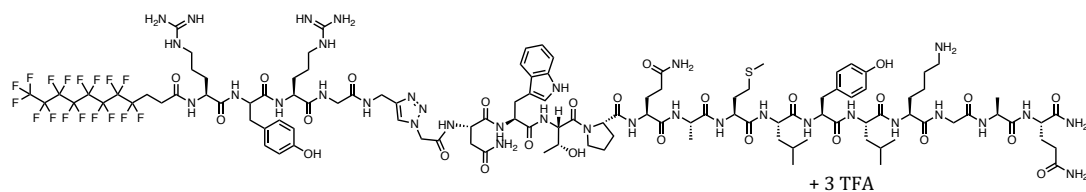
SPOrT resin (60 μmol) was prepared as previously described and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-K(Boc)Y(tBu)K(Boc)G-NH(CH₂)C \equiv CH was obtained by successive couplings of Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH following the general method 1.c. The resin-bound peptide was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min) and coupled with 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid according to the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound (6.2 mg, 16%) as a white solid (25.9 mg, 43%). $t_{\text{R}}^* = 5.14$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{F}_{17}\text{N}_7\text{O}_6$: 1005.3; found: 1005.3.

Azido-spexine: $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CO-NWTPQAMLYLKGAQ-NH}_2$, 1 TFA (**67**)



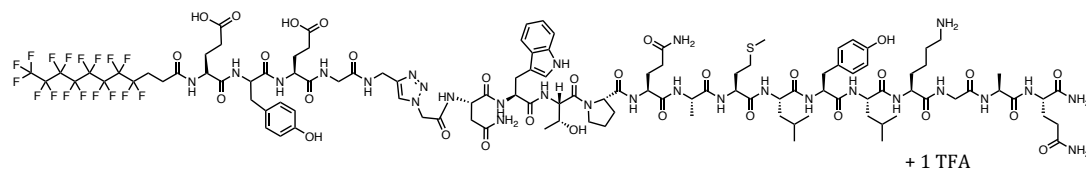
Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(tBu)PQ(Trt)AMLY(tBu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink sequence was synthesized following the general method 1.b. The resin-bound peptide (36 μmol) was then deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). azido-acetic acid was introduced on the resin-bound peptide following the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound (25 mg, 31%) as a white solid (18.9 mg, 28%). $t_{\text{R}}^* = 4.32$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for $\text{C}_{76}\text{H}_{115}\text{N}_{23}\text{O}_{20}\text{S}$: 1701.8; found: 1701.8.

F8-RYR-triazole-spexine: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO-RYRG-NH}-(\text{CH}_2)\text{-triazole}$ -
 NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**68**)



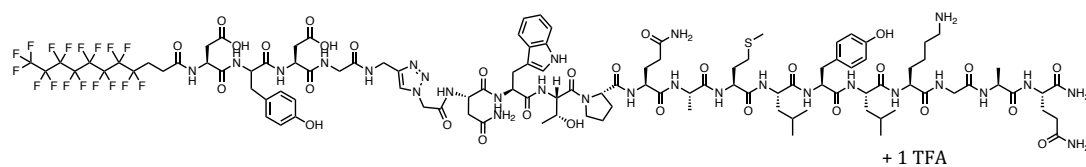
CuSO₄ (0.9 mg, 5.4 μmol), sodium ascorbate (2.9 mg, 10.9 μmol) and TBTA (2.1 mg, 5.4 μmol) were dissolved in DMF (0.5 mL) and water (0.2 mL) and added to compound **63** (5.3 mg, 4.9 μmol). Compound **67** (8 mg, 4.5 μmol) was solubilized in DMF (0.6 mL) and added to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred at 37°C for 1h. The crude was diluted in DMSO and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (5.8 mg, 50%). $t_R^* = 4.70$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₁₁₃H₁₅₉F₁₇N₃₄O₂₅S; 2763.2; found: 2763.2.

F8-EYE-triazole-spexine: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO-EYEG-NH}-(\text{CH}_2)\text{-triazole}$ -
 NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 1 TFA (**69**)



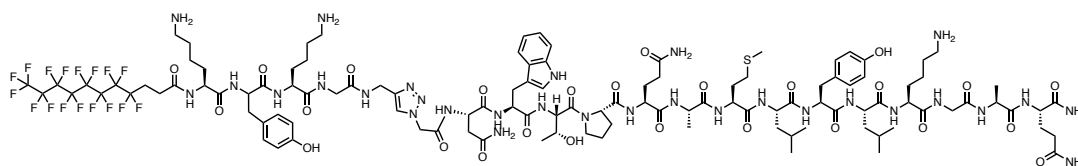
CuSO₄ (0.65 mg, 5.4 μmol), sodium ascorbate (2.1 mg, 10.9 μmol) and TBTA (1.6 mg, 5.4 μmol) were dissolved in DMF (0.4 mL) and water (0.15 mL) and added to compound **64** (3.7 mg, 3.7 μmol). Compound **67** (6 mg, 3.4 μmol) was solubilized in DMF (0.5 mL) and added to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred at 37°C for 1h. The crude was diluted in DMSO and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (3.9 mg, 46%). $t_R^* = 5.17$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₁₁₁H₁₄₉F₁₇N₂₈O₃₀S; 2709.0; found: 2709.0.

F8-DYD-triazole-spexine: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{CO-DYDG-NH}-(\text{CH}_2)\text{-triazole}$ -
 NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 1 TFA (**70**)



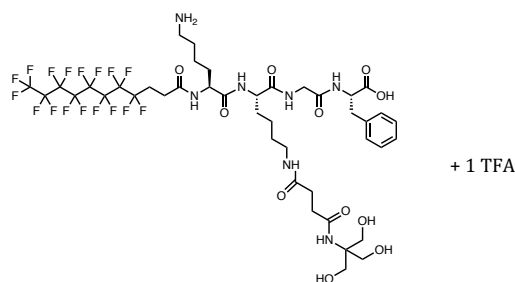
CuSO₄ (0.9 mg, 5.4 μmol), sodium ascorbate (2.9 mg, 10.9 μmol) and TBTA (2.1 mg, 5.4 μmol) were dissolved in DMF (0.5 mL) and water (0.2 mL) and added to compound **65** (4.9 mg, 4.9 μmol). Compound **67** (8 mg, 4.5 μmol) was solubilized in DMF (0.6 mL) and added to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred at 37 °C for 1h. The crude was diluted in DMSO and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (5.7 mg, 51%). t_R* = 5.18 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₁₀₉H₁₄₅F₁₇N₂₈O₃₀S: 2681.0; found: 2681.0.

F8-KYK-triazole-spexine: CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-KYKG-NH-(CH₂)-triazole -
NWTPQAMLYLKGAQ-NH₂, 3 TFA (**71**)



CuSO₄ (0.9 mg, 5.4 μmol), sodium ascorbate (2.9 mg, 10.9 μmol) and TBTA (2.1 mg, 5.4 μmol) were dissolved in DMF (0.5 mL) and water (0.2 mL) and added to compound **66** (5.1 mg, 4.9 μmol). Compound **67** (8 mg, 4.5 μmol) was solubilized in DMF (0.6 mL) and added to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred at 37°C for 1h. The crude was diluted in DMSO and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound as a white solid (6.2 mg, 51%). t_R* = 4.61 min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI) calcd for C₁₁₃H₁₅₉F₁₇N₃₀O₂₆S: 2707.2; found: 2707.2.

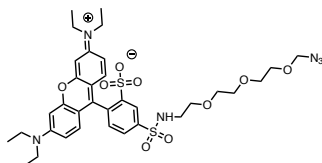
CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂CO-K-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-GF-OH, 1 TFA (**84**)



Fmoc-Phe-Wang resin (30 μmol) was swollen in DCM for 1 h and was deprotected using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(CH₂-CH₂-CO-TRIS(OTBDMS)₃)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH and finally 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptafluoroundecanoic acid were successfully coupled according to the general method 1.c. Finally, the peptide was cleaved and purified following the general methods 1.f. and 1.g., affording the expected compound

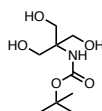
(3.45 g, 5.8 mmol, 8%). $t_R^* = 4.95$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd for $C_{27}H_{29}ClN_2O_6S_2$ 576.1; found 576.1.

5-(chlorosulfonyl)-2-(6-(diethylamino)-3-(diethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzenesulfonate (**46**)



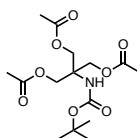
Compound 45 (0.69 g, 1.16 mmol) is solubilized in anhydrous DCM (1 mL) and DMF (1 mL). NEt_3 (0.5 mL, 3.48 mmol) and DMAP (12.2 mg, 0.16 mmol) were added. The mixture is stirred for 16 h at room temperature. The crude product was concentrated under reduced pressure and was purified on silica gel eluted with 10% ethyl acetate in n-pentane to obtain a purple solid (0.63 g, 0.85 mmol, 74%). $t_R = 4.78$ min (>95% purity [220.8 nm]); MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd for $C_{27}H_{29}ClN_2O_6S_2$ 744.8; found 744.8.

tert-butyl (1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)carbamate (**72**)



A suspension of trometamol (2 g, 16.5 mmol) in tertbutanol (16.7 mL) and methanol (16.7 mL) is slowly added to Boc_2O (4.7 g, 21.5 mmol) solubilized in tertbutanol (22.3 mL). The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature. The crude mixture was concentrated under reduced pressure and washed three times with ethyl acetate. The pure compound was obtained as a white solid (1.65 g, 15.1 mmol, 69%). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.83 (br s, 1 H) 4.57 (t, $J=5.6$ Hz, 3 H) 3.58 (d, $J=5.8$ Hz, 6 H) 1.44 (s, 9 H); ^{13}C NMR (126 MHz, Methanol- d_4) δ 164.7, 87.5, 70.1, 69.9, 37.8.

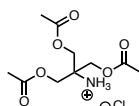
2-(acetoxymethyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propane-1,3-diyl diacetate (**73**)



Compound **72** (1 g, 4.52 mmol), acetic anhydride (4.24 mL, 45.2 mmol) and $NaHCO_3$ (2.3 g, 27.1 mmol) are dissolved in acetonitrile (18 mL) and ethyl acetate (9.01 mL). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. The crude mixture was filtered and washed with ethyl acetate. The filtrate was concentrated under reduced

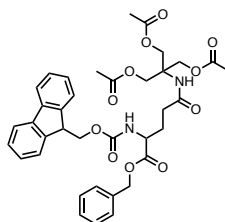
pressure, solubilized with DCM and extracted with water. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , isolated by filtration and concentrated under reduced pressure. The crude was purified on silica gel eluted with 30% ethyl acetate in n-pentane to obtain a white solid (1,7 mg, 3,16 mmol, 70%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.93 - 5.02 (m, 1 H), 4.35 (d, $J=11.3$ Hz, 2 H), 4.14 (d, $J=11.3$ Hz, 2 H), 3.76 (s, 2 H), 2.08 - 2.12 (m, 9 H), 1.41 - 1.47 (m, 9 H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 63.0, 58.4, 28.3, 20.8

1,3-diacetoxy-2-(acetoxymethyl)propan-2-aminium chloride (**74**)



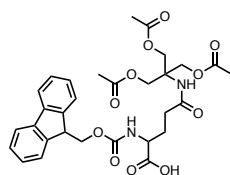
Compound **73** (600 mg, 1.73 mmol) was dissolved in 4N HCl in dioxane (5.4 mL). The mixture was stirred during 1 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, the residue was washed three times with toluene and concentrated under reduced pressure. The crude was dried under vacuum to give a clear oil (432 mg, 0.67 mmol, 99%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (br s, 2 H), 4.39 (s, 6 H), 2.19 (s, 9 H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.1, 67.1, 61.3, 58.5, 20.7

2-(4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(benzyloxy)-5-oxopentanamido) - 2-(acetoxymethyl)propane-1,3-diyl diacetate (**75**)



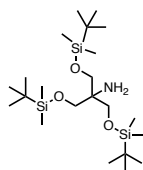
N- α -Fmoc-L-glutamic acid α -benzyl ester (157 mg, 0.35 mmol), dihydroxy-carbodiimide (55 μL , 0.35mmol) and Oxyma (50.1 mg, 0.35mmol) were solubilized in DMF (1.5 mL) at 0°C. DIEA (146 μL , 0.88 mmol) and compound **74** (100 mg, 0.35mmol) were added and the mixture was stirred for 5 min and then was brought to room temperature and stirred for 16 h. The crude mixture was concentrated under reduces pressure and purified in RP-HPLC C18 column. The compound was eluted with 80% acetonitrile 0.1% TFA in water 0.1% TFA to obtain an oil (80 mg, 0.12 mmol, 34%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (d, $J=7.6$ Hz, 2 H), 7.60 (br t, $J=6.3$ Hz, 2 H), 7.41 (br t, $J=7.4$ Hz, 2 H), 7.33 (t, $J=7.4$ Hz, 2 H), 6.67 - 6.74 (m, 1 H), 5.86 - 5.94 (m, 1 H), 4.39 - 4.51 (m, 8 H), 4.36 (br s, 1 H), 4.20 - 4.25 (m, 1 H), 3.81 - 4.16 (m, 2 H), 2.39 (br s, 1 H), 2.18 - 2.26 (m, 1H), 2.18 - 2.26 (m, 1 H), 2.09 (s, 9 H), 1.92 - 2.00 (m, 1 H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 170.9, 143.5, 141.3, 127.8, 127.1, 125.0, 120.1, 67.3, 62.6, 58.5, 53.0, 47.1, 20.8

N-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N5-(1,3-diacetoxy-2-(acetoxymethyl) propan-2-yl)glutamine (**76**)



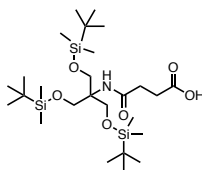
Compound **75** (68 mg, 0.1 mmol) was dissolved in MeOH (2.5 mL). Pd/C (6.8 mg) was added to the mixture and stirred under H₂ for 1 h. The crude mixture was filtered on celite and washed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dried under vacuum to give a white solid (48 mg, 0.08 mmol, 92%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (br d, J=7.6 Hz, 2 H), 7.58 (br t, J=7.3 Hz, 2 H), 7.36 - 7.42 (m, 2 H), 7.27 - 7.32 (m, 2 H), 7.27 - 7.32 (m, 2 H), 6.65 (br s, 1 H), 5.98 (br d, J=6.7 Hz, 1 H), 4.35 - 4.50 (m, 6 H), 4.27 - 4.35 (m, 1 H), 4.19 (t, J=7.0 Hz, 1 H), 2.34 (br s, 2 H), 2.13 - 2.26 (m, 1H), 2.01 - 2.09 (m, 8 H), 1.89 - 1.97 (m, 1 H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 143.6, 141.3, 127.8, 127.1, 125.0, 120.0, 67.2, 62.5, 58.4, 47.1, 29.2, 20.7

6-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3,9,9,10,10-octamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundecan-6-amine (**77**)



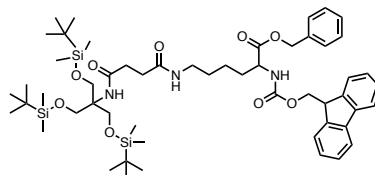
Imidazole (1.27 g, 18.7 mmol) and TBDMS-Cl (1.87 g, 12.4 mmol) were dissolved in DCM (9.3 mL) under argon atmosphere. Trometamol (0.5 g, 4.13 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred for 48 h at room temperature. An ammonium acetate solution (5 mL) was added to the reaction mixture. DCM was added to the mixture and extracted with water then brine. The organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, isolated by filtration and concentrated under reduced pressure to obtain a white oil (1.7 g, 3.7 mmol, 89%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.46 (s, 6 H), 0.88 - 0.91 (m, 27 H), 0.03 - 0.07 (m, 18 H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 64.1, 57.4, 25.9, 18.3, -5.5

4-((6-(((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3,9,9,10,10-octamethyl-4,8-dioxo-3,9-disilaundecan-6-yl)amino)-4-oxobutanoic acid (**78**)



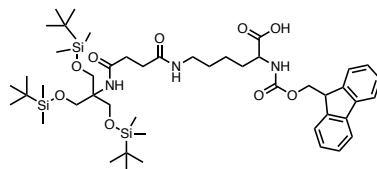
Succinic anhydride (2 g, 4.3 mmol) is dissolved in anhydrous DCM (12 mL) and compound **77** dissolve separately in DCM (8 mL) is added drop by drop. The reaction mixture is stirred at room temperature for 2 h. The crude is concentrated under reduced pressure to obtain a white oil (1.8 g, 3.2 mmol, 75%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.39 - 12.30 (m, 1 H), 6.84 - 6.92 (m, 1 H), 3.66 (s, 6 H), 2.27 - 2.36 (m, 4 H), 0.84 - 0.86 (m, 27 H), -0.01 (s, 18 H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 174.3, 171.1, 65.4, 62.3, 59.3, 31.3, 39.9, 26.2, 18.4, 15.6, -5.1

benzyl-17-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6,6-bis(((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3-tetramethyl-8,11-dioxo-4-oxa-7,12-diaza-3-silaoctadecan-18-oate (**79**)



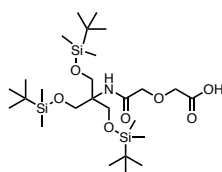
Compound **78** (563 mg, 1 mmol), PYBOP (520 mg, 1 mmol) and DIEA (0.901 mL, 5.45 mmol) were dissolved in anhydrous DMF under argon atmosphere. The mixture was stirred for one minute then compound **11** (450 mg, 0.909 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated under reduced pressure and was purified on silica gel eluted with 40% ethyl acetate in n-pentane to obtain a yellowish oil (235 mg, 0.24 mmol, 40 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, J=7.5 Hz, 2 H), 7.61 (d, J=7.5 Hz, 2 H), 7.28 - 7.43 (m, 9 H), 6.32 (br t, J=5.4 Hz, 1 H), 5.70 (s, 1H), 5.44 - 5.51 (m, 1 H), 5.12 - 5.24 (m, 2 H), 4.35 - 4.46 (m, 3 H), 4.22 (br t, J=6.9 Hz, 1 H), 3.82 (s, 6 H), 3.11 - 3.21 (m, 2 H), 2.95 (s, 1 H), 2.88 (s, 1 H), 2.36 - 2.52 (m, 4 H), 1.81 - 1.96 (m, 2 H), 1.66 - 1.77 (m, 1 H), 1.43 - 1.54 (m, 2 H), 1.32 - 1.39 (m, 1 H), 1.24 - 1.39 (m, 3 H), 1.24 - 1.39 (m, 3 H), 0.86 - 0.89 (m, 27H), 0.01 - 0.05 (m, 18 H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.3, 171.6, 141.3, 128.6, 128.5, 128.3, 127.7, 127.0, 125.1, 119.9, 61.9, 60.6, 47.1, 39.0, 32.3, 31.8, 29.1, 25.8, 18.2, -5.6

17-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6,6-bis(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3-tetramethyl-8,11-dioxo-4-oxa-7,12-diaza-3-silaoctadecan-18-oic acid (**80**)



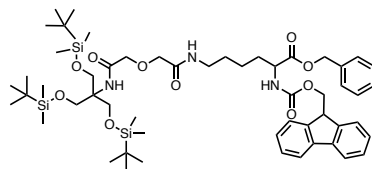
Compound **79** (170 mg, 0.17 mmol) was dissolved in MeOH (3.7 mL). Pd/C (17 mg) was added to the mixture and stirred under H₂ for 1 h. The crude mixture was filtered on celite and washed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dried under vacuum to give a white oil (140 mg, 0.15 mmol, 90 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, J=7.5 Hz, 2 H), 7.58 (br s, 2 H), 7.33 - 7.39 (m, 2 H), 7.27 (s, 3 H) 6.69 - 6.83 (m, 1 H), 6.53 - 6.62 (m, 1 H), 6.36 (s, 1 H), 5.90 - 6.07 (m, 1 H), 5.77 - 5.85 (m, 1 H), 4.32 (br dd, J=14.3, 7.53 Hz, 3 H), 4.18 (br d, J=7.0 Hz, 1 H), 3.72 - 3.84 (m, 6 H), 3.08 - 3.26 (m, 2 H), 2.45 (br s, 4 H), 1.59 - 1.99 (m, 3 H), 1.32 - 1.52 (m, 4 H), 0.92 (s, 2 H), 0.85 - 0.89 (m, 25 H), 0.10 - 0.11 (m, 1 H), 0.01 - 0.06 (m, 17 H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 171.6, 143.1, 139.9, 137.9, 129.4, 128.0, 127.8, 127.5, 125.7, 127.8, 121.8, 120.5, 110.2, 62.2, 59.3, 33.8, 32.3, 31.6, 26.2, 29.5, 24.9, 23.3, 18.5, -5.1

6,6-bis(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3-tetramethyl-8-oxo-4,10-dioxo-7-aza-3-siladodecan-12-oic acid (**81**)



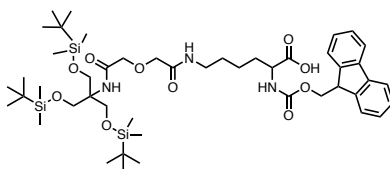
Diglycolic anhydride (12.5 mg, 0.1 mmol) is dissolved in anhydrous DCM (12 mL) and compound **77** (50 mg, 0.1 mmol) dissolve separately in DCM (0.5 mL) is added drop by drop. The reaction mixture is stirred at room temperature for 2 h. The crude is concentrated under reduced pressure to obtain a white oil (48 mg, 0.08 mmol, 78%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.55 - 13.17 (m, 1 H), 6.82 - 6.89 (m, 1 H), 4.06 (s, 2 H), 3.87 (s, 2 H), 3.76 (s, 6 H), 0.85 (s, 27 H), 0.01 (s, 18 H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 171.5, 168.7, 70.7, 68.1, 65.4, 61.7, 60.3, 26.1, 18.4, 15.6, -5.2

benzyl-18-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6,6-bis(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3-tetramethyl-8,12-dioxo-4,10-dioxo-7,13-diaza-3-silanonadecan-19-oate (**82**)



Compound **81** (31.5 mg, 0.06 mmol), PYBOP (36.5 mg, 0.07 mmol) and DIEA (0.063 mL, 0.4 mmol) were dissolved in anhydrous DMF under argon atmosphere. The mixture was stirred for one minute then compound 11 (40.6 mg, 0.07 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated under reduced pressure and was purified on silica gel eluted with 40% ethyl acetate in n-pentane to obtain a yellowish oil (235 mg, 0.24 mmol, 40 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, J=7.5 Hz, 2 H), 7.61 (br d, J=7.4 Hz, 2 H), 7.38 - 7.43 (m, 2 H), 7.27 - 7.34 (m, 3 H), 6.55 (br t, J=5.9 Hz, 1 H), 6.48 - 6.52 (m, 1 H), 5.43 - 5.49 (m, 1 H), 5.13 - 5.24 (m, 2 H), 4.33 - 4.48 (m, 3 H), 4.18 - 4.26 (m, 1 H), 4.01 (s, 2 H), 3.92 (s, 2 H), 3.87 (s, 6 H), 3.25 (q, J=6.9 Hz, 2 H), 2.95 (s, 1 H), 2.89 (s, 1 H), 1.83 - 2.00 (m, 1 H), 1.66 - 1.78 (m, 1 H), 1.46 - 1.63 (m, 2 H), 1.27 - 1.44 (m, 2 H), 0.87 - 0.90 (m, 27 H), 0.05 (s, 18 H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.5, 167.5, 167.1, 166.8, 143.7, 141.3, 135.2, 128.6, 128.5, 128.3, 127.7, 127.0, 125.1, 119.9, 71.7, 71.1, 67.2, 67.0, 61.7, 60.7, 53.7, 47.1, 38.5, 32.1, 29.2, 25.8, 22.4, 18.2, -5.6

benzyl-18-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6,6-bis(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3-tetramethyl-8,12-dioxo-4,10-dioxo-7,13-diaza-3-silanonadecan-19-oate (**83**)



Compound **82** (43 mg, 0.04 mmol) was dissolved in MeOH (1,1 mL). Pd/C (4.3 mg) was added to the mixture and stirred under H₂ for 1 h. The crude mixture was filtered on celite and washed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dried under vacuum to give a white oil (32,8 mg, 0.03 mmol, 70 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, J=7.1 Hz, 2 H), 7.60 (br t, J=5.7 Hz, 2 H), 7.27 - 7.42 (m,

4 H), 6.48 - 6.75 (m, 2 H), 5.71 - 5.84 (m, 1H), 4.36 (br d, J=6.8 Hz, 2 H), 4.17 - 4.24 (m, 1 H), 4.01 (br d, J=2.0 Hz, 2 H), 3.94 (s, 2 H), 3.86 (d, J=1.8 Hz, 6 H), 3.20 - 3.42 (m, 2 H), 2.08 - 2.09 (m, 1 H), 2.08 - 2.09 (m, 1 H), 1.70 - 1.96 (m, 2 H), 1.47 - 1.66 (m, 3 H), 1.13 - 1.41 (m, 3 H), 0.88 (s, 27 H), 0.02 - 0.05 (m, 18 H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 143.1, 139.9, 137.9, 129.4, 127.8, 121.8, 120.5, 110.2, 62.2, 59.3, 26.2, 18.5.

3. CHI measurements

CHI measurements were done on a Gilson HPLC system with a photodiode array detector, an autosampler, and a Valco injector. Data acquisition and processing were performed with Trilution LC V3.0 software. Measurements were carried out at 20 ± 2 °C. A 5 μm Luna C18(2) column (50 × 4.6) purchased from Phenomenex was used. The mobile phase flow rate was 2 mL/min and the following program was applied for the elution: 0–0.2 min, 0% B; 0.2–2.7 min, 0–100% B; 2.7–3.2 min, 100% B; 3.2–3.4 min, 100–0% B; and 3.4–6.1 min, 0% B. Solvent A was 50 mM ammonium acetate (pH 7.4) in water, and solvent B was HPLC-grade acetonitrile (Sigma–Aldrich Chromasolv). The detection wavelengths were 254 and 230 nm.

First, a solution with 10 reference compounds with known CHI values was injected onto the HPLC to generate a calibration line from their retention times. The concentration of the mixture was 0.2 mg/mL for each compound and the injected volume was 3 μL. The test compounds were analyzed on the same system. The 10 mM DMSO stock solutions were diluted to 200 μM in acetonitrile/50 mM ammonium acetate, pH 7.4 (1/1 v/v). The linear regression equation of the calibration line was used to convert retention time of the test compounds to CHI values

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Brugère, J.-F.; Atkins, J. F.; O'Toole, P. W.; Borrel, G. Pyrrolysine in Archaea: A 22nd Amino Acid Encoded through a Genetic Code Expansion. *Emerging Top. Life Sci.* **2018**, *2* (4), 607–618.
- (2) Mai, X.; Huang, J.; Tan, J.; Huang, Y.; Chen, Y. Effects and Mechanisms of the Secondary Structure on the Antimicrobial Activity and Specificity of Antimicrobial Peptides: Secondary Structure of Antimicrobial Peptides. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21* (7), 561–568.
- (3) Zhang, M.; Zhao, J.; Zheng, J. Molecular Understanding of a Potential Functional Link between Antimicrobial and Amyloid Peptides. *Soft Matter* **2014**, *10* (38), 7425–7451.
- (4) Griebel, G.; Holsboer, F. Neuropeptide Receptor Ligands as Drugs for Psychiatric Diseases: The End of the Beginning? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (6), 462–478.
- (5) Ryan, C. A.; Pearce, G.; Scheer, J.; Moura, D. S. Polypeptide Hormones. *Plant Cell* **2002**, *14*, S251–S264.
- (6) Lei, J.; Sun, L.; Huang, S.; Zhu, C.; Li, P.; He, J.; Mackey, V.; Coy, D. H.; He, Q. The Antimicrobial Peptides and Their Potential Clinical Applications. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*(7): 3919–3931.
- (7) De Lucca, A. J.; Walsh, T. J. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. *ANTIMICROB. AGENTS CH.* **1999**, *43* (1), 1–11.
- (8) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2700–2707.
- (9) La Manna, S.; Di Natale, C.; Florio, D.; Marasco, D. Peptides as Therapeutic Agents for Inflammatory-Related Diseases. *Int. J. Med. Sci.* **2018**, *19* (9), 2714.
- (10) Usmani, S. S.; Bedi, G.; Samuel, J. S.; Singh, S.; Kalra, S.; Kumar, P.; Ahuja, A. A.; Sharma, M.; Gautam, A.; Raghava, G. P. S. THPdb: Database of FDA-Approved Peptide and Protein Therapeutics. *PLoS ONE* **2017**, *12* (7)
- (11) Lee, A. C.-L.; Harris, J. L.; Khanna, K. K.; Hong, J.-H. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. *IJMS* **2019**, *20* (10), 2383.
- (12) Patil, S. P.; Goswami, A.; Kalia, K.; Kate, A. S. Plant-Derived Bioactive Peptides: A Treatment to Cure Diabetes. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2020**, *26* (2), 955–968.
- (13) Ribarič, S. Peptides as Potential Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Molecules* **2018**, *23* (2), 283.
- (14) New, R.; Bogus, M.; Bansal, G. S.; Dryjska, M.; Zajkowska, K.; Burnet, M. Efficacy of Bioactive Cyclic Peptides in Rheumatoid Arthritis: Translation from *In Vitro* to *In Vivo* Models. *Molecules* **2017**, *22* (10), 1613.
- (15) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatskiy, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (1–2), 40–56.
- (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) Werle, M.; Bernkop-Schnürch, A. Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs. *J. Amino Acids* **2006**, *30* (4), 351–367.
- (18) Evans, B. J.; King, A. T.; Katsifis, A.; Matesic, L.; Jamie, J. F. Methods to Enhance the Metabolic Stability of Peptide-Based PET Radiopharmaceuticals. *Molecules* **2020**, *25* (10), 2314.
- (19) Th, J. Improving Stability of Peptide Drugs through Chemical Modifications. *Chim. Oggi* **2014**, *32*, 4.
- (20) Garton, M.; Nim, S.; Stone, T. A.; Wang, K. E.; Deber, C. M.; Kim, P. M. Method to Generate Highly Stable D-Amino Acid Analogs of Bioactive Helical Peptides Using a Mirror Image of the Entire PDB. *PNAS* **2018**, *115* (7), 1505–1510.
- (21) Tugyi, R.; Uray, K.; Ivan, D.; Fellingner, E.; Perkins, A.; Hudecz, F. Partial D-Amino Acid Substitution: Improved Enzymatic Stability and Preserved Ab Recognition of a MUC2 Epitope Peptide. *PNAS* **2005**, *102* (2), 413–418.
- (22) Cardoso, M. H.; Cândido, E. S.; Oshiro, K. G. N.; Rezende, S. B.; Franco, O. L. Peptides Containing d -Amino Acids and Retro-Inverso Peptides. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* **2018**, pp 131–155.
- (23) Rai, J. Peptide and Protein Mimetics by Retro and Retroinverso Analogs. *Chem. Biol. Drug Des.* **2019**, *93* (5), 724–736.
- (24) Adessi, C.; Soto, C. Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and Bioavailability. *CMC* **2002**, *9* (9), 963–978.
- (25) Goodwin, D.; Simerska, P.; Toth, I. Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity.

- CMC* **2012**, *19* (26), 4451–4461.
- (26) Johnson, D. B. F.; Takimoto, J. K.; Xu, J.; Wang, L. Unnatural Amino Acids to Investigate Biological Processes. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* **2008**, p 585.
- (27) Hook, D. F.; Bindschädler, P.; Mahajan, Y. R.; Šebesta, R.; Kast, P.; Seebach, D. The Proteolytic Stability of 'Designed' β -Peptides Containing α -Peptide-Bond Mimics and of Mixed α,β -Peptides: Application to the Construction of MHC-Binding Peptides. *C&B* **2005**, *2* (5), 591–632.
- (28) Obasse, I.; Taylor, M.; Fullwood, N. J.; Allsop, D. Development of Proteolytically Stable N-Methylated Peptide Inhibitors of Aggregation of the Amylin Peptide Implicated in Type 2 Diabetes. *Interface Focus* **2017**, *7* (6), 20160127.
- (29) Costa, S. P. G.; Maia, H. L. S.; Pereira-Lima, S. M. A. C-Terminal Amide Bond Stability of Peptides Containing α,α -Disubstituted Glycines. *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, *332*(1-2):43-50.
- (30) Asante, V.; Mortier, J.; Schlüter, H.; Kokscho, B. Impact of Fluorination on Proteolytic Stability of Peptides in Human Blood Plasma. *Bioorg. & Med. Chem.* **2013**, *21* (12), 3542–3546.
- (31) Merkel, L.; Budisa, N. Organic Fluorine as a Polypeptide Building Element: In Vivo Expression of Fluorinated Peptides, Proteins and Proteomes. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (36), 7241.
- (32) Buer, B. C.; Marsh, E. N. G. Fluorine: A New Element in Protein Design: Fluorine: A New Element in Protein Design. *Protein Science* **2012**, *21* (4), 453–462.
- (33) Salwiczek, M.; Nyakatura, E. K.; Gerling, U. I. M.; Ye, S.; Kokscho, B. Fluorinated Amino Acids: Compatibility with Native Protein Structures and Effects on Protein–Protein Interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2135–2171.
- (34) Meng, H.; Krishnaji, S. T.; Beinborn, M.; Kumar, K. Influence of Selective Fluorination on the Biological Activity and Proteolytic Stability of Glucagon-like Peptide-1. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (22), 7303–7307.
- (35) Martos-Maldonado, M. C.; Hjuler, C. T.; Sørensen, K. K.; Thygesen, M. B.; Rasmussen, J. E.; Villadsen, K.; Midtgaard, S. R.; Kol, S.; Schoffelen, S.; Jensen, K. J. Selective N-Terminal Acylation of Peptides and Proteins with a Gly-His Tag Sequence. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 3307.
- (36) Wu, Z.-C.; Isley, N. A.; Boger, D. L. N-Terminus Alkylation of Vancomycin: Ligand Binding Affinity, Antimicrobial Activity, and Site-Specific Nature of Quaternary Trimethylammonium Salt Modification. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4* (10), 1468–1474.
- (37) Moradi, S. V.; Hussein, W. M.; Varamini, P.; Simerska, P.; Toth, I. Glycosylation, an Effective Synthetic Strategy to Improve the Bioavailability of Therapeutic Peptides. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (4), 2492–2500.
- (38) Gazme, B.; Boachie, R. T.; Tsopmo, A.; Udenigwe, C. C. Occurrence, Properties and Biological Significance of Pyroglutamyl Peptides Derived from Different Food Sources. *Food Sci. and Human Wellness* **2019**, *8* (3), 268–274.
- (39) Brinckerhoff, L. H.; Kalashnikov, V. V.; Thompson, L. W.; Yamshchikov, G. V.; Pierce, R. A.; Galavotti, H. S.; Engelhard, V. H.; Slingluff, C. L. Terminal Modifications Inhibit Proteolytic Degradation of an Immunogenic Mart-127-35 Peptide: Implications for Peptide Vaccines. *Int. J. Cancer.* **1999**, *83*(3), 326-334.
- (40) Adessi, C.; Soto, C. Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and Bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9* (9), 963–978.
- (41) Goodwin, D.; Simerska, P.; Toth, I. Peptides as Therapeutics with Enhanced Bioactivity. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (26), 4451–4461.
- (42) Fominaya, J.; Bravo, J.; Rebollo, A. Strategies to Stabilize Cell Penetrating Peptides for in Vivo Applications. *Ther. Deliv.* **2015**, *6* (10), 1171–1194.
- (43) 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.
- (44) Begum, A.; Sujatha, D.; Prasad, K. V. S. R. G.; Bharathi, K. A Review on Azapeptides: The Promising Peptidomimetics. *Asian J. Chem.* **2017**, *29* (9), 1879–1887.
- (45) Roach, M.; Izaguirre, A. Goserelin Acetate in Combination with Radiotherapy for Prostate Cancer. *Expert Opin. Pharmac.* **2007**, *8* (2), 257–264.
- (46) 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. *PNAS* **1992**, *89* (20), 9367–9371.
- (47) Greco, I.; Hummel, B.; Vasir, J.; Watts, J.; Koch, J.; Hansen, J.; Nielsen, H.; Damborg, P.; Hansen, P. In Vitro ADME Properties of Two Novel Antimicrobial Peptoid-Based Compounds as Potential Agents against Canine Pyoderma. *Molecules* **2018**, *23* (3), 630.
- (48) Kruijtzter, J. A. W.; Nijenhuis, W. A. J.; Wanders, N.; Gispen, W. H.; Liskamp, R. M. J.; Adan, R. A. H. Peptoid–Peptide Hybrids as Potent Novel Melanocortin Receptor Ligands. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (13), 4224–4230.

- (49) Moss, M. Peptoids: Emerging Therapeutics for Neurodegeneration. *J Neurol Neuromedicine* **2017**, *2* (7), 1–5.
- (50) Kölmel, D. K.; Hörner, A.; Rönicke, F.; Nieger, M.; Schepers, U.; Bräse, S. Cell-Penetrating Peptoids: Introduction of Novel Cationic Side Chains. *Eur. J. Med.Chem.* **2014**, *79*, 231–243.
- (51) T. Dohm, M.; Kapoor, R.; E. Barron, A. Peptoids: Bio-Inspired Polymers as Potential Pharmaceuticals. *CPD* **2011**, *17* (25), 2732–2747.
- (52) Horne, W. S. Peptide and Peptoid Foldamers in Medicinal Chemistry. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6* (12), 1247–1262.
- (53) Zuckermann, R. N.; Kodadek, T. Peptoids as Potential Therapeutics. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2009** Jun;11(3):299-307.
- (54) Fremaux, J.; Venin, C.; Mauran, L.; Zimmer, R. H.; Guichard, G.; Goudreau, S. R. Peptide-Oligourea Hybrids Analogue of GLP-1 with Improved Action in Vivo. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 924.
- (55) Roy, S.; Ghosh, P.; Ahmed, I.; Chakraborty, M.; Naiya, G.; Ghosh, B. Constrained α -Helical Peptides as Inhibitors of Protein-Protein and Protein-DNA Interactions. *Biomedicines* **2018**, *6* (4), 118.
- (56) Bernal, F.; Katz, S. G. Synthesis of Stabilized Alpha-Helical Peptides. In *Cancer Genomics and Proteomics*; Wajapeyee, N., Ed.; *Methods Mol. Biol.* **2014**, Vol. 1176, pp 107–114.
- (57) Gentilucci, L.; De Marco, R.; Cerisoli, L. Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization. *CPD* **2010**, *16* (28), 3185–3203.
- (58) Mathur, D.; Prakash, S.; Anand, P.; Kaur, H.; Agrawal, P.; Mehta, A.; Kumar, R.; Singh, S.; Raghava, G. P. S. PEPLife: A Repository of the Half-Life of Peptides. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 36617.
- (59) 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.
- (60) Khoo, K. K.; Wilson, M. J.; Smith, B. J.; Zhang, M.-M.; Gulyas, J.; Yoshikami, D.; Rivier, J. E.; Bulaj, G.; Norton, R. S. Lactam-Stabilized Helical Analogues of the Analgesic μ -Conotoxin KIIIA. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (21), 7558–7566.
- (61) Tala, S. R.; Singh, A.; Lensing, C. J.; Schnell, S. M.; Freeman, K. T.; Rocca, J. R.; Haskell-Luevano, C. 1,2,3-Triazole Rings as a Disulfide Bond Mimetic in Chimeric AGRP-Melanocortin Peptides: Design, Synthesis, and Functional Characterization. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9* (5), 1001–1013.
- (62) Peraro, L.; Siegert, T. R.; Kritzer, J. A. Conformational Restriction of Peptides Using Dithiol Bis-Alkylation. *Meth. Enzymol.* **2016**, Vol. 580, pp 303–332.
- (63) Chu, Q.; Moellering, R. E.; Hilinski, G. J.; Kim, Y.-W.; Grossmann, T. N.; Yeh, J. T.-H.; Verdine, G. L. Towards Understanding Cell Penetration by Stapled Peptides. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6* (1), 111–119.
- (64) Walensky, L. D. Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix. *Science* **2004**, *305* (5689), 1466–1470.
- (65) 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.
- (66) Bailon, P.; Won, C.-Y. PEG-Modified Biopharmaceuticals. *Expert Opin. on Drug Del.* **2009**, *6* (1), 1–16.
- (67) Li, Z.; Jia, L.; Guo, L.; Yu, M.; Sun, X.; Nie, W.; Fu, Y.; Rao, C.; Wang, J.; Luo, Y. Pharmacokinetics of PEGylated Recombinant Human Endostatin (M2ES) in Rats. *Acta Pharmacol Sin* **2015**, *36* (7), 847–854.
- (68) Kang, J. S.; DeLuca, P. P.; Lee, K. C. Emerging PEGylated Drugs. *Expert Opin. Emerg. Dr.* **2009**, *14* (2), 363–380.
- (69) Schilling, B.; Vaubel, J.; Schadendorf, D. Adjuvant Pegylated Interferon α -2b Therapy for Melanoma. *Oncol. Lett.* **2010**, *1* (2), 237–241.
- (70) Hermanson, T.; Bennett, C. L.; Macdougall, I. C. Peginesatide for the Treatment of Anemia Due to Chronic Kidney Disease – an Unfulfilled Promise. *Expert Opin. Drug Saf.* **2016**, *15* (10), 1421–1426.
- (71) Zorzi, A.; Linciano, S.; Angelini, A. Non-Covalent Albumin-Binding Ligands for Extending the Circulating Half-Life of Small Biotherapeutics. *Med. Chem. Commun.* **2019**, *10* (7), 1068–1081.
- (72) Liu, Z.; Chen, X. Simple Bioconjugate Chemistry Serves Great Clinical Advances: Albumin as a Versatile Platform for Diagnosis and Precision Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (5), 1432–1456.
- (73) Stoddart, C. A.; Nault, G.; Galkina, S. A.; Thibaudeau, K.; Bakis, P.; Bousquet-Gagnon, N.; Robitaille, M.; Bellomo, M.; Paradis, V.; Liscourt, P.; Lobach, A.; Rivard, M.-È.; Ptak, R. G.

- Mankowski, M. K.; Bridon, D.; Quraishi, O. Albumin-Conjugated C34 Peptide HIV-1 Fusion Inhibitor: equipotent to C34 and T-20 in vitro with sustained activity in scid-hu THY/LIV mice. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (49), 34045–34052.
- (74) Sun, L. Human Serum Albumin (HSA) and Its Applications as a Drug Delivery Vehicle. *Health Sci. J.* **2020**, *14* (2), 8.
- (75) Bech, E. M.; Pedersen, S. L.; Jensen, K. J. Chemical Strategies for Half-Life Extension of Biopharmaceuticals: Lipidation and Its Alternatives. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (7), 577–580.
- (76) Van der Vusse, G. J. Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2009**, *24* (4), 300–307.
- (77) Lee, S.; Lee, D. Y. Glucagon-like Peptide-1 and Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2017**, *22* (1), 15.
- (78) Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How Many Drug Targets Are There? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (12), 993–996.
- (79) Garay, R. P.; El-Gewely, R.; Armstrong, J. K.; Garratty, G.; Richette, P. Antibodies against Polyethylene Glycol in Healthy Subjects and in Patients Treated with PEG-Conjugated Agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9* (11), 1319–1323.
- (80) Zhang, P.; Sun, F.; Liu, S.; Jiang, S. Anti-PEG Antibodies in the Clinic: Current Issues and beyond PEGylation. *J. Controlled Release* **2016**, *244*, 184–193.
- (81) Hoang Thi, T. T.; Pilkington, E. H.; Nguyen, D. H.; Lee, J. S.; Park, K. D.; Truong, N. P. The Importance of Poly(Ethylene Glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers* **2020**, *12* (2), 298.
- (82) Dawgul, M.; Greber, K.; Bartoszevska, S.; Baranska-Rybak, W.; Sawicki, W.; Kamysz, W. In Vitro Evaluation of Cytotoxicity and Permeation Study on Lysine- and Arginine-Based Lipopeptides with Proven Antimicrobial Activity. *Molecules* **2017**, *22* (12), 2017.
- (83) Greber, K. E.; Ciura, K.; Belka, M.; Kawczak, P.; Nowakowska, J.; Bączek, T.; Sawicki, W. Characterization of Antimicrobial and Hemolytic Properties of Short Synthetic Cationic Lipopeptides Based on QSAR/QSTR Approach. *J. Amino Acids* **2018**, *50* (3–4), 479–485.
- (84) Liapakis, G.; Cordomi, A.; Pardo, L. The G-Protein Coupled Receptor Family: Actors with Many Faces. *CPD* **2012**, *18* (2), 175–185.
- (85) Baek, K.; Schulman, B. A. Molecular Glue Concept Solidifies. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16* (1), 2–3.
- (86) 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.
- (87) Zhao, Q.; Wu, B. Ice Breaking in GPCR Structural Biology. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33* (3), 324–334.
- (88) Palczewski, K. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **2000**, *289* (5480), 739–745.
- (89) Pándy-Szekeres, G.; Munk, C.; Tsonkov, T. M.; Mordalski, S.; Harpsøe, K.; Hauser, A. S.; Bojarski, A. J.; Gloriam, D. E. GPCRdb in 2018: Adding GPCR Structure Models and Ligands. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (D1), D440–D446.
- (90) Hu, G.-M.; Mai, T.-L.; Chen, C.-M. Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 15495.
- (91) Ciancetta, A.; Sabbadin, D.; Federico, S.; Spalluto, G.; Moro, S. Advances in Computational Techniques to Study GPCR–Ligand Recognition. *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, *36* (12), 878–890.
- (92) Betke, K. M.; Wells, C. A.; Hamm, H. E. GPCR Mediated Regulation of Synaptic Transmission. *Prog. Neurobiol.* **2012**, *96* (3), 304–321.
- (93) Sébert, M.; Sola-Tapias, N.; Mas, E.; Barreau, F.; Ferrand, A. Protease-Activated Receptors in the Intestine: Focus on Inflammation and Cancer. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 717.
- (94) Wadman, M. ‘Biased’ Opioids Could Yield Safer Pain Relief. *Science* **2017**, *358* (6365), 847–848.
- (95) Hauser, A. S.; Chavali, S.; Masuho, I.; Jahn, L. J.; Martemyanov, K. A.; Gloriam, D. E.; Babu, M. M. Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell* **2018**, *172* (1–2), 41–54.
- (96) Ghanemi, A. Targeting G Protein Coupled Receptor-Related Pathways as Emerging Molecular Therapies. *Saudi Pharm. J.* **2015**, *23* (2), 115–129.
- (97) Wendell, S. G.; Fan, H.; Zhang, C. G Protein-Coupled Receptors in Asthma Therapy: Pharmacology and Drug Action. *Pharmacol. Rev.* **2020**, *72* (1), 1–49.
- (98) Luo, J.; Sun, P.; Siwko, S.; Liu, M.; Xiao, J. The Role of GPCRs in Bone Diseases and Dysfunctions. *Bone Res.* **2019**, *7* (1), 19.
- (99) Wang, J.; Gareri, C.; Rockman, H. A. G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circ. Res.* **2018**, *123* (6), 716–735.

- (100) O'Dowd, B. F.; Heiber, M.; Chan, A.; Heng, H. H. Q.; Tsui, L.-C.; Kennedy, J. L.; Shi, X.; Petronis, A.; George, S. R.; Nguyen, T. A Human Gene That Shows Identity with the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome 11. *Gene* **1993**, *136* (1–2), 355–360.
- (101) Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M.-X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Fujino, M. Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem. and Bioph. Res. Co.* **1998**, *251* (2), 471–476.
- (102) Cheng, J.; Luo, X.; Huang, Z.; Chen, L. Apelin/APJ System: A Potential Therapeutic Target for Endothelial Dysfunction-related Diseases. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234* (8), 12149–12160.
- (103) Scimia, M. C.; Hurtado, C.; Ray, S.; Metzler, S.; Wei, K.; Wang, J.; Woods, C. E.; Purcell, N. H.; Catalucci, D.; Akasaka, T.; Bueno, O. F.; Vlasuk, G. P.; Kaliman, P.; Bodmer, R.; Smith, L. H.; Ashley, E.; Mercola, M.; Brown, J. H.; Ruiz-Lozano, P. APJ Acts as a Dual Receptor in Cardiac Hypertrophy. *Nature* **2012**, *488* (7411), 394–398.
- (104) Roberts, E. M.; Newson, M. J. F.; Pope, G. R.; Landgraf, R.; Lolait, S. J.; O'Carroll, A.-M. Abnormal Fluid Homeostasis in Apelin Receptor Knockout Mice. *J. Endocrinol.* **2009**, *202* (3), 453–462.
- (105) 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), R13–R35.
- (106) Falcone, C. APJ Polymorphisms in Coronary Artery Disease Patients with and without Hypertension. *Mol. Med. Rep.* **2011**.
- (107) Huang, Z.; He, L.; Chen, Z.; Chen, L. Targeting Drugs to APJ Receptor: From Signaling to Pathophysiological Effects. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234* (1), 61–74.
- (108) Margathe, J.-F.; Iturrioz, X.; Alvear-Perez, R.; Marsol, C.; Riché, S.; Chabane, H.; Tounsi, N.; Kuhry, M.; Heissler, D.; Hibert, M.; Llorens-Cortes, C.; Bonnet, D. Structure–Activity Relationship Studies toward the Discovery of Selective Apelin Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (7), 2908–2919.
- (109) 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.
- (110) Huang, Z.; He, L.; Chen, Z.; Chen, L. Targeting Drugs to APJ Receptor: From Signaling to Pathophysiological Effects. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234* (1), 61–74.
- (111) Zhang, J.; Zhou, Y.; Wu, C.; Wan, Y.; Fang, C.; Li, J.; Fang, W.; Yi, R.; Zhu, G.; Li, J.; Wang, Y. Characterization of the Apelin/Elabela Receptors (APLNR) in Chickens, Turtles, and Zebrafish: Identification of a Novel Apelin-Specific Receptor in Teleosts. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 756.
- (112) Chapman, N. A.; Dupré, D. J.; Rainey, J. K. The Apelin Receptor: Physiology, Pathology, Cell Signalling, and Ligand Modulation of a Peptide-Activated Class A GPCR. *Biochem. Cell Biol.* **2014**, *92* (6), 431–440.
- (113) Shin, K.; Kenward, C.; Rainey, J. K. Apelinergic System Structure and Function. In *Compr. Physiol.* **2017**, pp 407–450.
- (114) 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.
- (115) 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.
- (116) Rajagopal, K.; Whalen, E. J.; Violin, J. D.; Stiber, J. A.; Rosenberg, P. B.; Premont, R. T.; Coffman, T. M.; Rockman, H. A.; Lefkowitz, R. J. β -Arrestin2-Mediated Inotropic Effects of The Angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *PNAS* **2006**, *103*(44), 16284–9.
- (117) Azizi, M.; Iturrioz, X.; Blanchard, A.; Peyrard, S.; De Mota, N.; Chartrel, N.; Vaudry, H.; Corvol, P.; Llorens-Cortes, C. Reciprocal Regulation of Plasma Apelin and Vasopressin by Osmotic Stimuli. *JASN* **2008**, *19* (5), 1015–1024.
- (118) Iturrioz X.; Alvear-Perez R.; De Mota N.; Franchet C.; Guillier F.; Leroux V.; Dabire H.; Le Jouan M.; Chabane H.; Gerbier R.; Bonnet D.; Berdeaux A.; Maigret B.; Galzi J.; Hibert M.; and Llorens-Cortes C. Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first non peptidic apeline receptor agonist. *FASEB J.* **2010**, *24*, 1506–1517.
- (119) Narayanan, S.; Harris, D. L.; Maitra, R.; Runyon, S. P. Regulation of the Apelinergic System and Its Potential in Cardiovascular Disease: Peptides and Small Molecules as Tools for Discovery: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (20), 7913–7927.

- (120) Szokodi, I.; Tavi, P.; Földes, G.; Voutilainen-Myllylä, S.; Ilves, M.; Tokola, H.; Pikkarainen, S.; Piuhola, J.; Rysä, J.; Tóth, M.; Ruskoaho, H. Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circ. Res.* **2002**, *91* (5), 434–440.
- (121) Lv, S.-Y.; Cui, B.; Chen, W.-D.; Wang, Y.-D. Apelin/APJ System: A Key Therapeutic Target for Liver Disease. *Oncotarget* **2017**, *8* (67).
- (122) Zhou, Q.; Cao, J.; Chen, L. Apelin/APJ System: A Novel Therapeutic Target for Oxidative Stress-Related Inflammatory Diseases (Review). *Int. J. of Mol. Med.* **2016**, *37* (5), 1159–1169.
- (123) Castan-Laurell, I.; Masri, B.; Valet, P. The Apelin/APJ System as a Therapeutic Target in Metabolic Diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* **2019**, *23* (3), 215–225.
- (124) 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.
- (125) 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.
- (126) Castan-Laurell, I.; Dray, C.; Attané, C.; Duparc, T.; Knauf, C.; Valet, P. Apelin, Diabetes, and Obesity. *Endocrine* **2011**, *40* (1), 1–9.
- (127) Sawane, M.; Kajiya, K.; Kidoya, H.; Takagi, M.; Muramatsu, F.; Takakura, N. Apelin Inhibits Diet-Induced Obesity by Enhancing Lymphatic and Blood Vessel Integrity. *Diabetes* **2013**, *62* (6), 1970–1980.
- (128) 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.
- (129) Yu, X.-H.; Tang, Z.-B.; Liu, L.-J.; Qian, H.; Tang, S.-L.; Zhang, D.-W.; Tian, G.-P.; Tang, C.-K. Apelin and Its Receptor APJ in Cardiovascular Diseases. *Clin. Chim. Acta* **2014**, *428*, 1–8.
- (130) Wu, D.; He, L.; Chen, L. Apelin/APJ System: A Promising Therapy Target for Hypertension. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41* (10), 6691–6703.
- (131) Narayanan, S.; Harris, D. L.; Maitra, R.; Runyon, S. P. Regulation of the Apelinergic System and Its Potential in Cardiovascular Disease: Peptides and Small Molecules as Tools for Discovery: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (20), 7913–7927.
- (132) Llorens-Cortès, C.; Beaudet, A. L'apéline, un inhibiteur naturel de l'effet antidiurétique de la vasopressine. *Med. Sci.* **2005**, *21* (8–9), 741–746.
- (133) Berry, M. F. Apelin Has In Vivo Inotropic Effects on Normal and Failing Hearts. *Circulation* **2004**, *110* (11), II-187-II-193.
- (134) 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.
- (135) Sekerci, R.; Acar, N.; Tepekoy, F.; Ustunel, I.; Keles-Celik, N. Apelin/APJ Expression in the Heart and Kidneys of Hypertensive Rats. *Acta Histochem* **2018**, *120* (3), 196–204.
- (136) Besserer-Offroy, É.; Bérubé, P.; Côté, J.; Murza, A.; Longpré, J.-M.; Dumaine, R.; Lesur, O.; Auger-Messier, M.; Leduc, R.; Marsault, É.; Sarret, P. The Hypotensive Effect of Activated Apelin Receptor Is Correlated with β -Arrestin Recruitment. *Pharmacol. Res.* **2018**, *131*, 7–16.
- (137) Mughal, A.; O'Rourke, S. T. Vascular Effects of Apelin: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Pharmacology & Therapeutics* **2018**, *190*, 139–147.
- (138) Gerbier, R.; Alvear-Perez, R.; Margathe, J.; Flahault, A.; Couvineau, P.; Gao, J.; De Mota, N.; Dabire, H.; Li, B.; Ceraudo, E.; Hus-Citharel, A.; Esteouille, L.; Bisoo, C.; Hibert, M.; Berdeaux, A.; Iturrioz, X.; Bonnet, D.; Llorens-Cortes, C. Development of Original Metabolically Stable Apelin-17 Analogs with Diuretic and Cardiovascular Effects. *FASEB J.* **2017**, *31* (2), 687–700.
- (139) 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.
- (140) Fukamizu. Evaluation of Novel Cyclic Analogues of Apelin. *Int. J. Mol. Med.* **1998**, *22* (4).
- (141) Fischer, C.; Lamer, T.; Wang, W.; McKinnie, S. M. K.; Iturrioz, X.; Llorens-Cortes, C.; Oudit, G. Y.; Vederas, J. C. Plasma Kallikrein Cleaves and Inactivates Apelin-17: Palmitoyl- and PEG-Extended Apelin-17 Analogs as Metabolically Stable Blood Pressure-Lowering Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 119–124.
- (142) Mahrous, M. Review: Fluorine in Medicinal Chemistry. **2014**, 1-15
- (143) Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (21), 8315–8359.
- (144) Mei, H.; Han, J.; Fustero, S.; Medio-Simon, M.; Sedgwick, D. M.; Santi, C.; Ruzziconi, R.;

- Soloshonok, V. A. Fluorine-Containing Drugs Approved by the FDA in 2018. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (51), 11797–11819.
- (145) Viel, T.; Boisgard, R.; Kuhnast, B.; Jego, B.; Siquier-Pernet, K.; Hinnen, F.; Dolle, F.; Tavitian, B. Molecular Imaging Study on *In Vivo* Distribution and Pharmacokinetics of Modified Small Interfering RNAs (SiRNAs). *Oligonucleotides* **2008**, *18* (3), 201–212.
- (146) Bolo, N. Brain Pharmacokinetics and Tissue Distribution *In Vivo* of Fluvoxamine and Fluoxetine by Fluorine Magnetic Resonance Spectroscopy. *Neuropsychopharmacol.* **2000**, *23* (4), 428–438.
- (147) 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*, S38461.
- (148) Meinert, H.; Knoblich, A. The Use of Semifluorinated Alkanes in Blood-Substitutes. *Biomat. Artif. Cell Im.* **1993**, *21* (5), 583–595.
- (149) Remy, B.; Deby-Dupont, G.; Lamy, M. Red Blood Cell Substitutes: Fluorocarbon Emulsions and Haemoglobin Solutions. *Brit. Med. Bull.* **1999**, *55* (1), 277–298.
- (150) Spahn, D. R. Blood Substitutes Artificial Oxygen Carriers: Perfluorocarbon Emulsions. *Crit. Care.* 1999; *3*(5), R93–R97.
- (151) Spahn, D. R.; van Brempt, 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.
- (152) Hequet, E.; Henoumont, C.; Muller, R. N.; Laurent, S. Fluorinated MRI Contrast Agents and Their Versatile Applications in the Biomedical Field. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (10), 1157–1175.
- (153) Ahrens, E. T.; Zhong, J. *In Vivo* MRI Cell Tracking Using Perfluorocarbon Probes and Fluorine-19 Detection: *In vivo* cell tracking using ¹⁹F MRI. *NMR Biomed.* **2013**, *26* (7), 860–871.
- (154) Ahrens, E. T.; Helfer, B. M.; O'Hanlon, C. F.; Schirda, C. Clinical Cell Therapy Imaging Using a Perfluorocarbon Tracer and Fluorine-19 MRI: Clinical Cell Therapy. *Magn. Reson. Med.* **2014**, *72* (6), 1696–1701.
- (155) 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.
- (156) 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.
- (157) Malik, L.; Nygaard, J.; Hoiberg-Nielsen, R.; Arleth, L.; Hoeg-Jensen, T.; Jensen, K. J. Perfluoroalkyl Chains Direct Novel Self-Assembly of Insulin. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 593–
- (158) Riess, J. G. Understanding the Fundamentals of Perfluorocarbons and Perfluorocarbon Emulsions Relevant to *In Vivo* Oxygen Delivery. *Artif. Cell Blood Sub.* **2005**, *33* (1), 47–63.
- (159) Langelan, 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.
- (160) Gerbier, R.; Leroux, V.; Couvineau, P.; Alvear-Perez, R.; Maignet, 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.
- (161) Iturrioz, X.; Gerbier, R.; Leroux, V.; Alvear-Perez, R.; Maignet, 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.
- (162) Fischer, E.; Fourneau, E. Ueber einige Derivate des Glykocolls. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34* (2), 2868–2877.
- (163) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- (164) Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *J. Amino Acids* **2018**, *50* (1), 39–68.
- (165) Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 16.
- (166) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (2), 97–116.
- (167) Murza, A.; Belleville, K.; Longpré, J.-M.; Sarret, P.; Marsault, É. Stability and Degradation Patterns of Chemically Modified Analogs of Apelin-13 in Plasma and Cerebrospinal Fluid: Patterns of Chemically Modified Analogs of Apelin-13. *Biopolymers* **2014**, *102* (4), 297–303.
- (168) 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.; Oudit, G. Y. Angiotensin-Converting Enzyme 2

- Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertension* **2016**, *68* (2), 365–377.
- (169) McKinnie, S. M. K.; Fischer, C.; Tran, K. M. H.; Wang, W.; Mosquera, F.; Oudit, G. Y.; Vederas, J. C. The Metalloprotease Nephilysin Degrades and Inactivates Apelin Peptides. *ChemBioChem* **2016**, *17* (16), 1495–1498.
- (170) Buck, R. C.; Franklin, J.; Berger, U.; Conder, J. M.; Cousins, I. T.; de Voogt, P.; Jensen, A. A.; Kannan, K.; Mabury, S. A.; van Leeuwen, S. P. Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2011**, *7* (4), 513–541.
- (171) Schlummer, M.; Sölch, C.; Meisel, T.; Still, M.; Gruber, L.; Wolz, G. Emission of Perfluoroalkyl Carboxylic Acids (PFCA) from Heated Surfaces Made of Polytetrafluoroethylene (PTFE) Applied in Food Contact Materials and Consumer Products. *Chemosphere* **2015**, *129*, 46–53.
- (172) Powley, C. R.; Michalczyk, M. J.; Kaiser, M. A.; Buxton, L. W. Determination of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) Extractable from the Surface of Commercial Cookware under Simulated Cooking Conditions by LC/MS/MS. *Analyst* **2005**, *130* (9), 1299.
- (173) Suja, F.; Pramanik, B. K.; Zain, S. Md. Contamination, Bioaccumulation and Toxic Effects of Perfluorinated Chemicals (PFCs) in the Water Environment: A Review Paper. *Water Sci. Technol.* **2009**, *60* (6), 1533–1544.
- (174) Land, M.; de Wit, C. A.; Cousins, I. T.; Herzke, D.; Johansson, J.; Martin, J. W. What Is the Effect of Phasing out Long-Chain per- and Polyfluoroalkyl Substances on the Concentrations of Perfluoroalkyl Acids and Their Precursors in the Environment? A Systematic Review Protocol. *Environ. Evid.* **2015**, *4* (1), 3.
- (175) Wang, P.; Lu, Y.; Su, H.; Su, C.; Johnson, A. C.; Yu, L.; Jenkins, A. Managing Health Risks of Perfluoroalkyl Acids in Aquatic Food from a River-Estuary-Sea Environment Affected by Fluorochemical Industry. *Environ. Int.* **2020**, *138*, 105621.
- (176) Post, G. B.; Cohn, P. D.; Cooper, K. R. Perfluorooctanoic Acid (PFOA), an Emerging Drinking Water Contaminant: A Critical Review of Recent Literature. *Environ. Res.* **2012**, *116*, 93–117.
- (177) Rotander, A.; Kärman, A.; Bavel, B. van; Polder, A.; Rigét, F.; Auðunsson, G. A.; Víkingsson, G.; Gabrielsen, G. W.; Bloch, D.; Dam, M. Increasing Levels of Long-Chain Perfluorocarboxylic Acids (PFCAs) in Arctic and North Atlantic Marine Mammals, 1984–2009. *Chemosphere* **2012**, *86* (3), 278–285.
- (178) Steenland, K.; Fletcher, T.; Savitz, D. A. Epidemiologic Evidence on the Health Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Environ. Health Perspect* **2010**, *118* (8), 1100–1108.
- (179) Goeden, H. M.; Greene, C. W.; Jacobus, J. A. A Transgenerational Toxicokinetic Model and Its Use in Derivation of Minnesota PFOA Water Guidance. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2019**, *29* (2), 183–195.
- (180) Cui, L.; Zhou, Q.; Liao, C.; Fu, J.; Jiang, G. Studies on the Toxicological Effects of PFOA and PFOS on Rats Using Histological Observation and Chemical Analysis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *56* (2), 338–349.
- (181) Pérez, F.; Nadal, M.; Navarro-Ortega, A.; Fàbrega, F.; Domingo, J. L.; Barceló, D.; Farré, M. Accumulation of Perfluoroalkyl Substances in Human Tissues. *Environ. Int.* **2013**, *59*, 354–362.
- (182) Sznajder-Katarzyńska, K.; Surma, M.; Cieślík, I. A Review of Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) in Terms of Sources, Applications, Human Exposure, Dietary Intake, Toxicity, Legal Regulation, and Methods of Determination. *J. Chem.* **2019**, *2019*, 1–20.
- (183) Besserer-Offroy, É.; Bérubé, P.; Côté, J.; Murza, A.; Longpré, J.-M.; Dumaine, R.; Lesur, O.; Auger-Messier, M.; Leduc, R.; Marsault, É.; Sarret, P. The Hypotensive Effect of Activated Apelin Receptor Is Correlated with β -Arrestin Recruitment. *Pharmacol. Res.* **2018**, *131*, 7–16.
- (184) Katugampola, S. D.; Maguire, J. J.; Matthewson, S. R.; Davenport, A. P. [¹²⁵I]-(Pyr¹)Apelin-13 Is a Novel Radioligand for Localizing the APJ Orphan Receptor in Human and Rat Tissues with Evidence for a Vasoconstrictor Role in Man. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132* (6), 1255–1260.
- (185) Ramanoudjame, S. M.; Esteouille, L.; Riché, S.; Margathe, J.-F.; Durroux, T.; Karpenko, I. A.; Bonnet, D. Chemoselective Acylation of Hydrazinopeptides to Access Fluorescent Probes for Time-Resolved FRET Assays on GPCRs. In *G Protein-Coupled Receptor Signaling. Methods Mol. Biol.* **2019** Vol. 1947, pp 137–147.
- (186) 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.

- (187) Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (14), 5061–5084.
- (188) Ciancetta, A.; Jacobson, K. A. Breakthrough in GPCR Crystallography and Its Impact on Computer-Aided Drug Design. In *Computational Methods for GPCR Drug Discovery. Methods Mol. Biol.* **2018**, Vol. 1705, pp 45–72.
- (189) Sand, K. M. K.; Bern, M.; Nilsen, J.; Noordzij, H. T.; Sandlie, I.; Andersen, J. T. Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. *Front. Immunol.* **2015**, 5.
- (190) Habert-Ortoli, E.; Amiranoff, B.; Loquet, I.; Laburthe, M.; Mayaux, J. F. Molecular Cloning of a Functional Human Galanin Receptor. *PNAS* **1994**, 91 (21), 9780–9783.
- (191) Schmidt, W. E.; Kratzin, H.; Eckart, K.; Drevs, D.; Mundkowsky, G.; Clemens, A.; Katsoulis, S.; Schafer, H.; Gallwitz, B.; Creutzfeldt, W. Isolation and Primary Structure of Pituitary Human Galanin, a 30-Residue Nonamidated Neuropeptide. *PNAS* **1991**, 88 (24), 11435–11439.
- (192) Tatemoto, K.; Rökaeus, Å.; Jörnvall, H.; McDonald, T. J.; Mutt, V. Galanin - a Novel Biologically Active Peptide from Porcine Intestine. *FEBS Letters* **1983**, 164 (1), 124–128.
- (193) Smith, K. E.; Forray, C.; Walker, M. W.; Jones, K. A.; Tamm, J. A.; Bard, J.; Branchek, T. A.; Linemeyer, D. L.; Gerald, C. Expression Cloning of a Rat Hypothalamic Galanin Receptor Coupled to Phosphoinositide Turnover. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (39), 24612–24616.
- (194) Smith, K. E.; Walker, M. W.; Artymyshyn, R.; Bard, J.; Borowsky, B.; Tamm, J. A.; Yao, W.-J.; Vaysse, P. J.-J.; Branchek, T. A.; Gerald, C.; Jones, K. A. Cloned Human and Rat Galanin GALR3 Receptors: Pharmacology and activation of a G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (36), 23321–23326.
- (195) Waters, S. M.; Krause, J. E. Distribution of Galanin-1, -2 and -3 Receptor Messenger RNAs in Central and Peripheral Rat Tissues. *Neuroscience* **1999**, 95 (1), 265–271.
- (196) Branchek, T. A.; Smith, K. E.; Gerald, C.; Walker, M. W. Galanin Receptor Subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, 21 (3), 109–117.
- (197) Hohmann, J. G.; Jureus, A.; Teklemichael, D. N.; Matsumoto, A. M.; Clifton, D. K.; Steiner, R. A. Distribution and Regulation of Galanin Receptor 1 Messenger RNA in the Forebrain of Wild Type and Galanin-Transgenic Mice. *Neuroscience* **2003**, 117 (1), 105–117.
- (198) Burazin, T. C. D.; Larm, J. A.; Ryan, M. C.; Gundlach, A. L. Galanin-R1 and -R2 Receptor mRNA Expression during the Development of Rat Brain Suggests Differential Subtype Involvement in Synaptic Transmission and Plasticity: Gal-R1 and Gal-R2 mRNA Localization in Developing Rat Brain. *European J. Neurosci.* **2000**, 12 (8), 2901–2917.
- (199) Lang, R.; Gundlach, A.; Kofler, B. The Galanin Peptide Family: Receptor Pharmacology, Pleiotropic Biological Actions, and Implications in Health and Disease. *Pharmacol. & Therapeut.* **2007**, 115 (2), 177–207.
- (200) Lu, X.; Ross, B.; Sanchez-Alavez, M.; Zorrilla, E. P.; Bartfai, T. Phenotypic Analysis of GalR2 Knockout Mice in Anxiety- and Depression-Related Behavioral Tests. *Neuropeptides* **2008**, 42 (4), 387–397.
- (201) Rustay, N. R.; Wrenn, C. C.; Kinney, J. W.; Holmes, A.; Bailey, K. R.; Sullivan, T. L.; Harris, A. P.; Long, K. C.; Saavedra, M. C.; Starosta, G.; Innerfield, C. E.; Yang, R. J.; Dreiling, J. L.; Crawley, J. N. Galanin Impairs Performance on Learning and Memory Tasks: Findings from Galanin Transgenic and GAL-R1 Knockout Mice. *Neuropeptides* **2005**, 39 (3), 239–243.
- (202) Jurkowski, W.; Yazdi, S.; Elofsson, A. Ligand Binding Properties of Human Galanin Receptors. *Mol. Memb. Biol.* **2013**, 30 (2), 206–216.
- (203) Webling, K. E. B.; Runesson, J.; Bartfai, T.; Langel, Ü. Galanin Receptors and Ligands. *Front. Endocrin.* **2012**, 3.
- (204) Sollenberg, U. E.; Runesson, J.; Sillard, R.; Langel, Ü. Binding of Chimeric Peptides M617 and M871 to Galanin Receptor Type 3 Reveals Characteristics of Galanin Receptor-Ligand Interaction. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2010**, 16 (1), 17–22.
- (205) Saar, I.; Runesson, J.; McNamara, I.; Järv, J.; Robinson, J. K.; Langel, Ü. Novel Galanin Receptor Subtype Specific Ligands in Feeding Regulation. *Neuroch. Int.* **2011**, 58 (6), 714–720.
- (206) Smith, K. E.; Walker, M. W.; Artymyshyn, R.; Bard, J.; Borowsky, B.; Tamm, J. A.; Yao, W.-J.; Vaysse, P. J.-J.; Branchek, T. A.; Gerald, C.; Jones, K. A. Cloned Human and Rat Galanin GALR3 Receptors: pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (36), 23321–23326.
- (207) Swanson, C. J.; Blackburn, T. P.; Zhang, X.; Zheng, K.; Xu, Z.-Q. D.; Hokfelt, T.; Wolinsky, T. D.; Konkel, M. J.; Chen, H.; Zhong, H.; Walker, M. W.; Craig, D. A.; Gerald, C. P. G.; Branchek, T. A. From The Cover: Anxiolytic- and Antidepressant-like Profiles of the Galanin-3 Receptor (Gal3) Antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299. *PNAS* **2005**, 102 (48), 17489–17494.

- (208) 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.
- (209) 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.
- (210) 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* (1), 21453.
- (211) Gu, L.; Ma, Y.; Gu, M.; Zhang, Y.; Yan, S.; Li, N.; Wang, Y.; Ding, X.; Yin, J.; Fan, N.; Peng, Y. Spexin Peptide Is Expressed in Human Endocrine and Epithelial Tissues and Reduced after Glucose Load in Type 2 Diabetes. *Peptides* **2015**, *71*, 232–239.
- (212) Hodges, S. K.; Teague, A. M.; Dasari, P. S.; Short, K. R. Effect of Obesity and Type 2 Diabetes, and Glucose Ingestion on Circulating Spexin Concentration in Adolescents. *Pediatr. Diabetes* **2018**, *19* (2), 212–216.
- (213) Kumar, S.; Hossain, M. J.; Javed, A.; Kullo, I. J.; Balagopal, P. B. Relationship of Circulating Spexin with Markers of Cardiovascular Disease: A Pilot Study in Adolescents with Obesity: Spexin and CVD Risk in Adolescents. *Pediatr. Obes.* **2018**, *13* (6), 374–380.
- (214) Behrooz, M.; Vaghef-Mehrabany, E.; Ostadrahimi, A. Different Spexin Level in Obese vs Normal Weight Children and Its Relationship with Obesity Related Risk Factors. *Nutr. Metab. and Cardiovas.* **2019**, S0939475319304211.
- (215) Yun, S.; Reyes-Alcaraz, A.; Lee, Y.-N.; Yong, H. J.; Choi, J.; Ham, B.-J.; Sohn, J.-W.; Kim, D.-H.; Son, G. H.; Kim, H.; Kwon, S.-G.; Kim, D. S.; Kim, B. C.; Hwang, J.-I.; Seong, J. Y. Spexin-Based Galanin Receptor Type 2 Agonist for Comorbid Mood Disorders and Abnormal Body Weight. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 391.
- (216) Toll, L.; Khroyan, T. V.; Sonmez, K.; Ozawa, A.; Lindberg, I.; McLaughlin, J. P.; Eans, S. O.; Shahienand, 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.
- (217) Ma, A.; Bai, J.; He, M.; Wong, A. O. L. Spexin as a Neuroendocrine Signal with Emerging Functions. *General and Comparative Endocrinology* **2018**, *265*, 90–96.
- (218) Al-Daghri, N. M.; Alenad, A.; Al-Hazmi, H.; Amer, O. E.; Hussain, S. D.; Alokail, M. S. Spexin Levels Are Associated with Metabolic Syndrome Components. *Dis. Markers* **2018**, *2018*, 1–5.
- (219) Al-Daghri, N. M.; Al-Hazmi, H. A.; Al-Ajlan, A.; Masoud, M. S.; Al-Amro, A.; Al-Ghamdi, A.; Alnaami, A. M.; Al-Attas, O. S.; Alokail, M. S. Associations of Spexin and Cardiometabolic Parameters among Women with and without Gestational Diabetes Mellitus. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *25* (4), 710–714.
- (220) Al-Daghri, N. M.; Wani, K.; Yakout, S. M.; Al-Hazmi, H.; Amer, O. E.; Hussain, S. D.; Sabico, S.; Ansari, M. G. A.; Al-Musharaf, S.; Alenad, A. M.; Alokail, M. S.; Clerici, M. Favorable Changes in Fasting Glucose in a 6-Month Self-Monitored Lifestyle Modification Programme Inversely Affects Spexin Levels in Females with Prediabetes. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 9454.
- (221) Karaca, A.; Bakar-Ates, F.; Ersoz-Gulcelik, N. Decreased Spexin Levels in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes. *Med. Princ. Pract.* **2018**, *27* (6), 549–554.
- (222) Lv, S.-Y.; Cui, B.; Yang, Y.; Du, H.; Zhang, X.; Zhou, Y.; Ye, W.; Nie, X.; Li, Y.; Wang, Q.; Chen, W.-D.; Wang, Y.-D. Spexin/NPQ Induces FBJ Osteosarcoma Oncogene (Fos) and Produces Antinociceptive Effect against Inflammatory Pain in the Mouse Model. *Am. J. Pathol.* **2019**, *189* (4), 886–899.
- (223) Moazen, P.; Taherianfard, M.; Ahmadi Soleimani, M.; Norozpor, M. Synergistic Effect of Spexin and Progesterone on Pain Sensitivity Attenuation in Ovariectomized Rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2018**, *45* (4), 349–354.
- (224) Muzykantov, V. R. Drug Delivery by Red Blood Cells: Vascular Carriers Designed by Mother Nature. *Expert Opin. Drug Del.* **2010**, *7* (4), 403–427.
- (225) Villa, C. H.; Pan, D. C.; Zaitsev, S.; Cines, D. B.; Siegel, D. L.; Muzykantov, V. R. Delivery of Drugs Bound to Erythrocytes: New Avenues for an Old Intravascular Carrier. *Ther. Del.* **2015**, *6* (7), 795–826.
- (226) Biagiotti, S.; Paoletti, M. F.; Fraternali, A.; Rossi, L.; Magnani, M. Drug Delivery by Red Blood Cells. *IUBMB Life* **2011**, *63* (8), 621–631.
- (227) Epps, D. E.; Raub, T. J.; Caiolfa, V.; Chiari, A.; Zamai, M. Determination of the Affinity of Drugs toward Serum Albumin by Measurement of the Quenching of the Intrinsic Tryptophan Fluorescence of the Protein. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51* (1), 41–48.
- (228) Ghisaidoobe, A.; Chung, S. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and

- Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *IJMS* **2014**, *15* (12), 22518–22538.
- (229) Pieters, R. J.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J. Application of the 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Chemical Biology: Approaches Toward Multivalent Carbohydrates and Peptides and Peptide-Based Polymers. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (11–12), 1181–1190.
- (230) Li, H.; Aneja, R.; Chaiken, I. Click Chemistry in Peptide-Based Drug Design. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9797–9817. <https://doi.org/10.3390/molecules18089797>.
- (231) de Araújo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. Diels–Alder Ligation of Peptides and Proteins. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (23), 6095–6109.
- (232) Zorzi, A.; Middendorp, S. J.; Wilbs, J.; Deyle, K.; Heinis, C. Acylated Heptapeptide Binds Albumin with High Affinity and Application as Tag Furnishes Long-Acting Peptides. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 16092.
- (233) 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.
- (234) Yang, H.; Vasudevan, S.; Oriakhi, C.; Shields, J.; Carter, R. Scalable Synthesis of Lissamine Rhodamine B Sulfonyl Chloride and Incorporation of Xanthene Derivatives onto Polymer Supports. *Synthesis* **2008**, *2008* (6), 957–961.
- (235) Golovanov, A. P.; Hautbergue, G. M.; Wilson, S. A.; Lian, L.-Y. A Simple Method for Improving Protein Solubility and Long-Term Stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8933–8939.
- (236) Trevino, S. R.; Scholtz, J. M.; Pace, C. N. Amino Acid Contribution to Protein Solubility: Asp, Glu, and Ser Contribute More Favorably than the Other Hydrophilic Amino Acids in RNase Sa. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366* (2), 449–460.
- (237) Knowles, D. B.; Shkel, I. A.; Phan, N. M.; Sternke, M.; Lingeman, E.; Cheng, X.; Cheng, L.; O'Connor, K.; Record, M. T. Chemical Interactions of Polyethylene Glycols (PEGs) and Glycerol with Protein Functional Groups: Applications to Effects of PEG and Glycerol on Protein Processes. *Biochemistry* **2015**, *54* (22), 3528–3542.
- (238) Kramer, R. M.; Shende, V. R.; Motl, N.; Pace, C. N.; Scholtz, J. M. Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility. *Biophys. J.* **2012**, *102* (8), 1907–1915.
- (239) Ensing, B.; Tiwari, A.; Tros, M.; Hunger, J.; Domingos, S. R.; Pérez, C.; Smits, G.; Bonn, M.; Bonn, D.; Woutersen, S. On the Origin of the Extremely Different Solubilities of Polyethers in Water. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 2893.
- (240) Zsila, F.; Bikadi, Z.; Malik, D.; Hari, P.; Pechan, I.; Berces, A.; Hazai, E. Evaluation of Drug–Human Serum Albumin Binding Interactions with Support Vector Machine Aided Online Automated Docking. *Bioinformatics* **2011**, *27* (13), 1806–1813.
- (241) Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P. The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin. *IUBMB Life* **2005**, *57* (12), 787–796.
- (242) Veseli, A.; Žakelj, S.; Kristl, A. A Review of Methods for Solubility Determination in Biopharmaceutical Drug Characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2019**, *45* (11), 1717–1724.
- (243) Valko, K.; Abraham, M. H. Rapid Method for the Estimation of Octanol/Water Partition Coefficient (Log P_{ow}) from Gradient RP-HPLC Retention and a Hydrogen Bond Acidity Term ($\Sigma\alpha_2H$). *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*(9), 1137–1146.
- (244) Valkó, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to Log P/Log D. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (11), 2022–2029.
- (245) Montgomery, J. E.; Donnelly, J. A.; Fanning, S. W.; Speltz, T. E.; Shangguan, X.; Coukos, J. S.; Greene, G. L.; Moellering, R. E. Versatile Peptide Macrocyclization with Diels–Alder Cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (41), 16374–16381.
- (246) Pagel, M.; Meier, R.; Braun, K.; Wiessler, M.; Beck-Sickinger, A. G. On-Resin Diels–Alder Reaction with Inverse Electron Demand: An Efficient Ligation Method for Complex Peptides with a Varying Spacer to Optimize Cell Adhesion. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (21), 4809–4816.
- (247) Blackwell, H. E.; Sadowsky, J. D.; Howard, R. J.; Sampson, J. N.; Chao, J. A.; Steinmetz, W. E.; O'Leary, D. J.; Grubbs, R. H. Ring-Closing Metathesis of Olefinic Peptides: Design, Synthesis, and Structural Characterization of Macrocyclic Helical Peptides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (16), 5291–5302.
- (248) Masuda, S.; Tsuda, S.; Yoshiya, T. Ring-Closing Metathesis of Unprotected Peptides in Water. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (48), 9364–9367.

- (249) Robinson, A. J.; Elaridi, J.; Van Lierop, B. J.; Mujcinovic, S.; Jackson, W. R. Microwave-Assisted RCM for the Synthesis of Carbocyclic Peptides. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13* (4), 280–285.
- (250) Reja, R. M.; Sunny, S.; Gopi, H. N. Chemoselective Nitrile Oxide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions from Nitroalkane-Tethered Peptides. *Org. Lett.* **2017**, *19* (13), 3572–3575.
- (251) Colombo, M.; Bianchi, A. Click Chemistry for the Synthesis of RGD-Containing Integrin Ligands. *Molecules* **2010**, *15* (1), 178–197.
- (252) Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. 1,2,3-Triazoles as Peptide Bond Isosteres: Synthesis and Biological Evaluation of Cyclotetrapeptide Mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (6), 971.
- (253) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry: Applications of the 1,3-Dipolar Cycloaddition between Azides and Alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28* (2), 278–308.
- (254) Huisgen R. 1,3 dipolar cycloaddition. *Proceedings of the chemical society*, **1961**
- (255) Nwe, K.; Brechbiel, M. W. Growing Applications of “Click Chemistry” for Bioconjugation in Contemporary Biomedical Research. *Cancer Biother. Radio.* **2009**, *24* (3), 289–302.
- (256) Ahmad Fuaad, A.; Azmi, F.; Skwarczynski, M.; Toth, I. Peptide Conjugation via CuAAC ‘Click’ Chemistry. *Molecules* **2013**, *18* (11), 13148–13174.
- (257) Claerhout, S.; Ermolat’ev, D. S.; Van der Eycken, E. V. A New Colorimetric Test for Solid-Phase Amines and Thiols. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10* (4), 580–585.
- (258) Boas, U.; Mirsharghi, S. Color Test for Selective Detection of Secondary Amines on Resin and in Solution. *Org. Lett.* **2014**, *16* (22), 5918–5921.
- (259) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Analytical Biochemistry* **1981**, *117* (1), 147–157.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structures des acides aminés protéinogènes.	18
Figure 2 : Structures secondaires des peptides ³ .	19
Figure 3 : Implication variée des peptides dans les maladies ⁹ .	20
Figure 4 : Comparaison des propriétés des petites molécules et des peptides ⁹ .	22
Figure 5 : Dégradation des peptides les rendant inactifs.	23
Figure 6 : Stratégies de stabilisations des peptides ¹⁶ .	24
Figure 7 : Structures générales des acides aminés L et D.	24
Figure 8 : Structures du L-peptide, D-peptide, retro et retro-inversé ¹ .	25
Figure 9 : Familles d'acides aminés non naturels ²⁶ .	26
Figure 10 : Protections des extrémités du peptide.	27
Figure 11 : Structure d'un peptide et d'un azapeptide.	28
Figure 12 : Structure d'un peptide et d'un peptoïde.	29
Figure 13 : structure de l'hybride peptide/peptoïde (A) et du peptoïde (B) antimicrobiens ⁴⁷ .	29
Figure 14 : Structure d'un peptide et d'un peptide-oligourée.	30
Figure 15 : Différentes stratégies de cyclisation des peptides (Bio-Synthesis).	31
Figure 16 : Formation d'une agrafe hydrocarbonée (et résidus non naturels impliqués) pour stabiliser une hélice alpha ⁶³ .	32
Figure 17 : Principe de l'augmentation de la stabilité des peptides par introduction de groupements PEG ⁶⁸ .	34
Figure 18 : Polysaccharides classiquement utilisés pour la stabilisation de peptides et protéines ⁶⁵ .	35
Figure 19 : Représentation tridimensionnelle de l'albumine humaine et mise en évidence des différents sous unités et sites de liaison aux médicaments ⁷¹ .	36
Figure 20 : Liaison covalente d'un composé actif à l'albumine ⁷² .	37
Figure 21 : Liaison non covalente des peptides à l'albumine ⁷⁵ .	37
Figure 22 : Structure du liraglutide.	38
Figure 23 : Stratégie de développement classique pour la conception de peptides thérapeutiques ⁷⁸ .	39
Figure 24 : Structure générale des RCPG de classe A ⁹¹ .	44
Figure 25 : Principales voies de signalisations des RCPG : les couplages aux protéines G et aux protéines arrestines.	45
Figure 26 : Effets des agonistes, agonistes partiels et antagonistes (A) et effets d'une action simultanée d'un agoniste et antagoniste (B) sur l'activation du RCPG.	46
Figure 27 : Ligand classique et biaisé du récepteur μ opioïde ⁹⁴ .	46
Figure 28 : Maturation et isoformes actifs du peptide apeline.	48
Figure 29 : Signalisation du système apeline/APJ impliqués dans la diurèse et le système cardiovasculaire.	49
Figure 30 : Implication de l'apeline dans le mécanisme de diurèse ¹³² .	50
Figure 31 : Implication de l'apeline dans le diabète et l'obésité ¹²⁶ .	50
Figure 32 : Implication du système APJ/apeline dans le domaine cardiovasculaire.	51
Figure 33 : Mécanisme de l'effet hypotenseur de l'apeline-13 ¹³⁶ .	51
Figure 34 : Structure de l'apeline-17 modifiée en C-terminale par de résidus non naturels (violet) et par une chaîne palmitique en N-terminale (R) ¹⁴¹ .	54
Figure 35 : Structures des molécules perfluorées utilisées dans le développement de substituts sanguins.	56
Figure 36 : Structures des fluoro-insulines.	57
Figure 37 : Stratégie de stabilisation des peptides ligands de RCPG par introduction d'une chaîne fluorocarbonée.	58
Figure 38 : Structure de l'apeline et de la F8-apeline.	59
Figure 39 : Structure générale des familles principales d'agents de couplages peptidiques.	60
Figure 40 : Evaluation du caractère pro-inflammatoire de l'apeline et de la F8-apeline sur des cellules RAW 264,7.	62
Figure 41 : Evaluation in vivo de la diminution de pression artérielle après administration de l'apeline et de la F8-apeline dans un modèle de rat normotendu.	63
Figure 42 : Sites de coupure enzymatiques de la pyr-apelin-13 par les enzymes ACE-2 (rouge) et NEP (bleu).	64
Figure 43 : Sites de coupure enzymatiques de l'apeline-17 par les enzymes ACE-2 (rouge), NEP (bleu) et Kallikrein (violet).	65

Figure 44 : Evaluation de la stabilité enzymatique de l'apeline et de la F8-apeline en présence de l'enzyme ACE-2.	65
Figure 45 : Structure du peptide Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH substrat de l'enzyme ACE-2.	66
Figure 46 : Evaluation de la stabilité enzymatique du peptide substrat de l'enzyme	66
Figure 47 : Etude des interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires par microscopie confocale sur des cellules HEK 293 dont le noyau est marqué au Hoechst (bleu) et incubés avec les sondes fluorescentes (rouge) 18 (A), 20 (B), et 21 (C) et 22 (D) à 50 μ M.	80
Figure 48 : Evaluation du pouvoir hémolytique des composés 1 , 4 et 6 dans le PBS sur des globules rouges humains.	81
Figure 49 : Principe de l'étude de la formation de micelles ou agrégats.	83
Figure 50 : Principe de l'étude de la liaison aux protéines plasmatiques des fluoro-peptides par anisotropie de fluorescence.	85
Figure 51 : Anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés 18 à 21 .	85
Figure 52 : Corrélation entre les propriétés de liaison à l'albumine et la stabilité plasmatique des fluoro-apelines.	87
Figure 53 : Structure de la HSA et identifications des sites de liaison aux médicaments et ligands les plus fréquents ¹⁸⁹ .	88
Figure 54 Structures cristallographiques des complexes fluoro-apelines 4 et 6 avec l'albumine humaine.	88
Figure 55: Evaluation in vivo de la diminution de pression artérielle après administration intraveineuse des composés 4 (rouge) et 6 (vert) dans un modèle de rat normotendu.	89
Figure 56 : Evolution de la concentration plasmatique des composés 1 , 4 et 6 chez la souris après administration intraveineuse à 300 nmol/kg.	91
Figure 57 : Résidus clés du domaine de liaison au ligand des récepteurs GalR1, GalR2 et GalR3 ²⁰² .	98
Figure 58 : Homologies de séquences des spexines 1 et 2 retrouvés chez l'Homme (Hu), le Léopard Anole (An), le Poulet (Ch), le Xenopus (Xe), le Coelacanth (Coel), le Poisson Zèbre (Zf), le Médaka (Md), l'Épinoche (St) et le Tétrodon (To) ²⁰⁹ .	100
Figure 59 : Implications de la spexine dans différents axes thérapeutiques ²¹⁷ .	100
Figure 60 : Activation des signalisations intracellulaires des récepteurs de la galanine par les peptides galanine (GAL) et spexine (SPX) ²¹⁵ .	101
Figure 61 : Identification des résidus importants de la spexine sur l'activation de GalR2 et GalR3.	101
Figure 62 : Comparaison des séquences de la galanine humaine (Gal (Hu)) et de la spexine humaine (Spx (Hu)) et résidus communs (rose) ²⁰⁹ .	102
Figure 63 : Structure de la F8-spexine.	103
Figure 64 : Effet analgésique de la spexine et F8-spexine après administration intracérébroventriculaire.	104
Figure 65 : Effet analgésique de la spexine (Spx) et F8-spexine (F8-spx) après administration intrapéritonéale.	105
Figure 66 : Structures des métabolites de la spexine observés dans le plasma de souris à 25 μ M.	107
Figure 67: Formation au cours du temps des métabolites dérivés de la spexine dans le plasma de souris à 0,25 μ M.	107
Figure 68 : Formation des métabolites dérivés de la F8-spexine dans le plasma de souris à 0,25 μ M.	108
Figure 69 : Stabilités plasmatiques du composé 26 à différentes concentrations dans le plasma de souris.	114
Figure 70: Structure des composés 31 à 41 .	117
Figure 71 : Site de clivage principal de la F4-RGR-spexine (compos 33) é dans le plasma de souris.	122
Figure 72 : Formation de la spexine à partir des fluoro-RGR-spexines 33 à 35 dans le plasma de souris.	122
Figure 73 : Evaluation des propriétés hémolytiques des composés 23 , 27 , 35 et 30 dans le PBS.	124
Figure 74 : Evaluation des propriétés hémolytiques des composés 23 , 27 , 35 et 30 dans le PBS / 1% BSA.	125
Figure 75 : Evaluation de l'activité in vivo des composés 26 (orange), 27 (gris), 29 (bleu) et 38 (vert) et AUC (aires sous la courbe) des quatre composés à chaque dose, de la référence à 2,7 μ mol/kg (gris) et des animaux traités au CFA uniquement (rouge) dans un modèle de douleur inflammatoire après administration intrapéritonéale.	128
Figure 76 : Evolution de la concentration plasmatique du composé 27 chez la souris après une administration intra-péritonéale à 4,5 μ mol / kg.	131
Figure 77 : Stratégie de synthèse des fluoro-peptides en solution.	138

Figure 78 : Utilisation d'un motif fluorescent en remplacement du peptide. _____	139
Figure 79 : Optimisation du TPFc et du motif fluorescent. _____	139
Figure 80 : Evaluation des modèles fluorescents par anisotropie de fluorescence. _____	142
Figure 81 : Anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés 42 à 44 et 46 . _____	143
Figure 82 : Structure des composés 47 à 54 . _____	144
Figure 83 : Anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés 47 à 54 . _____	147
Figure 84 : Comparaison des anisotropies normalisée en fonction de la concentration en BSA des composés 44 et 49 . _____	148
Figure 85 : Structure des composés 55 à 62 . _____	149
Figure 86 : Corrélation entre les temps de rétention et la nature du motif fluorocarboné. _____	151
Figure 87 : Comparaison des anisotropies normalisées en fonction de la concentration en BSA des composés 55 et 62 . _____	151
Figure 88 : Corrélation entre l'affinité pour la BSA et la nature du motif fluorocarboné. _____	153
Figure 89 : Structures des TPFc choisis pour être introduits sur un peptide modèle. _____	153
Figure 90 : Droite d'étalonnage des CHI obtenue à partir des molécules de référence. _____	154
Figure 91 : Structure de l'azido-spexine. _____	156
Figure 92 : Structure des quatre TPFcs à introduire sur la spexine. _____	156
Figure 93 : Structure du TPFc fluorescent attendu. _____	165
Figure 94 : Structure du TPFc F8-Glu(TRIS)-Tyr-Glu(TRIS). _____	165
Figure 95 : Structure du TRIS protégé par des TBDMS 77 . _____	166
Figure 96 : Structures des tétrapeptides modèles. _____	169

TABLES DE TABLEAUX

Tableau 1 : Noms et indications thérapeutiques des principaux peptides médicaments.	21
Tableau 2 : Caractérisations pharmacologiques de l'apeline et de la F8-apeline.	62
Tableau 3 : Comparaison de la structure de la chaîne bioaccumulée APFO et de la chaîne F8 utilisée dans le cadre de la stabilisation plasmatique de peptides.	68
Tableau 4 : Structures, rendements et temps de rétentions des composés 1 à 8 .	70
Tableau 5 : Temps de demi-vie plasmatique des fluoro-apelines et apeline dans du plasma humain.	71
Tableau 6 : Evaluations pharmacologiques des fluoro-apelines optimisées.	73
Tableau 7 : Viabilité cellulaire des composés 1, 4, 5 et 6 à 30 μ M.	74
Tableau 8 : Rendements et temps de rétention des hydrazinopeptides 13 à 17 .	78
Tableau 9 : Caractérisation chimique des sondes fluorescentes 18 à 22 .	79
Tableau 10 : Coefficient de partage sanguin des composés 4 et 6 .	82
Tableau 11 : Détermination des K_d de liaison à l'albumine des sondes fluorescentes 18 à 21 par anisotropie de fluorescence.	85
Tableau 12 : Fraction liée à l'albumine bovine des composés 18, 20 et 21 .	86
Tableau 13 : Paramètres pharmacocinétiques du composé 1, 4 et 6 .	91
Tableau 14 : Mécanismes physiologiques impliquant les récepteurs GalR1, GalR2 et GalR3 ²⁰³ .	98
Tableau 15 : Caractérisation de la spexine et du fluoro-peptide F8-spexine.	103
Tableau 16 : Structures, rendements et temps de rétentions des composés 23 à 30 .	111
Tableau 17 : Activité fonctionnelle in vitro et temps de demi-vie plasmatiques de la spexine et des fluoro-spexines.	113
Tableau 18 : Comparaison des peptides spexine, F8-spexine et F8-RGR-spexine.	116
Tableau 19 : Structures, rendements et temps de rétentions des composés 31 à 41 .	118
Tableau 20 : Activité fonctionnelle et temps de demi-vie plasmatique des composés 31 à 41 .	120
Tableau 21 : Formation de la spexine à partir des fluoro-RGR-spexines 33 à 35 dans le plasma de souris.	123
Tableau 22 : Coefficient de partage sanguin des composés 23, 26, 27, 29, 35 et 38 .	126
Tableau 23 : Moyennes des AUC totales de l'efficacité in vivo des composés 26, 27, 29 et 38 .	129
Tableau 24 : Caractérisation in vitro des composés 26, 27, 29 et 38 .	130
Tableau 25 : Paramètres pharmacocinétiques du composé 27 .	132
Tableau 26 : Rendements et temps de rétention des composés 42 à 44 .	141
Tableau 27 : Affinité des composés 42 à 44 et 46 pour la BSA.	143
Tableau 28 : Rendements et temps de rétention des composés 44 et 47 à 52 .	145
Tableau 29 : Affinité des composés 44 et 47 à 52 pour la BSA.	147
Tableau 30 : Rendements et temps de rétention des composés 49, 50, 53, 54 et 55 à 62 .	150
Tableau 31 : Affinités des composés 49, 50 et 53 à 62 pour la BSA.	152
Tableau 32 : CHI des composés 49, 50, 53 et 54 .	155
Tableau 33 : Rendements et temps de rétention des composés 63 à 67 .	158
Tableau 34 : Optimisation de la cycloaddition entre le composé 63 et 67 pour former le composé 68 .	160
Tableau 35 : Rendements et temps de rétention des composés 68 à 71 .	161
Tableau 36 : Stabilité plasmatique et activité fonctionnelle des dérivés de la spexine synthétisés en solution.	161
Tableau 37 : Conditions de synthèse du composé 75 .	164
Tableau 38 : Conditions de déprotection du TPFc F8-Glu(TRIS)-Tyr-Glu(TRIS).	166
Tableau 39 : Evaluation de la stabilité du composé 78 dans les conditions de couplage avec le Fmoc-Glu-OBz.	167
Tableau 40 : Rendements et temps de rétention des composés 84 et 85 .	171

TABLES DES SCHEMAS

Schéma 1 : Principe de synthèse des peptides sur support solide en stratégie Fmoc/tBu.	60
Schéma 2 : Schéma de synthèse de l'apeline et de la F8-apeline sur support solide.	61
Schéma 3 : Synthèse des fluoro-apelines sur support solide.	69
Schéma 4 : Principe de l'acylation chimiosélective pour la synthèse de peptides fluorescents.	75
Schéma 5 : Synthèse de l'acide aminé protégé 12 .	76
Schéma 6 : Synthèse des hydrazinopeptides R-K(hdz)-apelines 13 à 17 .	77
Schéma 7 : Acylation chimio-sélective des hydrazino-peptides pour former les sondes fluorescentes 18 à 22 .	79
Schéma 8 : Synthèses des composés 23 à 30 .	110
Schéma 9 : Synthèse sur support solide des dérivés fluorescents 42 à 44 .	140
Schéma 10 : Synthèse du composé 46 ²³⁴ .	142
Schéma 11 : Synthèse des quatre TPFc à introduire sur la spexine.	157
Schéma 12 : Synthèse de l'azido-spexine 67 .	158
Schéma 13 : Synthèse des fluoro-peptides 68 à 71 en solution.	159
Schéma 14 : Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OAc) ₃)-OH 77 .	163
Schéma 15 : Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Glu(TRIS(OTBDMS) ₃)-OH.	167
Schéma 16 : Schéma de synthèse des acides aminés 80 et 83 .	168
Schéma 17 : Schéma de synthèse des peptides modèles 84 et 85 .	170

Synthèse de nouveaux conjugués fluorocarbonés pour augmenter la stabilité métabolique de peptides thérapeutiques ciblant les récepteurs couplés aux protéines G : application aux peptides apeline et spexine, étude mécanistique et évaluation biologique.

Résumé

Les peptides présentent un fort potentiel thérapeutique. En revanche, leur faible stabilité dans l'organisme rend leur étude et leur développement difficiles. Afin d'améliorer la stabilité plasmatique de peptides, il a été développé au laboratoire une nouvelle stratégie qui consiste en l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée dans la séquence d'un peptide. Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les mécanismes conduisant à cette augmentation de stabilité dans le cas de l'apeline, un peptide possédant un intérêt potentiel pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Cette stratégie de stabilisation a également été appliquée à la spexine, peptide ayant des propriétés analgésiques intéressantes. Ainsi, des études de relations structure-activité autour de ces peptides ont permis de montrer l'importance de la longueur et de la nature de la chaîne fluorocarbonée. Ce travail a également permis de concevoir de nouveaux dérivés biocompatibles à fort potentiel thérapeutique. Nous avons également développé une stratégie originale de synthèse des fluoro-peptides en solution par une réaction de bioconjugaison.

Mots-clefs : fluoro-peptides, RCPG, stabilité plasmatique, ADME, thérapie.

Abstract

Peptide are macromolecules presenting a high therapeutic potential. The main limitation for their study and development as therapeutics is their low plasma stability. In order to increase therapeutic peptides' stability, a novel strategy based on the incorporation of a fluorocarbon chain into the peptide's sequence has been developed in the laboratory. During this thesis, we studied the mechanism leading to this stability on a model peptide involved in cardiovascular diseases: apeline-17. This method has also been applied to spexine, a promising peptide in pain regulation. Structure-activity relationship studies on those two peptides showed the importance of the fluorocarbon chain length and its nature. These studies allowed the development of new biocompatible fluoro-peptides showing a high therapeutic potential. We also developed an original solution phase fluoro-peptide synthesis strategy using a bioconjugation reaction fluoro-peptide synthesis strategy.

Key words: fluoro-peptides, GPCR, plasma stability, ADME, therapy