

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
UMR 7200 – Laboratoire d’Innovation Thérapeutique

THÈSE présentée par :

Arthur LAURENT

soutenue le : **30 Mars 2023**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie biologique & thérapeutique

**Conception, synthèse et évaluation
biologique de nouveaux neuropeptides
photoactivables impliqués dans la
modulation de la douleur**

THÈSE dirigée par :

M. BONNET Dominique

Docteur, CNRS/Université de Strasbourg

M. SIMONIN Frédéric

Docteur, CNRS/Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. ACHER Francine

Docteur, CNRS/Université Paris-Cité

M. GOUDET Cyril

Docteur, CNRS/INSERM/Université de Montpellier

INVITÉE :

Mme. KARPENKO Julie

Docteur, Université de Strasbourg

Table des matières

Remerciements	9
Liste des abréviations	13
Introduction Contexte et Objectifs.....	17
Contexte.....	19
1. La douleur, entre physiologie et pathologie.....	19
1.1 Définition, épidémiologie & classification	19
1.1.1 Définition	19
1.1.2 Classification.....	19
1.1.3 Epidémiologie & impact socio-économique	21
1.2 Mécanismes physiopathologiques	22
1.2.1 Généralités.....	22
1.2.2 Modulation de la douleur.....	25
1.2.3 Pathologie.....	26
1.3 Prise en charge thérapeutique	27
2. Les récepteurs couplés aux protéines G, acteurs essentiels de la nociception	28
2.1 Structure et classification.....	29
2.2 Signalisation	31
2.2.1 Activation.....	31
2.2.2 Voies de signalisations	32
2.3 Le marché pharmaceutique des RCPGs	33
3. Les récepteurs de la galanine (GalRs)	34
3.1 Généralités	34
3.2 Voies de signalisations	35
3.3 Ligands.....	37

3.4 Biodistribution & rôles biologiques	42
4. La spexine comme nouvel outil d'étude de GalR₂.....	44
4.1 Découverte & structure.....	44
4.2 Synthèse endogène	47
4.3 Rôles.....	49
4.3.1 Biodistribution	49
4.3.2 Rôles	50
4.3.2.1 Métabolisme énergétique (diabète, obésité & alimentation)	50
4.3.2.2 Fonctions endocrines.....	52
4.3.2.3 Douleur.....	53
4.3.2.4 Autres.....	54
4.4 Relations Structure – Activité (RSA).....	55
5. La photopharmacologie comme outil pour nous éclairer sur le vivant.....	57
5.1 De l'optogénétique à la photopharmacologie.....	57
5.2 La photoisomérisation, une approche réversible	59
5.2.1 Principe	59
5.2.2 Les motifs photoisomérisables.....	61
5.2.3 Les azobenzènes	62
5.2.3.1 Propriétés spectroscopiques.....	62
5.2.3.2 Mécanisme d'isomérisation.....	65
5.2.3.3 La modulation chimique des azobenzènes pour en améliorer les propriétés	66
5.2.4 Les peptides photoisomérisables	68
5.3 Le photoclivage, une méthode irréversible.....	70
5.3.1 Principe	70
5.3.2 Les groupements protecteurs photolabiles (GPPs)	73
5.3.2.1 Généralités.....	73
5.3.2.2 Ortho-nitrobenzyle (o-NB).....	74
5.3.2.3 Coumarine.....	77
5.3.2.4 Utilisation de GPPs dans le domaine du visible et au-delà.....	80
5.3.3 Les acides aminés et peptides photocage	83

Objectifs des travaux de thèse	85
CHAPITRE 1 : Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés photoisomérisables de la spexine.....	87
1. Conception de la spexine photoisomérisable	89
1.1 Insertion du motif photoisomérisable en tant que chaîne latérale d'un acide aminé (motif AzoF)	92
1.2 Insertion du motif photoisomérisable au sein de la séquence peptidique (motif AMPP)	93
1.3 Insertion du motif photoisomérisable sous forme d'agrafe (motif BCA)	97
2. Evaluation des propriétés photophysiques des peptides photoisomérisables	102
3. Evaluation de la structuration de la spexine et de ses dérivés agrafés	109
4. Evaluation biologique fonctionnelle des peptides photoisomérisables sur cellules HEK-GalR₂	111
5. Conclusion & perspectives	115
CHAPITRE 2 : Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés photocages de la spexine.....	119
1. Conception et synthèse des acides aminés photocages pour l'introduction dans la spexine	121
1.1 Dérivés de la tyrosine	123
1.1.1 Synthèse de la tyrosine protégée par l'ortho-nitrobenzyle.....	124
1.1.2 Synthèse de la tyrosine protégée par la coumarin-4-ylméthyle	126
1.2 Dérivé de la lysine	135
2. Evaluation du photoclivage des peptides photocage.....	136
3. Evaluation biologique fonctionnelle des peptides photocage sur GalR₂	140
4. Développement d'un nouveau groupement photoclivable dérivé du fluorophore Nile Red.....	142
4.1 Le Nile red, un fluorophore sensible à son environnement.....	142
4.2 Synthèse et étude du photoclivage du Nile red.....	145
5. Conclusion et Perspectives.....	150

Conclusion générale	153
Experimental part	159
1. General methods.....	161
1.1 General methods for solution phase synthesis	161
1.1.1 Starting materials and reagents.....	161
1.1.2 Chemical synthesis monitoring.....	161
1.1.3 Chemical purification.....	161
1.1.4 Chemical characterization.....	162
1.2 General method for peptide synthesis	162
1.2.1 Reagents.....	162
1.2.2 Manual solid phase peptide synthesis.....	163
1.2.2.1 Method A.....	163
1.2.2.2 Method B.....	163
1.2.3 Automated solid phase peptide synthesis.....	164
1.2.4 Monitoring of solid phase peptide synthesis reactions	164
1.2.4.1 Colorimetric tests.....	164
1.2.4.2 Microcleavage tests.....	165
1.2.5 Peptide cleavage and deprotection.....	165
1.2.6 Peptide purification.....	166
1.3 Photophysical characterization	166
1.4 Cell line culture*.....	166
2. Chapter 1: Design, synthesis and biological evaluation of photoswitch spexine derivatives	167
2.1 Chemical synthesis.....	167
2.2 Peptide synthesis.....	173
2.3 Molecular modelling*.....	184
2.3.1 3D structure of the spexine and of the spexine with the stapled azobenzene photoswitch motif	184
2.3.2 Modelling of the photoswitch stapled spexine derivatives with GalR ₂	185

2.4	Isomerisation of photoswitchable peptides.....	185
2.5	Circular dichroism*.....	186
2.6	Evaluation of the functional activity of photoswitched peptides on GalR ₂ **.....	186
2.6.1	<i>Cells preparation</i>	187
2.6.2	<i>Compounds preparation</i>	187
2.6.2.1	<i>Method A</i>	187
2.6.2.2	<i>Method B</i>	187
2.6.3	<i>Measurement</i>	188
2.6.4	<i>Data analysis</i>	188
3.	Chapter 2: Design, synthesis and biological evaluation of photocage spexin derivatives	189
3.1	Chemical synthesis.....	189
3.2	Peptide synthesis.....	209
3.3	Photocleavage of photocaged peptides.....	210
3.4	Evaluation of the functional activity of photocaged peptides on GalR ₂ *	211
3.4.1	<i>Cells preparation</i>	211
3.4.2	<i>Compounds preparation</i>	212
3.4.3	<i>Measurement</i>	212
3.4.4	<i>Data analysis</i>	212
	Bibliographie	213

*« Je n'ai pas échoué. J'ai simplement trouvé
10 000 solutions qui ne fonctionnent pas »*

Thomas Edison

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (LIT, UMR 7200) parmi l'équipe de Chémobiologie et Pharmacognosie pour la Santé (CPS) sous la direction du Dr. Dominique Bonnet ainsi que dans l'unité de Biologie et Signalisation Cellulaire (BSC, UMR 7242) aux côtés de l'équipe RCPGs, Douleur & Inflammation sous la direction du Dr. Frédéric Simonin. Ce projet de recherche n'aurait bien sûr pas pu aboutir sans le financement 80|Prime (2019) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et de l'Ecole Université de Recherche Interdisciplinaire sur le Douleur (EURIDOL).

Je voudrais commencer par adresser mes remerciements aux membres du jury, le Dr. Francine Acher (Université Paris Cité) et le Dr. Cyril Goudet (Université de Montpellier) qui me font l'honneur d'évaluer ces travaux en prenant sur leur temps que je sais précieux.

Ces remerciements s'adressent également à mes deux directeurs de thèse, les docteurs Dominique Bonnet et Frédéric Simonin. Merci de m'avoir accepté dans vos équipes respectives, de m'avoir guidé et tant appris tout au long de ces trois années, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je garderai en mémoire chacun de vos précieux conseils en espérant pouvoir les transmettre à mon tour.

Julie, je ne pense pas exagérer en disant que ces travaux n'auraient pas été les mêmes sans toi, sans ton encadrement sans faille et tout l'altruisme dont tu as pu faire preuve à mon égard. Il serait difficile de résumer en quelques mots toute l'estime que je peux avoir pour toi, pour ton aide inestimable ainsi que ton dévouement tant envers tes collaborateurs que tes étudiants. Je te remercie d'avoir partagé avec moi ta passion de la recherche et de l'enseignement et j'espère pouvoir un jour transmettre tout ce que tu m'as appris.

Je souhaiterais exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Claire Marsol dont l'aide inestimable au laboratoire nous aura permis de progresser, plus que je n'aurai sans doute su le faire. Ces résultats sont aussi les tiens.

A Rosine et Valérie, merci d'avoir fait de moi un semblant de biologiste même si c'était un peu GalR. Travailler à vos côtés aura été une expérience très enrichissante, tant au niveau personnel que professionnel et, bien que certains résultats ce soient fait attendre, toutes les évaluations biologiques n'auraient pas pu voir le jour sans vous, votre travail irréprochable et vos remarques pertinentes.

Merci au Dr. Célien Jacquemard pour son investissement dans ce projet et grâce auquel nous avons pu étoffer notre histoire. Nos discussions auront toujours été très enrichissantes et je t'en remercie.

Je suis également reconnaissant envers le Dr. Nicolas Humbert pour toute l'aide et le temps qu'il a consacré à la réussite de ces travaux, et cela jusque dans les derniers jours. Merci pour ton engagement dans ce projet, j'ai eu grand plaisir à développer mes compétences auprès de quelqu'un d'aussi enthousiaste et bienveillant.

Merci aux membres de la PACSI, les docteurs Cheng Deng & Delphine Garnier pour leur aide dans la réalisation et le traitement des analyses structurales, même lorsque les conditions devenaient difficiles. J'ai également une pensée pour le Dr. Estefania Oliva qui a toujours déployé des efforts considérables afin de répondre aux besoins de chacun. Je suis content d'avoir eu l'occasion de partager ces déjeuners en ta compagnie.

Je voudrai également remercier les membres de PCBIS, les docteurs Pascal Villa & Patrick Gizzi ainsi que Sophie Gioria & Christel Valencia pour m'avoir permis d'accéder aux différents équipements de la plateforme.

Stéphanie, tu es et tu resteras à mes yeux le pilier de l'équipe CPS. Ton dévouement constant à la bonne marche du labo ainsi que tes qualités techniques (ou comment maintenir en vie une HPLC qui a dépassé sa date de péremption) ont été pour moi une source d'inspiration et de motivation. Merci pour ta disponibilité, ta joie de vivre de tous les instants et surtout pour les Lily du vendredi (avec des oignons confits bien sûr !).

A mes compagnons de l'équipe CPS, Lucille, Capucine, Elora, Océane, Yann & Sergio. Je ne pense pas que je serai venu à bout de ces derniers mois de rédaction sans vous. Merci pour nos discussions (même quand je venais surtout me plaindre), pour votre bonne humeur quotidienne, pour votre soutien mais avant tout, merci pour les gouters et les soirées au Grognon.

J'ai également une pensée pour tous les membres présents et passés du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique. Je ne peux malheureusement pas citer tout le monde (parce que j'en oublierai sûrement), chacun sera libre de se reconnaître dans ces lignes mais sachez que vous avez tous eu une importance particulière dans l'aboutissement de ces travaux durant ces trois (et quelques ...) années.

Je n'oublie pas non plus les membres de l'équipe Simonin. Mon passage chez vous aura certes été aussi agréable que furtif mais vous m'avez tout de même considéré comme l'un des vôtres et je vous en remercie.

Ces remerciements sont également destinés aux membres de l'équipe pédagogique de chimie organique de la faculté de pharmacie avec lesquels j'ai pu travailler (Aurélie, Julie, Marcel, Bruno & Robin). Cette année d'enseignement, aussi brève fut elle, m'a permis de renforcer mon engouement pour la transmission du savoir. Elle m'aura également permis de voir tout le chemin parcouru depuis mon entrée à l'université. Merci pour votre confiance et votre apprentissage.

Ronan, Adrien, Guillaume & Adrien, vous faisiez déjà parti des remerciements de ma thèse d'exercice en pharmacie il y a trois ans comme vous faites partie de ma vie depuis maintenant de longues années. Force est de constater que c'est parti pour durer. Merci d'avoir su rester les mêmes malgré la distance et les années.

Ah ! ma Team de cœur, Marion, Audrey, Maxime, Nellie, Charlotte, Maëlle, Camille, Baptiste & Juliette. Nous voilà maintenant devenu des (jeunes) adultes avec des soucis d'adultes mais quand je nous vois tous ensemble je nous revois encore sur les bancs de la fac. Je vous le redis : vous êtes les meilleurs. Vous l'étiez déjà hier, vous l'êtes encore aujourd'hui et vous le serez toujours demain.

A mon frère, Etienne qui a visiblement grandi plus vite que moi. Bien que nos sujets de conversations aient changés nous avons su rester les mêmes. Je suis fier de l'homme que tu es devenu et j'espère continuer à te voir grandir et t'épanouir.

Un grand merci à mes parents qui m'ont accompagné et guidé durant toutes les étapes de la vie. Merci pour votre soutien, vos conseils, votre présence au quotidien, ... Bref merci pour tout. Je me répète sûrement mais le redire ne fera pas de mal, je vous dois tout ce que je suis aujourd'hui et les mots à eux seuls ne peuvent pas exprimer à quel point je vous aime. Même si vous ne comprenez pas forcément tout ce qu'il y a dans ce manuscrit

j'espère que vous serez fier du chemin que j'ai parcouru jusqu'à maintenant et que je continuerai à suivre.

A tous les membres de ma famille et ami(e)s, présents ou absents, qui auront toujours une place particulière dans mon cœur.

Enfin je voudrais remercier toutes les personnes qui prendront le temps de parcourir ces travaux car la base de la recherche reste la transmission du savoir acquis.

Liste des abréviations

Å : Angstrom	DMF/DMA : Diméthylformamide/Diméthylacétal
aa : acide aminé	DMSO : Diméthylsulfoxyde
AC : Adénylate Cyclase	DOR : δ Opioid Receptor
AcOEt/EtOAc : Acétate d'éthyle	DRG : Dorsal Root Ganglia
AcOH : acide acétique	DT2 : Diabète de Type 2
ADN : Acide Désoxyribonucléique	EC ₅₀ : concentration efficace médiane
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien	EDT : ethanedithiol
AMPB : 4-[(4-aminométhyl)phénylazo]benzoïque	EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
AMPc : Adénosine Monophosphate cylique	eq : équivalent
AMPP : acide 3-[(3-aminométhyl)phénylazo]phényle acétique	ERK : Extracellular signal Regulated Kinases
APB : acide 4-[(4-amino)phénylazo]benzoïque	ESI : Electrospray Ionisation
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	EtOH : éthanol
ATP : Adénosine Triphosphate	FBS : Foetal Bovin Serum
AzoF : L-phénylazophénylalanine	FDA : Food and Drug Administration
BCA : bis(chloroacétamido)azobenzène	Fmoc : Fluorènylméthoxy-carbonyle
Bn : Benzyle	FSH β : Follicle Stimulating Hormone β
Boc : <i>tert</i> -butoxycarbonyle	GABA : Gamma Aminobutyric Acid
BODIPY : Boron Dipyrromethene	GalR : Récepteur de la galanine
BSA : Bovin Serum Albumin	GDP : Guanosine Diphosphate
BSBCA : 3,3-bis(sulfonato)-4,4-bis(chloroacétamido)azobenzène	GIRK : G protein coupled Inwardly Rectifying Potassium
BTC : triphosgène	GLP1 : Glucagon Like Peptide 1
Cbz : Carboxybenzyle	GLPR1 : Glucagon Like Peptide Receptor 1
CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide	GnIH : Gonadotrophin Inhibitory Hormone
CSD : Cambridge Structural Database	GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone
DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	GPP : Groupement Protecteur Photolabile
DCM : Dichlorométhane	GRK : G protein coupled Receptor Kinase
DEACM : 7-diéthylaminocoumarin-4-ylméthyle	GtH α : Gonadotrophin Hormone α
DIC : Diisopropylcarbodiimide	GTP : Guanosine Triphosphate
DIEA : Diisopropyléthylamine	HATU : <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium
DMF : Diméthylformamide	HEK : Human Endothelial Kidney

HEPES : 2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethane-1-sulfonic acid

HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HRMS : High Resolution Mass Spectroscopy

IASP : International Association for the Study of Pain

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane

icv : intra-cérébrovasculaire

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IP : Intra-Péritonéale

IP₃ : Inositol Triphosphate

J : constante de couplage

K_i : constante d'inhibition

KO : Knock-Out

KOR : κ Opioid Receptor

LRMS : Low Resolution Mass Spectroscopy

LUMO : Lowest Occupied Molecular Orbital

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases

MCM : Modèle Caché de Markov

MeCN/ACN : acétonitrile

MEM : Minimum Essential Media

MeOH : méthanol

mGluR : metabotropic Glutamate Receptor

MOM : méthyle-O-méthyle

MOR : μ Opioid Receptor

MS : Mass Spectrometry

MW : Microonde

NHWS : National Health and Wellness Survey

NOR : Nociceptine/Orphanine FQ Opioid Receptor

NPQ : Neuropeptide Q

NR : Nile red

NV : Nitrovératryle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

o-NB : *ortho*-nitrobenzyle

OPRL1 : Opioid Related nociceptine receptor 1

orf : opening reading frame

pb : paire de base

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCL : Photochromic Ligand

Pd/C : Palladium sur charbon

PDB : Protein DataBank

pH : potential Hydrogène

pK_a : constant d'équilibre acide

PLC_β/D/C_ε : Phospholipase C_β/D/C_ε

p-NPC : *para*-nitrophénylchloroformate

POMC : proopiomélanocrtine

PORTL : Photoswitchable Orthogonal Remotely Tethered Ligand

ppm : partie par million

PSS : Photostationnary State

quant : quantitatif

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

rflx : reflux

RGS : Regulator of G protein Signaling

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

rpm : rotation par minute

RSA : Relation structure activité

RVM : Rostro Ventromedial Medulla

SG : Substancia Gelatinosa

SGPA : Substance Grise Périaqueducale

S_N1 : Substitution Nucléophile d'ordre 1

SPPS : Solid Phase Peptide Synthesis

SPX : spexine

ta : température ambiante

TBAI : Tetrabutyl Amonium Iodide

TBAOH : Hydroxyde de tétrabutylamonium

*t*Bu : *tert*-butyle

TEA : Triéthylamine

TFA : Acide Trifluoroacétique

TFE : Trifluoroéthanol

THF : Tétrahydrofurane

TICT : Twisted Intramolecular Charge Transfer

TIS : Triisopropylsilane

TL : Tethered Ligand

TOF : Time of Flight

t_R : temps de rétention

TRPA1 TRPV1 TRPM8

Trt : Trityle

UV : Ultraviolet

v/v : volume à volume

W/V : Weight per volume

Y₄R : Neuropeptide Y Receptor 4

δ : déplacement chimique

Δ : relaxation thermique

ϵ : Coefficient d'extinction molaire

λ : longueur d'onde

λ_{max} : longueur d'onde d'absorption maximale

$\tau_{1/2}$: temps de demi-vie

φ : rendement quantique

Introduction

Contexte et Objectifs

Contexte

1. La douleur, entre physiologie et pathologie

1.1 Définition, épidémiologie & classification

1.1.1 Définition

La douleur et sa prise en charge représentent un problème de santé publique majeur ayant un retentissement individuel et collectif considérable, tant au niveau personnel que professionnel. Elle a été définie pour la première fois en 1979 puis révisée en 2018 par l'International Association for the Study of Pain (IASP)¹ comme « *une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle* ». Dans cette définition l'utilisation du terme « potentielle » permet de prendre en compte la douleur sans lésion identifiable. Cependant, ce type de douleur pose problème en recherche expérimentale et notamment dans le cadre de la création de modèles de la douleur.

La douleur est à différencier de la nociception qui correspond au processus neurologique permettant d'encoder un stimulus qui endommage ou menace d'endommager un tissu normal².

1.1.2 Classification

La douleur est un phénomène multidimensionnel où l'on retrouve des aspects sensoriels, psychologiques, cognitifs, affectifs, comportementaux et spirituels. Elle peut donc être perçue différemment par chacun. Une approche multimodale est essentielle pour une prise en charge efficace et c'est pourquoi plusieurs systèmes de classifications sont utilisés en clinique afin de cerner précisément chaque douleur³. Parmi les classifications les plus utilisées on retrouve celles basées sur l'anatomie, l'étiologique, l'intensité, la durée ou encore la physiopathologie.

La première classification utilisée lors du diagnostic est la classification anatomique qui est fonction de la région du corps ou de la fonction anatomique du tissu lésé. Vient ensuite l'évaluation de l'intensité de la douleur à l'aide d'échelles visuelles (Visual Analog

Scale ou FACES pain Rating Scale), numériques (Numeric Rating Scale) ou encore descriptives (Verbal/Description Rating Scale)⁴. L'identification de la cause de la douleur permet ensuite d'établir une classification étiologique.

Une des classifications les plus connues reste certainement celle qui est fonction de la durée de la douleur et qui permet de différencier la douleur aiguë de la douleur chronique³. La première étant définie comme une douleur soudaine, intense et brève arrivant immédiatement après une lésion et disparaissant généralement une fois cette même lésion guérie. La deuxième, quant à elle, est une douleur continue ou épisodique persistant depuis plus de trois mois. Elle peut apparaître et perdurer en l'absence de lésion ou de maladie ce qui explique qu'elle puisse continuer même après la guérison. Le système nerveux peut aussi être endommagé, avec une incapacité de retour vers un état normal⁵. La douleur aiguë est ici décrite comme un symptôme alors que la douleur chronique est une pathologie. De par sa longue durée, la douleur chronique peut affecter la vie quotidienne des patients (stress, anxiété, dépression, insomnie, ...).

Ajouté à cela, la douleur peut également être récurrente ou épisodique durant une longue période comme la migraine dont l'intensité, la qualité et la fréquence sont variables ce qui ne les rend pas prédictibles. On sait également qu'une douleur peut être à la fois continue et intermittente. Une augmentation soudaine, intense et brève de la douleur au-dessus du niveau basal préexistant peut survenir plusieurs fois par jour, en l'absence de stimulus ou de facteurs aggravants. La douleur peut aussi être causée par un mouvement ou par l'arrêt des traitements.

Enfin, on retrouve une classification physiopathologique de la douleur selon son origine anatomique, le stimulus impliqué, son étendue ainsi que sa description par le patient. Nous reviendrons sur cette classification plus loin dans ce manuscrit.

Malgré l'ensemble de ces classifications, il arrive que l'origine de la douleur ne puisse pas être identifiée et dans ce cas nous parlons de douleurs idiopathiques.

Bien qu'elles permettent d'appréhender chaque douleur dans sa globalité, l'utilisation de classifications aussi diverses que variées rend difficile les investigations épidémiologiques concernant la douleur.

1.1.3 Epidémiologie & impact socio-économique

La prévalence de la douleur chronique est très difficile à estimer du fait de l'absence d'une définition claire, précise et harmonisée⁶⁻⁸. Cela explique notamment le fait que les données des différentes études françaises et internationales varient entre 10,1 et 55,2%⁸. Cela conduit à une minimisation de l'importance de cette pathologie compliquant son évaluation ainsi que sa prise en charge⁷. Néanmoins, la plupart des études réalisées mettent en évidence l'impact conséquent de cette pathologie sur l'ensemble des populations.

Entre 2003 et 2010, plusieurs études ont montré que la douleur chronique touchait entre 25% et 35% des populations adultes des pays d'Europe⁶ contre 11 à 40% en 2016 pour les Etats-Unis⁹. En Europe, ces douleurs chroniques sont légèrement plus présentes dans les pays en voie de développement (41%) que dans les pays développés (37%) et on note également que leur prévalence est supérieure à 40% en France, en Italie ainsi qu'en Ukraine⁶. Elles représentent à elles seules entre 15 et 20% des visites chez le médecin⁷. Ces douleurs sont généralement plus élevées chez la femme que chez l'homme et cet écart augmente avec l'âge. Nous pouvons également constater que les douleurs chroniques sont plus fréquentes chez les travailleurs manuels et non employés^{6,8}. Parmi les patients cancéreux, environ 50% d'entre eux souffrent de douleurs chroniques et on estime que la moitié de ces patients ne sont pas traités pour ces douleurs⁶.

En ce qui concerne la France (2005), 78% de la population adulte dit avoir été concerné directement ou indirectement par la douleur et ce dans les deux dernières années⁸. Plus récemment (2014), 92% des français ont précisés avoir ressenti une douleur dans l'année écoulée⁸. En 2013 une étude française réalisée par l'INSERM a également permis d'établir qu'environ 30% de la population adulte souffre de douleurs chroniques.

Les retentissements de la douleur chronique ne sont pas seulement médicaux. En effet, ces pathologies sont malheureusement connues pour avoir un impact socio-économique important du point de vue individuel et collectif. Elles entraînent une diminution significative de la qualité de vie et elles peuvent être sources de handicaps avec des conséquences professionnelles majeures. En Europe, 1/3 des patients douloureux sont impactés dans leur travail (2/3 en France en 2010 selon l'étude NHWS)

et 1/5 ont perdu leur emploi à cause de leur pathologie. Nous pouvons également constater une augmentation des arrêts de travail liés aux douleurs chroniques pouvant parfois entraîner un départ à la retraite anticipé^{6,8}. De plus, elles sont généralement associées à une augmentation de la prévalence des pathologies psychiatriques comme la dépression ou l'anxiété^{6,8}.

En 2010 aux Etats-Unis, le coût global de la douleur chronique a été estimé entre 560 et 635 milliards de dollars chaque année ce qui est supérieur à celui des maladies cardiaques, du cancer et du diabète. En Europe, ces dépenses se chiffrent également en milliards d'euros chaque année où les coûts directs et indirects représentent chacun la moitié du coût total⁶. Comme pour les données épidémiologiques, ces coûts sont sous-estimés en raison des définitions et des classifications complexes de la douleur⁶.

1.2 Mécanismes physiopathologiques

1.2.1 Généralités

Charles Darwin a caractérisé la douleur comme une émotion essentielle à la survie des espèces et Descartes a, quant à lui, dépeint la douleur comme étant le résultat de l'activation de canaux précis circulant entre la peau et le cerveau¹⁰. De manière générale, la douleur est un mécanisme physiologique ayant valeur de signal d'alarme qui assure notre sécurité. Nous parlons alors de nociception¹¹.

Toute douleur physiologique débute avec un stimulus bref (millisecondes) qui peut être de nature biologique, électrique, thermique, mécanique ou chimique¹¹. Lorsque ce dernier est dommageable ou potentiellement dommageable pour les tissus, cela conduit à l'activation des nocicepteurs. Il s'agit de neurones spécialisés uniquement impliqués dans la détection et la transmission du stimulus douloureux¹². En effet, les nocicepteurs sont connus pour avoir un seuil d'activation élevé c'est pourquoi ils ne répondront qu'à un stimulus ayant une énergie suffisante pour endommager les tissus ce qui permet de les différencier des neurones sensoriels classiques¹².

Un nocicepteur présente 4 composantes : une terminaison périphérique qui perçoit le stimulus et forme l'information douloureuse, un axone qui transmet cette information, un corps cellulaire permettant de contrôler l'identité ainsi que l'intégrité du neurone et

enfin la terminaison périphérique qui forme la première synapse dans la moelle épinière¹².

Au niveau de la terminaison périphérique du nocicepteur, on retrouve plusieurs récepteurs et canaux ioniques qui seront les premiers à détecter le stimulus nociceptif et à l'intégrer sous forme de potentiel d'action¹² (Figure 1). Bien que certains d'entre eux soient spécifiques en terme de seuil de réponse ou de stimulus, la plupart de ces récepteurs/canaux sont polymodaux, c'est-à-dire qu'ils sont capables de déceler différents stimuli¹².

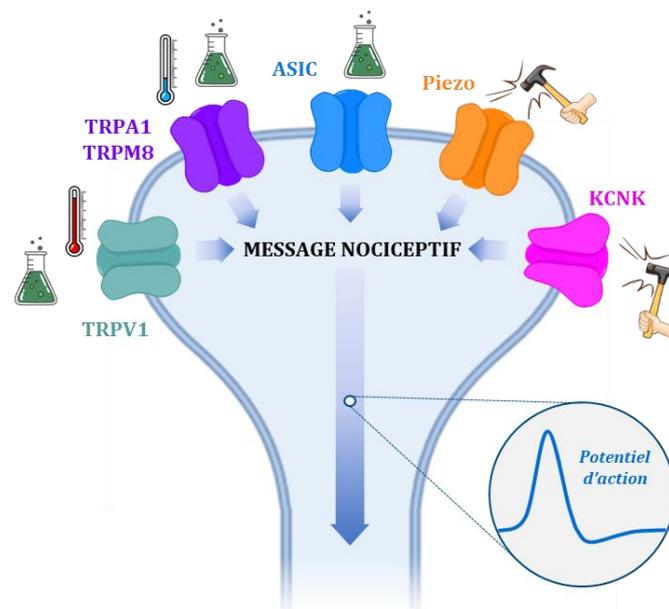


Figure 1. Exemples de nocicepteurs : TRPV1¹² (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) détecte les stimuli chimiques et thermiques au chaud ; TRPM8¹² (Transient Receptor Potential Melastatin 8) & TRPA1¹² (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) détectent les stimuli chimiques et thermiques au froid ; l'ASIC¹³ (Acid-Sensing Ion Channel) est sensible aux stimuli chimiques ; les mécanorécepteurs Piezo et les canaux potassiques KCNK détectent les stimuli mécaniques^{14,15}

Suite à cela, l'information douloureuse est véhiculée le long des fibres nerveuses afférentes et jusqu'à la moelle épinière par le biais de canaux sodiques et potassiques voltages dépendant^{12,14}. Les fibres A δ , aussi appelées fibres larges du fait de la gaine de myéline qui les compose, sont impliquées dans la transmission rapide (20 m/s) de l'information douloureuse à l'origine de la douleur aiguë¹⁶. A côté de cela on retrouve également les fibres C, plus fines et non myélinisées ce qui fait qu'elles transmettent l'information douloureuse plus lentement (0,5-2 m/s). Elles participent donc à la

perception de la douleur¹¹. Ces neurones primaires atteignent ensuite la corne dorsale de la moelle épinière et notamment la *substantia gelatinosa* (SG)^{10,11}. D'une part, les neurones afférents vont permettre l'activation des motoneurones conduisant au réflexe musculaire de retrait^{17,18}. D'autre part, ces mêmes nocicepteurs vont faire synapse avec les neurones des laminae de Rexed I, II et V qui se trouvent être les plus impliquées dans l'intégration du message nociceptif^{19,20}. Le message nociceptif est ensuite transmis à un neurone de second ordre (ou neurone de projection) qui, après décussation, va prolonger l'information jusqu'aux centres supra-spinaux situés dans le cerveau. Ces derniers vont permettre de filtrer et traiter l'information afin d'aboutir à la douleur telle qu'elle sera perçue^{10,11}.

Les neurones de projection progressent vers le cerveau par l'intermédiaire de différentes voies^{21,22} :

- Le faisceau paléo-spino-thalamique où l'on retrouve :
 - o Le faisceau spino-réticulaire qui projette au niveau de la formation réticulée du tronc cérébral pour ensuite atteindre le thalamus, le cortex (composante émotionnelle de la douleur) ou encore l'amygdale (composante cognitive de la douleur)
 - o Le faisceau spino-mésencéphalique qui se prolonge jusqu'à la substance grise périaqueducale (SGPA) et le noyau parabrachial impliqués dans la modulation de la douleur
- Le faisceau néo-spino-thalamique qui projette directement au niveau du thalamus et où un neurone de troisième ordre va permettre de transmettre l'information au cortex somato-sensoriel primaire et secondaire (composante sensorielle de la douleur)

Bien entendu d'autres structures cérébrales participent à l'intégration de la douleur comme l'hippocampe ou encore le cervelet²³. Cette implication d'une pléiade de régions du cerveau dans la nociception sous-tend l'aspect multimodal de la douleur. C'est pourquoi nous pouvons parler de matrice de la douleur²².

1.2.2 Modulation de la douleur

De même que la nociception, certains mécanismes endogènes sont connus pour moduler cette douleur de manière physiologique. En effet, la transmission du message nociceptif peut être régulée à différents niveaux mais les principaux processus mis en jeu sont ceux faisant appel à la modulation descendante et à la théorie du portillon (« gate control »). Cette hypothèse du « gate control », initiée par Melzack & Wall en 1965²⁴ se base sur l'association étroite des voies sensorielles et nociceptives. En effet, la stimulation des fibres sensorielles A β permettrait, par l'intermédiaire d'un interneurone, d'inhiber les fibres C et ainsi bloquer la transmission du message nociceptif à l'entrée de la moelle épinière. Même si elle n'est pas encore complètement approfondie, cette théorie a permis de rationaliser scientifiquement le fait que frotter une zone douloureuse permettrait de diminuer la sensation de douleur. À côté de cela, on sait que certains centres supra-spinaux vont également exercer une modulation directe ou indirecte au niveau de la moelle épinière. C'est ce que l'on appelle la modulation descendante²⁵. Elle peut se produire au niveau des neurones afférents, des neurones de projection ou encore des interneurones excitateurs ou inhibiteurs situés dans la moelle épinière. Tout cela dans le but de moduler l'excitabilité neuronale. La principale structure impliquée ici est la SGPA²⁶ où sont concentrées des informations venant du cortex, de l'hypothalamus et de l'amygdale. Elle projette ensuite au niveau du *locus coeruleus* et du noyau du *raphe magnus* qui conduisent respectivement à la libération de noradrénaline et de sérotonine dans la moelle épinière^{10,27}. Ces deux neurotransmetteurs participent ainsi à la régulation de l'excitabilité neuronale. La SGPA est également connectée à la médulla rostrale ventromédiale (rostromedial medulla ou RVM) qui, grâce à l'utilisation de cellules excitatrices ou inhibitrices, participera à la modulation du message nociceptif²⁸.

Parmi ces phénomènes de modulation de la douleur, on retrouve également le système opioïde endogène avec le récepteur opioïde μ qui est, encore aujourd'hui, la cible de bon nombre de médicaments anti-douleurs retrouvés sur le marché pharmaceutique²⁹. Il se compose de quatre récepteurs couplés aux protéines G³⁰ : μ (MOR), δ (DOR), κ (KOR) et le récepteur à la nociceptine/orphanine FQ (NOR). La stimulation de ces RCPGs par des peptides opioïdes endogènes tels que les enképhalines, les dynorphines, la β -endorphine ou encore la nociceptine/orphanine FQ conduit à une diminution de l'excitabilité neuronale et donc une diminution de la transmission du message nociceptif.

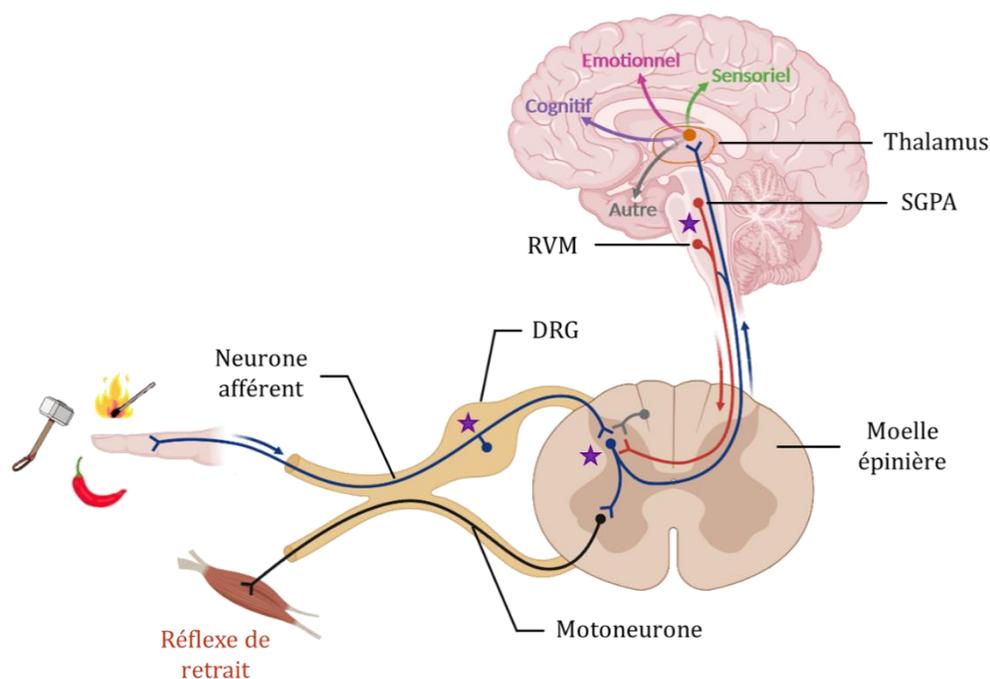


Figure 2. Le système nociceptif (DRG: ganglion rachidien dorsal; RVM: médulla rostrale ventromédiale; SGPA: substance grise périaqueducale; ☆: modulation de la douleur; —: transmission du message nociceptif; —: modulation descendante; —: interneurone)

1.2.3 Pathologie

Si l'on se réfère à la classification physiopathologique de la douleur évoquée précédemment, plusieurs types de douleurs pathologiques sont définies. Nous pouvons alors différencier la douleur par excès de nociception de la douleur neuropathique. La première décrit une douleur où le système nerveux fonctionne normalement, à la différence de la douleur neuropathique qui est causée par une lésion ou une pathologie du système nerveux central ou périphérique devant être clairement identifiée. Ce type de douleur entraîne souvent certaines dysfonctions sensorielles (allodynie, hyper/hypoalgésie, paresthésie, dysesthésie, hyper/hypoesthésie). La douleur peut également être mixte lorsque les douleurs nociceptives et neuropathiques coexistent au même moment ou séparément. On retrouve également des douleurs psychogènes, plus rares et dues à des facteurs psychologiques.

La persistance du stimulus douloureux (excès de nociception) entraîne une adaptation du système nociceptif, il s'agit de la plasticité. Elle peut être bénéfique lorsqu'elle favorise la protection des individus mais elle est généralement délétère

lorsque le changement persiste. En effet, une lésion persistante amène à une modification des propriétés des neurones périphériques pouvant conduire à un défaut de transmission du message nociceptif¹¹. De même, lorsque le système nerveux est endommagé, il se produit des changements qui peuvent avoir lieu au niveau moléculaire (altération de la fonction ou de la localisation), synaptique (augmentation ou diminution de la transmission du signal) et cellulaire (augmentation de l'excitabilité neuronale)¹⁰. L'ensemble de ces phénomènes vont entraîner une modification de la capacité des nocicepteurs à transmettre l'information douloureuse où l'on trouvera généralement une augmentation de la réponse à un même stimulus ou une réponse à un stimulus habituellement sans conséquences². Cette sensibilisation peut être centrale ou périphérique.

La sensibilisation périphérique est fortement corrélée à l'inflammation¹². En effet, lors de la réaction inflammatoire faisant suite à une lésion de nombreux médiateurs³¹⁻³⁴ (H⁺, K⁺, leucotriènes, prostaglandines, cytokines, ...) sont libérés au voisinage des fibres afférentes par le système immunitaire mais également par les tissus endommagés. De leur côté, les nocicepteurs vont répondre en libérant à leur tour des médiateurs tels que la substance P ou le CGRP qui vont amplifier la réponse inflammatoire. Tous ces événements vont alors contribuer à l'augmentation de l'excitabilité des fibres afférentes. Comme ils sont circonscrits au niveau du site de la lésion, ces phénomènes seront responsables de l'hyperalgésie primaire.

En ce qui concerne la sensibilisation centrale, elle se produit au niveau de la moelle épinière et passe par des mécanismes complexes³⁵ tels que le wind-up, la potentialisation à long terme ou encore la sensibilisation latente à la douleur^{36,37}.

1.3 Prise en charge thérapeutique

La prise en charge de la douleur est inscrite dans la législation française depuis 2002 (Loi n°2002-303, Art. L. 1110-5.)³⁸. Telle que définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)³⁹, elle fait intervenir l'utilisation de différents traitements pouvant aller du paracétamol aux opioïdes en passant par les anti-inflammatoires qui seront prescrits selon le type et l'intensité la douleur (Tableau 1). Certains auront un effet antalgique (diminution de la sensation de douleur) ou analgésique (suppression complète de la sensation de douleur).

Type de douleur	Palier	Intensité de la douleur	Traitements	Exemples de spécialités
Douleur nociceptive	1	Légère à modérée	Antalgiques faibles	Paracétamol
			AINS	Ibuprofène ou aspirine
	2	Modérée à sévère	Opioides faibles	Codéine ou tramadol
	3	Sévère	Opioides forts	Morphine, oxycodone ou fentanyl
Douleur neuropathique			Antidépresseurs	Amitriptyline ou imiparine
			Anticonvulsivants	Carbamazépine ou gabapentine
			Anesthésiques locaux	Lidocaïne ou capsaïcine

Tableau 1. *Stratégies de prise en charge de la douleur*
(AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens)

Les opioïdes forts restent les traitements les plus utilisés dans le cadre des douleurs chroniques. Malheureusement, ils présentent des effets indésirables tels que la sédation, la constipation ou encore la dépression respiratoire pouvant causer la mort. Nous pouvons également observer la mise en place d'une tolérance analgésique (qui correspond à une diminution progressive de l'effet du traitement) généralement associée à une dépendance à ces traitements qui participent au mésusage des opioïdes. En effet, en 2019 aux Etats-Unis 70% des décès dus aux overdoses impliquaient les opioïdes⁴⁰.

Au vu de l'impact grandissant de la douleur chronique et de la limitation des traitements actuels⁴¹ il est donc urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la douleur afin de proposer une alternative à ces dérivés opioïdes.

2. Les récepteurs couplés aux protéines G, acteurs essentiels de la nociception

Pour prospérer, un être vivant à besoin que ses cellules communiquent entre elles et avec leur environnement. C'est là qu'interviennent les récepteurs cellulaires dont le rôle est de détecter les messages extracellulaires pour ensuite les traiter et les

transmettre au reste de la cellule. Différentes classes de récepteurs ont été identifiées chez l'Homme comme les canaux ioniques ou les récepteurs enzymatiques. Mais la catégorie la plus représentée à ce jour reste celle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) qui compte environ 800 représentants soit 1% du génome humain⁴². De ce fait, ils se retrouvent impliqués dans la plupart des fonctions physiologiques et pathologiques de notre organisme. C'est notamment le cas des récepteurs opioïdes qui participent à la régulation de la douleur ou encore des récepteurs adrénergiques impliqués dans la régulation des fonctions cardiovasculaires.

Leur importance et leur efficacité est due en grande partie à leur structure unique ainsi qu'aux multiples voies de signalisations cellulaires mises en œuvre.

2.1 Structure et classification

Les récepteurs couplés aux protéines G sont des récepteurs membranaires qui répondent à des signaux pouvant aller de la stimulation lumineuse à la fixation de petites hormones en passant par la liaison de neurotransmetteurs^{43,44}. Cette grande diversité est accessible grâce à leur architecture commune (Figure 3). Elle se compose d'une extrémité *N*-terminale qui participe à la liaison du ligand, de sept hélices transmembranaires reliées entre elles par une alternance de trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires ainsi qu'une extrémité *C*-terminale impliquée dans l'interaction avec les protéines *G*⁴².

Les protéines *G* associées à ces récepteurs sont des protéines hétérotrimériques composées d'une sous unité α ainsi que des sous unités β et γ . Elles sont appelées « *G* » en raison de leur capacité à lier les guanosine di- et triphosphate (GDP & GTP) responsables de leur activité⁴⁵.

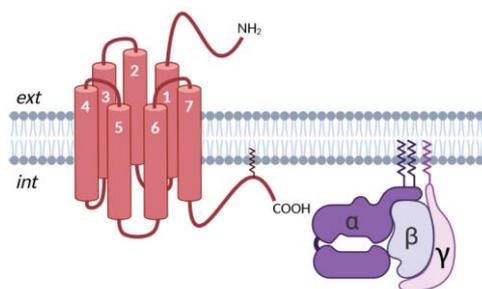


Figure 3. Structure d'un RCPG et de la protéine *G*

Bien que ces récepteurs présentent une structure commune leur séquence d'acides aminés peut varier. Néanmoins, c'est leur similarité de séquence qui a permis d'établir leur classification en six groupes^{43,46} (Figure 4). La plus représentée (719 récepteurs) reste la classe A aussi appelée rhodopsin-like. Elle est elle-même divisée en trois sous catégories définies selon la taille des ligands impliqués⁴². Cela va des neurotransmetteurs jusqu'aux hormones en passant par les peptides. Vient ensuite la classe B ou la famille des sécrétines (48 récepteurs) permettant de lier des hormones comme le glucagon dans le cas du récepteur peptidique au glucagon de type 1 (GLPR1). Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) forment la classe C (22 récepteurs) où leur imposante partie *N*-terminale permet la liaison de ligands chargés tels que le glutamate. Enfin on retrouve la classe F (11 récepteurs) qui comprend les récepteurs de type Frizzled et Smoothened impliqués dans le développement embryonnaire⁴². Il y a également une classe D (récepteurs fongiques) et E (récepteurs de l'AMPC) mais elles ne sont pas retrouvées chez les vertébrés^{43,46}.

Hormis leur séquence d'acides aminés, les RCPGs peuvent également se différencier par la nature de la protéine G à laquelle ils sont associés. Plus précisément selon le variant de la sous unité α où chaque catégorie entraînera l'activation ou l'inhibition d'un effecteur bien précis⁴⁵ (Tableau 2).

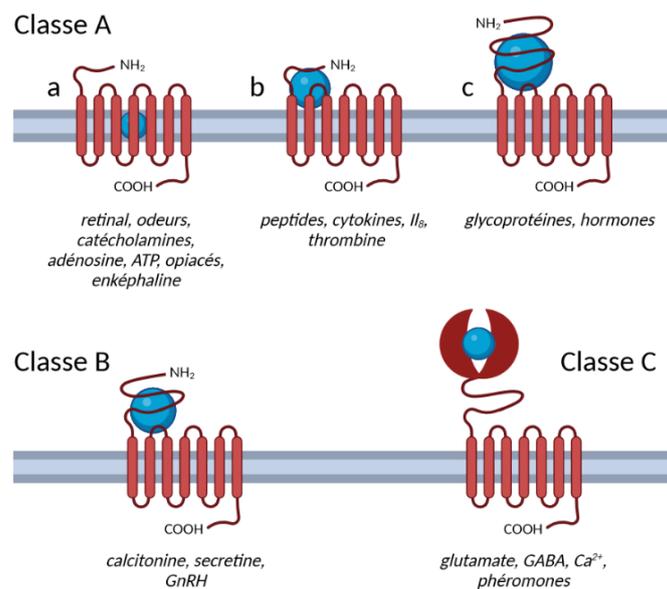


Figure 4. Classification des RCPGs (ATP : adénosine triphosphate ; Il_8 : interleukine 8 ; GnRH : gonadotrophin releasing hormone ; GABA : acide gamma aminobutyrique)
(inspirée de Bockaert & Pin⁴²)

Famille	G _s	G _{i/o}		G _{q/11}	G _{12/13}
Effecteur	AC(+)	ERK(+) MAPK(+)	AC(-)	PLC _β (+)	PLD/C _ε (+)

Tableau 2. Classification des protéines G avec les effecteurs qu'elles activent (+) ou inhibent (-) (AC : adénylate cyclase ; ERK : extracellular signal-regulated kinases ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; PLC_β : phospholipase C_β ; PLD/C_ε : phospholipase D/C_ε)

2.2 Signalisation

2.2.1 Activation

Les RCPGs sont des intermédiaires indispensables à la transmission de l'information entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. En l'absence de stimulus, ils oscillent de manière permanente entre une conformation active et inactive ce qui conduit à l'existence d'une activité basale (ou constitutive) des RCPGs en l'absence de ligand⁴⁷. La fixation d'un ligand va modifier cet équilibre conformationnel d'une manière qui sera fonction de la nature du ligand^{46,47} (Figure 5).

Si le ligand favorise la conformation active du récepteur afin d'augmenter l'activité basale, nous parlerons alors d'agoniste. Il sera défini comme « complet » si la réponse biologique qu'il entraîne est identique à celle du ligand endogène ou « partiel » lorsqu'elle lui est inférieure. Au contraire lorsqu'un ligand déplace l'équilibre en faveur de la conformation inactive, entraînant une diminution de l'activité basale, il s'agira d'un agoniste inverse. Enfin, il existe les antagonistes neutres qui ne modifient en rien l'équilibre mais empêchent la fixation d'un autre ligand.

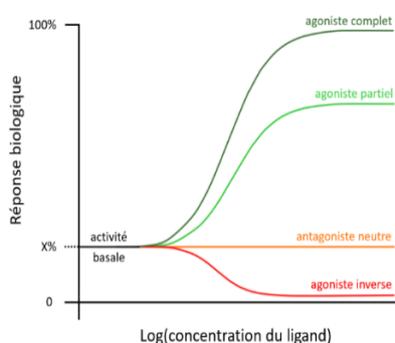


Figure 5. Pharmacologie d'un RCPG

Les ligands que nous venons de décrire se fixent sur le récepteur au niveau du site orthostérique (il en est de même pour le(s) ligand(s) endogène(s))⁴⁷. A côté de cela certains récepteurs possèdent un autre site de fixation permettant la liaison de ligands allostériques qui vont modifier l'activité ou l'affinité d'un ligand orthostérique⁴⁸. Il existe également des ligands bitopiques pouvant se fixer à la fois sur les sites orthostériques et allostériques⁴⁹.

Certains RCPGs fonctionnent sous forme de monomères, toutefois ils peuvent également se dimériser et ainsi former des homo- ou hétérodimères dont les fonctions ou les voies de signalisation peuvent être différentes du monomère⁵⁰.

2.2.2 Voies de signalisations

Les RCPGs sont connus pour s'associer avec les protéines G^{47,51} mais ils peuvent également interagir avec des GRKs (GPCR kinases) et des β -arrestines⁵² (Figure 6).

A l'équilibre la protéine G n'interagit pas avec le récepteur mais lorsque ce dernier évolue en faveur d'une conformation active, la signalisation cellulaire débute par le recrutement de la protéine G. Cette association conduit à l'activation de la protéine hétérotrimérique qui se traduit par le remplacement du GDP lié à la sous unité α par une molécule de GTP. La protéine G va alors se scinder en deux parties avec d'un côté la sous unité α et de l'autre les sous unités β & γ formant le complexe $\beta\gamma$. Chaque composant va alors pouvoir interagir avec d'autres effecteurs cellulaires et ainsi entraîner une cascade de signalisation. Après avoir activé les seconds messagers, le GTP est hydrolysé en GDP grâce à l'action des RGS (regulator of G protein signaling) ce qui permet aux différentes sous unités de se rassembler afin de reformer la protéine G hétérotrimérique.

Les voies de signalisation sont dépendantes des effecteurs concernés. En effet, les protéines G vont activer différents seconds messagers comme des cyclases, des phospholipases ou des kinases qui entraîneront à leur tour une cascade de signalisation intracellulaire⁴⁵.

A la suite de l'activation du RCPG et de la protéine G, une autre voie de signalisation peut être mise en jeu^{47,52}. Elle est initiée par les GRKs qui vont venir phosphoryler les résidus sérine et thréonine se trouvant sur la partie C-terminale du récepteur. Cela permet le recrutement de la β -arrestine qui va faire obstacle à l'association de la protéine

G au récepteur et ainsi conduire à sa désensibilisation⁵³. La β -arrestine participe aussi à l'internalisation du récepteur⁵⁴ qui pourra ensuite être dégradé ou recyclé. Des études plus récentes ont également mis en évidence l'engagement de la β -arrestine dans certaines voies de signalisations cellulaires (MAPK, PI3K, Rho, Wnt, Hh, NF κ B, ...) ^{52,55}. L'implication de cette nouvelle voie de signalisation peut conduire à l'apparition d'un agonisme qui sera biaisé de par la nature de certains ligands à favoriser des conformations différentes d'un même récepteur⁵¹.

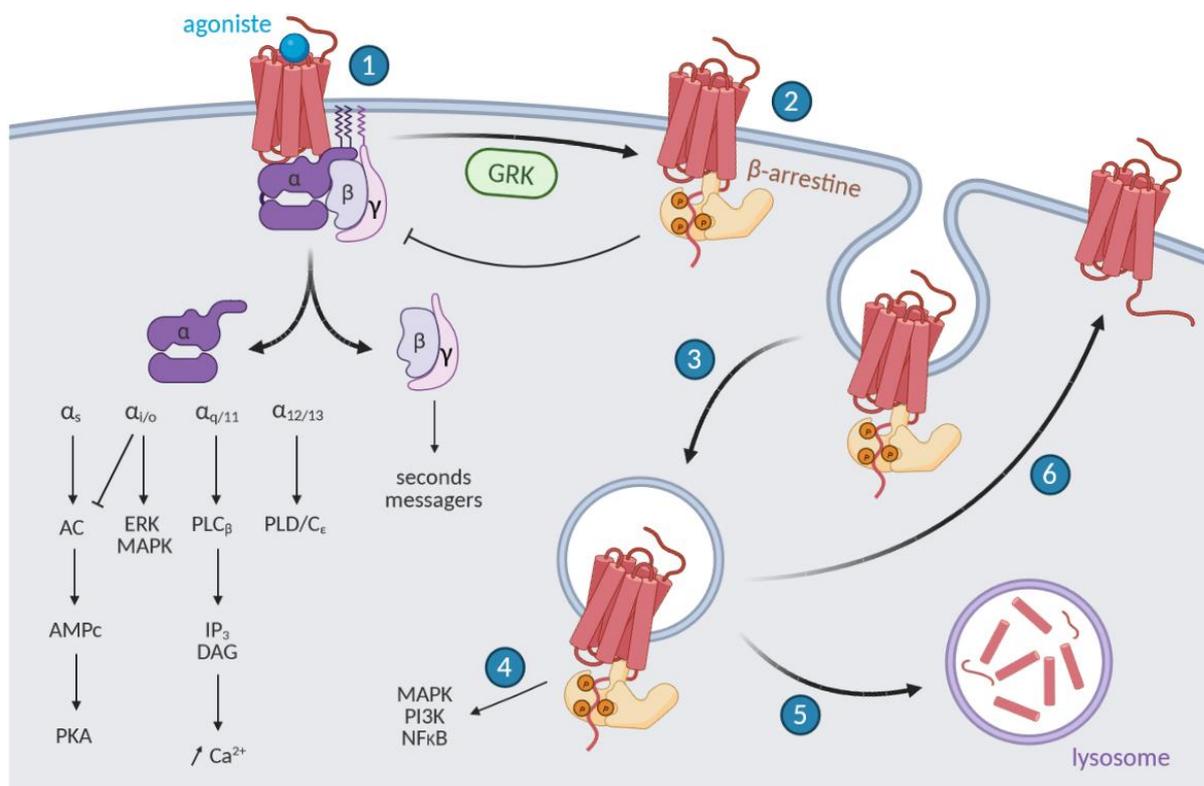


Figure 6. Cycle de vie d'un RCPG : (1) activation par un agoniste puis (2) désensibilisation grâce au recrutement de la β -arrestine par les GRKs qui va également permettre (3) l'internalisation du récepteur. (4) La β -arrestine peut activer d'autres voies de signalisations avant que le récepteur ne soit (5) dégradé ou (6) recyclé.

2.3 Le marché pharmaceutique des RCPGs

Depuis leur découverte les RCPGs ont été le centre d'une attention toute particulière de la part de la communauté scientifique. Leur expression au niveau de la membrane plasmique de quasiment toutes les cellules ainsi que leur implication dans un grand nombre de fonctions tant physiologiques que pathologiques en font des cibles de choix

pour le développement de nouvelles thérapies. Encore aujourd'hui ils représentent environ 30% des médicaments autorisés par l'autorité de santé américaine, la Food and Drug Administration (FDA)⁴⁹. Bien que cela représente un nombre conséquent, ces thérapies ne ciblent que 25% des RCPGs⁴⁶ activés par des ligands endogènes alors que ceux qui se trouvent être les plus exprimés sont encore orphelins⁵⁶, c'est-à-dire que leurs ligands et leurs fonctions ne sont pas encore connus. Cela signifie qu'il y a encore beaucoup de travail afin de désorphaniser tous ces récepteurs et ainsi en apprendre davantage sur leur fonctionnement. Même si des ligands endogènes d'un récepteur ont pu être identifiés, il arrive que leurs fonctions soient encore mal connues et nécessitent de plus amples investigations.

Associé à cela, l'étude de l'expression des RCPGs est également un paramètre intéressant à étudier. L'analyse de la localisation sélective de certaines populations de récepteurs ainsi que de leur sur- ou sous-expression en conditions pathologiques au niveau de certains tissus nous renseigne sur leur implication dans diverses maladies^{49,56}.

C'est notamment le cas pour les récepteurs de la galanine qui sont mis en jeu dans plusieurs mécanismes physiopathologiques impliqués dans la douleur.

3. Les récepteurs de la galanine (GalRs)

3.1 Généralités

Les récepteurs de la galanine sont des récepteurs couplés aux protéines G appartenant à la classe A. A l'heure actuelle trois récepteurs ont été identifiés. Il s'agit de GalR₁, GalR₂ & GalR₃.

La reconstruction génétique et phylogénétique du gène ancestral des récepteurs de la galanine a mis en évidence la présence de deux branches distinctes pour GalR₁ et GalR_{2/3}⁵⁷. La branche de GalR₁ se divise ensuite en deux (GalR_{1a} & GalR_{1b}) alors que, celle de GalR_{2/3} se divise en trois branches (GalR_{2a}, GalR_{2b} & GalR₃). Une forte similarité de séquence a été observée entre les gènes humains de GalR₂ et de GalR₃ (53.8%) contrairement à ceux de GalR₁ et GalR₂ (35.5%) ou GalR₁ et GalR₃ (33.2%). A cela s'ajoute également le fait que le gène codant pour GalR₃ n'est présent que chez les mammifères les plus évolués (Tableau 3) ce qui laisse à penser qu'il serait issu de la duplication du gène de GalR₂⁵⁸.

La séquence d'ADN de GalR₁ fut la première à être identifiée ce qui a permis de mettre en évidence la séquence protéique de 349 acides aminés (aa) du récepteur⁵⁹. En ce qui concerne le récepteur GalR₂ (372 aa), il a d'abord été identifié et cloné chez le rat^{60,61} puis chez l'Homme^{62,63} où il a été localisé sur le chromosome 17q25.3. De la même manière, GalR₃ (370 aa) a été identifié dans le génome du rat⁶⁴ puis de l'Homme⁶⁵ grâce à sa forte homologie de séquence avec GalR₂⁶⁴.

Espèces	GalR ₁	GalR ₂	GalR ₃
<i>H sapiens</i>	+	+	+
<i>P troglodytes</i>	+	+	+
<i>M mulatta</i>	+	+	+
<i>M musculus</i>	+	+	+
<i>R norvegicus</i>	+	+	+
<i>B taurus</i>	+	+	-
<i>G gallus</i>	+	+	-
<i>F rubripes</i>	+	+	-
<i>T nigroviridis</i>	+	+	-
<i>D rerio</i>	+	+	-
<i>C intestinalis</i>	?	?	-
<i>B floridae</i>	?	?	-
<i>S purpuratus</i>	?	?	-

Tableau 3. Distribution des gènes de GalR₁, GalR₂ & GalR₃ au sein de différentes espèces (+ : présent ; - : absent ; ? : présence incertaine)⁵⁸

3.2 Voies de signalisations

Bien que ces récepteurs partagent une certaine similarité de séquence⁵⁸, leurs voies de signalisations restent aussi différentes que variées ce qui permettrait d'expliquer les effets pléiotropiques de ces récepteurs (Figure 7).

Les récepteurs GalR₁ et GalR₃ partagent des voies de signalisations similaires avec notamment un couplage à une protéine G_{i/o} dont l'activation entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase^{59,65,66} ainsi qu'une activation de canaux GIRK induisant une hyperpolarisation de la cellule⁶⁷.

A l'inverse des deux précédents, les cascades de signalisations intracellulaires de GalR₂ sont multiples du fait d'un couplage à plusieurs classes de protéines G. Elles dépendent donc du type cellulaire ainsi que des effecteurs présent en aval⁶⁸. Malgré cette multitude de voies de signalisations, plusieurs études laissent à penser que la majorité des GalR₂ sont couplés à une protéine de type G_{q/11} qui met en jeu une phospholipase C permettant la formation d'IP₃ et conduisant généralement à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ainsi qu'à l'ouverture de canaux chlorure Ca²⁺ dépendants^{62,63,66,69}. Un couplage à une protéine de type G_{i/o} entraînant une inhibition de l'adénylate cyclase^{62,66} et à une protéine G_{12/13} qui conduit vraisemblablement à l'activation de la petite GTPase Rho⁷⁰ ont également été observés.

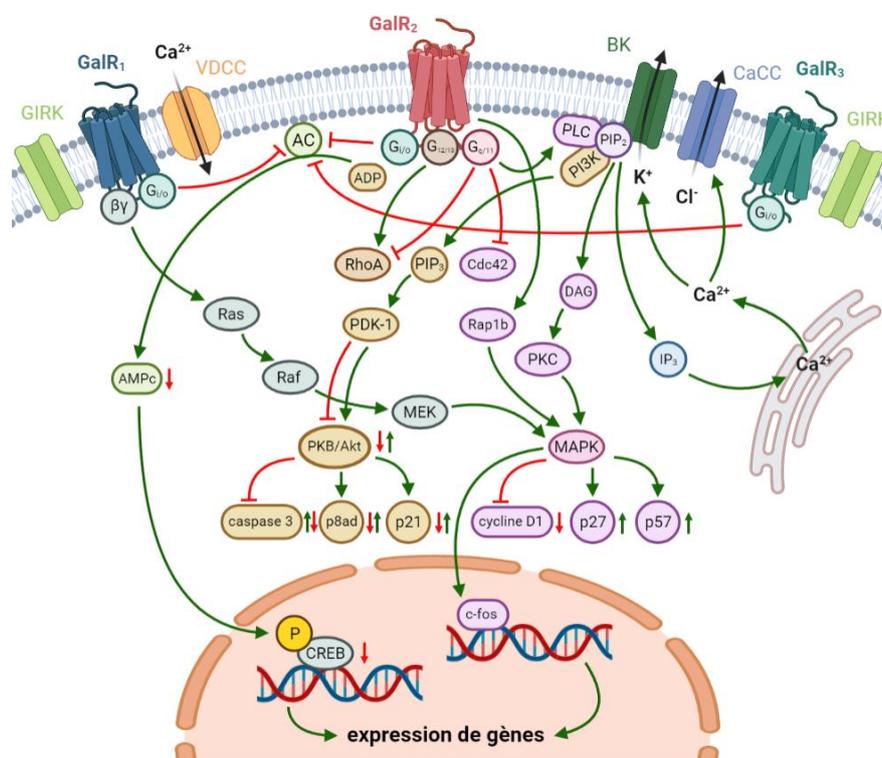


Figure 7. Voies de signalisations des GalRs

(AC : adénylate cyclase ; BK : canal potassique (large) calcium dépendant ; CaCC : canal chlorure calcium dépendant ; (p)CREB : protéine (phosphorylée) se fixant à l'élément de réponse du 39,59-AMPc ; DAG : diacylglycérol ; GIRK : G protein-regulated inwardly rectifying potassium channel ; IP₃ : inositol triphosphate, MEK : mitogen-induced extracellular kinase ; PDK : protéine kinase 1 phosphoinosotide dépendante ; PIP₂ : phosphatidylinositol bisphosphate, PIP₃ : phosphatidylinositol trisphosphate ; PI₃K : kinase-3-phosphatidylinositol ; PKB : protéine kinase B ; PLC : phospholipase C ; VDCC : canal calcique voltage-dépendant) (inspiré de Lang et al.⁶⁸)

Concernant le récepteur GalR₃, un manque de données expérimentales a été constaté. Cela peut s'expliquer par le fait que, dans les systèmes recombinants, le récepteur n'est que faiblement exprimé à la surface des cellules. En effet, la présence de motifs particuliers d'acides aminés sur sa partie C-terminale entraîne sa rétention au niveau du réticulum endoplasmique conduisant à une expression intracellulaire du récepteur⁷¹.

3.3 Ligands

La galanine, un neuropeptide endogène de 29-30 acides aminés, est le ligand principal des GalRs. Elle se lie aux trois types de récepteurs avec une haute affinité⁵⁷.

Au cours de leur évolution, les neuropeptides et leurs récepteurs se sont développés essentiellement grâce à une série de deux duplications complètes du génome associées à des duplications plus localisées de gènes. Cela a entraîné une certaine variabilité de séquence rendant leur évolution difficile à retracer⁵⁷. Toutefois en associant une analyse génétique et phylogénétique il a été possible de retracer l'ensemble des duplications ou pertes de gènes ayant eu lieu au cours de l'évolution. Cela a permis de reconstruire le chromosome ancestral des vertébrés sur lequel se trouvait le gène de la spexine, au voisinage des gènes de la galanine⁵⁷.

Une fois les séquences alignées, une certaine homologie a pu être observée entre la spexine et la galanine où les résidus Trp², Thr³, Tyr⁹, Leu¹⁰ et Gly¹² sont identiques entre les deux peptides (Figure 8).

Cette étude a également permis d'identifier un autre gène paralogue de la spexine, nommé spexine2 présent sur le chromosome des vertébrés mais absent chez les mammifères. Sa séquence codante est similaire à celle de la spexine et il permet également la synthèse d'un peptide mature de quatorze acides aminés amidé en C-terminal et qui présente quatre acides aminés différents par rapport à la spexine.

Tout au long de leur développement, les neuropeptides ont évolué de manière à conserver leur structure tridimensionnelle au détriment de leur séquence peptidique mature⁷². Cela suggère que des peptides issus d'un ancêtre commun peuvent partager la même cible biologique du fait de la conservation du mode de liaison induit par la structure 3D. Etant donné la forte homologie de séquence entre la spexine et la galanine, il a été

suggéré que la spexine puisse se lier aux récepteurs de la galanine (GalR₁, GalR₂ & GalR₃). Pour étudier sa liaison au récepteur, la spexine, la spexine2 et la galanine ont été utilisées sur des cellules HEK293-G_{qi} exprimant chaque type de récepteurs à la galanine⁵⁷. L'administration de spexine humaine et de spexine2 de poisson zèbre a entraîné une liaison et une activation des récepteurs GalR₂ et GalR₃ sans solliciter GalR₁. L'activité de GalR₂ induite par la spexine était inférieure à celle consécutive à l'injection de galanine. Contrairement à l'activité de GalR₃ qui était supérieure dans le cas de la spexine et de la spexine2. (Tableau 4 & Figure 9)

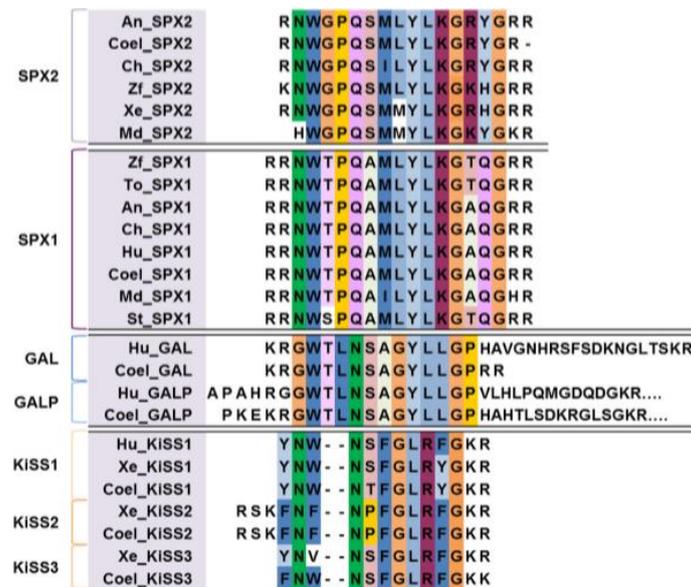


Figure 8. Alignement des séquences peptidiques matures encadrées par les sites de clivage des peptides de la famille de la spexine (SPX), la galanine (GAL) et la kisspeptine (KISS) retrouvés chez l'Homme (Hu), le lézard anole (An), le poulet (Ch), le *Xenopus* (Xe), le cœlacanthe (Coel), le poisson zèbre (Zf), le médaka (Md), l'Épinoche (St) et le Tétrodon (To). Les résidus conservés sont indiqués par différentes couleurs⁵⁷

	EC ₅₀ (nM)		
	galanine	spexine	spexine2
GalR ₂	88	161	317
GalR ₃	1383	626	724

Tableau 4. Activité (EC₅₀) de la galanine, de la spexine humaine et de la spexine2 de poisson zèbre sur des cellules HEK293-G_{qi} exprimant GalR_{2/3}⁵⁷

Des études sur différents fragments de la galanine ont permis de mettre en évidence la faible importance des acides aminés au-delà des positions 15-16 contrairement à la partie *N*-terminale (2-11) qui s'est révélée être capitale pour la liaison au récepteur⁶⁸. Plusieurs modifications de ces fragments ont été effectuées et notamment une élimination de la Gly¹ qui a réduit ou abolit complètement la liaison à GalR₁ en ne modifiant que très légèrement la liaison à GalR_{2/3}⁶⁸. La troncation de cet acide aminé, associée à une substitution de la partie C-terminale a permis de synthétiser le M871, un peptide sélectif de GalR₂ présentant une activité antagoniste⁷³. Des ligands non peptidiques ont également été développés dont le SNAP 37889⁷⁴, un antagoniste sélectif des récepteurs GalR₃ qui a été le premier à montrer une véritable efficacité⁶⁸.

Bien qu'elles se lient à GalR₂, la spexine et la galanine stabilisent des conformations différentes du récepteur aboutissant à des voies de signalisations différentes. Cela expliquerait leurs différents effets observés dans la régulation de l'appétit et de la reproduction⁷⁵. A cela s'ajoute le fait que la spexine se dissocie très rapidement de son récepteur contrairement à la galanine qui resterait assez longtemps pour activer plusieurs voies de signalisations et notamment celles entraînant l'internalisation du récepteur⁷⁵.

Les ligands des récepteurs de la galanine sont cités ci-après (Tableaux 5, 6 & 7).

	Structure	GalR₁	GalR₂	GalR₃
Galanine ^{63,67}	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRFSKNGLTS	0.14 ± 0.05 ^[a]	2.19 ± 0.27 ^[a]	7.16 ± 0.06 ^[b]
GALP ⁷⁶	APAHRGRGGWTLNSAGYLLGPVLHLPQMGD QDGKRETALEILDWLKAIIDGLPYSHPPQPS	77 ± 20 ^[c]	28 ± 10 ^[c]	10 ± 4 ^[c]

Tableau 5. *Ligands endogènes des GalRs humains*

(^[a] : K_i en nM ; ^[b] : pK_i ; ^[c] : IC_{50} en nM ; ± erreur standard)

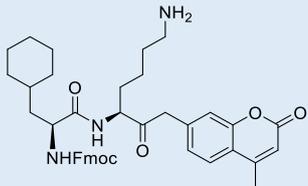
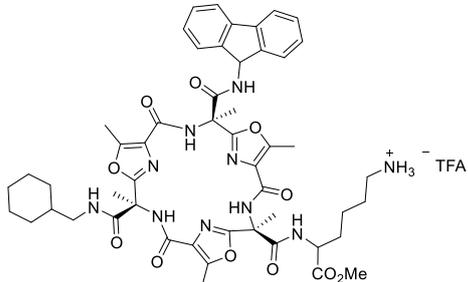
	Structure	GalR ₁	GalR ₂	GalR ₃
M242 ⁷⁷	GWTLNSAGYLLGPRHYINLIWRQRY-NH ₂	0.25 ± 0.15 ^[a,c]	5.84 ± 1.69 ^[a,c]	
M617 ^{78,79}	GWTLNSAGYLLGPQPPGFSPFR-NH ₂	0.23 ± 0.12 ^[a,c]	5.71 ± 1.28 ^[a,c]	49 ± 9.4 ^[a,c]
M1145 ⁸⁰	RGRGNWTLNSAGYLLGPVLPALALA-NH ₂	587 ± 250 ^[a,c]	6.55 ± 2.7 ^[a,c]	497 ± 150 ^[a,c]
M1151 ⁸¹	GWTLNSAGYLLGPK(C(O)X ₂)-NH ₂	98.6 ± 77 ^[a,c]	28.9 ± 17.5 ^[a,c]	874 ± 270 ^[a,c]
M1152 ⁸¹	WTLNSAGYLLGPK(C(O)X ₂)-NH ₂	2370 ± 417 ^[a,c]	36.4 ± 27 ^[a,c]	656 ± 119 ^[a,c]
M1153 ⁸¹	RGRGNWTLNSAGYLLGPK(C(O)X ₂)-NH ₂	1890 ± 329 ^[a,c]	4.98 ± 0.81 ^[a,c]	230 ± 149 ^[a,c]
M1160 ⁸²	RGRGNWTLNSAGYLLGPVLPALALA-NH ₂	15 500 ± 1 400 ^[a,c]	33.3 ± 13 ^[a,c]	> 10 ⁴ ^[a,c]
AR-M1896 ⁸³	WTLNSAGYLL-NH ₂	879 ^[b,c]	1.76 ^[b,d]	
J18 ⁸⁴	RGRGNWTLNSAGYLLGPkkk(C(O)X ₃)k - NH ₂	138 ± 46 ^[a,c]	20 ± 8 ^[a,c]	112 ± 14 ^[a,c]
J20 ⁸⁴	RGRGNWTLNSAGYLLGPXXK(C(O)X ₃)K-NH ₂	25 ± 5.5 ^[a,c]	4.9 ± 1.6 ^[a,c]	13 ± 7 ^[a,c]
Galnon ⁸⁵		11.7 ^[a,c]	34.1 *10 ³ ^[a,d]	
Galmic ⁸⁵		34.2 ^[a,c]	> 10 ⁵ ^[a,d]	

Tableau 6. Agonistes des récepteurs de la galanine

[^a] : K_i en nM ; [^b] : IC₅₀ en nM ; ± erreur standard ; [^c] : GalRs humains ; [^d] : GalRs de rat ; X : -HNCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)- ; X₂ : glutamyle ; X₃ : stéaryle ; liste non exhaustive)

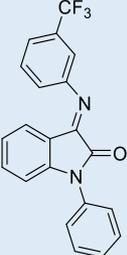
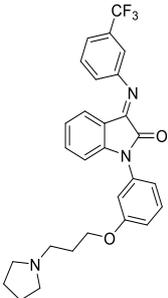
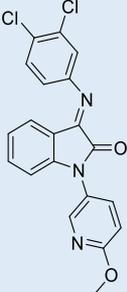
	Structure	GalR ₁	GalR ₂	GalR ₃
C7 ^{67,86}	GWTLNSAGYLLGPRPKPQQWFWLL	9.55 ± 0.05 ^[a,c]	2.0 ± 0.25 ^[b,d]	8.09 ± 0.07 ^[a,d]
M15 ⁸⁷	GWTLNSAGYLLGPQQFFGLM-NH ₂	0.4 ^[b,d]	1.1 ^[b,d]	10.5 ^[b,d]
M32 ^{67,77}	GWTLNSAGYLLGPRHYINLITRQRY-NH ₂	0.18 ± 0.16 ^[b,d]	2.18 ± 0.48 ^[b,d]	8.22 ± 0.11 ^[a,d]
M35 ^{67,86,87}	GWTLNSAGYLLGPPPGFSPFR-NH ₂	4.8 ^[b,d]	1.8 ± 0.24 ^[b,d]	7.84 ± 0.08 ^[a,d]
M40 ^{67,86,87}	GWTLNSAGYLLGPPPALALA-NH ₂	1.8 ^[b,d]	1.5 ± 0.10 ^[b,d]	6.54 ± 0.09 ^[a,d]
M871 ^{73,79}	WTLNSAGYLLGPEHPPPALALA-NH ₂	420.0 ± 89.7 ^[b,d]	13.1 ± 1.2 ^[b,d]	> 10 ³ ^[b,d]
SNAP 37889 ⁷⁴		> 10 ⁴ ^[b,d]	> 10 ⁴ ^[b,d]	17.44 ± 0.01 ^[b,d]
SNAP 398299 ⁷⁴		> 10 ³ ^[b,d]	> 10 ³ ^[b,d]	5.33 ± 0.28 ^[b,d]
GALR3ant ⁸⁷		> 10 ⁴ ^[b,d]	> 10 ⁴ ^[b,d]	20 ^[b,c]

Tableau 7. Antagonistes des récepteurs de la galanine (^[a] : pK_i ; ^[b] : K_i en nM ; ^[c] : GalRs de rat ; ^[d] : GalRs humains ; ± erreur standard ; liste non exhaustive)

3.4 Biodistribution & rôles biologiques

De manière générale, les récepteurs GalR₁ & GalR₂ sont retrouvés en majorité au niveau du système nerveux central avec une expression beaucoup moins élevée en périphérie mais tout de même plus importante pour GalR₂ que pour GalR₁.

Au niveau cérébral, l'ARNm de GalR₁ se situe en grande partie dans plusieurs noyaux du thalamus, de l'hypothalamus et de l'hippocampe ainsi que dans l'amygdale notamment au niveau du tractus olfactif⁸⁸⁻⁹⁰. Une expression majoritaire est également à signaler au niveau des ganglions dorsaux de la moelle épinière (DRGs) ainsi que dans la moelle épinière où GalR₁ est retrouvé en grand nombre dans les fibres nerveuses larges alors que GalR₂ est plus localisé au niveau des petites et moyennes fibres⁹⁰. Chez l'Homme, des transcrits de GalR₁ ont été retrouvés dans le cortex cérébral, l'amygdale et la substance noire⁹¹. En périphérie peu de récepteurs GalR₁ sont exprimés avec tout de même une faible expression au niveau du tractus digestif, du cœur et des testicules chez le rat et l'Homme^{89,91}.

En ce qui concerne l'expression centrale de GalR₂, il est retrouvé principalement au niveau de l'hippocampe (gyrus denté), de l'hypothalamus (corps mamillaire, aire pré-optique, noyau arqué et aire postérieure) et du cortex cérébral^{88,90,92}. A l'inverse de GalR₁, GalR₂ a une localisation périphérique plus étendue au niveau des poumons, de la prostate, de l'utérus, des ovaires, de l'estomac et du gros intestin⁶⁰. Des localisations similaires à ce qui a été observé chez le rat sont constatées chez l'Homme^{62,63,86} avec une expression centrale majoritaire au niveau de l'hippocampe et de l'hypothalamus ainsi qu'une expression périphérique dans le cœur, les reins, le foie, l'intestin grêle, le colon et la rétine^{63,86}. Cependant certaines de ces localisations restent différentes entre l'Homme et le rongeur avec notamment une expression globale plus restreinte chez l'Homme que chez le rat^{63,86} d'où la difficulté d'extrapoler des résultats entre ces deux espèces.

Une expression de GalR₁ dès les stades embryonnaires avec une persistance jusqu'à l'âge adulte a été observée chez le rat à la différence de GalR₂ qui présente une expression évolutive en fonction de l'âge⁸⁸. En effet, on observe un pic d'expression de la naissance et jusqu'à sept jours, notamment dans le cortex et le thalamus, qui redescend après quatorze jours. Cette augmentation de l'expression durant les premiers jours de la vie suggère une implication de ces récepteurs dans le développement du système nerveux.

Comme dit précédemment, peu d'études concernant GalR₃ ont été réalisées du fait de sa faible expression à la surface des cellules⁷¹ mais il a été démontré que, dans le cerveau du rat, l'ARNm de GalR₃ est exprimé faiblement et de façon restreinte dans certaines régions du cerveau comparé à GalR₁ et GalR₂⁹³. On le retrouve cependant au niveau de l'aire pré-optique/hypothalamique, du cerveau antérieur basal, de la médulla ainsi que de la corne dorsale de la moelle épinière, du pont, du néocortex, du striatum, du thalamus, de l'hippocampe et du cervelet. Même si ces localisations cérébrales font écho aux actions centrales de la galanine, il est difficile de déterminer le rôle précis de GalR₃ dans ces différents mécanismes étant donné sa co-localisation avec GalR₁ & GalR₂⁹³. D'un autre côté, une expression plus abondante de GalR₃ est retrouvée chez le rat au niveau périphérique et notamment dans la rate et les testicules⁶⁴ supposant un rôle plus important de ces récepteurs en périphérie.

De par leur localisation importante tant au niveau du système nerveux qu'en périphérie et associé à leurs voies de signalisation multiples, les récepteurs de la galanine sont impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques essentielles^{68,94,95}. Parmi elles l'homéostasie osmotique, la reproduction, l'alimentation et le métabolisme énergétique, l'éveil et le sommeil, la douleur ainsi que l'apprentissage et la mémoire. Leur expression majoritaire au niveau du système nerveux central est également liée à leur implication dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie, l'anxiété et la dépression^{68,95}.

Concernant la douleur, de nombreuses études suggèrent l'implication des récepteurs de la galanine dans la modulation de la nociception⁹⁶, tant au niveau central^{97,98} que périphérique⁹⁹⁻¹⁰¹. Il a été observé que les effets anti-nociceptifs de la galanine au niveau périphérique étaient médiés par les récepteurs GalR₂ présents au niveau des ganglions dorsaux de la moelle épinière^{94,102,103}. Certaines études ont montré que l'activation périphérique des récepteurs GalR₂ par l'agoniste sélectif AR-M1896 aurait un effet pro-nociceptif^{100,104}, au contraire de Hulse et al.¹⁰⁵ qui ont mis en évidence que ce même agoniste entraînait un effet anti-nociceptif. A cela s'ajoute le fait que les effets anti-nociceptifs médiés par GalR₂ n'entraînaient aucun des effets secondaires graves traditionnellement associés à l'utilisation des analgésiques opioïdes¹⁰¹.

L'ensemble de ces observations font de GalR₂ une nouvelle cible potentielle dans le traitement de la douleur chronique. Toutefois, certaines observations concernant son rôle

dans la modulation de la douleur sont contradictoires et c'est pourquoi son implication précise reste à établir. En effet, les modèles animaux knock-out (KO GalR₂) présentent une anomalie du développement des neurones présents dans les DRGs associés à un phénotype douloureux quasiment identique à celui des animaux sauvages^{106,107}. Ces résultats indiquent que les KO constitutifs de ce récepteur ne sont vraisemblablement pas des outils adaptés à l'étude du rôle de GalR₂ dans la douleur. Par ailleurs, bien que certaines études histochimiques aient pu être réalisées, elles restent difficiles à entreprendre du fait de la faible expression des GalRs chez le rongeur et de l'utilisation d'anticorps anti-GalRs non spécifiques¹⁰². L'expression étroite de GalR₁ et GalR₂ ainsi que l'absence de sélectivité de la galanine et de certains ligands pour les différents sous-types GalR₁₋₃ ne permet pas d'aborder spécifiquement le rôle de GalR₂¹⁰⁵. C'est dans ce contexte que nous avons porté notre attention sur la spexine qui a récemment montré une sélectivité pour les récepteurs GalR_{2/3}⁵⁷. En effet, ce neuropeptide endogène pourrait s'avérer être un outil intéressant pour l'étude du rôle du récepteur GalR₂ dans la douleur. Et ce d'autant plus que le récepteur GalR₃ semble peu impliqué dans la modulation de la nociception¹⁰⁵.

4. La spexine comme nouvel outil d'étude de GalR₂

4.1 Découverte & structure

Il y a quelques années, l'utilisation d'outils bio-informatiques dans la recherche de nouvelles hormones peptidiques a permis d'identifier la spexine, aussi appelée neuropeptide Q (NPQ), un peptide amidé de quatorze acides aminés (Figure 10)^{108,109}.

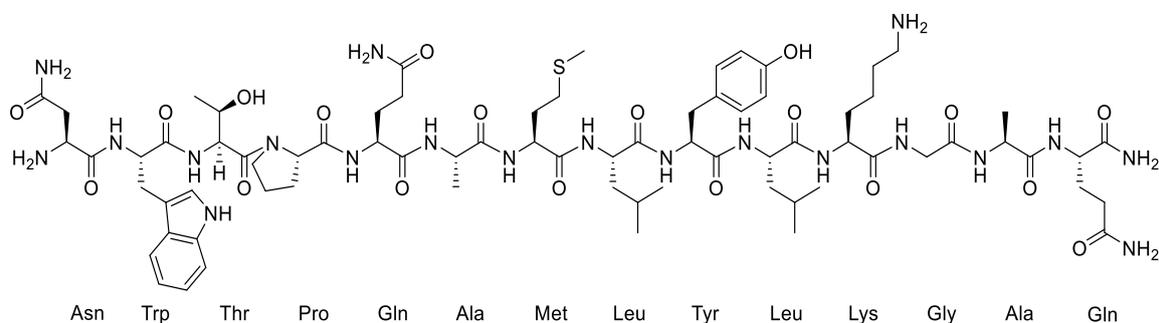


Figure 10. Structure chimique de la spexine humaine

Longtemps, l'identification des neuropeptides était limitée du fait de leur taille réduite, leur expression faible et restreinte ainsi que leur manque de similarité de séquence. Plusieurs méthodes ont jusqu'à aujourd'hui été utilisées dans la découverte de nouveaux neuropeptides. L'ocytocine, le premier neuropeptide à avoir été caractérisé a pu être isolé et identifié à partir d'un extrait de tissu présentant une activité biologique¹¹⁰. Par la suite, d'autres neuropeptides ont pu être découverts grâce à leur capacité de se lier ou d'activer une cible biologique particulière en fonction de leurs caractéristiques biochimiques, à l'aide d'approches génomiques ou, plus récemment, en les caractérisant par spectrométrie de masse¹¹¹. Le séquençage des gènes de plusieurs espèces a permis de mettre en place un ensemble de bibliothèques contenant un grand nombre de gènes de ces espèces, d'où la nécessité de concevoir des outils pour faciliter le criblage de ces bibliothèques. Le développement de modèles mathématiques a été une avancée majeure dans ce domaine et cela a notamment permis l'identification du NPQ à l'aide d'un modèle caché de Markov (MCM). Ce modèle présente l'avantage de pouvoir gérer des séquences de longueurs variables en intégrant plusieurs informations à caractères biologiques pour une seule et même séquence¹⁰⁸.

L'ensemble des neuropeptides présentent des motifs caractéristiques dans leur séquence d'acides aminés (site de clivage dibasique, peptide signal, ...). Dans le MCM, les séquences possibles de ces motifs sont déterminées en analysant plusieurs hormones peptidiques connues et en attribuant à chaque acide aminé un état auquel est associé une probabilité de distribution ainsi qu'une probabilité de transition vers un autre état (Figure 11). Dans le cas des neuropeptides, les motifs de référence utilisés sont une séquence peptide signal, au moins un site de clivage dibasique et l'absence de domaines transmembranaires. Une fois ces motifs de référence établis, le modèle est lancé sur un ensemble de protéines connues ou hypothétiques contenues dans une base de données de façon à attribuer à chaque protéine un score qui dépendra de la présence/absence de ces motifs particuliers et reflètera la possibilité que cette protéine puisse coder pour une hormone peptidique (Figure 11).

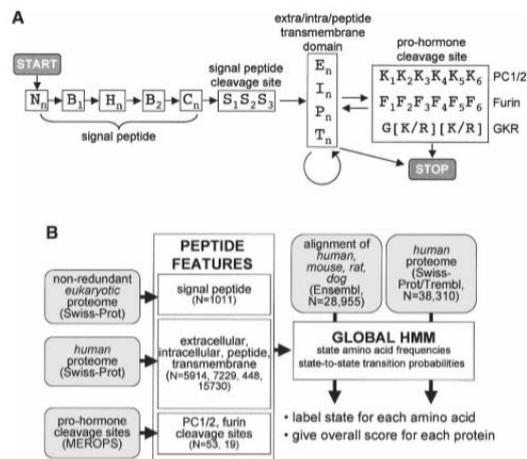


Figure 11. Principe du modèle caché de Markov : (A) Les états sont indiqués par des lettres et les flèches représentent les transitions entre ces états. L'indice sur l'état indique la multiplicité de l'état, un chiffre indique que cet état représente un seul acide aminé alors qu'un n indique la présence possible de plusieurs états dont la longueur dépendra des probabilités de transition ainsi que de la probabilité de distribution des autres états. (B) Les séquences possibles des motifs sont déterminées en analysant plusieurs séquences d'hormones peptidiques connues (N représente la taille de l'échantillon) et en attribuant à chaque acide aminé un état auquel est associée une probabilité de distribution ainsi qu'une probabilité de transition vers un autre état. Au final, le MCM est appliqué pour donner un score à l'ensemble des protéines étudiées¹⁰⁸

Parmi les 61 protéines encore non caractérisées qui présentaient un score élevé, des critères supplémentaires ont été appliqués :

- Les protéines où au moins 1 acide aminé de chaque site de clivage dibasique n'est pas conservé entre des séquences orthologues sont exclues
- Si le site de clivage appartient à un résidu basique plus long alors les protéines sont exclues
- La présence d'un changement significatif (> 30%) dans l'homologie de séquence des 5 acides aminés se situant avant et après le site de clivage

L'ensemble de ces paramètres a finalement permis d'identifier la spexine, un peptide amidé endogène de quatorze acides aminés où le motif GRR présent dans le précurseur permettrait de former la fonction amide en partie C-terminale. Une caractéristique commune à de nombreux neuropeptides¹⁰⁹.

Etant donnée le remplacement de ce motif GRR par un motif GHR, le rat produit un peptide mature non amidé en C-terminal. Une activité de la spexine amidée a néanmoins été détectée chez le rat¹⁰⁹ et le peptide mature non amidé a montré une activité inhibitrice sur le système gonadotrope du poisson zèbre¹¹². Cela laisse à penser que la partie amidée ne serait pas impliquée dans la liaison au récepteur.

La séquence de la spexine mature est généralement conservée entre les espèces avec quelques différences. En effet, on observe une substitution Ala¹³ → Thr¹³ chez les poissons et Ala⁶ → Ser⁶ chez certains mammifères (panda, chat & chien) (Tableau 8).

Homme	NWTPQAMLYLKGAQ
Chimpanzé	NWTPQAMLYLKGAQ
Souris	NWTPQAMLYLKGAQ
Rat	NWTPQAMLYLKGAQ
Lapin	NWTPQAMLYLKGAQ
Vache	NWTPQAMLYLKGAQ
Dauphin	NWTPQAMLYLKGAQ
Panda	NWTPQSMLYLKGAQ
Chien	NWTPQSMLYLKGAQ
Chat	NWTPQSMLYLKGAQ
Poule	NWTPQAMLYLKGAQ
Lézard	NWTPQAMLYLKGAQ
Xenopus	NWTPQAMLYLKGAQ
Poisson zèbre	NWTPQAMLYLKGTQ
Fugu	NWTPQAMLYLKGTQ
Poisson rouge	NWTPQAMLYLKGTQ

Tableau 8. *Alignement de séquences du peptide mature de la spexine retrouvée chez différentes espèces (inspiré de Wong et al.¹¹³)*

Cette forte homologie de séquence est le témoin de la place importante du peptide dans l'évolution des espèces et de sa probable implication dans de nombreuses fonctions physiopathologiques¹¹³.

4.2 Synthèse endogène

Chez l'Homme, le gène codant pour la spexine est situé sur le chromosome 12 et il est appelé C12orf39 (chromosome 12 open-reading framework 39)¹¹⁴. La séquence du gène de la spexine chez les mammifères se compose de six exons (215 paires de bases (pb), 84 pb, 58 pb, 63 pb, 87 pb et 227 pb) associés à cinq introns (403 pb, 160 pb, 937 pb, 177 pb et 1459 pb)¹¹⁵. Cette séquence génomique est similaire à celle observée chez le

mérou¹¹⁶ contrairement à celle retrouvée chez le poisson rouge où il n'y a que cinq exons et quatre introns¹¹³. Cette différence est sûrement due à l'insertion d'un cinquième intron au sein de l'exon cinq qui se divise alors en deux nouveaux exons¹¹⁶ (Figure 12).

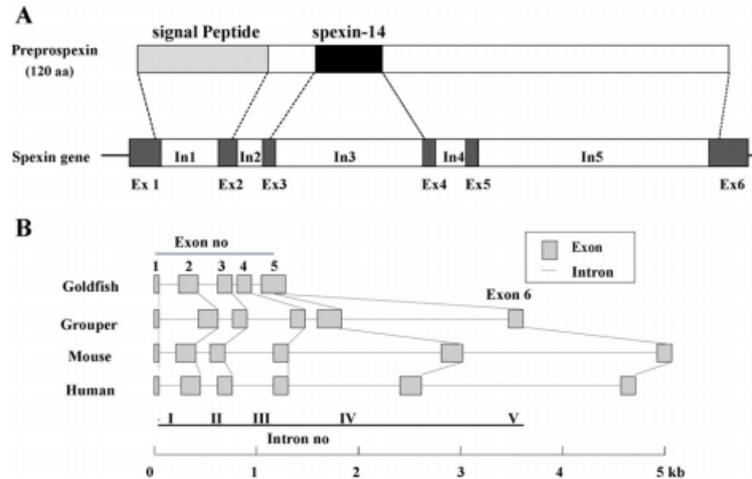


Figure 12. Organisation génomique du gène de la spexine du mérou : (A) Organisation intron (In) – exon (Ex) du gène de la spexine du mérou (B) Comparaison de l'organisation intron – exon du gène de la spexine entre différentes espèces¹¹⁶

Le séquençage des 763 paires de bases codantes du gène de la spexine présent chez le mérou¹¹⁶ a permis d'identifier une séquence 5' non traduite de 209 pb, une séquence 3' non traduite de 191 pb ainsi qu'un cadre de lecture ouvert (Opening Reading Frame ou ORF) de 363 pb qui code pour un prepropeptide de 120 acides aminés (116 chez l'Homme¹¹⁵) (numéro d'accès GenBank : KU375455). Ce prepropeptide de 120 acides aminés est composé d'un peptide signal codé par les exons 1 et 2 alors que le peptide final, dont la séquence diffère de celle des mammifères d'un acide aminé (Ala¹³ → Thr¹³), est lui codé par les exons 3 et 4¹¹⁵. Une étude des transcrits du gène de la spexine effectuée chez le poisson rouge¹¹³ a montré la présence de trois résidus d'ARNm (847 pb, 805 pb et 574 pb). Parmi eux, seul celui de 574 pb a été identifié comme contenant la séquence codante du précurseur de la spexine. Bien que cette analyse ait été réalisée chez le poisson rouge, qui possède une séquence intron/exon différente de celle de l'Homme, nous pouvons être amené à penser que la transcription du gène suit une voie similaire chez l'Homme mais cela reste à prouver¹¹⁵.

Le précurseur de la spexine, la protéine C12orf39, contient une séquence peptide signal de vingt-cinq à vingt-sept acides aminés en fonction des espèces^{116,117} ainsi que

deux sites de clivages dibasiques (RR) encadrant la séquence de quatorze acides aminés correspondant au peptide mature (Figure 13).

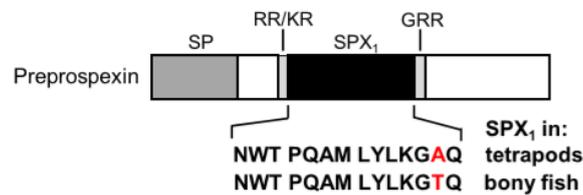


Figure 13. Organisation de la protéine codant pour la spexine (SPX) chez les poissons et les tétrapodes (SP : peptide signal)¹¹⁸

Comme dans tout neuropeptide, la partie *N*-terminale du précurseur de la spexine correspond au peptide signal et permet un adressage de ce précurseur dans le compartiment cellulaire adéquat¹¹⁹. Les résidus basiques encadrant la séquence de quatorze acides aminés donnant la spexine mature sont reconnus par des enzymes de types convertases qui participent ainsi au clivage du précurseur et à la maturation du peptide final. Il arrive que certains peptides biologiques subissent des modifications post-translationnelles de type amidation C-terminale, acétylation *N*-terminale, glycosylation, sulfonation ou phosphorylation¹¹⁹. En ce qui concerne les hormones peptidiques, plus de la moitié identifiées à ce jour sont amidées en position C-terminale et cette α amidation post-translationnelle correspond à la dernière étape du processus de biosynthèse de ces peptides. Dans le cas de la spexine, la réaction d'amidation est catalysée par une peptidylglycine α -amidating mono-oxygénase qui reconnaît spécifiquement le motif signal GRR présent dans la séquence peptidique¹²⁰.

Il a été observé que, comme dans la plupart des synthèses endogènes de neuropeptides, la protéine C12orf39 non hydrolysée est transportée du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi puis dans une vacuole de sécrétion pour pouvoir être libérée telle quel dans le milieu extracellulaire. Même si la sécrétion du prepropeptide non hydrolysé est assez surprenante, une libération du peptide hydrolysé n'est pas à exclure¹¹⁴.

4.3 Rôles

4.3.1 Biodistribution

Une première étude de la localisation de la spexine a été réalisée par immunohistochimie¹⁰⁸. Elle a notamment permis de montrer la co-localisation du NPQ avec l'insuline. Cette localisation au voisinage d'une voie de sécrétion endogène ajouté au fait que le peptide mature de la spexine clivé et sécrété a pu être mis en évidence par western blot¹⁰⁸ a renforcé l'idée que la spexine puisse être un neuropeptide. D'autres analyses préliminaires faisant suite à l'identification de ce peptide ont mis en évidence la présence d'ARNm de la spexine au niveau du cerveau, du pancréas, des reins et de l'estomac^{108,109}. Chez le poisson rouge, l'ARNm de la spexine a été détecté au niveau de la rate, des reins, du cœur, du foie, de l'intestin, de l'hypophyse et des gonades avec une expression majoritaire dans le tectum optique, l'hypothalamus et le tronc cérébral¹¹³. La distribution de l'ARNm et du précurseur peptidique de la spexine a été étudiée chez le rat¹²¹ avec des résultats similaires chez l'Homme¹²².

De manière générale, la spexine est largement exprimée au niveau de plusieurs tissus endocrines avec une localisation majoritaire dans le tissu épithélial alors qu'elle est moindre dans le tissu musculaire et connectif. Cette localisation épithéliale est cohérente avec un possible rôle dans le transport transépithélial, la sécrétion et la prolifération¹²¹. Dans le cerveau de rat, la spexine est co-localisée avec l'hormone corticotrope au niveau du noyau de Barrington et elle est proche de la choline acétyltransférase dans le noyau tegmental latérodorsal¹⁰⁹. L'expression de la spexine dans les différents noyaux du système nerveux associée à sa capacité de sécrétion suggèrent une implication dans la neuromodulation¹²¹. Cette localisation de la spexine étendue à l'ensemble du corps renforce l'idée de son implication dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles à la survie

4.3.2 Rôles

4.3.2.1 Métabolisme énergétique (diabète, obésité & alimentation)

De par la co-localisation de la spexine avec l'insuline observée dans les cellules pancréatiques de rat et de cochon^{108,123}, plusieurs études ont cherché à mettre en évidence son implication sur les paramètres glycémiques. A des concentrations de glucose normales (6 mM), la spexine entraîne une diminution de l'expression (*in vitro*) des gènes de l'insuline sans modifier sa sécrétion alors qu'à des taux de glucose élevés (16 mM) représentatifs d'un état postprandial ou de diabète, la sécrétion d'insuline (*in vitro* & *in*

vivo) induite par l'injection de glucose est inhibée¹²⁴. Plus généralement, le glucose stimule la libération de spexine à court terme mais l'inhibe à plus long terme, probablement via une régulation de l'expression des récepteurs de la spexine. Au contraire, la production et la libération de la spexine est inhibée par la sécrétion d'insuline¹²³. Associé à cela, on note que la spexine entraîne une amélioration de la viabilité et de la prolifération des cellules pancréatiques, altérées en cas de diabète¹²⁴.

Etant donné le lien entre la sécrétion d'insuline et le diabète, l'implication de la spexine dans cette pathologie a été explorée chez l'Homme. Dans le cas du diabète de type 1, la diminution des taux de spexine n'a pas été corrélée avec l'indice de masse corporelle, le taux de glucose ou les paramètres lipidiques¹²⁵. Alors que les observations concernant le diabète de type 2 (DT2) ont montré des résultats contradictoires^{122,125,126}. Chez des patients adultes non obèses atteints de DT2, une diminution des taux de spexine a été observée^{122,125} alors qu'aucune différence n'a été constatée entre des patients adolescents sains et des patients obèses avec une tolérance normale au glucose ou obèses avec un DT2¹²⁶. D'un autre côté Gu et al.¹²² ont mis en évidence une corrélation négative entre le taux de spexine et les paramètres glycémiques/lipidiques contrairement à Karaca et al.¹²⁵ qui n'ont observé aucune relation entre ces paramètres et les taux de spexine.

Une étude de l'expression du gène C12orf39, codant pour la spexine, a permis de mettre en évidence une sous expression importante (environ quinze fois) chez le patient obèse ce qui a suggéré l'implication du peptide dans l'obésité¹²⁷. Il a également été observé chez les patients obèses et sains, une corrélation négative entre les taux circulants de spexine et de leptine qui pourraient donc avoir des effets opposés dans le phénomène d'obésité¹²⁸. L'administration intra-péritonéale (IP) quotidienne de spexine chez des rats et souris à régime riche en graisse a entraîné une réduction de leur poids ainsi qu'une baisse de leur consommation de nourriture, n'étant pas reliée à une altération du goût¹²⁸. Ceci serait dû à une oxydation plus importante des lipides durant la nuit associée à une augmentation de la locomotion. L'ensemble de ces effets faisant suite à l'administration de spexine évoquent une action centrale qui serait associée à une action directe au niveau des adipocytes en empêchant l'absorption d'acides gras. Chez le poisson rouge et le Ya-fish, la prise de nourriture a déclenché une augmentation de l'expression de la spexine alors qu'elle est diminuée chez le groupe à jeun^{113,129}. Un effet opposé a pu être observé chez le mérrou et le pavillon tacheté où une augmentation des taux de spexine après

plusieurs jours de jeûne^{116,117} a été constatée. Mais dans les deux cas, la reprise de nourriture a permis de reverser les effets^{116,117,129}. L'administration de spexine a eu pour effet de diminuer la consommation de nourriture en diminuant le comportement de recherche de nourriture associé à une régurgitation. Il a également été observé une diminution de l'expression de facteurs orexigènes ainsi qu'une augmentation de facteurs anorexigènes suite à l'injection du peptide mature^{113,116,130}.

4.3.2.2 Fonctions endocrines

Nous avons pu voir que la spexine est exprimée dans plusieurs tissus endocrines du corps humain et du rat^{121,122} avec une localisation majoritaire au niveau de la glande surrénale évoquant de possibles rôles dans la modulation des fonctions endocrines. Une administration prolongée d'hormone adrénocorticotrope a induit une diminution de l'expression d'ARNm de la spexine au niveau de la surrénale contrairement à la dexaméthasone qui l'a augmenté¹³¹. Lorsque des cellules adrénocorticales de rat ont été traitées avec la spexine cela a provoqué une augmentation de l'aldostérone ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire¹³¹. Une ablation chirurgicale de la glande surrénale a conduit à une augmentation notable des niveaux d'ARNm de la spexine avec un maximum après huit jours et un retour à la normale trente jours après l'ablation. Cette augmentation dans les premiers jours suivant l'intervention sous-entend un possible rôle de la spexine dans la réparation des tissus surrénaliens lésés¹³¹. Une diminution de la synthèse d'ARNm d'hormone de croissance faisant suite à l'injection de spexine a également été mis en évidence chez certains poissons^{116,132}.

Chez le poisson zèbre et le poisson rouge, la spexine est majoritairement exprimée au niveau du cerveau et des gonades¹¹². L'hypothèse d'un rôle du peptide au niveau de l'axe reproducteur a alors été émise. La spexine a montré, *in vitro* et *in vivo*, une activité inhibitrice sur la libération d'hormone lutéinisante chez le poisson rouge¹¹². Il a également été observé chez certains poissons une modification de l'expression de la spexine durant le cycle de reproduction avec une diminution de l'expression basale lors de la maturation sexuelle^{112,116} qui a pu être reversée en cas d'ovariectomie et bloquée par l'administration d'œstrogènes^{112,117}. L'ensemble de ces informations a permis de mettre en évidence une possible implication de la spexine hypothalamique dans la régulation du cycle gonadique chez le poisson et notamment au niveau de la sécrétion d'hormone lutéinisante.

Cependant, une étude récente¹³⁰ a montré qu'un poisson zèbre avec un knock-out du gène de la spexine présentait un phénotype reproducteur inchangé remettant ainsi en cause le rôle de la spexine dans le cycle reproducteur. Il est également possible que l'axe reproducteur des poissons soit régulé par un système neuroendocrine complexe où l'absence d'un neuromédiateur peut rapidement être compensée. Il a également été montré qu'une injection IP de spexine chez le *Cynoglossus semilaevis* (poisson plat) a déclenché une augmentation des taux d'ARNm de GnIH (gonadotropin inhibitory hormone) et GnRH3 au niveau hypothalamique ainsi qu'une diminution de l'expression d'ARNm de GtH α (gonadotropin hormone α) et FSH β (follicle-stimulating hormone β -subunit) dans l'hypophyse¹³². Alors que, chez le m \acute{e} rou, la spexine n'a eu aucune influence sur l'expression d'ARNm de GnRH1 et des hormones gonadotropes¹¹⁶, suggérant encore une fois des rôles biologiques différents en fonction des espèces. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires, notamment sur des mammifères, pour comprendre l'implication de la spexine endocrine.

4.3.2.3 Douleur

Une administration intra-cérébrovasculaire (icv) de spexine chez des souris a induit une réponse anti-nociceptive dose dépendante lors du test du retrait de la queue, durant environ une heure et qui est maximale après trente minutes pour une dose de 30 nmoles¹³³. Une diminution de la sensibilité à la douleur lors des deux phases du test à la formaline a également été mis en évidence chez le rat et la souris après une injection intra-hippocampale ou intra-cérébrovasculaire de spexine¹³⁴⁻¹³⁶. L'injection icv de spexine non amidée n'a cependant entraîné aucune réponse anti-nociceptive¹³⁶.

Concernant l'effet anti-nociceptif central induit par la spexine observé chez la souris, il a été montré que cette réponse n'était pas médiée par des récepteurs opioïdes car elle n'était pas inhibée par la naloxone (10 mg/kg)¹³³. Cependant, une étude plus récente laisse à penser que cette diminution de la sensibilité à la douleur au niveau du système nerveux central mettrait en jeu les voies opioïdiques¹³⁶. L'explication de ces observations différentes réside dans les modèles de douleurs aiguës utilisés et notamment dans le fait qu'ils induisent différents types de douleurs aiguës potentiellement associées à des voies de signalisations distinctes. En effet, l'étude de Toll et al.¹³³ est basée sur le test du retrait de la queue dont le rôle est de déclencher une douleur nociceptive contrairement au test de la formaline utilisé par Lv et al.¹³⁶ où l'injection d'agents chimiques va entraîner une

lésion des tissus périphériques (phase précoce) associée à une inflammation (phase tardive)¹³⁷. Dans le cas de cette douleur inflammatoire, l'injection icv de spexine permettrait l'activation de GalR₃ ce qui entrainerait la production d'un peptide opioïde, la dynorphine ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs KOR. D'un autre côté, l'effet anti-nociceptif de la spexine dans le modèle de douleur viscérale passerait par l'activation de GalR₂ et conduirait à la libération de proopiomélanocortine associée à l'augmentation de l'expression des récepteurs MOR¹³⁶.

4.3.2.4 *Autres*

La première identification de la spexine a permis de mettre en évidence sa présence au niveau du muscle lisse de l'estomac ainsi que son implication dans la contraction de ce dernier¹⁰⁸ évoquant un possible rôle au niveau du tractus digestif. Une diminution des concentrations circulantes de spexine a été observée chez des patients présentant une constipation fonctionnelle¹³⁸. Des taux plus faibles d'ARNm de la spexine ont été retrouvés dans l'intestin et le colon de souris affamées associés à une diminution du transit intestinal. L'administration de spexine induit également une stimulation de la motilité intestinale grâce à l'activation de GalR₂ qui provoque un influx de Ca²⁺ via des canaux calciques voltage dépendant de type L. Etant donné qu'elle diminue le taux d'acides biliaires totaux ainsi que l'expression de l'ARNm de la 7 α -hydroxylase 1 cholestérol (responsable de la transformation du cholestérol en acide biliaire) au niveau du foie de la souris¹³⁹, la spexine est également impliquée dans le métabolisme de l'acide biliaire au niveau hépatique.

Des effets cardiovasculaires et rénaux ont également été constatés. En effet, l'injection icv de spexine chez le rat a entraîné une augmentation de la pression artérielle moyenne ainsi qu'une diminution du rythme cardiaque et du débit urinaire¹³³.

L'escitalopram est un antidépresseur connu pour entrainer une prise de poids et étant donné que la spexine est connue pour être impliquée dans la prise de poids et la régulation du métabolisme énergétique^{113,116,117,122-129}, les interactions possibles entre ces produits ont été étudiées. Il a été montré que l'administration IP d'escitalopram chez le rat pendant quatre semaines a entraîné une diminution de l'expression d'ARNm de la spexine au niveau de l'hippocampe alors qu'elle était augmentée dans l'hypophyse et le striatum¹⁴⁰.

4.4 Relations Structure – Activité (RSA)

Au début de ces travaux il y avait très peu de données concernant la relation entre la structure de la spexine et son activité pour les récepteurs GalR_{2/3}. Concernant la galanine, il a été mis en évidence que ce peptide présente majoritairement une structure sous forme d'hélice α sur la partie N-terminale. Cette hélice est également connue pour être impliquée dans la liaison de la galanine au récepteur GalR₂ contrairement au reste de la structure secondaire^{141,142}. Une analyse associant dichroïsme circulaire et RMN de la spexine de poisson rouge¹¹³ et de souris¹⁴³ a permis de montrer que le peptide présente une structure aléatoire entre l'Asn¹ et la Pro⁴ contrairement au reste de la molécule (Gln⁵ à Gln¹⁴) qui adopte une structure sous forme d'hélice α (Figure 14).

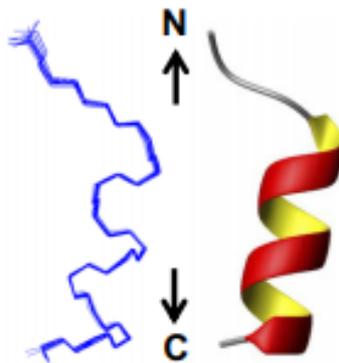


Figure 14. Structure adoptée par le peptide mature de la spexine du poisson rouge¹¹³

La surface moléculaire de la spexine est relativement hydrophobe à l'exception de la Lys¹¹ qui se trouve être le seul résidu chargé de la molécule et qui doit probablement intervenir dans la liaison à la cible biologique.

Même si l'hélice α de la spexine se trouve en position C-terminale il semblerait qu'elle participe activement à la liaison du peptide sur GalR₂. En effet, une modélisation du récepteur par homologie suivie d'un docking du peptide réalisé par Wong et al.¹⁴³ a permis de mettre en évidence l'implication des résidus Gln⁵, Leu¹⁰, Lys¹¹, Gly¹², Ala¹³ et Gln¹⁴ dans la liaison au récepteur. D'autre part, il a également été suggéré que Asn¹, Trp², Gly¹², Ala¹³ et Gln¹⁴ joueraient un rôle dans la stabilité du complexe peptide/récepteur. Quant aux résidus Trp², Gln⁵, Lys¹¹, Gly¹² et Ala¹³ ils seraient également importants pour la sélectivité du peptide entre les différents récepteurs de la galanine. Une autre étude¹⁴⁴

a également permis de mettre en évidence les acides aminés de la spexine impliqués dans l'activité et la sélectivité.

Comme mentionné au début de ce chapitre, la spexine et la galanine présentent une forte homologie de séquence. La substitution de certains résidus de la spexine par ceux retrouvés sur la galanine (Figure 15) a permis de diminuer l'activité sur GalR₃ tout en maintenant celle sur GalR₂. Mettant ainsi en évidence l'implication de ces acides aminés dans la sélectivité. A côté de cela, la substitution des acides aminés de la série L par ceux de la série D a montré que les résidus Thr³, Tyr⁹ et Leu¹⁰ sont fortement impliqués dans l'activité du peptide. Le remplacement ou la fonctionnalisation de l'Asn¹ a également permis d'augmenter la stabilité du peptide sans en modifier l'activité.

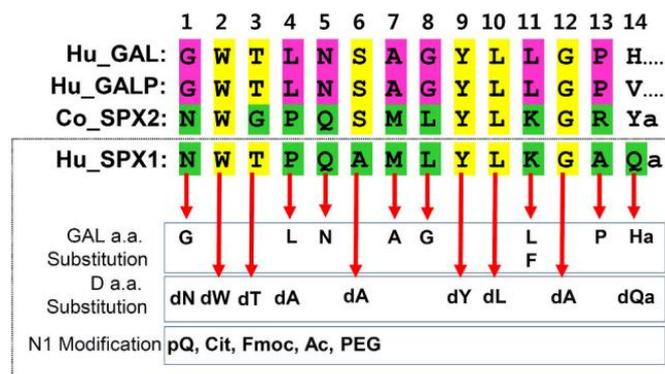


Figure 15. Alignement des séquences humaine de la galanine, GALP, spexine1 et de la spexine2 de cœlacanthe. Les résidus conservés sont indiqués en **jaune**, ceux spécifiques de la spexine sont en **vert** et ceux spécifiques de la galanine sont en **violet**. Les résidus de la spexine humaine ont été modifiés comme indiqué¹⁴⁴

Bien que la spexine et les récepteurs de la galanine soient connus depuis plusieurs années, l'activation de ces RCPGs par le NPQ n'a été mis en évidence que récemment. Cela explique sans doute le fait qu'une majorité des effets *in vivo* de la spexine n'ont pas été associés aux GalRs. Bien que certaines études aient démontrées l'influence du complexe spexine/GalR₂ dans les phénomènes de régulation de la douleur, son implication exacte reste encore assez vague. Le développement d'outils chimiques permettant un contrôle spatio-temporel précis de l'activation de GalR₂ pourrait représenter une voie importante pour mieux comprendre l'implication du système spexine/GalR₂ dans les voies non-opioïdes de la douleur et ainsi le valider comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la douleur.

5. La photopharmacologie comme outil pour nous éclairer sur le vivant

5.1 De l'optogénétique à la photopharmacologie

Du fait de l'importance grandissante des neurosciences, il a été nécessaire de développer des méthodes permettant une étude spatio-temporelle du fonctionnement des circuits neuronaux¹⁴⁵. Les premières techniques d'excitation électrique de populations neuronales ont permis une stimulation temporelle précise mais sans spécificité cellulaire. D'un autre côté les études de pharmacologie et de génétique, bien que spécifiques dans certains cas, n'ont pas permis un contrôle temporel de la stimulation neuronale. C'est en 1979 que pour la première fois Francis Crick a suggéré l'utilisation de la lumière comme outil d'étude spatio-temporelle dans les neurosciences^{146,147}. Depuis ce jour son utilisation n'a cessé de se développer afin de se rapprocher de ce qui se fait de mieux dans la nature.

La lumière est une onde électromagnétique composée d'un flux de particules de masse nulle appelées photons et certaines molécules possèdent des motifs chimiques (ou chromophores) capables d'absorber ces photons¹⁴⁸. Cela entraîne une modification de la répartition électronique de la molécule qui passe alors de l'état fondamental à un état excité. Cet état électronique étant instable, la molécule cherche à revenir à l'état fondamental en éliminant le trop plein d'énergie reçu via différents processus qui peuvent être représentés selon le diagramme de Jablonski¹⁴⁸ (Figure 16). Ces phénomènes peuvent être non radiatifs comme la conversion interne (rotation/vibration de liaisons) ou la conversion inter-système (passage de l'état S_1 à T_1). Ils peuvent également être de nature radiative avec l'émission d'un photon, c'est notamment le cas de la fluorescence et de la phosphorescence.

La première et la plus connue des méthodes d'étude des neurones grâce à la lumière reste certainement l'optogénétique qui est définie comme la combinaison de processus optiques et génétiques. Plus précisément elle utilise la stimulation par la lumière de protéines photosensibles encodées génétiquement¹⁴⁹. Ceci ayant pour but de contrôler des événements précis dans le temps au niveau de cellules spécifiques¹⁵⁰. Les protéines transmembranaires généralement utilisées pour ces techniques sont la channelrhodopsine^{2151,152} et l'halorhodopsine^{153,154}. Il s'agit là d'opsines microbiennes

retrouvées chez les procaryotes sous forme de canaux ioniques dont la stimulation par la lumière va permettre un influx d'ions conduisant à une excitation ou une inhibition du neurone¹⁵⁵.

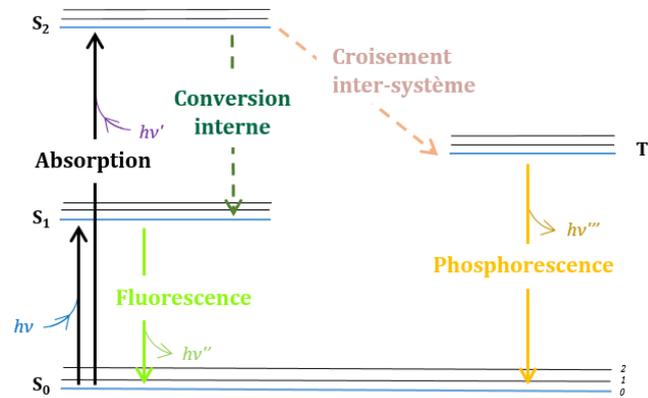


Figure 16. Diagramme de Jablonski

(S_0 : état fondamental ; S_1/S_2 : états singulet ; T_1 : état triplet ; $h\nu$: photon)¹⁴⁸

Bien que l'optogénétique microbienne (Figure 17) permette une stimulation spatio-temporelle précise, elle ne reflète en rien une excitation physiologique normale des neurones car les opsines utilisées ne sont pas retrouvées dans les systèmes eucaryotes¹⁵⁶. L'élaboration d'une nouvelle technique a donc été indispensable pour permettre une étude plus précise des circuits neuronaux. Le développement de l'optogénétique pharmacologique¹⁵⁷ (Figure 17) a permis de répondre à cette problématique. Dans cette technique un récepteur endogène est génétiquement modifié de manière à introduire un nouveau site de liaison. Cela permettra ensuite la fixation covalente par bioconjugaison d'un ligand synthétique rendu sensible à la lumière grâce à l'introduction d'un groupement photoisomérisable. La pharmacologie traditionnelle est ici associée à l'optique et la génétique pour permettre une étude spatio-temporelle précise où l'on retrouve la spécificité qui faisait défaut à l'optogénétique microbienne.

En dépit des progrès réalisées dans ce genre de techniques, l'optogénétique microbienne & pharmacologique nécessitent l'introduction de cibles biologiques génétiquement modifiées pouvant entraîner une perturbation des systèmes biologiques étudiés¹⁵⁸. La photopharmacologie (optopharmacologie ou optogénétique chimique) permet de s'affranchir de cet aspect génétique et des inconvénients qui lui incombent. En effet, grâce à la lumière il est possible de moduler les propriétés pharmacocinétiques et

pharmacodynamiques de ligands traditionnels¹⁵⁹. Cela dans le but d'exercer un contrôle spatio-temporel de l'activité biologique du ligand. Actuellement, deux stratégies sont utilisées (Figure 17) :

- Les ligands photocages où le ou les résidu(s) fonctionnel(s) de la molécule sont protégés par un groupement photolabile
- Les ligands photoisomérisables qui possèdent dans leur structure un motif permettant de passer de manière réversible d'une forme active à inactive

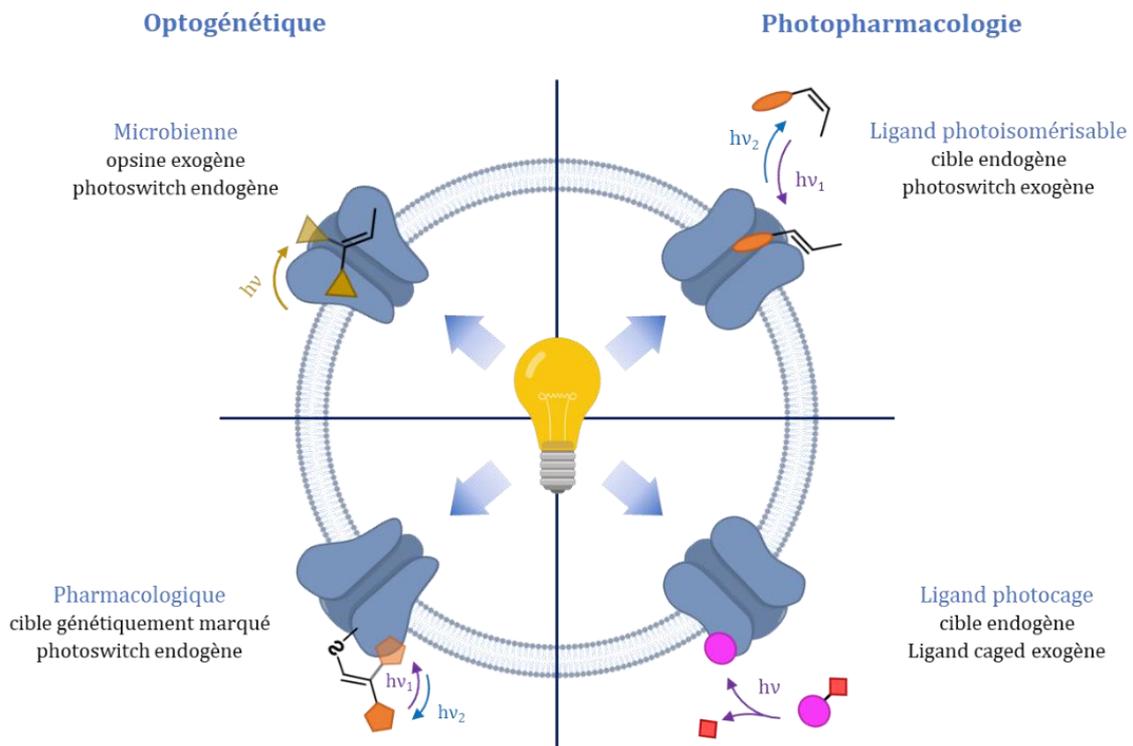


Figure 17. Techniques et outils photochimiques utilisés dans le domaine des neurosciences (inspirée de Kramer et al)¹⁵⁶

5.2 La photoisomérisation, une approche réversible

5.2.1 Principe

Cette stratégie repose sur l'introduction d'un motif photoisomérisable au sein d'une molécule bioactive¹⁶⁰. A la suite de leur exposition à la lumière les ligands photoisomérisables vont, grâce à l'absorption d'un photon, s'isomériser de manière

réversible. Cette isomérisation conduit à une modification significative de leur structure et de leurs propriétés¹⁶⁰.

Plusieurs méthodes d'utilisation des motifs photoisomérisables ont vu le jour^{159,161}. Elles sont regroupées et se distinguent par la manière dont le ligand interagit avec la cible biologique (Figure 18). Il y a d'une part les ligands photochromiques (PCLs) où les composés évoluent librement dans les milieux biologiques. Leur isomérisation entre deux configurations va entraîner une modification de leur affinité/efficacité et/ou pharmacocinétique/dynamie. A côté de cela, il y a les ligands qui sont liés de manière covalente à la cible d'intérêt (TLs)¹⁶². Ici, la liaison préalable à la cible permet d'augmenter la concentration locale du ligand tout en réduisant sa diffusion. Cette classe regroupe elle-même deux sous catégories qui sont définies selon la distance entre le site de bioconjugaison et le site de liaison. Lorsque ces derniers sont proches il s'agit de ligands photoisomérisables covalents (PTLs) alors que si ils sont éloignés, nous parlons plutôt de ligands orthogonaux photoisomérisables liés à distance (PORTLs). Il existe plusieurs autres sous catégories de TLs¹⁶¹ cependant nous ne citons ici que celles ayant été appliquées à l'étude des RCPGs. Enfin nous pouvons évoquer les linkers photochromiques (light responsive crosslinkers) où les deux extrémités du motif photoisomérisables sont liées à la cible biologique de façon à ce que son isomérisation puisse moduler la conformation de la cible et par conséquent l'activité biologique.

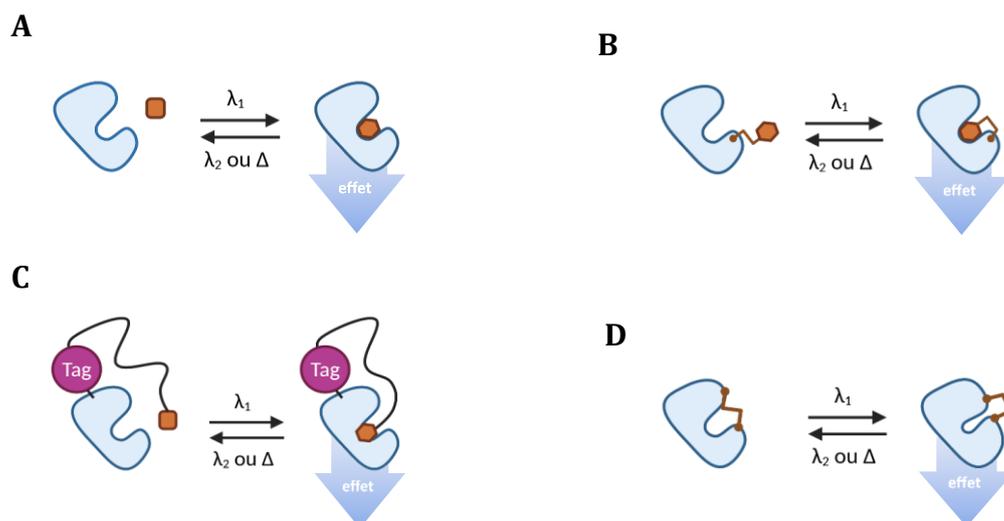


Figure 18. Les différentes classes de ligands photoisomérisables (A) PCLs, (B) PTLs, (C) PORTLs & (D) linker photochromique^{159,161}

Dans ce manuscrit, seule l'approche PCLs est assimilée à la photopharmacologie. En effet nous avons pu constater que la distinction entre optogénétique pharmacologique et photopharmacologie peut être évasive. De notre point de vue, les approches TLs ainsi que les linkers photochromiques ont plus trait à l'optogénétique pharmacologique car elles font intervenir des modifications artificielles de la cible d'intérêt¹⁶³.

Au sein d'un composé bioactif, le motif photoisomérisable peut être introduit au niveau d'un pharmacophore ou entre deux pharmacophores où il va jouer le rôle d'espaceur. Lorsqu'il est introduit de façon optimale son isomérisation permettra d'alterner entre une configuration ayant une faible affinité et une autre ayant une forte affinité pour la cible biologique¹⁶⁰.

5.2.2 Les motifs photoisomérisables

Une grande diversité de motifs photoisomérisables a été développée à ce jour. Ils peuvent être regroupés en deux catégories en fonction du mécanisme d'isomérisation mis en jeu^{160,161} (Figure 19). En effet on retrouve ceux qui s'isomérisent entre une configuration *cis* & *trans* ce qui a pour conséquence une modification de leur structure et de leur polarité. Il s'agit des azobenzènes, des stilbènes et des hémithioindigos. De l'autre côté, les spiropyranes, les diaryléthènes et les fulgides font partis de la catégorie où le motif oscille entre des configurations dites « fermée » et « ouverte ». Ici, l'isomérisation conduit à une modification de la flexibilité et des propriétés électroniques du composé. Dans la première catégorie le composé peut, après son exposition à la lumière, revenir à l'équilibre en s'isomérisant naturellement par relaxation thermique (Δ). Ce n'est pas le cas pour les configurations ouverte/fermée qui sont toutes deux thermodynamiquement stables.

Pour être utilisé *in vivo*, un motif photoisomérisable doit répondre à plusieurs critères^{160,164} :

- Son isomérisation doit être rapide et efficace. Cet aspect est défini par le coefficient d'extinction molaire (ϵ) et le rendement quantique d'isomérisation (φ) associés à une différence significative des propriétés structurales ou biologiques entre les deux isomères.

- Le ligand photoisomérisable de même que ses métabolites doivent être stables et non toxique *in vivo* à l'équilibre ainsi qu'après son exposition à la lumière.
- Les longueurs d'ondes (λ) utilisées doivent être compatibles avec l'application sur le vivant.

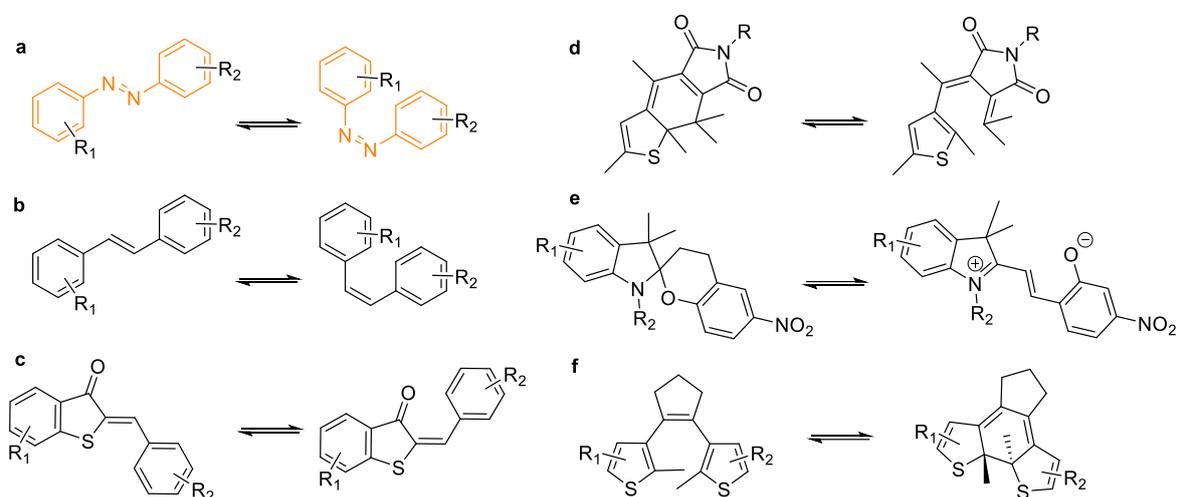


Figure 19. Les différents motifs photoisomérisables : (a) azobenzènes, (b) stilbènes, (c) hemithioindigos, (d) fulgides, (e) spiropyranes & (f) diaryléthènes¹⁶¹

Parmi tous les motifs photoisomérisables cités précédemment, aucun ne coche toutes les cases du motif parfait. Mais à l'heure actuelle, les plus utilisés restent les azobenzènes en raison d'un certain nombre de critères qui en font des motifs photoisomérisables optimaux¹⁶⁴. En effet ils s'isomérisent de manière rapide et efficace et présentent peu de photoblanchiment. Bien que leurs longueurs d'ondes d'excitations se situent en majorité dans le domaine de l'ultraviolet (UV), les azobenzènes restent les motifs les plus couramment utilisés en pratique.

5.2.3 Les azobenzènes

5.2.3.1 Propriétés spectroscopiques

Les azobenzènes représentent une classe de molécules chimiques colorées qui ont été découvertes au milieu des années 1800. Mais c'est seulement en 1937 que Hartley a mis en évidence l'isomérisation *cis-trans* de la double liaison -N=N- après un stimulus lumineux¹⁶⁵ (Figure 20).

La présence des noyaux phényles de part et d'autre de la double liaison -N=N- permet d'étendre la conjugaison du système et ainsi d'améliorer la photostabilité du composé tout en diminuant les énergies nécessaires à l'excitation en comparaison des composés aliphatiques¹⁶⁶. Dans le cas de l'azobenzène non-substitué, c'est la forme *trans* qui prédomine (> 99.99%) en l'absence de stimulus extérieur du fait de sa stabilité thermodynamique plus importante (10-12 kcal par rapport à la forme *cis*)^{164,167}. Plusieurs études ont mis en évidence le fait que l'azobenzène sous sa forme *trans* possède une structure globalement planaire avec une symétrie C_{2h} (Figure 20), un angle dièdre -N-N-C autour de 114° et un moment dipolaire proche de zéro^{166,168-170}. Au contraire, l'isomère *cis* adopte une structure « courbée » avec un moment dipolaire de 3 Debyes où les cycles benzéniques se trouvent à environ 53° par rapport au plan de la liaison -N=N-^{166,168} conduisant à une symétrie C_{2v} ¹⁷¹ (Figure 20).

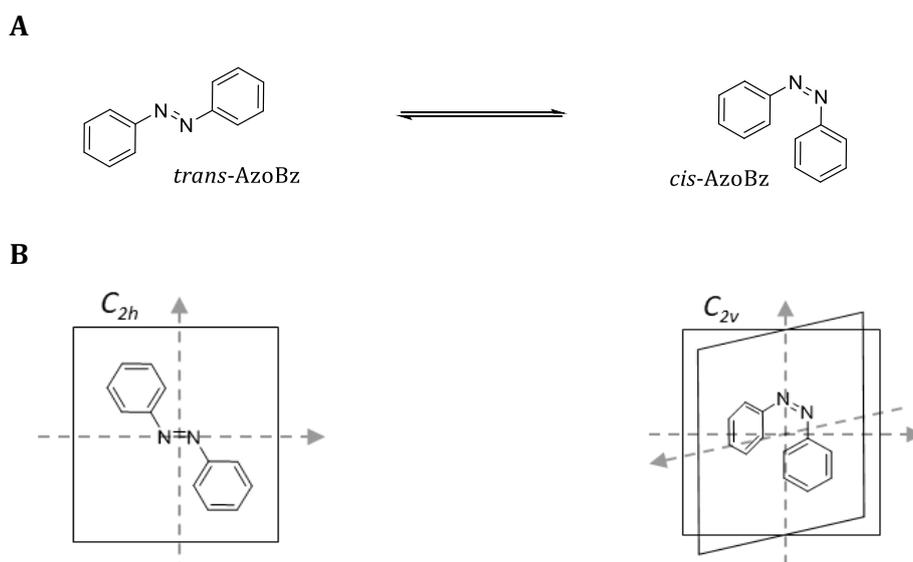


Figure 20. Les isomères *trans* & *cis* de l'azobenzène
(A) structure & (B) symétrie

Le spectre d'absorption du *trans*-azobenzène présente des maximums d'absorption aux alentours de 316 nm et 443 nm alors qu'ils se situent à 280 nm et 430 nm pour l'isomère *cis*^{172,173}. Il est également intéressant de noter que les spectres d'absorption des formes *cis* & *trans* de l'azobenzène (Figure 21) se recouvrent par endroits ce qui permet de définir des points isobestiques à 268 nm et 372 nm qui correspondent à des longueurs d'onde où les deux isomères présentent un coefficient d'absorption molaire identique.

L'étroite association de ces deux spectres permet d'expliquer le fait que l'état photostationnaire (PSS), défini comme l'équilibre des proportions relatives des isomères *cis* & *trans* à une certaine longueur d'onde et qui ne varie plus avec le temps d'exposition à la lumière¹⁷³, soit de 80% pour la forme *cis* et 95% pour la forme *trans*¹⁶⁴.

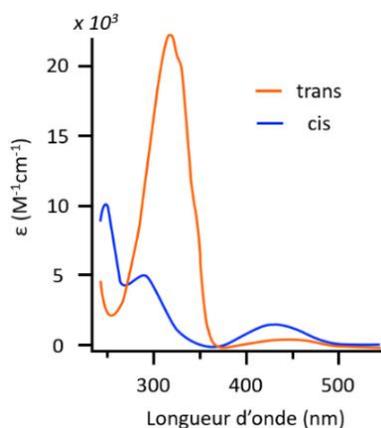
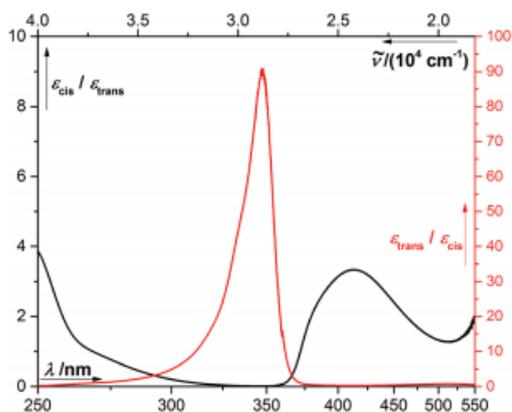


Figure 21. Spectres d'absorption de la forme *cis* (—) & *trans* (—) de l'azobenzène dans l'éthanol (inspirée de Beharry & Woolley)¹⁶⁴

Lorsque l'on fait une analyse du ratio des coefficients d'absorption molaire de la forme *cis* et de la forme *trans* de l'azobenzène dans le méthanol, on constate qu'à 347 nm l'isomère *trans* absorbe 91 fois plus que la forme *cis* alors que ce dernier n'absorbe que 3.3 fois plus que le *trans*-azobenzène à une longueur d'onde de 413 nm¹⁷² (Figure 22). Ces longueurs d'onde peuvent donc être utilisées pour déclencher l'isomérisation.

Les maximums d'absorption observés sur les spectres permettent également de définir plusieurs bandes d'absorption^{166,173}. Les deux isomères présentent une bande de faible énergie correspondant à une transition $n \rightarrow \pi^*$ aux alentours de 440 nm. L'isomère *trans* possède également une autre bande de plus forte énergie aux alentours de 320 nm qui équivaut à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Bien qu'ayant une apparence différente, cette même bande est retrouvée sur le spectre de la forme *cis* aux environs de 280 nm. Ce shift est dû à la configuration différente de l'azobenzène et notamment à la perte de planéité de la forme *cis*. Nous observons également une transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$ aux alentours de 230-240 nm, retrouvée chez les deux isomères. Elle se situerait au niveau des noyaux benzéniques mais ne serait pas impliquée dans la réaction d'isomérisation¹⁷³. L'ensemble de ces informations justifie l'utilisation de longueurs d'ondes autour de 320 nm pour

déclencher l'isomérisation *trans* → *cis* et de longueurs d'ondes aux environs de 440 nm pour permettre l'isomérisation *cis* → *trans*.



λ [a]	ϵ_{trans} [b]	ϵ_{cis} [b]
254	2446.0 ± 2.6	7342 ± 93
268	4365.4 ± 2.0	4431 ± 53
280	8146.9 ± 1.5	4976 ± 59
313	22337.4 ± 1.0	2016 ± 37
334	17383.6 ± 0.7	378 ± 43
337	14733.4 ± 0.6	276 ± 37
345	10077.4 ± 0.7	
355	3098.1 ± 0.7	
358	1658.1 ± 0.7	73 ± 13
365	374.0 ± 0.6	89 ± 9
405	287.3 ± 0.1	942 ± 12
436	486.2 ± 0.3	1402 ± 23

Figure 22. Coefficient d'absorption molaire (ϵ) de la forme *trans* (25°C) et *cis* (35°C) de l'azobenzène dans le MeOH [a] : longueur d'onde en nm ; [b] : $\epsilon \pm$ écart type en $M^{-1}cm^{-1}$;
— : $\epsilon_{cis} / \epsilon_{trans}$; — : $\epsilon_{trans} / \epsilon_{cis}$ (inspirée de Vetráková et al¹⁷²)

Différentes études n'ont pas permis de mettre en évidence une influence notable du solvant sur le spectre d'absorption de ces isomères^{166,174}. Cependant, il a été observé qu'une augmentation de la température entraîne une diminution de l'absorbance associée à un déplacement hypsochrome¹⁷⁴. Cette variation serait due à une modification de l'angle de torsion -N=N- à la suite d'une redistribution de l'énergie thermique acquise au sein de la molécule.

5.2.3.2 Mécanisme d'isomérisation

Le rendement quantique et le mécanisme d'isomérisation sont influencés par le mode d'excitation (thermique ou lumineux), la longueur d'onde, le solvant, les substituants présents sur les noyaux phényles, la température et la pression¹⁷⁵.

Concernant l'isomérisation *trans* → *cis*, les premières études effectuées ont avancé le fait qu'elle passerait par des mécanismes classiques d'inversion pour une excitation $n \rightarrow \pi^*$ et de rotation à la suite d'une excitation $\pi \rightarrow \pi^*$ (Figure 23)^{175,176}. Cependant, de plus

en plus d'études remettent en question ces observations en proposant des mécanismes de rotation/inversion plus complexes (Figure 23) et parfois des phénomènes complètement différents dont nous ne détaillerons pas les aspects dans ce manuscrit^{170,175}.

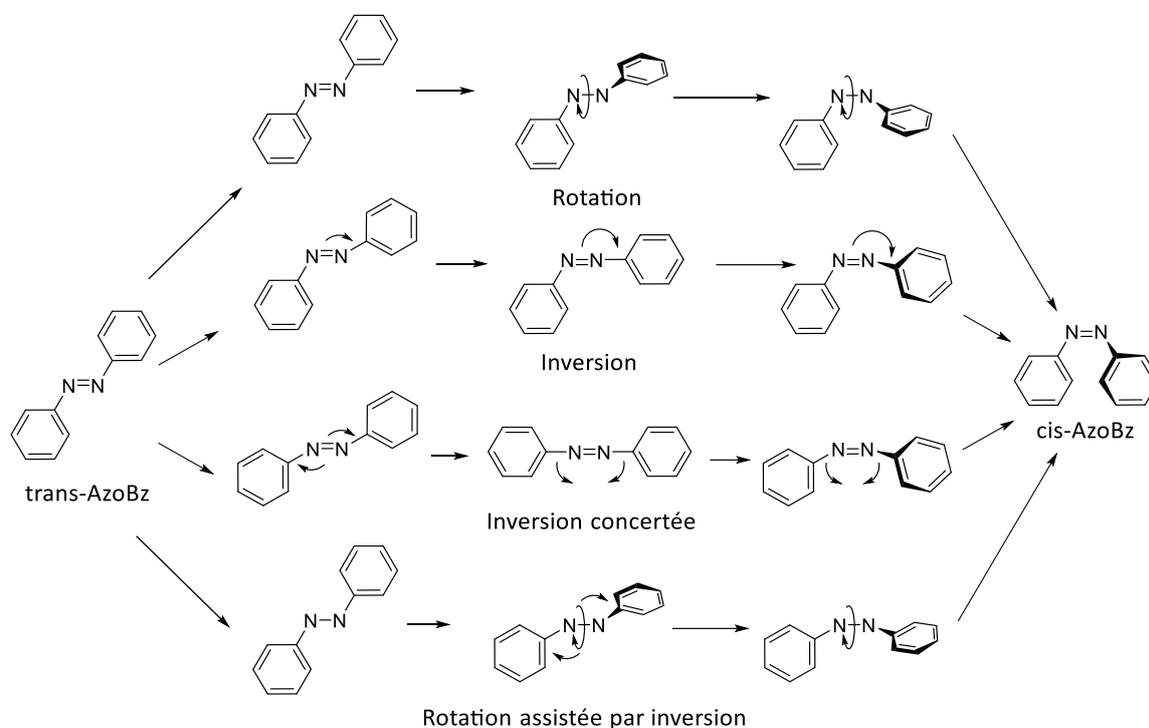


Figure 23. Mécanismes proposés pour l'isomérisation *trans* → *cis* des azobenzènes (inspirée de Bandara & Burdette)¹⁷⁵

Du fait de la plus grande stabilité thermodynamique de la configuration *trans*, le *cis*-azobenzène s'isomérisise spontanément par relaxation thermique. Toutefois il est possible de forcer cette isomérisation en exposant le composé à une lumière ayant une longueur d'onde de 450 nm, qui correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ retrouvée chez la forme *cis*. Dans le cas de la relaxation thermique il semblerait que l'isomérisation passe par un mécanisme d'inversion alors que, en ce qui concerne la photoisomérisation, il s'agirait d'un phénomène de rotation¹⁷⁰.

5.2.3.3 La modulation chimique des azobenzènes pour en améliorer les propriétés

Au fil du développement de la recherche en photopharmacologie, un grand nombre de variantes du noyau azobenzène ont été synthétisés afin de répondre aux besoins suscités par leurs multiples applications^{164,177} (Figure 24).

L'introduction de substituants sur les cycles benzéniques a permis de moduler la position et l'aspect des bandes d'absorption de l'azobenzène. Lorsque des groupements donneurs d'électrons ou un groupement donneur et un groupement accepteur (système push/pull) sont ajoutés en positions *para* des atomes d'azotes les longueurs d'ondes des maximums d'absorption sont décalées vers le rouge^{164,175,178}. Ce déplacement bathochrome s'explique par l'augmentation de la densité électronique des cycles benzéniques et du moment dipolaire ce qui conduit à un état excité plus stable. Ainsi la différence d'énergie avec l'état fondamental est plus faible ce qui se traduit par le déplacement bathochrome du spectre d'absorption. Cependant, cet effet a également des conséquences sur la relaxation thermique de la forme *cis*. En effet, l'augmentation de la densité électronique des noyaux benzéniques entraîne également une diminution des énergies d'activation nécessaires à la relaxation *cis* → *trans*. Les temps de demi-vie de la forme *cis* ($\tau_{1/2}$) sont alors réduits. Cela peut être un avantage supplémentaire si le processus biologique ciblé est de courte durée. Ce n'est malheureusement pas le cas pour tous où un processus plus long nécessiterait une exposition à la lumière quasi-continue qui pourrait nuire au système étudié. Pour résoudre ce problème, des substituants ont été ajoutés en position *ortho*. Les contraintes stériques induites par ces nouveaux groupements permettent de stabiliser la forme *cis* et/ou déstabiliser la forme *trans* ce qui a pour conséquence une augmentation des temps de demi-vie de la forme *cis*.

Plus récemment, une nouvelle sous-catégorie de motifs photoisomérisables a vu le jour. Il s'agit des azopyrazoles où l'un des cycles benzéniques a été remplacé par un cycle hétéroaromatique¹⁷⁹⁻¹⁸². Cela permet non seulement de conserver les propriétés d'isomérisation mais également une stabilisation encore jamais vue jusque-là de la forme *cis* avec des $\tau_{1/2}$ d'environ milles jours¹⁸³. Associé à cela, la présence des atomes d'azotes supplémentaires permet d'augmenter le champ des modulations de ce genre de motif. Son utilisation par l'équipe de Wiktor Szymanski¹⁸⁴ a notamment permis de démontrer une efficacité supérieure à celle des azobenzènes dans le cadre du développement d'un inhibiteur de protéine kinase photoisomérisable.

Afin de développer des motifs azobenzènes pouvant s'isomériser lors de leur exposition dans l'infrarouge, il est également possible d'utiliser une excitation à deux photons¹⁸⁵. L'utilisation de deux photons de plus faible énergie mais ayant une longueur

d'onde élevée permettra de s'affranchir de l'utilisation des ultraviolets tout en apportant suffisamment d'énergie pour permettre l'isomérisation.

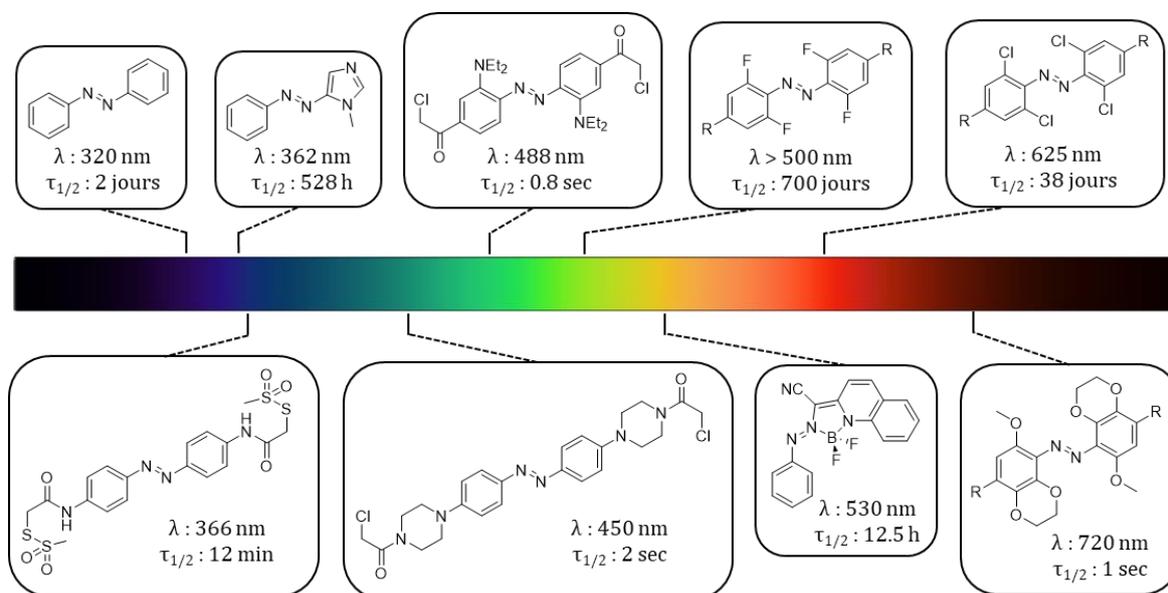


Figure 24. Exemples de modulations effectuées sur les azobenzènes

(λ : longueur d'onde d'absorption maximale ; $\tau_{1/2}$: temps de demi-vie de la forme cis)

Depuis leur découverte et leur première utilisation en photopharmacologie, les motifs azobenzène ont été largement exploités afin de développer de nombreux ligands photoisomérisables¹⁵⁹. Toutefois nous ne détaillerons ici que l'utilisation des azobenzènes appliquée au développement de peptides photoisomérisables ciblant les RCPGs.

5.2.4 Les peptides photoisomérisables

Les peptides constituent une des clés du fonctionnement de notre organisme. Leur utilisation sur le vivant est depuis longtemps reconnue même si certaines de leurs propriétés, notamment leur faible stabilité plasmatique, nous empêchent d'exploiter pleinement leur potentiel. Pour pallier ce problème une approche consiste à modifier ces peptides en y introduisant des résidus non naturels permettant ainsi le développement de peptidomimétiques ayant démontrés leur efficacité dans le domaine de la chimie biologique ou encore dans le développement de nouveaux composés à visée thérapeutique¹⁸⁶.

Concernant l'utilisation des azobenzènes, Goodman fut le premier à introduire un motif azoaromatique sur la chaîne latérale d'un acide aminé et à étudier son impact sur la

conformation du peptide⁵⁴. A partir de là, de nombreuses études ont vu le jour et ont conduit au développement de plusieurs approches visant à concevoir les peptides photoisomérisables (Figure 25). La plus classique repose sur l'utilisation de l'azobenzène en tant que chaîne latérale d'un acide aminé grâce à l'emploi de la L-phénylazophénylalanine (AzoF). Vient ensuite la deuxième approche où les motifs acide 4-[(4-aminométhyl)phénylazo]benzoïque¹⁸⁷ (AMPB), acide 3-[(3-aminométhyl)phénylazo]phényle acétique¹⁸⁸ (AMPP) ou acide 4-[(4-amino)phénylazo]benzoïque (APB) sont directement introduits au sein de la séquence peptidique. Enfin, la dernière approche concerne uniquement les peptides possédant une structure secondaire sous forme d'hélice α . Dans ce cas précis un linker photoisomérisable de type acétamido est agrafé sur le peptide aux positions i et $i+n$ où n représente le nombre de résidus séparant ces deux acides aminés. Ainsi l'isomérisation permettra de moduler la structure secondaire du peptide où l'un des isomères va favoriser la formation de l'hélice α alors que l'autre entrainera une déstructuration du peptide. Ce paramètre est dépendant des positions d'insertion mais également de la longueur du linker. Les plus utilisés restent le bis(chloroacétamido)azobenzène (BCA) et son analogue 3,3-bis(sulfonato)-4,4-bis(chloroacétamido)azobenzène (BSBCA).

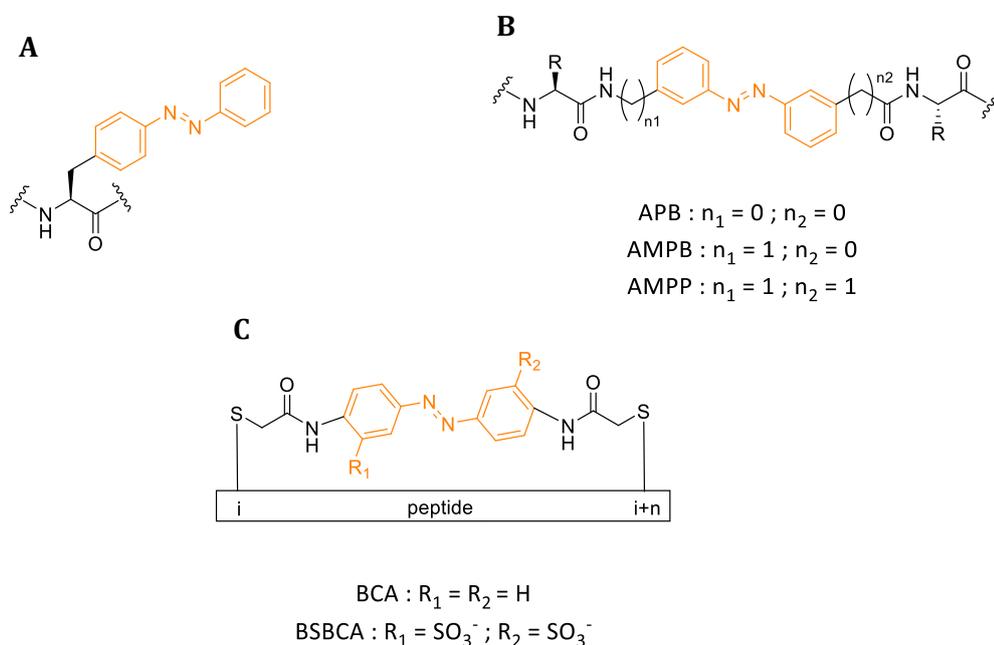


Figure 25. Stratégies d'introduction de motifs azobenzène au sein d'un peptide (A) sur la chaîne latérale d'un acide aminé, (B) dans la chaîne peptidique ou sous forme (C) d'agrafe photoisomérisable

Les premières études au sujet des peptides photoisomérisables se focalisaient sur l'étude de leur conformation après exposition à la lumière¹⁷⁷. Toutefois, de plus en plus d'études récentes s'intéressent à l'impact de ces peptides sur bon nombre de cibles et processus biologiques. C'est notamment le cas pour les RCPGs où plusieurs de ces peptidomimétiques ont eu une incidence plus ou moins significative sur la fonction biologique de ces récepteurs. Nous pouvons par exemple citer le GLP1 (glucagon like peptide 1), impliqué dans le diabète de type 2, où l'introduction d'un motif AMPP a permis d'observer une diminution de la libération d'insuline de 2.5 fois pour la forme *trans* du peptide comparé à sa forme native¹⁸⁸. Il y a également le cas du neuropeptide Y sur lequel plusieurs motifs photoisomérisables ayant une flexibilité différente ont permis de moduler l'affinité du peptide pour le Y₄R avec notamment une différence de K_i de l'ordre de deux en ce qui concerne l'azobenzène¹⁸⁹.

5.3 Le photoclivage, une méthode irréversible

5.3.1 Principe

L'utilisation de certains groupements protecteurs ayant la capacité de s'éliminer après une exposition aux ultraviolets est connue depuis longtemps. C'est en 1962 que Barltrop a pour la première fois mis en évidence la libération de la glycine reliée à des dérivés benzyloxycarbonylés après leur exposition aux ultraviolets¹⁹⁰. Quelques années après cela, ce sont Engels et Schlaeger en 1977 puis Hoffman en 1978 qui furent les premiers à appliquer ce concept à des molécules d'intérêt biologique^{191,192}. Rapidement, Hoffman qualifia ces ligands de « caged compounds ». Cependant cette dénomination restait abstraite et c'est pourquoi les termes « photoactivatable », « light-triggered » ou « photocage » lui sont aujourd'hui préférés¹⁴⁹. A la suite de ces études les groupements photolabiles ont pu être utilisés sur une multitude de ligands d'intérêt biologique comme des ions^{193,194}, des neurotransmetteurs¹⁹⁵ ou encore des peptides¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ et des protéines^{199,200}.

Cette technique repose sur l'introduction d'un groupement protecteur photolabile (GPP) au niveau d'un ou de plusieurs sites actifs du ligand de manière à rendre la molécule inactive. L'application contrôlée d'un rayonnement lumineux permettra de cliver le groupement protecteur pour libérer le ligand actif qui va alors produire l'effet biologique

recherché¹⁵⁷ (Figure 26). Dans certains cas, c'est l'effet inverse qui se produit. Le ligand protégé possède toujours une activité biologique et le départ du GPP va conduire à une diminution voire une suppression de cette activité¹⁴⁹.

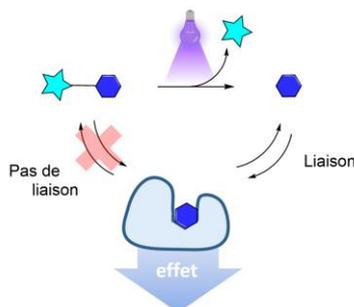
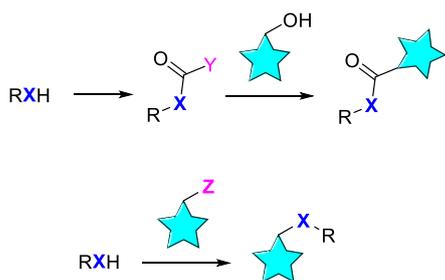


Figure 26. Utilisation d'un ligand photocage sur le vivant

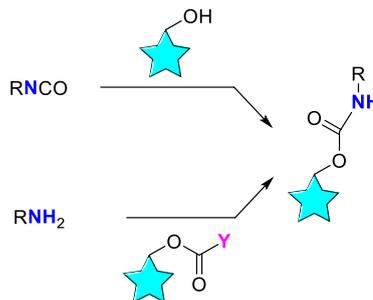
Contrairement aux dérivés photoisomérisables, le clivage d'un groupement photolabile est un processus irréversible auquel s'ajoute également le problème de la diffusion et du métabolisme des GPPs libérés. Toutefois la conception d'un ligand photocage est plus aisée que pour un ligand photoswitch. En effet cela démarre toujours par l'identification du ou des résidus responsables de l'activité biologique. Le type de résidu permettra de définir le groupement photolabile adéquat ainsi que la bonne stratégie de couplage^{201,202}. Les principaux résidus pouvant être protégés sont généralement une amine, un alcool, un thiol, un carboxylate ou encore un phosphate ce qui permet d'introduire le GPP de manière covalente via des liaisons ester, éther, carbamate ou amide^{203,204} (Figure 27).

Du fait de la présence de plusieurs résidus réactifs au sein d'un composé d'intérêt biologique, la conception d'un ligand photoclivable se fait généralement par synthèse organique multi-étapes^{201,202}. Et de par la nature hydrophobe des groupements photolabiles introduits, ces synthèses se font dans des solvants non-aqueux. Il est donc essentiel que la dernière étape de synthèse permette d'obtenir un composé soluble dans les milieux biologiques aux concentrations assurant l'activité biologique²⁰². Ajouté à cette solubilité, il faut prendre en compte la stabilité du lien photolabile durant toute la voie de synthèse mais également dans les conditions où il sera appliqué. Une faible stabilité conduira à une hydrolyse spontanée de la liaison avec une libération prématurée du ligand actif.

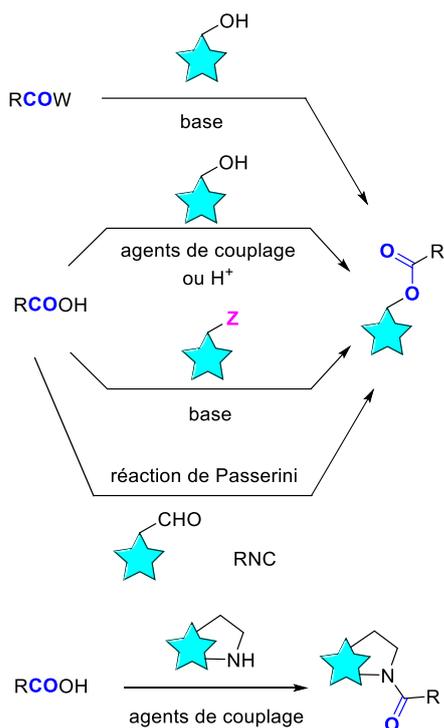
1) Alcool et thiols



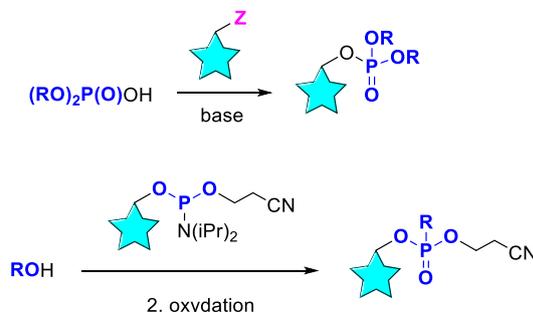
2) Amine



3) Acide carboxylique



4) Phosphate



W = Cl ou RCOO
X = O ou S
Y = *p*-nitrophénol, imidazole ou Cl
Z = halogène ou dérivé halogéné
R = ligand
★ = GPP

Figure 27. Exemples de réactions de protection des fonctions (1) alcool/thiol, (2) amine, (3) acide carboxylique et (4) phosphate par un groupement photocage (inspirée de Hansen et al)²⁰⁵

La réaction de photoclivage doit être plus rapide que le processus biologique étudié^{201,202}. En effet l'énergie lumineuse nécessaire au clivage d'un GPP est plus importante que pour l'isomérisation. De plus, les mécanismes mis en jeu impliquent généralement de passer par des intermédiaires radicalaires ou ioniques qui retardent la libération des composés. Sachant cela, un clivage rapide est indispensable afin d'obtenir une concentration de ligand actif suffisante tout en évitant les effets délétères que pourrait induire une trop forte exposition à la lumière.

Ce photoclivage peut être caractérisé par deux paramètres. Le coefficient d'absorption molaire (ϵ) du GPP qui traduit sa capacité à absorber les photons et le rendement quantique du photoclivage (φ) qui correspond au rapport entre la quantité de substrat libéré et la quantité de photons absorbés à une longueur d'onde donnée. Le produit de ces deux paramètres, appelé section d'absorption efficace²⁰⁶, permet de définir l'efficacité d'un groupement photolabile à une longueur d'onde donnée^{201,202}. Il est également important de mentionner que le rendement quantique d'un GPP varie en fonction de la nature du ligand sur lequel il est utilisé, du solvant ou encore du pH²⁰⁷. Cet aspect complique les comparaisons des GPPs issus de différentes études où les systèmes utilisés varient constamment. C'est la raison pour laquelle nous ne donnerons pas de valeurs de rendement quantique de photoclivage dans ce manuscrit.

5.3.2 Les groupements protecteurs photolabiles (GPPs)

5.3.2.1 Généralités

Depuis leur première utilisation par Schlaeger et Hoffman, de nombreux GPPs ont vu le jour²⁰⁴. Le développement de nouveaux groupements photolabiles peut faire suite à l'identification de nouveaux résidus impliqués dans l'activité biologique des ligands²⁰¹ même si, la plupart du temps, ils sont le résultat d'une optimisation de GPPs connus²⁰⁸.

Bien que ces motifs soient tous différents, ils doivent présenter des caractéristiques communes à tout GPP^{201,204,208} :

- Les longueurs d'ondes utilisées doivent être compatibles avec le domaine d'application (idéalement dans le domaine du visible ou du proche-infrarouge)
- Le photoclivage doit être efficace (ϵ & φ) et plus rapide que le processus biologique étudié
- Le groupement doit être facile à introduire au sein de la molécule, biologiquement inerte et biocompatible (stabilité et solubilité)
- Le produit secondaire libéré ne doit pas être toxique ni absorber la lumière plus que le GPP lui-même

Pour le moment, aucun GPP ne respecte toutes ces conditions à la lettre²⁰¹. En effet la plupart des groupements photolabiles présentent des longueurs d'ondes de clivage se situant autour de 300-500 nm ce qui est bien loin de la fenêtre de transparence des tissus

qui débute aux environs de 700 nm²⁰³. Il est possible d'étendre la conjugaison des liaisons d'un GPP afin de décaler sa longueur d'onde d'absorption vers le rouge. Cependant de telles modifications entraînent généralement un changement de certaines propriétés du GPP comme le rendement quantique, le coefficient d'absorption molaire ou encore la solubilité²⁰⁸.

A ce jour, les groupements les plus utilisés sont les *ortho*-nitrobenzyles (*o*-NB), les coumarines, les *para*-hydroxyphénacyles, les benzoïnes, les pérylènes et les complexes de ruthénium²⁰¹ (Figure 28). Toutefois la majorité des études sur le vivant emploient généralement les *o*-NB et les dérivés coumarin-4-ylméthyles.

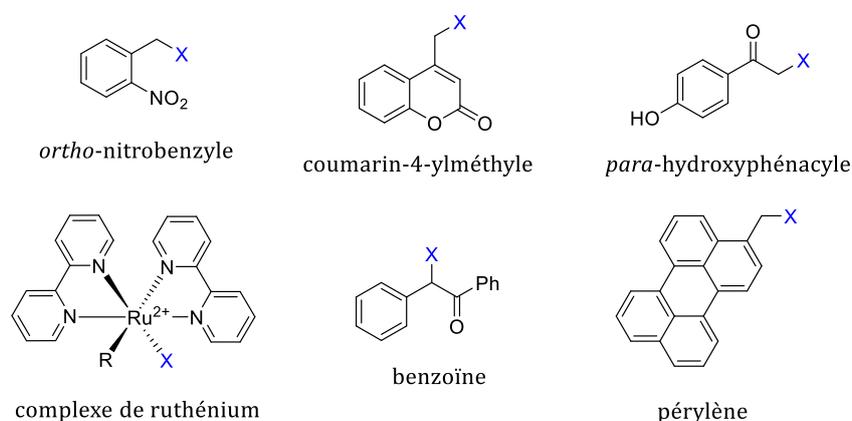


Figure 28. Exemples de GPPs les plus utilisés

5.3.2.2 *Ortho*-nitrobenzyle (*o*-NB)

Après avoir établi le photoclivage de dérivés benzyloxycarbonylés de la glycine, Barltrop a étendu ce concept aux dérivés *ortho*-nitrobenzyles²⁰⁹ (Figure 29) où le substrat est introduit directement sur la position benzylique ou via un dérivé carbonylé. Il s'agit là des premiers groupements photolabiles à avoir été décrits et utilisés en biologie¹⁹¹. Ils représentent le point de départ des composés photocages d'aujourd'hui.

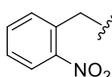


Figure 29. Structure chimique de l'*ortho*-nitrobenzyle

L'*o*-NB classique présente une large bande d'absorption entre 200 nm et 400 nm avec un maximum aux alentours de 260 nm²¹⁰ qui peut se décaler jusqu'à 350 nm voire 450 nm pour ses dérivés.

L'exposition des composés *ortho*-nitrobenzylés à la lumière entraîne le transfert d'un hydrogène situé sur le carbone benzylique vers le -NO₂²¹¹. Cela conduit à la formation d'une forme tautomérique *aci*-nitro²¹² en équilibre avec sa base conjuguée dont le pKa se situe aux alentours de 4²⁰⁶. Cette photoisomérisation permet d'amorcer le clivage qui débute par une cyclisation intramoléculaire irréversible qui va permettre l'élimination du substrat^{204,213-215} (Figure 30). Le principal inconvénient de ce clivage reste néanmoins la formation du nitrosobenzaldéhyde qui absorbe fortement la lumière incidente²¹³.

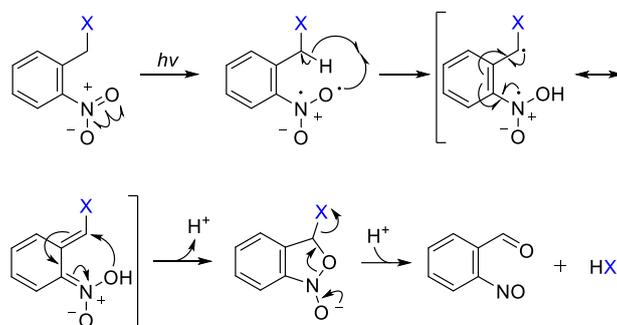


Figure 30. Mécanisme de photoclivage des dérivés *o*-NB

Au fil de leur utilisation, plusieurs modifications des *o*-NB ont été explorées dans le but d'améliorer leur efficacité (Figure 31). Le groupe de Jullien a notamment étudié l'introduction de groupements électro-attracteurs en position benzylique ou de groupements électro-donneurs en *para* du -NO₂²⁰⁶. Ces modifications ont ainsi permis d'augmenter la largeur de la bande d'absorption avec des maximums allant jusqu'à 400 nm. Cependant cela a également eu des effets délétères sur le clivage où une diminution des rendements quantiques a été observée. Pour ce qui est de l'introduction d'un substituant en position benzylique ces résultats peuvent être expliqués par son incidence sur la réaction de clivage. En effet la gêne stérique et les effets électroniques peuvent impacter la formation initiale du dérivé *aci*-nitro ou encore favoriser des mécanismes de relaxation dans le cas de l'utilisation d'atomes d'halogènes²⁰⁶. La plupart des modifications effectuées sur les *o*-NB n'ont pas permis d'améliorer significativement la section d'absorption efficace et c'est sans doute la raison pour laquelle il existe peu de

dérivés *o*-NB dans la littérature. Toutefois, l'introduction de deux -OMe sur le cycle benzénique par Patchornik et al.²¹⁶ a permis de développer le 6-nitrovératryle (NV) (Figure 31) ayant un maximum d'absorption à 350 nm associé à un rendement quantique correct. Cela a permis au NV de rester le dérivé *o*-NB le plus utilisé et le plus étudié²⁰⁴ avec le développement de nouveaux dérivés tel que l' α -méthyl-6-nitropipéronyloxyméthyle (Figure 31). L'optimisation de la solubilité aqueuse a également été envisagée grâce à l'introduction de groupements -COOH²¹⁷ (Figure 31). Des études plus récentes cherchant à augmenter la conjugaison du système π ont permis d'obtenir des GPPs conduisant à un photoclivage efficace du glutamate²¹⁸ et du calcium¹⁹³ à une longueur d'onde de 440 nm (Figure 31).

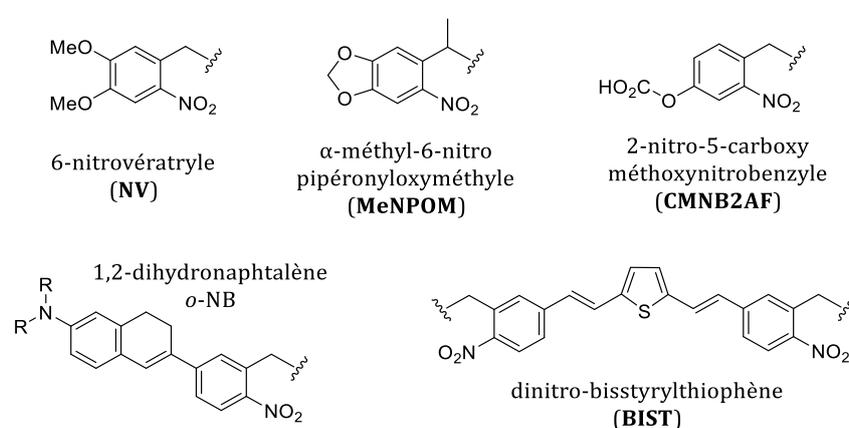


Figure 31. Exemples de quelques structures de GPPs dérivés de l'*o*-NB

En parallèle de cela, d'autres dérivés *o*-NB ont été développés. Nous pouvons par exemple citer les *ortho*-nitro-2-phényléthyles (Figure 32) dont le mécanisme de clivage est différent des *o*-NB classiques²¹⁹ et où la substitution de la position benzylique a cette fois permis une augmentation significative du rendement quantique^{220–222}. On retrouve également les *ortho*-nitroanilides (Figure 32) qui ont un mécanisme de clivage par réarrangement²⁰⁴.

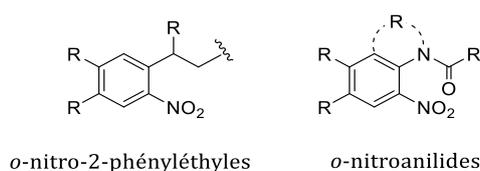


Figure 32. Structures des dérivés *o*-nitro-2-phényléthyles et *o*-nitroanilides

5.3.2.3 Coumarine

Bien qu'ils aient été les premiers à avoir été exploités, les *o*-NB ne sont pas idéals pour une application sur le vivant. C'est pourquoi l'utilisation de dérivés coumarin-4-ylméthyle lui sont préférée (Figure 33). Cela s'explique par leur large coefficient d'extinction molaire qui est également plus élevé ce qui permet un clivage rapide et efficace à des longueurs plus hautes que les *o*-NB (> 300 nm). Associé à cela le clivage libère un sous-produit présentant des caractéristiques de fluorescence permettant un suivi de la réaction²⁰⁴.

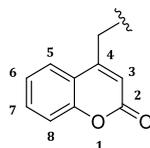


Figure 33. Structure chimique de la coumarin-4-ylméthyle

C'est en 1984 que Givens fut le premier à démontrer la libération après exposition à la lumière d'un substrat diéthylphosphate relié à un dérivé 7-méthoxycoumarin-4-ylméthyle²²³.

Après son exposition à la lumière la coumarine évolue vers un état excité ce qui entraîne une augmentation de la densité électronique du C₄ conduisant à un affaiblissement de la liaison avec le ligand²²⁴ (Figure 34). A partir de là il y a une compétition entre des phénomènes de désexcitation (radiatifs ou non radiatifs) et la réaction de photoclivage qui débute par la coupure hétérolytique de la liaison C-X²⁰⁴. Plusieurs études ont démontré que cette coupure s'effectue via un mécanisme de type S_N1 aboutissant à la formation d'une paire d'ions où le dérivé coumarin-4-ylméthyle est chargé positivement alors que le groupement partant forme l'espèce anionique²²⁵. Ces deux ions entrent ensuite en réaction avec le solvant ou tout autre nucléophile présent en solution ce qui permet la formation d'espèces neutres. Bien que la coupure hétérolytique se produise de l'ordre de la nanoseconde ($2 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$)²²⁶, la recombinaison de la paire d'ions est dix fois plus rapide que la stabilisation du cation par le solvant²²⁷. La solution pour retarder ce phénomène de recombinaison passe par la stabilisation des deux espèces ioniques²²⁶. L'ajout de substituants électro-donneurs sur le noyau de la coumarine va permettre de stabiliser le cation alors que l'utilisation de substrats de faible pK_a entrainera la formation d'espèces anioniques plus stables. La stabilisation de ces espèces

chargées a également pour effet de favoriser la coupure hétérolytique de la liaison avec le ligand. Ce mécanisme s'applique généralement pour une liaison de type C-O car une liaison C-N est trop stable pour permettre une coupure hétérolytique²²⁸.

De plus, les mauvais groupements partants comme les alcools, les thiols ou encore les amines peuvent résister à cette coupure hétérolytique²²⁶. C'est pourquoi les composés bioactifs sont généralement reliés à la coumarine par des liens acétate, carbamate ou carbonate qui faciliteront la cassure de la liaison. Dans les deux derniers cas, le carboxylate formé se décomposera spontanément afin de libérer le substrat²⁰⁴.

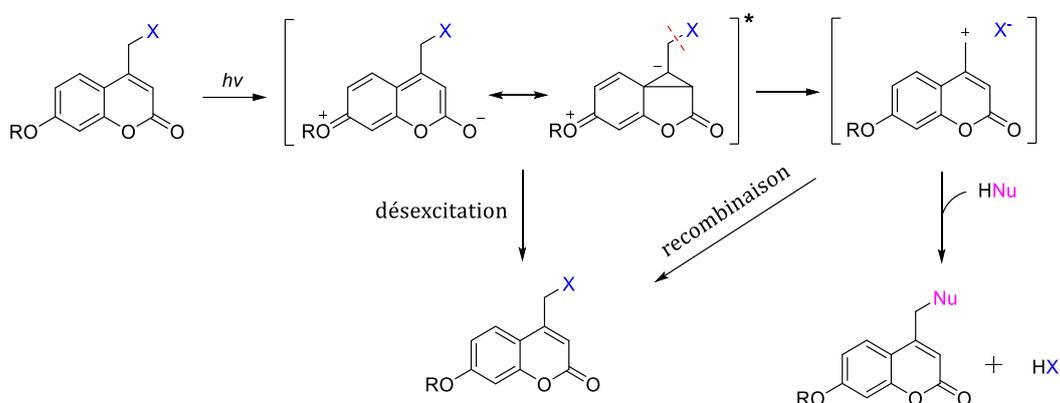


Figure 34. Mécanisme de photoclivage des dérivés coumarin-4-ylméthyles
(inspiré de Klàn et al.²⁰⁴ & Schade et al.²²⁵)

Les dérivés 7-alkoxycoumarinyles rassemblent les dérivés coumarin-4-ylméthyles de première génération où l'introduction de substituants en C₆ et C₇ a permis d'optimiser certaines de leurs propriétés (Figure 35). Par exemple, l'ajout d'un atome de brome sur le C₆²²⁹⁻²³² a non seulement entraîné un déplacement de 60 nm des maximums d'absorption vers le rouge mais cela a également augmenté la solubilité aqueuse de ces dérivés. Cet effet est dû à une diminution du pKa de l'hydroxyle en C₇ conduisant à sa déprotonation complète au pH physiologique. La substitution de l'hydroxyle en C₇ par une fonction diéthylamine a contribué au développement de la deuxième génération de dérivés coumarin-4-ylméthyles ayant des maximums d'absorption entre 350 nm et 400 nm ainsi que les meilleurs rendements quantiques observés chez cette classe de GPPs^{204,233}.

Plusieurs travaux ont également été effectués afin de déplacer les longueurs d'onde de ces GPPs dans le domaine du visible (Figure 35). Comme pour les *o*-NB, la possibilité

d'augmenter la conjugaison du système π a été étudiée. L'introduction de dérivés styryles en C₇²³⁴ a effectivement permis d'augmenter les maximum d'absorption jusqu'à 400 nm et la diminution observée des rendements quantiques a pu être contrebalancée par des coefficients d'extinction molaires plus larges. Des fonctions styryles ont également été introduites en C₃ ce qui a entraîné un déplacement du maximum d'absorption du DEAC450 autour de 450 nm associé à une amélioration des rendements quantiques²³⁵. Et lorsque des groupements électro-attracteurs ont été rajoutés sur ces fonctions styryles, une diminution des rendements de clivage a été observée²³⁶. Cela peut être dû à la diminution de la densité électronique du C₄, indispensable à la coupure. Le groupe de Jullien s'est également intéressé aux modifications de l'atome d'oxygène en C₂^{237,238}. Sa substitution par des groupements électro-attracteurs dans le but d'augmenter le transfert de charge photoinduit a permis d'obtenir des dérivés coumarin-4-ylméthyles dont les maximums d'absorption étaient une fois de plus décalés vers 450 nm (Figure 35). Des analogues polyaromatiques ont également été étudiés afin d'augmenter les propriétés fluorescentes de ces GPPs²⁰⁴.

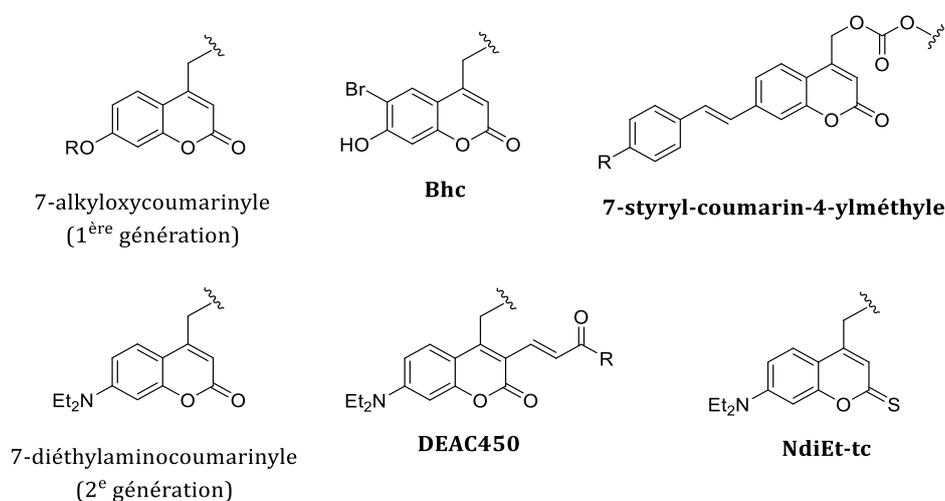


Figure 35. Exemples de quelques structures de GPPs dérivés du noyau coumarin-4-ylméthyle

A notre connaissance aucun dérivé coumarin-4-ylméthyle ne peut être clivé par une longueur d'onde se situant dans l'infrarouge à l'aide d'une excitation simple photon. Afin d'atteindre de telles longueurs d'ondes, le développement de nouveaux GPPs a été nécessaire.

5.3.2.4 Utilisation de GPPs dans le domaine du visible et au-delà

Les dipyrrométhènes boroniques (BODIPYs) (Figure 36) sont des fluorophores connus et utilisés depuis longtemps grâce à leur excellentes propriétés²¹⁰. En effet leurs bandes d'absorptions sont fines et intenses, leurs rendements quantiques de fluorescence sont élevés et on observe peu de formation d'état triplet. Associé à cela, ils présentent une bonne photostabilité ainsi qu'une certaine stabilité thermique et chimique mais également une bonne solubilité et plusieurs substitutions chimiques sont possibles sur leur structure. C'est le groupe d'Urano qui, en cherchant à augmenter les propriétés de fluorescence des BODIPYs à l'aide de dérivés 4-aryloxy, a mis en évidence la possibilité d'utiliser ces fluorophores en tant que groupements photolabiles (Figure 37). Il s'agit là de l'un des premiers GPPs dont les longueurs d'onde d'absorption sont supérieures à 500 nm²³⁹. Ils ont également démontré la possibilité de cliver grâce à la lumière un substrat introduit en C₂ et C₆ via des fonctions sulfonamides²⁴⁰ (Figure 37). L'introduction d'un -CH₂OH en position *meso* (C₈) par l'équipe de Weinstain a permis de développer une nouvelle classe de GPPs dérivés des BODIPYs dont le mécanisme de clivage est similaire à celui des coumarin-4-ylméthyle²⁴¹ (Figure 37). Ces dérivés présentaient des maximums d'absorption autour de 545 nm avec de faibles rendements quantiques de photoclivage compensés par leurs hauts coefficients d'extinction molaire.

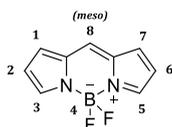


Figure 36. Structure des BODIPYs

Les BODIPYs ont ainsi pu être utilisés dans le photoclivage d'alcools²⁴², d'amines²⁴³ ou encore de thiols²⁴⁴. Une étude de leur relation structure-activité²⁴⁵ a permis de mettre en évidence que l'alkylation de la position *meso* n'avait aucun effet sur le clivage contrairement à l'alkylation du bore qui a entraîné une augmentation des rendements quantiques (Figure 37). Cet effet a également été observé pour les dérivés où la conversion inter-système était favorisée, notamment grâce à l'introduction d'atomes d'halogènes (Figure 37). De manière similaire aux *o*-NB et aux coumarin-4-ylméthyle, l'extension de la conjugaison π des BODIPYs à l'aide de dérivés styryles a donné lieu à une augmentation des longueurs d'ondes d'absorption pouvant aller jusqu'à 693 nm²⁴⁶

(Figure 37). Malgré tous ces avantages les BODIPYs présentent également des inconvénients. En effet la plupart de ces fluorophores sont relativement hydrophobes ce qui limite leur utilisation en milieu aqueux. De plus, les BODIPYs sont connus pour être instable en présence d'acides forts tels que l'acide trifluoroacétique (TFA) classiquement utilisé dans la synthèse peptidique sur support par stratégie Fmoc/*t*Bu. Un autre inconvénient pour l'utilisation des BODIPYs *in vivo* est la génération d'oxygène singulet pouvant être délétère à la fois pour le GPP et pour le système étudié²⁴⁷.

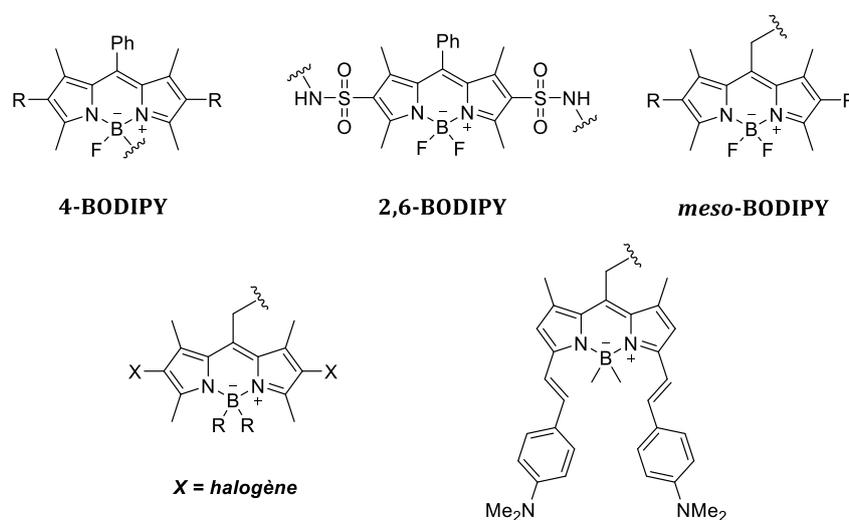


Figure 37. Exemple de structures de GPPs dérivés des BODIPYs

Ces derniers temps les cyanines, qui présentent une absorption dans le rouge et le proche infrarouge²¹⁰, suscitent de plus en plus d'intérêt en tant que groupements protecteurs photolabiles. C'est en 2014 que Schnermann utilise pour la première fois une cyanine heptaméthine en tant que GPP permettant de libérer des dérivés phénoliques via un linker dialkylamine à une longueur d'onde de 690 nm²⁴⁸. Plus récemment, des GPPs dérivés de la cyanine développés par les groupes de Feringa²⁴⁹ et Stacko²⁵⁰ ont montré une efficacité associée à des maximums d'absorption remarquables se situant au-delà de 800 nm. En conditions normales le mécanisme de clivage de ces cyanines débute par la photooxydation de la partie polyène grâce à la production d'un oxygène singulet à l'état triplet²⁵¹. S'en suit la solvolysse du GPP permettant ainsi la libération du substrat^{248,250}. Un mécanisme de clivage similaire aux coumarin-4-ylméthyles et aux *meso*-BODIPY est également suspecté^{249,250} (Figure 38) mais de plus amples études sur ce point sont nécessaires afin de pouvoir en élucider tous les aspects.

Tous les GPPs que nous venons de décrire ont démontré un clivage efficace après une excitation à un seul photon. Toutefois afin de s'affranchir de l'utilisation des ultraviolets dans le cas des *o*-NB et des coumarin-4-ylméthyles il est également possible d'utiliser une excitation à deux photons²⁵².

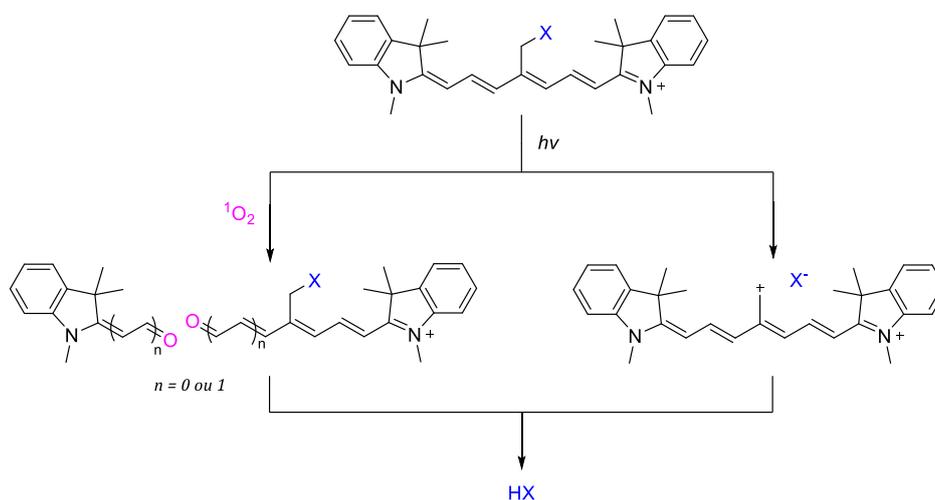


Figure 38. Mécanismes de photoclivage des cyanines

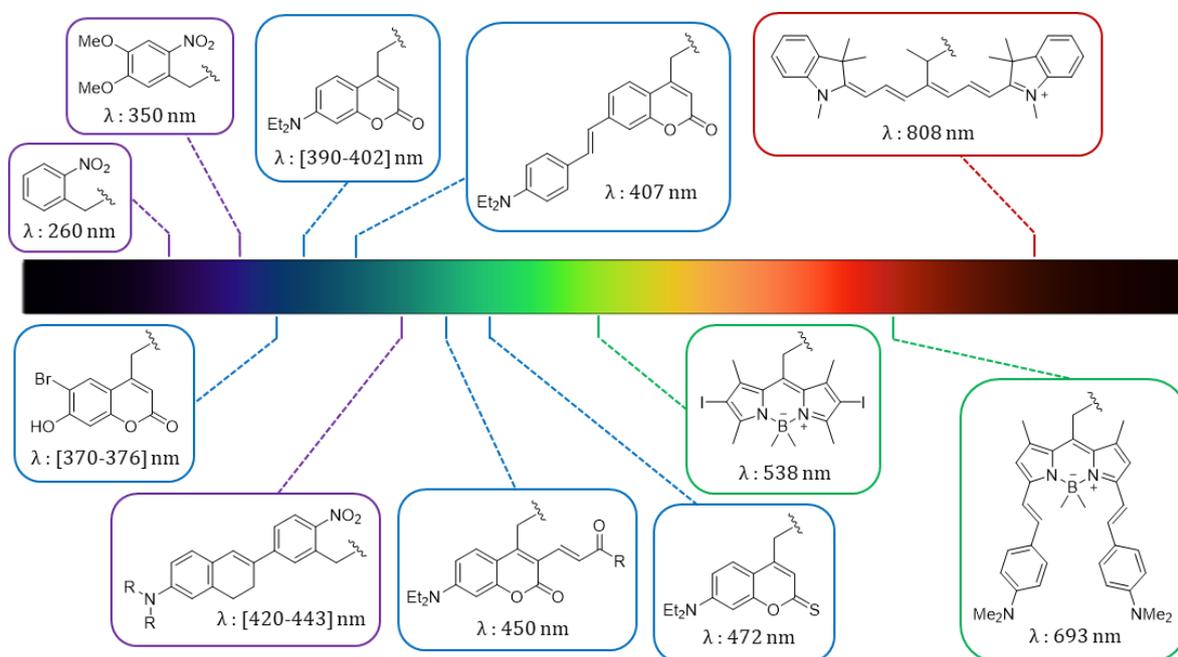


Figure 39. Exemples de GPPs

(λ : longueur d'onde d'absorption maximale)

5.3.3 Les acides aminés et peptides photocage

A la suite de leur première utilisation par Engels et Schlaeger, les GPPs ont pu être employés dans le développement de nombreux ligands photoactivables d'intérêts biologiques^{204,253-255}. Et parmi ces composés, plusieurs d'entre eux sont impliqués dans le ciblage de RCPGs^{195,256-258}. C'est notamment le cas du glutamate qui représente sûrement le ligand photoactivable le plus exploité à l'heure actuelle²⁵³. Nous pouvons citer l'exemple du JF-NP-26, un dérivé photoactivable d'un modulateur allostérique du récepteur mGlu, qui a montré une efficacité certaine dans la modulation de la douleur¹⁹⁵. Toujours dans le domaine de la douleur, nous pouvons également évoquer le développement d'un analogue photoactivable de la naloxone par le groupe de Banghart²⁵⁸.

Au même titre que leurs analogues photoisomérisables, l'utilisation de peptides photocage représente un intérêt certain dans le contrôle de processus biologiques^{202,253,254}. Contrairement aux protéines où les acides aminés photoactivables sont introduits par encodage génétique¹⁹⁹, la synthèse des peptides photoactivables peut se faire selon trois approches différentes^{253,259}. La plus évidente et la plus utilisée consiste à insérer l'acide aminé photocage dans la séquence peptidique durant la synthèse sur support solide (SPPS). Si le GPP utilisé est incompatible avec les conditions de la SPPS, il est possible de l'introduire une fois le peptide synthétisé sur support solide grâce à la déprotection orthogonale du ou des résidus que l'on souhaite protéger. Enfin il est également possible de remplacer la synthèse sur support solide par une synthèse en solution, notamment pour des peptides courts. Cependant cette stratégie reste peu utilisée car elle implique généralement l'utilisation de peptides isolés d'un organisme et donc non protégés présentant de ce fait un certains nombres de sites réactifs.

Le développement d'un peptide photoactivable implique généralement la synthèse préalable d'un acide aminé photocage. Etant donné que le clivage de la plupart des GPPs nécessite la présence d'un hétéroatome au niveau du site de coupure, il est logique que seul les acides aminés polaires soient utilisés pour la synthèse d'analogues photoactivables²⁵³. Il est donc possible d'utiliser des acides aminés possédant une fonction alcool (sérine, thréonine & tyrosine), acide carboxylique (acide aspartique & acide glutamique), amine (lysine), amide (asparagine & glutamine) ou thiols (cystéine). Toutefois la tyrosine, la lysine et la cystéine restent les acides aminés les plus utilisés.

L'introduction de GPPs sur l'azote de la fonction amide de la glycine peut également être envisagée afin de moduler la structure secondaire d'un peptide.²⁵³ Bien que des dérivés coumarin-4-ylméthyles aient été utilisés pour protéger certains acides aminés, les GPPs les plus utilisés dans ce type de stratégie restent les dérivés *ortho*-nitrobenzyles. C'est donc par la synthèse d'acides aminés photosensibles que des peptides « photocages » ont pu être développés^{196-198,260-267}. Parmi l'ensemble de ces ligands nous pouvons mentionner les travaux réalisés par Banghart^{196,260} dans le développement d'analogues photoactivables de l'enképhaline et de la dynorphine permettant de moduler la cinétique des récepteurs opioïdes μ . Plus récemment, nous avons également noté le développement d'un dérivé photoactivable du neuropeptide orexine²⁶⁸.

Objectifs des travaux de thèse

L'implication des récepteurs GalR₁ & GalR₂ dans les voies périphériques et centrales de la douleur a depuis longtemps été mis en évidence²⁶⁹ où le récepteur GalR₂ est notamment connu pour ses effets anti-nociceptifs au niveau des DRGs^{94,102,105}. Ces observations font de GalR₂ une nouvelle cible potentielle dans le traitement de la douleur chronique. Toutefois son rôle dans la modulation de la douleur, notamment au niveau périphérique, reste encore inconnu. Les modèles animaux knock-out ainsi que les études histochimiques et pharmacologiques n'ont, pour le moment, pas permis d'aborder spécifiquement le rôle de GalR₂. Pour étudier son implication dans les voies de la douleur, de nouveaux outils chimiques permettant une activation précise et contrôlée de GalR₂ sont nécessaires. Un nouveau neuropeptide, la spexine (ou neuropeptide Q), a été identifié grâce à la bioinformatique²⁷⁰. Plus récemment, il a été démontré que la spexine est en mesure d'activer les sous types deux et trois des RCPGs de la famille des GalRs²⁷¹, faisant de ce neuropeptide un agoniste endogène des récepteurs GalR_{2/3}. Au vu de cela, la spexine représente un outil d'intérêt pour l'étude spécifique du récepteur GalR₂ dans la modulation de la douleur.

La photopharmacologie est un domaine en développement constant qui utilise des ligands rendus activables par la lumière afin d'obtenir un contrôle spatio-temporel précis de l'activation de molécules d'intérêt thérapeutique. Les ligands photoactivables ont fait leur preuve dans le contrôle optique de canaux ioniques¹⁵⁷, d'enzymes²⁷² et des RCPGs¹⁶³. Néanmoins, aucun neuropeptide photoactivable possédant une activité *in vivo* n'a encore été rapporté à ce jour.

Le but de ce projet est donc de synthétiser les premiers dérivés photoactivables de la spexine (Figure 40) utilisables *in vivo* afin de permettre un contrôle spatio-temporel précis de l'activation du récepteur GalR₂. En absence de stimulus lumineux le récepteur devra conserver une forme inactive qui évoluera vers une conformation active après l'exposition à la lumière. Tout cela permettrait de déterminer l'implication de GalR₂ dans les voies non-opioïdes de la douleur mais également de valider le système spexine/GalR₂ comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la douleur.

La première approche de ce projet repose sur l'introduction d'un motif photoisomérisable au sein de la spexine en remplacement d'un ou plusieurs acides aminés. Le composé inactif à l'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire en l'absence de stimulus lumineux, devra retrouver son activité une fois isomérisé grâce à l'application de lumière.

La deuxième approche consiste à utiliser des groupements protecteurs photolabiles afin de protéger certains acides aminés de la spexine, responsables de l'activité pour le récepteur GalR₂. Cela laisse supposer que la protection de ces résidus clés permettra de réduire, voire abolir l'activité de la spexine. Le peptide contenant cet acide aminé photocage serait ainsi inactif et le clivage du groupement protecteur par la lumière permettra de retrouver le peptide natif ainsi que son activité pour le récepteur. Enfin, dans le but de développer un nouveau groupement protecteur photolabile excitable par la lumière verte et sensible à son environnement, un nouvel acide aminé dérivé du Nile Red, un fluorophore solvatochrome, sera étudié.

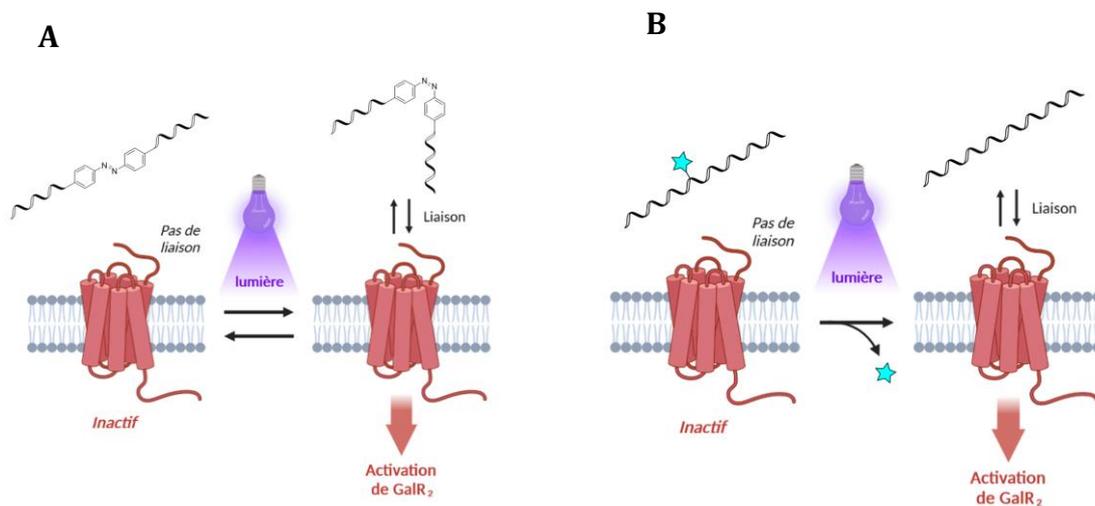


Figure 40. Approches (A) photoswitch et (B) photocage

CHAPITRE 1 :

Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés photoisomérisables de la spexine

1. Conception de la spexine photoisomérisable

Cette partie du projet de thèse a consisté à synthétiser les premiers dérivés photoisomérisables de la spexine. Cela afin d'avoir une activation spatio-temporelle contrôlée du récepteur GalR₂. Comme illustré en figure 41, l'objectif de cette approche est d'obtenir un peptide inactif lorsqu'il se trouve à l'équilibre thermodynamique c'est-à-dire en l'absence de stimulus lumineux et où le ligand est majoritairement en configuration *trans* (*E*). Après son exposition à une lumière de longueur d'onde précise, le peptide va pouvoir s'isomériser de manière réversible et adopter une configuration majoritairement *cis* (*Z*), qui serait une configuration active. Le ligand sera alors en mesure de se lier au récepteur GalR₂. Tout ceci ayant donc pour but de moduler l'activité biologique de la spexine pour le récepteur GalR₂ grâce à la lumière.

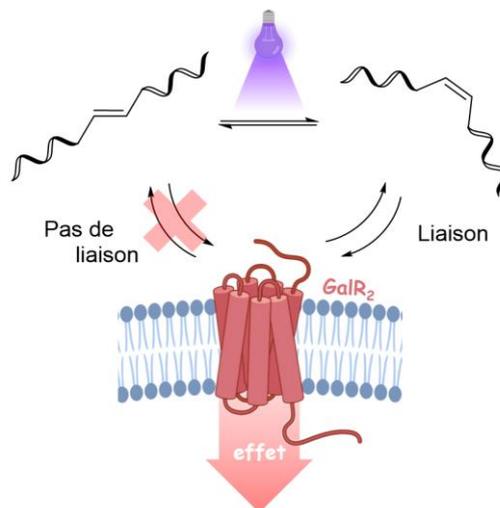


Figure 41. Principe de fonctionnement d'une spexine photoisomérisable

La spexine ne pouvant s'isomériser de manière naturelle lors de son exposition à la lumière il a donc fallu introduire un motif photoisomérisable. Pour une application sur le vivant les azobenzènes restent les plus utilisés à l'heure actuelle (Figure 42). Cela s'explique par leurs caractéristiques optimales en termes de vitesse d'isomérisation, de stabilité thermodynamique de la forme isomérisée et leur facilité de synthèse¹⁶⁴. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de les utiliser dans ce projet.

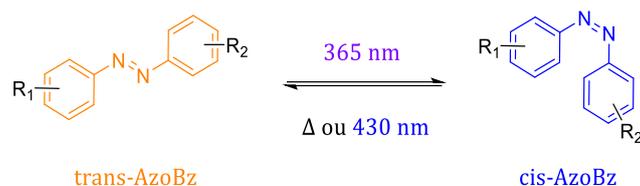


Figure 42. Isomérisation *trans/cis* de l'azobenzène

De nombreux motifs photoisomérisables dérivés des azobenzènes ont été développés. Certains d'entre eux présentent des longueurs d'ondes d'excitation se situant dans le domaine du visible ou de l'infrarouge. Toutefois nous avons considéré que les temps de demi-vie de leur forme *cis* (de l'ordre de la minute ou de la seconde) étaient trop courts pour une utilisation dans notre projet. À savoir une insertion rapide et efficace dans un peptide pouvant être utilisé sur un animal vivant et dont la configuration *cis* serait stable assez longtemps (de l'ordre de quelques heures) pour observer un effet comportemental chez l'animal durant les tests de sensibilité à la douleur. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'utiliser un motif azobenzène classique (sans substituants) qui, même si ses longueurs d'ondes d'excitation se situent dans l'ultraviolet, pourrait être activé localement *in vivo* grâce à l'emploi de fibres optiques²⁷³.

Afin d'insérer ce motif au sein de la spexine, nous avons choisi d'appliquer les stratégies mentionnées précédemment dans ce chapitre et décrites par Albert & Vázquez¹⁷⁷. Cela nous a permis de développer trois méthodes différentes permettant d'insérer un motif photoisomérisable de type azobenzène dans le peptide (Figure 43).

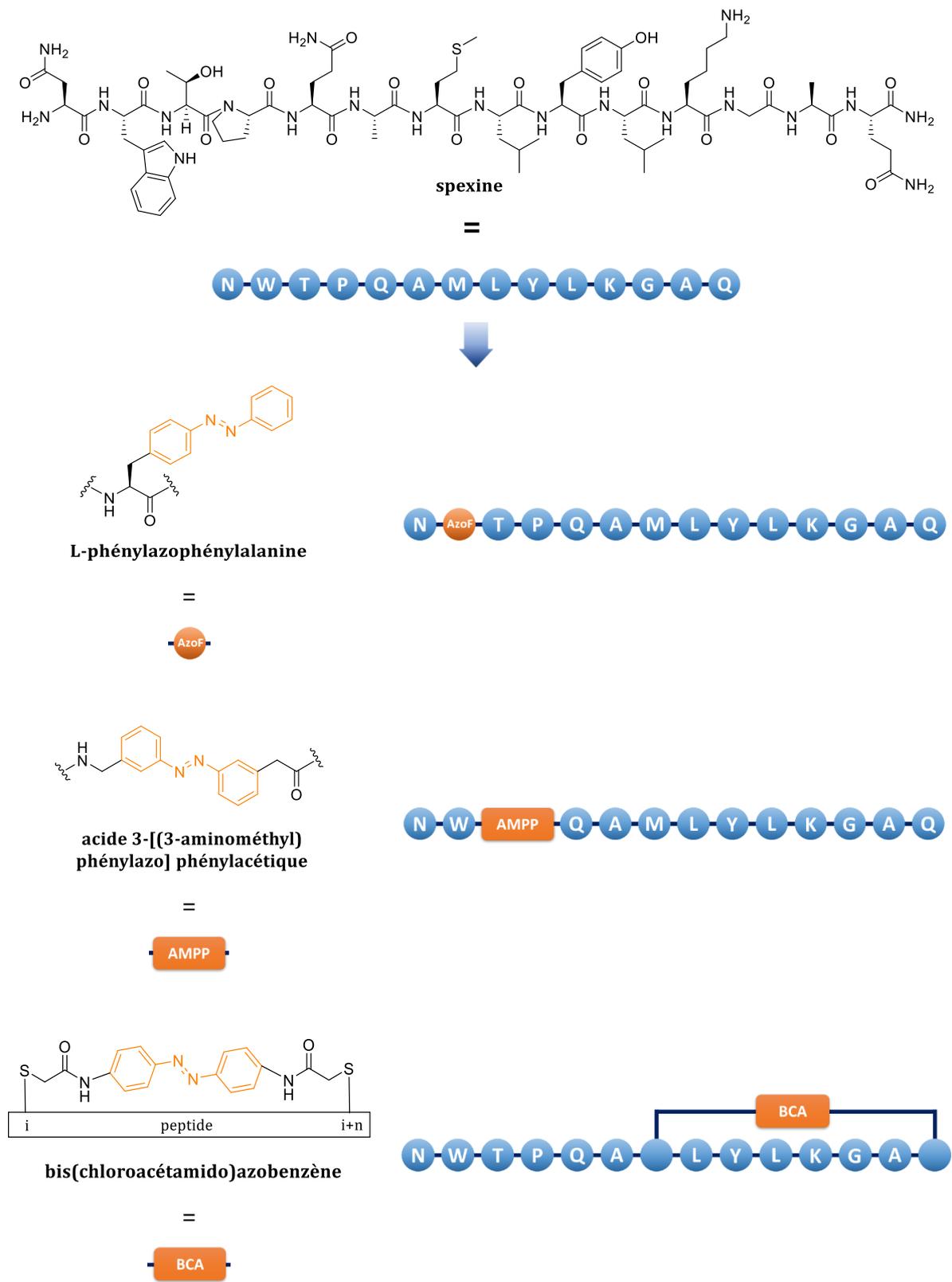


Figure 43. Stratégies d'insertion de l'azobenzène sur la spexine : en tant que chaîne latérale d'un acide aminé (AzoF), au sein de la séquence peptidique (AMPP) & agrafé sur le peptide (BCA)

1.1 Insertion du motif photoisomérisable en tant que chaîne latérale d'un acide aminé (motif AzoF)

Comme évoqué, la première des trois stratégies a consisté à introduire l'azobenzène en lieu et place de la chaîne latérale d'un acide aminé. Pour se faire nous avons utilisé la L-phénylazophénylalanine (AzoF). Cette dernière a été synthétisée comme décrit dans la littérature²⁷⁴ (Schéma 1). Nous avons commencé par former le noyau azobenzène selon la réaction de Mills en faisant réagir la *N*-Boc-L-tyrosine **1.1** avec le nitrosobenzène dans l'acide acétique glacial pour ainsi obtenir le composé **1.2** avec un rendement de 81%. L'amine a ensuite été déprotégée en présence de TFA pour finalement introduire le groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), indispensable à la synthèse peptidique en stratégie Fmoc/*t*Bu, et obtenir ainsi l'acide aminé **1.4** avec un rendement de 71%.

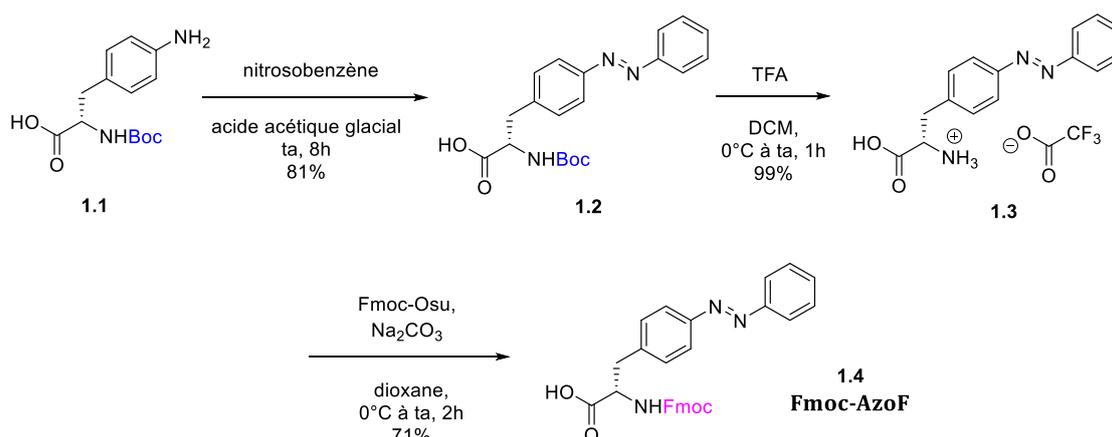


Schéma 1. Synthèse de la Fmoc-L-phénylazophénylalanine (Fmoc-AzoF)

L'analyse des relations structure-activité de la spexine sur le récepteur GalR₂ a représenté un véritable défi dans ce projet. En effet, au début du projet il n'existait aucune structure cristalline du peptide associé à son récepteur et les quelques données que nous avons réussi à nous procurer restaient succinctes. Malgré cela, une étude de substitution des résidus de la spexine et de leur impact sur l'activité de GalR₂¹⁴⁴ nous a permis de mettre en évidence l'importance du Trp², de la Tyr⁹ et de la Leu¹⁰ pour l'activité du peptide sur le récepteur. En conséquence nous avons décidé d'introduire l'AzoF en lieu et place de ces résidus où l'isomérisation serait susceptible d'avoir le plus d'impact sur l'activité du peptide pour le récepteur GalR₂ (Tableau 9).

Composés	Motif	Position	Structure
LIT-01-277	AzoF	Trp ²	
LIT-01-322	AzoF	Tyr ⁹	
LIT-01-276	AzoF	Leu ¹⁰	

Tableau 9. Spexines photoisomérisables contenant une AzoF à différentes positions

Une fois synthétisée, la Fmoc-AzoF a pu être introduite au sein de la spexine par synthèse peptidique sur support solide en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu sur une résine de type Rink amide de façon à d'obtenir un peptide amidé en C-terminal. Une grande partie des résidus ont été introduits de manière automatisée (assistée par microonde) à l'aide d'un synthétiseur peptidique CEM[®] Liberty Blue. Toutefois, nous avons choisi d'insérer l'acide aminé photoisomérisable manuellement de manière à pouvoir contrôler son introduction au sein de la séquence peptidique tout en diminuant au maximum les quantités utilisées. Après avoir obtenu le peptide complet, il a été libéré de la résine et de ses groupements protecteurs grâce à un mélange de clivage K, composé d'acide trifluoroacétique et de différents scavengers (TFA/phénol/thioanisole/H₂O/éthanedithiol, 82.5/5/5/5/2.5, v/v).

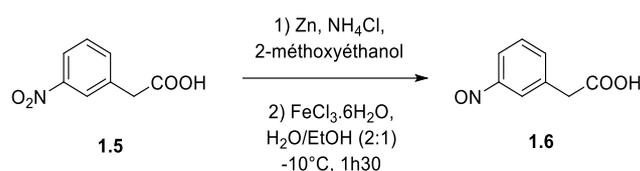
Durant les premières synthèses nous avons observé une déprotection incomplète du peptide après trois heures de réaction en utilisant le mélange K. Après analyse nous avons constaté une persistance du groupement protecteur trityle de l'asparagine située en position *N*-terminale. Ce problème a néanmoins pu être résolu en prolongeant le temps de réaction à quatre heures et en rajoutant 1% de triisopropylsilane dans le mélange de clivage. Cela nous a finalement permis d'obtenir les trois premiers dérivés photoisomérisables de la spexine **LIT-01-276**, **LIT-01-277** & **LIT-01-322** avec des rendements isolés de 10%, 13% et 4% respectivement pour 46 étapes (Tableau 9).

1.2 Insertion du motif photoisomérisable au sein de la séquence peptidique (motif AMPP)

La deuxième stratégie reposait sur l'introduction du motif azobenzène au sein même de la séquence peptidique de la spexine. Cela a été possible en substituant un ou deux acides aminés, afin de limiter les variations de longueur du peptide. Pour cela, nous avons

choisi d'utiliser l'acide [3-(3aminométhyl)phénylazo]phénylacétique (AMPP) qui fait partie des motifs les plus utilisés dans ce type d'approche¹⁷⁷. Comme pour l'AzoF, la synthèse de ce motif est basée sur la réaction de Mills entre une aniline et un dérivé nitrosobenzène.

Nous avons tout d'abord cherché à réduire l'acide 3-nitrophényle acétique **1.5** en deux étapes successives selon la voie de synthèse précédemment décrite par Podewin et al.²⁷⁵ (Figure 44). En premier lieu, sa réduction en dérivé phénylhydroxylamine a été réalisée en présence de zinc et de chlorure d'ammonium pour ensuite être réoxydé en dérivé nitroso à l'aide de chlorure de fer hexahydraté. Cependant cette réaction ne nous a pas permis d'obtenir des quantités acceptables de produit final. Associé à cela, le dérivé nitroso était impossible à séparer du produit de départ, majoritairement présent dans le brut réactionnel. Même en tentant d'optimiser la première étape de la réaction (Figure 44) nous n'avons pas été en mesure d'améliorer les résultats obtenus.



	Zinc (eq)	NH ₄ Cl (eq)	Température (°C)	Temps (h)	Ratio des composés*	
					1.5	1.6
1	2.5	1.5	25	1	2/3	1/3
2	3.5	1.5	0	4	2/3	1/3
3	4.5	3.5	25	44	majoritaire	traces

Figure 44. Optimisation de la réduction de l'acide 3-nitrophénylacétique en acide 3-nitrosophénylacétique (* : déterminés par analyse RMN)

Nous avons ensuite envisagé une approche différente en oxydant l'acide 3-aminophénylacétique en présence d'oxone²⁷⁶. Malheureusement ces réactions ne conduisaient qu'à une consommation partielle du produit de départ. De plus, seulement une faible quantité de dérivé nitroso ainsi qu'une majorité de dérivé nitré ont pu être identifiés par analyse RMN dans le brut réactionnel (1/5 et 4/5, respectivement).

A la suite de ces résultats nous avons décidé d'utiliser les travaux réalisés par Aemissegger & Hilvert²⁷⁷ où la fonction -COOH de l'acide nitrophénylacétique a été protégée à l'aide d'un groupement *tert*-butyle (Schéma 2). Après sa réduction, toujours en présence de zinc, NH₄Cl et FeCl₃.6H₂O, cela nous a permis d'obtenir le dérivé nitroso **1.8** avec un rendement de 41%. En parallèle, nous avons également synthétisé l'aniline **1.10** en une seule étape grâce à la protection de la 3-aminobenzylamine commerciale à l'aide de Fmoc-OSu en présence de triéthylamine (TEA) (Schéma 2). Cette dernière a ensuite pu être mise à réagir avec le dérivé nitroso **1.8** dans l'acide acétique afin de former le noyau azobenzène du composé **1.11** avec un rendement de 58%. Le Fmoc-AMPP **1.12** a finalement pu être obtenu après déprotection quantitative du groupement *tert*-butyle en présence d'acide trifluoroacétique.

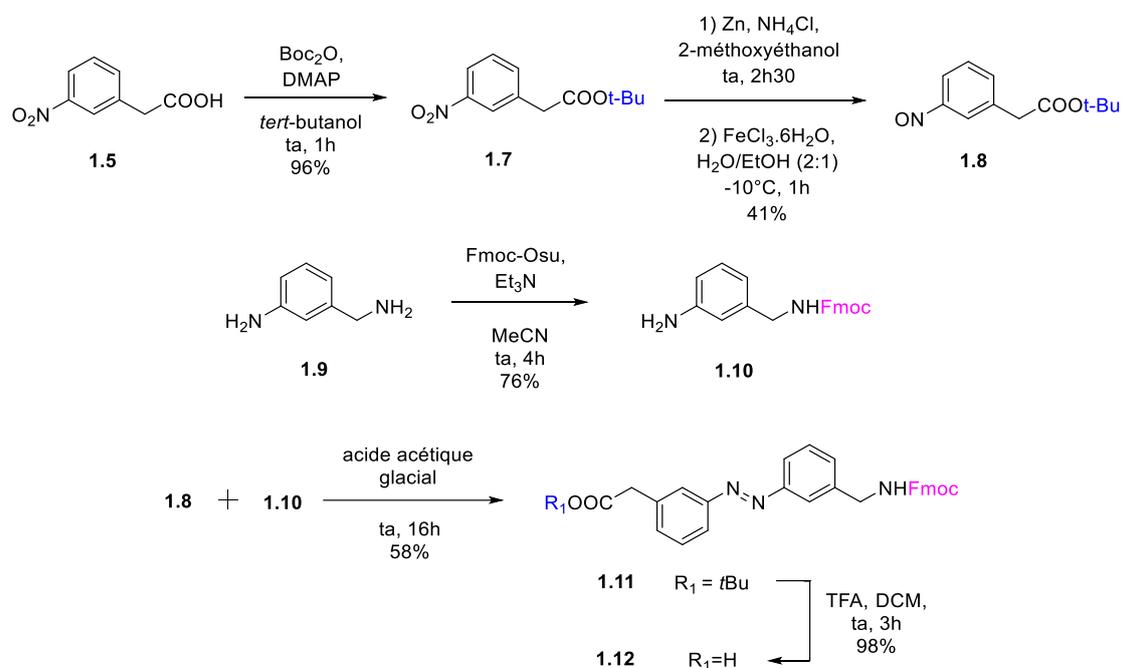


Schéma 2. Synthèse du motif Fmoc-AMPP **1.12**

Sur la base de la précédente analyse des relations structure-activité nous avons tout d'abord choisi d'introduire le motif AMPP en substitution de deux acides aminés à des positions où son isomérisation pourrait avoir le plus d'impact (Tableau 10). La proline est connue pour induire une structuration particulière sous forme de feuillet β ²⁷⁸ similaire aux conformations induites par l'isomérisation du motif azobenzène²⁷⁹. C'est la raison pour laquelle nous avons introduit le résidu AMPP au niveau de la Pro⁴ (**LIT-01-278** &

LIT-01-308) en supposant que l'une des configurations de l'AMPP serait tolérée sur ces positions alors que l'autre aurait une incidence sur l'activité du peptide. Associé à cela nous avons également choisi d'introduire le motif photoisomérisable à hauteur de la Met⁷ (**LIT-01-309** & **LIT-01-310**). Etant un résidu situé en position centrale du peptide, une isomérisation à ce niveau pourrait avoir une influence majeure sur la structuration globale de la spexine.

De plus récentes données¹⁴³ laissaient à penser que les acides aminés C-terminaux Gly¹², Ala¹³ & Gln¹⁴ seraient impliqués dans la liaison du peptide au récepteur GalR₂ et notamment dans la stabilisation du complexe peptide/récepteur. C'est la raison pour laquelle nous avons également choisi d'introduire le motif AMPP au niveau de cette partie C-terminale (**LIT-01-307**, **LIT-01-378**, **LIT-01-379** & **LIT-01-380**).

Grâce à l'insertion du motif AMPP au sein de la séquence peptidique par synthèse sur support solide en stratégie Fmoc/*t*Bu, cela nous a permis de synthétiser huit nouveaux dérivés photoisomérisables de la spexine avec des rendements isolés allant de 1% à 6% pour 45 étapes (Tableau 10) :

Composés	Motif	Position	Structure
LIT-01-278	AMPP	Thr ³ -Pro ⁴	N-W-AMPP-Q-A-M-L-Y-L-K-G-A-Q
LIT-01-308	AMPP	Pro ⁴ -Gln ⁵	N-W-T-AMPP-A-M-L-Y-L-K-G-A-Q
LIT-01-309	AMPP	Ala ⁶ -Met ⁷	N-W-T-P-Q-AMPP-L-Y-L-K-G-A-Q
LIT-01-310	AMPP	Met ⁷ -Leu ⁸	N-W-T-P-Q-A-AMPP-Y-L-K-G-A-Q
LIT-01-378	AMPP	Lys ¹¹ -Gly ¹²	N-W-T-P-Q-A-M-L-Y-L-AMPP-A-Q
LIT-01-379	AMPP	Lys ¹¹	N-W-T-P-Q-A-M-L-Y-L-AMPP-G-A-Q
LIT-01-380	AMPP	Gly ¹²	N-W-T-P-Q-A-M-L-Y-L-K-AMPP-A-Q
LIT-01-307	AMPP	Gly ¹² -Ala ¹³	N-W-T-P-Q-A-M-L-Y-L-K-AMPP-Q

Tableau 10. Spexines photoisomérisables contenant le motif AMPP à différentes positions

Pour six d'entre eux, le motif a été inséré en lieu et place de deux acides aminés alors que, pour les **LIT-01-379** & **LIT-01-380**, nous avons seulement substitué un acide aminé. Cette différence s'explique par le fait que la Lys¹¹ du **LIT-01-378** a été substituée par le

motif photoisomérisable. Or il s'agit du seul acide aminé chargé du peptide lui apportant ainsi une certaine solubilité aqueuse. La synthèse de ces deux peptides a donc eu pour objectif d'observer si la modification de la Lys¹¹ ou de la Gly¹² seule aura un impact différent par rapport à la substitution simultanée des deux acides aminés.

1.3 Insertion du motif photoisomérisable sous forme d'agrafe (motif BCA)

Récemment, l'équipe de Wong¹⁴³ a mis en évidence une structuration de la spexine de souris en milieu apolaire sous forme d'hélice α entre la Gln⁵ et la Gln¹⁴, dont nous avons reproduit le modèle en collaboration avec Célien Jacquemard (LIT, UMR7200) (Figure 45). A la suite de ces résultats ils ont observé une forte implication de cette structure secondaire dans la liaison du peptide sur le récepteur GalR₂ de la même manière que cela a été observé chez la galanine^{141,142}.

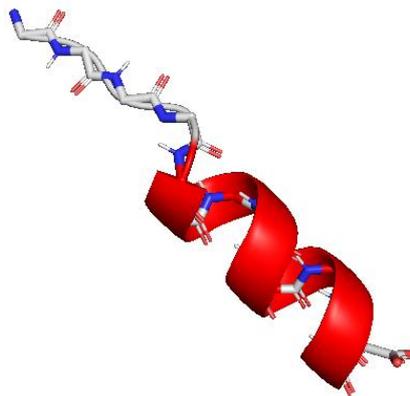


Figure 45. *Modélisation de la structure secondaire de la spexine en milieu apolaire*

C'est cette observation qui nous a permis de façonner la troisième et dernière approche. En effet l'une des stratégies utilisées pour introduire un motif photoisomérisable sur un peptide consiste à agraffer le motif au niveau d'une structure secondaire, en l'occurrence l'hélice α , afin que son isomérisation en perturbe la structuration. Ici nous avons décidé d'utiliser le motif BCA qui a été agrafé sur le peptide grâce à sa réaction avec deux cystéines, introduites aux positions souhaitées après la substitution des acides aminés correspondant (Schéma 3).

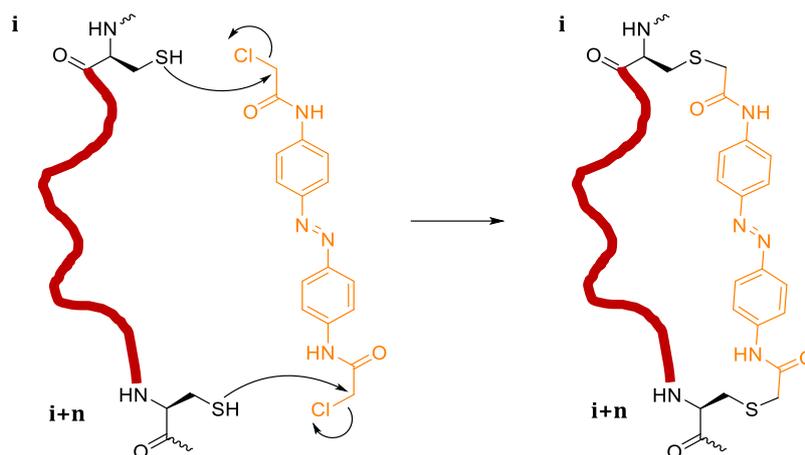


Schéma 3. Introduction du motif BCA sur le peptide

Une fois la stratégie établie nous avons défini à quelles positions nous pourrions introduire ce nouveau motif photoisomérisable. En effet, plusieurs approches ayant chacune des conséquences différentes sont utilisées pour ce genre de motifs¹⁷⁷. En introduisant le BCA en positions i , $i+4$ ou $i+7$ (où i représente le premier acide aminé où le motif est introduit) la forme *trans* va perturber la structure secondaire et son isomérisation en forme *cis* permettra de retrouver la structure en hélice α (Figure 46). Au contraire, son introduction en positions i , $i+11$ conduira à une stabilisation de l'hélice α lorsque le motif se trouve sous sa configuration *trans*. Nous avons cependant éliminé d'office cette approche étant donné que, d'une part, nous souhaitons que les composés soient inactifs à l'équilibre thermodynamique, soit sous leur forme *trans*, pour ensuite être activés après leur exposition à la lumière. Et d'autre part, l'hélice α de la spexine n'est composée que de dix acides aminés et de ce fait, si le motif est introduit selon cette approche, il ne sera pas complètement positionné sur l'hélice α .

Après avoir sélectionné les approches $i, i+4/i, i+7$ il nous restait à déterminer si l'une d'entre elles était à privilégier ou si les deux stratégies pouvaient être utilisées. Pour ce faire nous avons modélisé l'hélice α de notre peptide et nous y avons associé les configurations *cis* & *trans* du motif BCA (Figure 47). Grâce à cela nous avons pu remarquer que la distance entre les carbones terminaux du motif photoisomérisable sous sa forme *cis* (11.80 Å) correspondait pratiquement à la distance séparant les acides aminés en position $i, i+7$ (11.0 Å) et non à celle entre les acides aminés en position $i, i+4$ (6.48 Å).

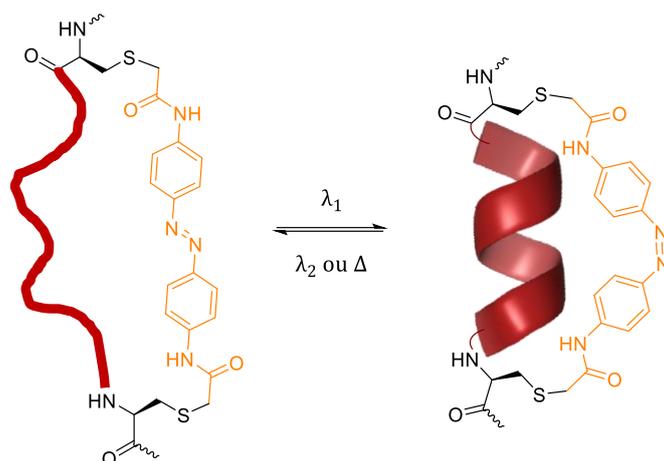


Figure 46. *Isomérisation du peptide agrafé selon les stratégies i, i+4 & i, i+7*

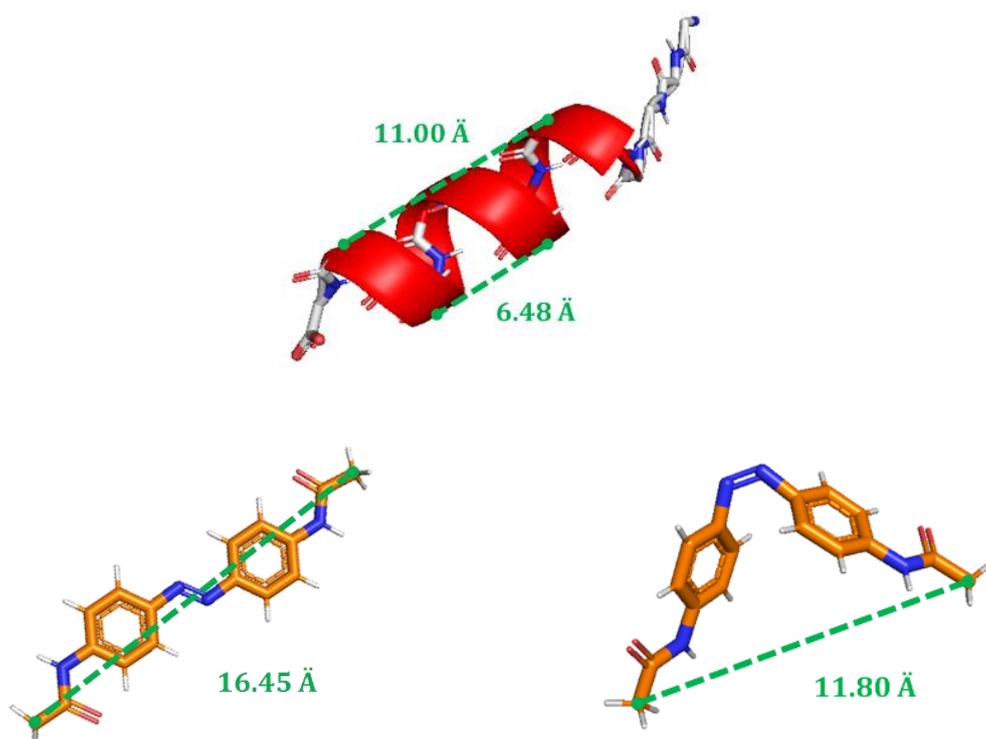


Figure 47. *Analyse des distances entre les positions i, i+4 & i, i+7 de la spexine corrélées à celles des carbones terminaux des isomères trans & cis du motif BCA*

Grâce à cela nous avons finalement choisi de synthétiser trois dérivés agrafés de la spexine où le motif photoisomérisable BCA a été introduit au niveau de l'hélice α du peptide selon une stratégie i, i+7. Soit en positions Gln⁵-Gly¹² (**LIT-01-398**), Ala⁶-Ala¹³ (**LIT-01-438**) et Met⁷-Gln¹⁴ (**LIT-01-405**) (Tableau 11).

Composés	Motif	Position	Structure
LIT-01-398	BCA	Gln ⁵ -Gly ¹²	
LIT-01-438	BCA	Ala ⁶ -Ala ¹³	
LIT-01-405	BCA	Met ⁷ -Gln ¹⁴	

Tableau 11. Spexines photoisomérisables contenant le motif BCA à différentes positions

Associé à leur analyse de la structure de la spexine, l'équipe de Wong a également réalisé une étude du docking de la spexine sur les récepteurs GalR₂ & GalR₃, précédemment modélisés par homologie¹⁴³. En se basant sur les résultats de leurs travaux nous avons effectué une autre étude de modélisation de nos dérivés agrafés au sein de GalR₂. Cela nous a permis de constater que le **LIT-01-398** serait le dérivé le plus à même d'être efficace étant donné que le motif agrafé sur ces positions ne semblait pas interférer avec les acides aminés du récepteur GalR₂ impliqués dans la liaison. Contrairement aux **LIT-01-405** & **LIT-01-438** tels qu'ils ont été modélisés (Figure 48).

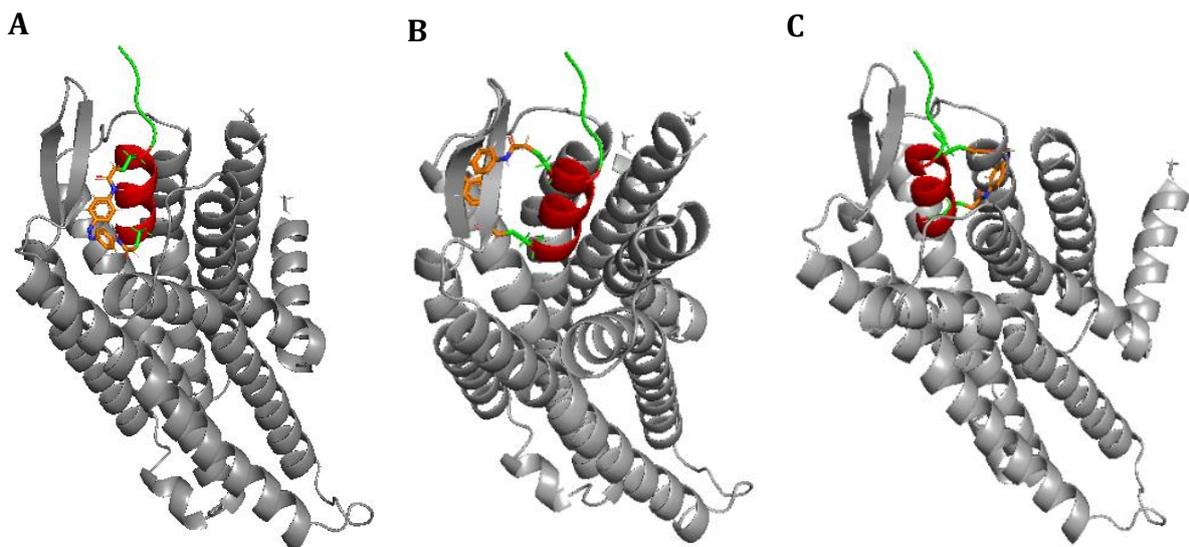


Figure 48. Modélisation du (A) **LIT-01-398**, (B) **LIT-01-438** & (C) **LIT-01-405** avec GalR₂ (effectuée par Célien Jacquemard (LIT, UMR 7200))

Dès lors, nous avons initié la synthèse du motif photoisomérisable BCA en suivant une stratégie de synthèse similaire aux deux précédents motifs (Schéma 4). Nous avons commencé par réduire la *p*-nitroaniline **1.13**, où la fonction amine a été préalablement protégée par un groupement Boc, en dérivé nitroso **1.14**. Ce dernier a ensuite pu être mis à réagir avec la *p*-aminophénylacétamide dans l'acide acétique afin d'obtenir l'azobenzène **1.16** avec un rendement de 58%. Après avoir déprotégé les fonctions amines à l'aide d'acide chlorhydrique en chauffant à reflux nous avons pu former le résidu chloroacétamide et ainsi produire le motif BCA avec un rendement faible de 12% mais en quantité suffisante pour être introduit dans la séquence des peptides.

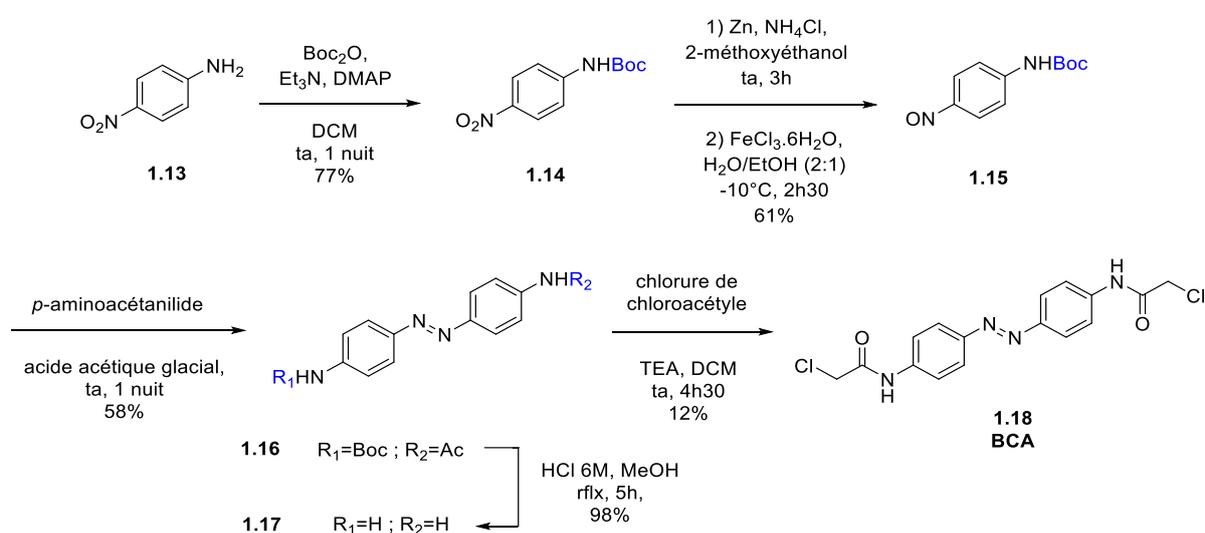


Schéma 4. Synthèse du motif BCA

Contrairement aux deux précédents acides aminés photoisomérisables, le motif BCA n'a pas été introduit sur le peptide durant la synthèse sur support solide. En effet nous avons commencé par synthétiser le peptide comprenant les cystéines aux positions souhaitées par synthèse automatisée à l'aide du synthétiseur CEM® Liberty Blue. Une fois le peptide clivé de la résine et purifié, il a été solubilisé dans un tampon Tris-HCl à pH 8 contenant deux équivalents de tris-carboxyéthylphosphine (TCEP) et agité pendant 1h, afin de s'assurer que les cystéines soient sous forme réduite lors de leur réaction avec le motif. Nous avons ensuite pu ajouter le BCA en solution dans le DMF pour obtenir le peptide photoisomérisable correspondant après 21h30 d'agitation avec des rendements isolés allant de 5 à 46% (Schéma 5).

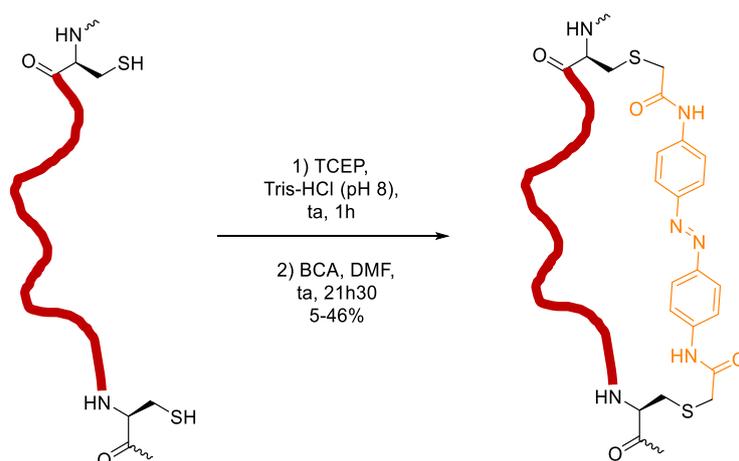


Schéma 5. Synthèse des dérivés photoisomérisables agrafés de le spexine

2. Evaluation des propriétés photophysiques des peptides photoisomérisables

Une fois les peptides photoisomérisables synthétisés nous avons déterminé les propriétés photophysiques relatives à leur isomérisation. A savoir leur longueur d'onde d'excitation ainsi que le temps d'exposition à la lumière nécessaire afin que les motifs azobenzènes s'isomérisent et atteignent l'état photostationnaire.

Pour cela nous avons commencé par analyser les spectres d'absorption des motifs photoisomérisables Fmoc-AzoF, Fmoc-AMPP et BCA dans un mélange H₂O/ACN (50/50, v/v) (Figure 49). Nous avons ainsi pu constater la prédominance de l'isomère *trans* à l'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire en l'absence de stimulus lumineux. Cela s'est traduit par la présence d'un maximum d'absorption aux alentours de 320 nm¹⁶⁴. Nous avons ainsi été en mesure de confirmer l'absorption des motifs azobenzènes à une longueur d'onde de 365 nm permettant l'utilisation d'une lampe à UV de paillasse pour déclencher l'isomérisation. C'est donc après l'exposition de nos composés à une lumière ayant une longueur d'onde de 365 nm que nous avons observé, au fil du temps d'exposition, une diminution du pic d'absorption caractéristique de la configuration *trans* et l'apparition d'une bande d'absorption autour de 450 nm. Ces deux évènements étant les témoins d'une isomérisation de l'isomère *trans* vers l'isomère *cis*.

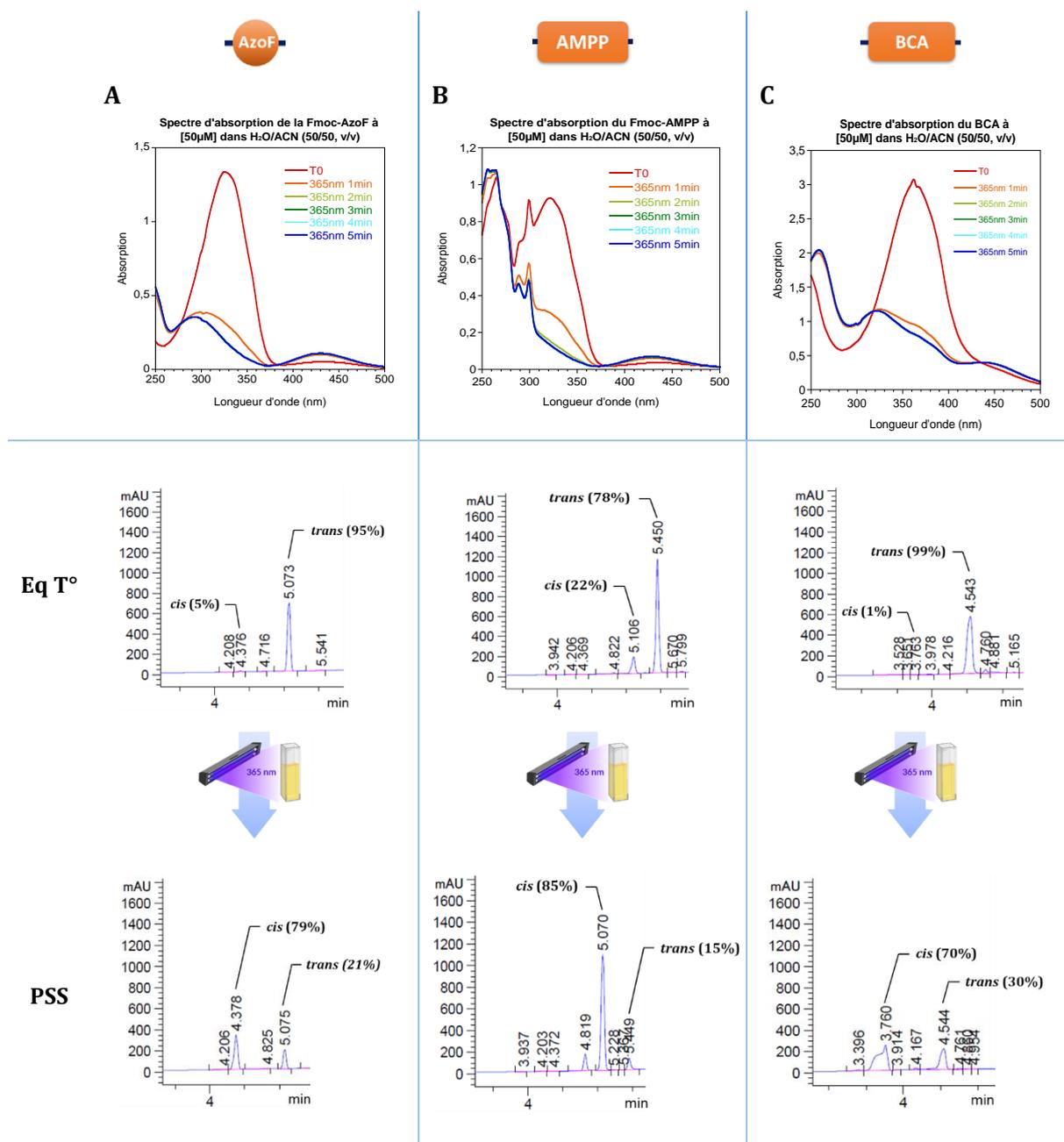


Figure 49. Spectres d'absorption et profils HPLC (entre 3.5 min et 5.5 min) des composés (A) Fmoc-AzoF, (B) Fmoc-AMPP et (C) BCA à l'équilibre thermodynamique (Eq T°; —) et après 1 min (—), 2 min (—), 3 min (—), 4 min (—) et 5 min (—) d'exposition à la lumière ($\lambda = 365 \text{ nm}$) (PSS : état photostationnaire)

En parallèle de cela, nous avons réalisé un suivi de la photoisomérisation par HPLC analytique en phase inverse afin de pouvoir quantifier l'isomérisation *trans* → *cis* de nos composés après leur exposition à une lumière de longueur d'onde 365 nm (Figure 49). A l'équilibre thermodynamique nous avons relevé la présence d'un pic majoritaire correspondant à l'isomère *trans*. Nous avons également observé un deuxième pic d'intensité moindre et ayant un temps de rétention plus faible que le premier. Cela est

cohérent avec le fait qu'il s'agisse de la forme *cis* de nos composés. En effet, l'isomère *cis* possède un moment dipolaire plus important que l'isomère *trans* ce qui se traduit par une polarité plus importante et donc un temps de rétention plus faible sur colonne C18. Cette observation a également été renforcée par le fait que les deux pics présentent la même masse moléculaire (confirmé par des analyses HPLC-MS) et que l'intensité du pic supposé de la forme *cis* augmente au fur et à mesure du temps d'exposition à la lumière.

L'ensemble de ces analyses nous a permis de démontrer que l'exposition à une lumière ayant une longueur d'onde de 365 nm pendant cinq minutes des trois motifs photoisomérisables Fmoc-AzoF, Fmoc-AMPP et BCA à une concentration de 50 μM était suffisante pour atteindre l'état photostationnaire.

Afin de visualiser l'isomérisation au niveau moléculaire nous avons également effectué une étude par RMN (Figure 50). Pour faciliter l'interprétation nous avons utilisé le motif Boc-AzoF **1.2**. Cela nous a notamment permis d'observer la présence de deux couples de pics correspondant aux configurations *trans* & *cis* de l'acide aminé et dont les proportions s'inversent après leur exposition à la lumière pour atteindre des pourcentages voisins de ceux mesurés par HPLC.

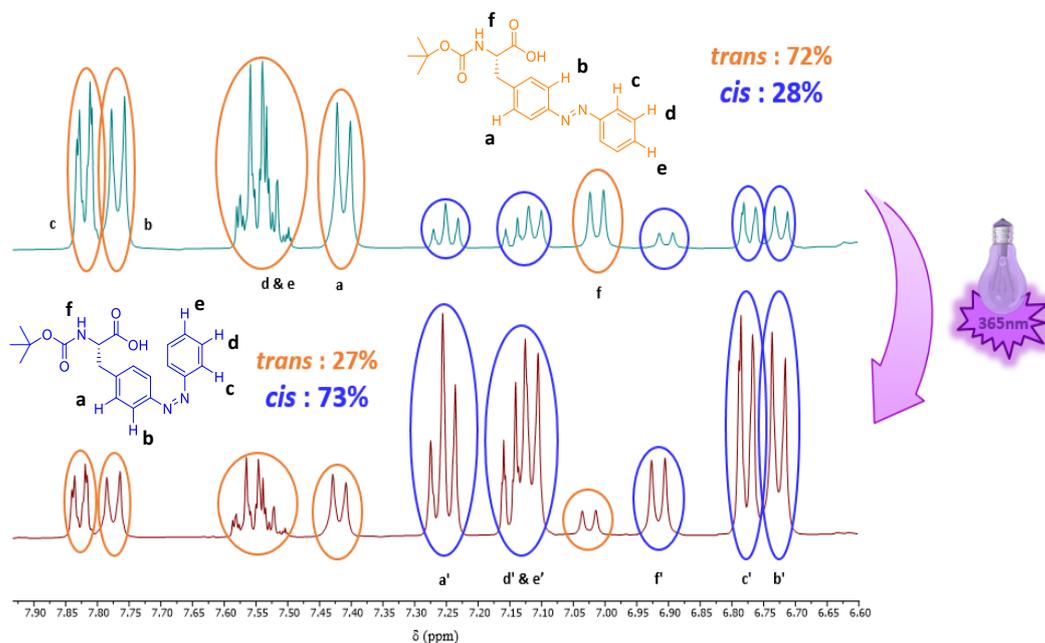


Figure 50. Spectres RMN de la Boc-AzoF **1.2** dans le DMSO-*d*₆ avant (—) et après (—) son exposition à la lumière ($\lambda = 365 \text{ nm}$) pendant 5 h (les signaux de la forme *trans* sont indiqués en orange et ceux de la forme *cis* en bleu)

Une fois les paramètres de l'isomérisation *trans* → *cis* établis, nous sommes passées à l'évaluation de l'isomérisation de nos peptides en conditions biologiques. Plus précisément à la plus forte concentration et dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de leur évaluation *in vitro* (50 µM dans un tampon HEPES contenant 1% BSA).

Tout d'abord, nous avons voulu étudier l'impact potentiel de l'albumine de sérum bovin (BSA) sur l'isomérisation de nos peptides. Pour cela nous avons analysé l'isomérisation d'un de nos peptides, le **LIT-01-277** (motif AzoF en position Trp²), en utilisant un tampon HEPES sans BSA ou comprenant 0.1 ou 1% de BSA et en comparant les résultats obtenus (Tableau 12). Nous avons ainsi pu démontrer que la présence et le pourcentage de BSA dans le tampon biologique n'ont aucune influence significative sur le temps d'isomérisation ainsi que sur le pourcentage de forme *cis* à l'état photostationnaire.

Temps	Sans BSA		BSA 0.1%		BSA 1%	
	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
T0	86%	14%	87%	13%	86%	14%
5 min	28%	72%	29%	71%	29%	71%
15 min	29%	71%	29%	71%	29%	71%

Tableau 12. Pourcentage de forme *trans* & *cis* du **LIT-01-277** (analysé par HPLC, absorption à 210 nm) à 50 µM dans un tampon HEPES sans BSA ou contenant 0.1% ou 1% de BSA avant (T0) et après son exposition à la lumière ($\lambda = 365$ nm) pendant 5 min ou 15 min

A la suite de ces conclusions et du fait que certains de nos peptides n'étaient pas solubles dans le tampon biologique sans BSA à la concentration de 50 µM, la présence de la BSA s'est avérée indispensable à l'évaluation de l'isomérisation de nos échantillons. C'est pourquoi nous avons étudié l'isomérisation de nos peptides à une concentration de 50 µM dans un tampon biologique HEPES contenant 1% de BSA. La solution a ensuite été exposée à la lumière ($\lambda = 365$ nm) pendant un temps défini à l'aide d'une lampe à UV. Le suivi de cette isomérisation a tout d'abord été réalisé grâce à la mesure du spectre d'absorption de nos composés. Les résultats obtenus nous ont ainsi permis de déterminer que l'état photostationnaire de nos composés est atteint après cinq minutes d'irradiation lumineuse à 365 nm (Figure 51). Nous avons également pu constater qu'une exposition à

la lumière pendant dix minutes supplémentaires n'entraînait aucune modification du spectre d'absorption. C'est pourquoi, afin de s'assurer que l'état photostationnaire serait atteint durant les évaluations biologiques, tous les composés ont été exposés à la lumière pendant quinze minutes. Associé à cela, l'analyse par HPLC analytique en phase inverse (Figure 51) nous a permis de quantifier la proportion de chaque isomère à l'équilibre thermodynamique et à l'état photostationnaire

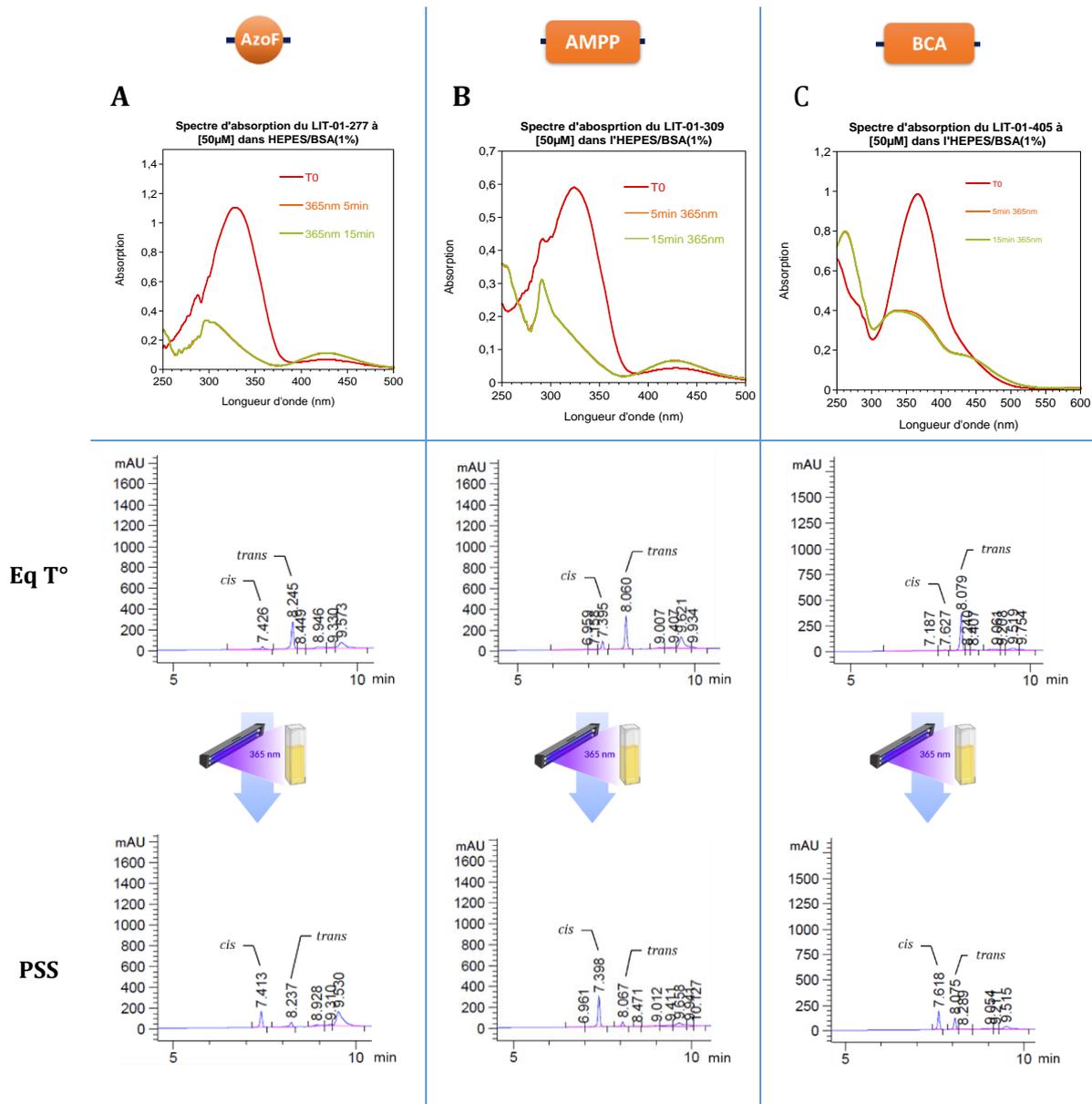


Figure 51. Spectres d'absorption et profils HPLC (entre 5 min et 10 min) du (A) LIT-01-322 (AzoF en position Tyr⁹), (B) LIT-01-309 (AMPP en position Ala⁶-Met⁷) & (C) LIT-01-405 (BCA en position Met⁷-Gln⁴) dans un tampon HEPES/BSA(1%) à l'équilibre thermodynamique (Eq T°; —) et après l'exposition à la lumière ($\lambda = 365$ nm) pendant 5 min (—) et 15 min (—) (t_R : 9.5 – 9.6 min = traces de BSA ; PSS : état photostationnaire)

Toutefois, la présence de BSA a demandé l'optimisation du protocole d'analyse par HPLC analytique en phase inverse. En raison de sa forte absorption à la longueur d'onde d'analyse (210 nm), elle a dû être éliminée avant toute analyse par HPLC analytique. Nous avons donc mis en place un protocole de précipitation de la BSA à l'aide d'acétonitrile (50% dans le tampon) afin de permettre son élimination après centrifugation pendant deux minutes en récupérant uniquement le surnageant. Cette étape d'élimination de la BSA a naturellement entraîné une dilution de l'échantillon ce qui a conduit à des signaux de plus faible intensité et ayant un profil large, notamment pour la forme *cis* des composés (Figure 52). Plusieurs alternatives ont été envisagées comme l'utilisation de méthanol ou d'éthanol en remplacement de l'acétonitrile ou encore l'ajout d'acide trifluoroacétique. Cependant aucune de ces options n'a permis d'améliorer les résultats obtenus. La seule solution a donc été d'augmenter le temps de la méthode d'analyse par HPLC analytique en phase inverse jusqu'à vingt minutes pour ainsi obtenir une meilleure résolution des signaux (Figure 52).



Figure 52. Profils HPLC selon la méthode (A) 7min ou (B) 20min du **LIT-01-277** à 50 μ M dans un tampon HEPES/BSA(1%) après élimination de la BSA

En résumé, la mesure des spectres d'absorption nous a permis de déterminer que cinq minutes d'exposition à la lumière étaient nécessaires pour atteindre l'état photostationnaire. Et grâce à l'analyse par chromatographie analytique nous avons pu quantifier la proportion de chaque isomère de nos composés avant et après leur exposition à la lumière (Tableau 13).

Ne disposant pas de lampe émettant à une longueur d'onde de 450 nm permettant une isomérisation *cis* \rightarrow *trans*, nous n'avons pas été en mesure d'étudier la réversibilité de l'isomérisation de nos peptides de manière exhaustive. Toutefois nous avons pu observer qu'après isomérisation, les peptides sous leur configuration *cis* étaient stables au moins 2h à 25°C avant de revenir naturellement vers la forme *trans* par relaxation thermique.

Cette observation nous a non seulement permis de démontrer la réversibilité de l'isomérisation mais également que les isomères *cis* sont suffisamment stables pour pouvoir étudier leur activité biologique *in vitro* de manière optimale.

Composés	Motif	Position	<i>cis</i> (%)	
			Eq T°	PSS
LIT-01-277	AzoF	Trp ²	16	72
LIT-01-322	AzoF	Tyr ⁹	10	76
LIT-01-276	AzoF	Leu ¹⁰	8	73
LIT-01-278	AMPP	Thr ³ -Pro ⁴	13	79
LIT-01-308	AMPP	Pro ⁴ -Gln ⁵	17	60
LIT-01-309	AMPP	Ala ⁶ -Met ⁷	19	84
LIT-01-310	AMPP	Met ⁷ -Leu ⁸	18	85
LIT-01-378	AMPP	Lys ¹¹ -Gly ¹²	14	55
LIT-01-379	AMPP	Lys ¹¹	6	58
LIT-01-380	AMPP	Gly ¹²	3	63
LIT-01-307	AMPP	Gly ¹² -Ala ¹³	14	78
LIT-01-398	BCA	Gln ⁵ -Gly ¹²	14	45
LIT-01-438	BCA	Ala ⁶ -Ala ¹³	20	35
LIT-01-405	BCA	Met ⁷ -Gln ¹⁴	4	59

Tableau 13. Pourcentage de forme *cis* des spexines photoisomérisables à l'équilibre thermodynamique (Eq T°) et à l'état photostationnaire (PSS)

Concernant les dérivés agrafés, nous avons constaté que les ratios *trans/cis* obtenus étaient inférieurs à ceux des deux autres approches (Tableau 13). Associé à cela, nous avons également observé que leur relaxation *cis* → *trans* en absence de lumière se produisait plutôt de l'ordre de la minute (Figure 53). Cela peut s'expliquer par la contrainte stérique induite par l'insertion du motif BCA ou par la structuration du peptide¹⁷⁷.

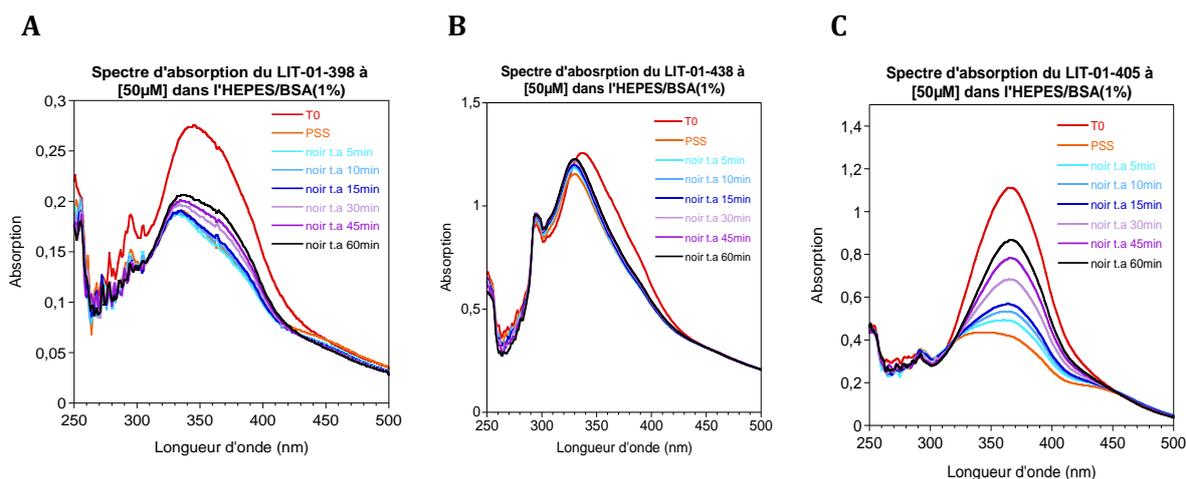


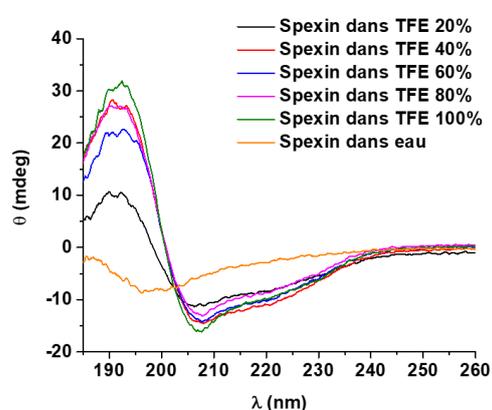
Figure 53. Spectres d'absorption des dérivés agrafés de la spexine dans le tampon HEPES/BSA(1%) à l'équilibre thermodynamique (T0 ; —), à l'état photostationnaire (PSS ; —) après leur exposition à la lumière ($\lambda = 365 \text{ nm}$) et après 5 min (—), 10 min (—), 15 min (—), 30 min (—), 45 min (—) et 60 min (—) dans le noir à température ambiante (t.a)

3. Evaluation de la structuration de la spexine et de ses dérivés agrafés

Au vu des photoisomérisations incomplètes obtenues pour les dérivés agrafés de la spexine, nous avons cherché à savoir quelles en étaient les conséquences sur la structure secondaire des peptides. C'est pourquoi nous avons commencé par étudier la structuration d'une spexine synthétisée par nos soins grâce à des mesures de dichroïsme circulaire dans le trifluoroéthanol (TFE) (Figure 54). Bien que nos résultats soient quelque peu différents de ceux obtenus par le groupe de Wong¹⁴³ cela nous a permis de confirmer la structuration majoritaire (54%) sous forme d'hélice α de la spexine en milieu apolaire (100% de TFE).

Après avoir confirmé la structuration de la spexine en présence de TFE, nous avons étudié quel était l'impact réel de l'isomérisation du motif azobenzène agrafé sur la structuration en hélice α de la spexine. Pour cela nous avons tout d'abord réalisé une étude de la structure secondaire du **LIT-01-405** (motif BCA en position Met⁷-Gln¹⁴) en solution dans l'eau par dichroïsme circulaire avant et après son exposition à la lumière (Figure 55). En effet, nous avons démontré que la spexine ne se structure pas lorsqu'elle se trouve dans l'eau or, si l'isomérisation force le peptide à se structurer sous forme d'hélice α , cela devrait être observé sur les résultats du dichroïsme circulaire. Bien que

l'isomérisation du motif azobenzène du **LIT-01-405** ait été confirmée (Tableau 13 & Figure 53) nous n'avons pas été en mesure de démontrer qu'elle puisse améliorer la structuration en hélice α du peptide dans l'eau. C'est pourquoi nous avons ensuite réalisé la même évaluation en utilisant, cette fois, du TFE à la place de l'eau (Figure 55). Du fait de la présence du solvant apolaire nous avons logiquement observé une structuration du peptide sous forme d'hélice α à l'équilibre thermodynamique. Nous avons néanmoins constaté que cette structuration secondaire s'est trouvée légèrement augmentée après cinq minutes d'exposition à la lumière ($\lambda = 365$ nm) permettant l'isomérisation du motif BCA (29% à l'équilibre thermodynamique contre 31% à l'état photostationnaire).



H ₂ O/TFE	Hélice α	Feuillet β	Autre
0/100	54	15	31
20/80	40	18	42
40/60	46	15	39
60/40	45	18	37
80/20	21	26	53
100/0	5	30	65

Figure 54. Analyse de la structure secondaire de la spexine par dichroïsme circulaire dans un solvant composé d'eau et de concentrations croissantes de trifluoroéthanol (TFE)

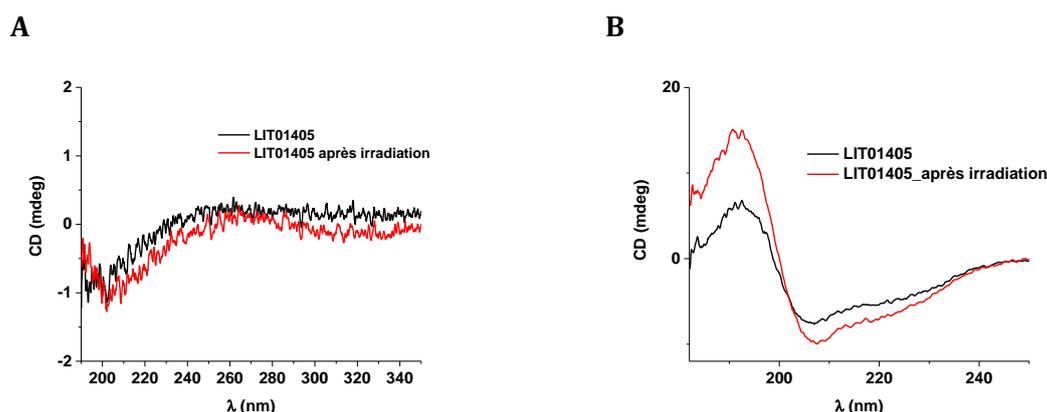


Figure 55. Analyse de la structure secondaire du **LIT-01-405** par dichroïsme circulaire dans (A) l'eau et (B) le TFE avant (—) et après (—) son exposition à la lumière

A la suite de ces observations nous avons également réalisé une analyse de la structuration des **LIT-01-398** (motif BCA en position Gln⁵-Gly¹²) & **LIT-01-438** (motif BCA en position Ala⁶-Ala¹³) en solution dans le TFE à l'équilibre thermodynamique et à l'état photostationnaire (Figure 56). Concernant ces deux peptides nous avons d'une part pu mettre en évidence que, bien qu'elle soit améliorée après l'isomérisation du motif BCA (10% à l'équilibre thermodynamique contre 21% à l'état photostationnaire), la structure secondaire du **LIT-01-438** n'était pas aussi bien définie que celle du **LIT-01-405**. D'autre part nous avons pu constater que le **LIT-01-398** ne présentait aucune structuration secondaire dans le TFE, contrairement aux deux autres peptides. Ces observations sont en lien avec les pourcentages d'isomérisation précédemment observés (Tableau 13) et qui témoignent d'une faible efficacité de l'isomérisation du motif BCA pour ces peptides.

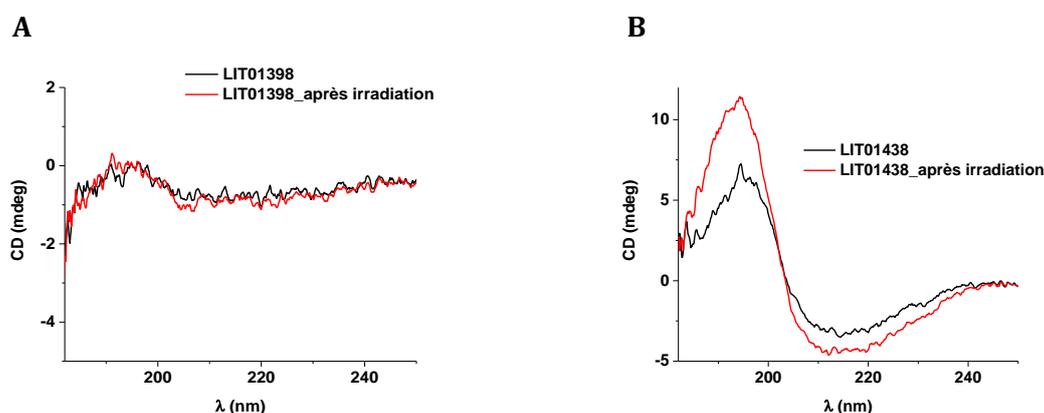


Figure 56. Analyse de la structure secondaire des (A) **LIT-01-398** & (B) **LIT-01-438** par dichroïsme circulaire dans le TFE avant (—) et après (—) leur exposition à la lumière

4. Evaluation biologique fonctionnelle des peptides photoisomérisables sur cellules HEK-GalR₂

Après avoir confirmé l'isomérisation de chacun de nos peptides, nous sommes passés à leur évaluation biologique fonctionnelle *in vitro* sur des cellules HEK exprimant de manière stable le récepteur GalR₂ et en utilisant la spexine native (GeneCust®) comme agoniste de référence.

Comme mentionné en introduction, le récepteur GalR₂ est connu pour être couplé à une protéine G_{q/11} dont le recrutement conduit à la libération de calcium intracellulaire. L'activation du récepteur d'intérêt a donc pu être évaluée grâce à la détection et la

quantification de la variation de calcium intracellulaire. Pour cela nous avons utilisé le Fluo-4, une sonde fluorescente fluorogène qui va pouvoir se complexer avec le Ca^{2+} et ainsi émettre de la fluorescence (Figure 57). L'intensité de cette fluorescence sera proportionnelle à la quantité de calcium libérée qui est elle-même corrélée à la capacité des peptides à activer le récepteur GalR₂.

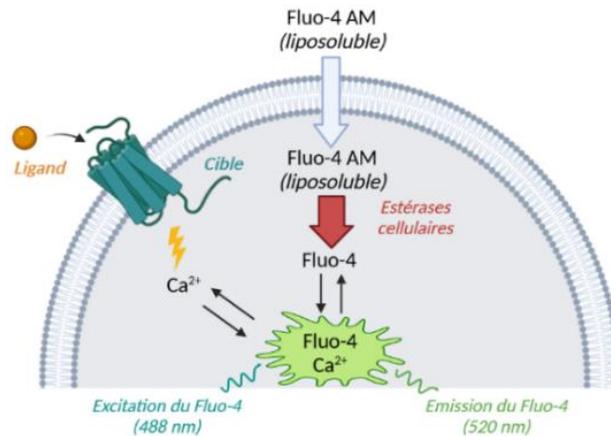


Figure 57. Principe de l'évaluation biologique *in vitro* en utilisant le Fluo-4

Nous avons commencé par mettre en place un protocole spécifique afin d'évaluer les isomères *cis* & *trans* de chaque peptide et pouvoir comparer les résultats en s'affranchissant des biais de reproductibilité. Le principal problème a été l'étape d'isomérisation des composés. En effet, si l'on veut tester à la fois les formes *cis* & *trans* de nos composés, une partie devra être exposée à la lumière alors que l'autre devra être, le plus possible, protégée de tout stimulus lumineux. Comme les composés sont placés dans des plaques 96 puits, une première approche a consisté à exposer toute la plaque de composés à la lumière ($\lambda = 365 \text{ nm}$) et en protégeant la moitié des composés avec de l'aluminium. Malheureusement cette méthode n'était pas adaptée car une partie non négligeable des composés qui étaient protégés de la lumière se sont isomérisés. Ne pouvant éviter cette isomérisation parasite en utilisant une seule plaque de composé, nous avons pris la décision de séparer les composés en utilisant deux plaques 96 puits. L'une où les composés seront exposés à la lumière et l'autre où les composés ne le seront pas.

Grâce à ce protocole nous avons été en mesure d'évaluer l'activité fonctionnelle de nos quatorze dérivés photoisomérisables de la spexine (Tableau 14) :

Composés	Motif	Position	EC ₅₀ (± SEM)	
			Eq T°	PSS
spexine			11.7 ± 2.1 nM	
LIT-01-277	AzoF	Trp ²	7 ± 0.5 µM	> 10 µM
LIT-01-322	AzoF	Tyr ⁹	665 ± 81 nM	1.6 ± 0.3 µM
LIT-01-276	AzoF	Leu ¹⁰	456 ± 69 nM	1.3 ± 0.2 µM
LIT-01-278	AMPP	Thr ³ -Pro ⁴	2.4 ± 0.2 µM	2.4 ± 0.1 µM
LIT-01-308	AMPP	Pro ⁴ -Gln ⁵	ND	ND
LIT-01-309	AMPP	Ala ⁶ -Met ⁷	ND	ND
LIT-01-310	AMPP	Met ⁷ -Leu ⁸	> 10 µM	> 9 µM
LIT-01-378	AMPP	Lys ¹¹ -Gly ¹²	10.9 ± 3.7 nM	27 ± 8 nM
LIT-01-379	AMPP	Lys ¹¹	17.6 ± 5.7 nM	37 ± 6 nM
LIT-01-380	AMPP	Gly ¹²	0.7 ± 1.1 nM	1.8 ± 0.3 nM
LIT-01-307	AMPP	Gly ¹² -Ala ¹³	12.4 ± 1.7 nM	26.8 ± 7 nM
LIT-01-398	BCA	Gln ⁵ -Gly ¹²	ND	ND
LIT-01-438	BCA	Ala ⁶ -Ala ¹³	> 10 µM	> 10 µM
LIT-01-405	BCA	Met ⁷ -Gln ¹⁴	13.6 ± 1.1 nM	6.3 ± 0.4 nM

Tableau 14. *Evaluation de l'effet (EC₅₀) de concentrations croissantes de ligands photoisomérisables (n = 2) et de spexine (n = 6) sur la libération intracellulaire de calcium de cellules HEK-GalR₂ avant et après l'exposition à la lumière (λ = 365 nm) (SEM : erreur standard à la moyenne ; ND : activité non-déterminée ; Eq T° : équilibre thermodynamique ; PSS : état photostationnaire)*

A la suite de ces résultats, nous avons constaté que l'introduction d'un motif photoisomérisable au sein de la spexine a eu différents impacts sur l'activité biologique du peptide pour le récepteur GalR₂.

La première observation que nous avons pu faire a été que la plupart des composés conservaient leur effet agoniste sur le récepteur GalR₂ ce qui n'a malheureusement pas été le cas pour les composés **LIT-01-308**, **LIT-01-309**, **LIT-01-310**, **LIT-01-398** & **LIT-01-438** où l'introduction d'un motif azobenzène a entraîné une perte d'activité pour le

récepteur GalR₂. A côté de cela nous avons remarqué que, parmi l'ensemble des dérivés qui présentaient toujours une activité, certains avaient une EC₅₀ voisine voire meilleure que celle de la spexine native, notamment dans le cas du **LIT-01-380** qui présentait une EC₅₀ de 0.7 ± 1.1 nM contre 11.7 ± 2.1 nM en moyenne pour la spexine. En ce qui concerne les autres composés nous avons observé une diminution de l'activité fonctionnelle, avec pour certains une EC₅₀ passant de l'ordre du nM au μ M.

De manière générale, l'exposition des peptides photoisomérisables à la lumière a entraîné une diminution de leur activité biologique d'un facteur 2 à 10. Toutefois nous avons observé une amélioration de l'EC₅₀ du **LIT-01-405** d'un facteur 2 après une exposition aux ultraviolets. En effet, l'activité passait de 13.6 ± 1.1 nM à l'équilibre thermodynamique contre 6.3 ± 0.4 nM à l'état photostationnaire. Bien que dans la littérature, certains composés photoisomérisables aient déjà présenté des écarts d'activité fonctionnelle aussi faibles^{177,188,189}, nous avons jugé que cette différence d'activité n'était pas assez significative pour poursuivre vers de potentielles études *in vivo*. En effet nous avons estimé que cette amélioration de l'EC₅₀ ne pouvait pas être différenciée des variations observées durant les expériences.

L'introduction du motif AMPP au niveau des acides aminés C-terminaux Lys¹¹, Gly¹² & Ala¹³ nous a permis d'obtenir des dérivés de la spexine possédant une activité similaire, voire meilleure, à celle du peptide natif. Cette observation laisserait penser que cette partie du peptide a peu d'importance pour l'activité vis-à-vis du récepteur GalR₂. Toutefois lorsque le motif photoisomérisable est introduit en substituant la Gly¹² nous avons observé une amélioration de l'activité d'un facteur 10.

Bien que la synthèse des peptides agrafés n'ait pas posé de problèmes particuliers, l'introduction du motif BCA au niveau des résidus Gln⁵-Gly¹² (**LIT-01-398**) et Ala⁶-Ala¹³ (**LIT-01-438**) a entraîné une perte complète de l'activité pour le récepteur GalR₂. Le motif utilisé doit certainement interférer dans la liaison des acides aminés de l'hélice α au récepteur. Cependant, lorsque l'on décale le motif au niveau des acides aminés Met⁷-Gln¹⁴ nous retrouvons l'activité de la spexine qui n'est toutefois pas suffisamment améliorée par l'isomérisation du motif. Sur la base de ces résultats, il serait intéressant d'étudier plus en détail le rôle de l'hélice α sur l'activité du peptide.

5. Conclusion & perspectives

Concernant cet aspect du projet, nous avons été en mesure de synthétiser les quatorze premiers dérivés photochromiques de la spexine. Cela a été rendu possible grâce à l'introduction d'un motif photoisomérisable de type azobenzène en tant que chaîne latérale d'un acide aminé, directement au sein de la séquence peptidique ou agrafé sur le peptide. Après avoir confirmé leur isomérisation *trans* → *cis* lorsqu'ils sont exposés à une lumière de longueur d'onde 365 nm, nous avons pu évaluer leur activité biologique fonctionnelle sur des cellules HEK exprimant de manière stable le récepteur GalR₂.

Cela nous a permis de démontrer que le principe de la photoisomérisation est applicable à la spexine. En effet l'introduction du motif photoisomérisable au sein du peptide a eu différents impacts sur son activité fonctionnelle. Certains dérivés ont complètement perdu leur activité pour le récepteur GalR₂ (**LIT-01-308**, **LIT-01-309**, **LIT-01-398** & **LIT-01-438**). D'autres conservaient une activité, parfois similaire (**LIT-01-307** & **LIT-01-405**) voire meilleure (**LIT-01-380**) que celle du peptide natif. Après leur photoisomérisation nous avons observé une différence d'activité pour certains peptides où seulement l'un d'eux a vu son EC₅₀ être améliorée tandis qu'elle a diminué pour le reste des composés.

Bien qu'ayant effectivement observé des différences d'activités chez les dérivés photoisomérisables de la spexine après leur exposition à la lumière nous n'avons malheureusement pas été en mesure de constater une amélioration significative de l'activité biologique fonctionnelle sur le récepteur GalR₂. En effet, seul le **LIT-01-405** présentait une amélioration d'un facteur 2 de son EC₅₀ à l'état photostationnaire (6.3 ± 0.4 nM contre 13.6 ± 1.1 nM). Cependant nous avons considéré que cette variation n'était pas significative et qu'elle ne pourrait pas permettre d'observer un effet chez l'animal. De plus, le peptide à l'équilibre thermodynamique présentait déjà une activité similaire à celle de la spexine native qui nous a empêché d'envisager l'utilisation de ce composé lors de futures expériences *in vivo* étant donné que nous cherchions un composé dont l'activité à l'équilibre serait fortement diminuée.

Ce manque de résultats peut s'expliquer en grande partie par le peu de données de relation structure-activité concernant le complexe spexine/GalR₂.

Les informations concernant la structure secondaire de la spexine sous forme d'hélice α que nous avons pu trouver dans la littérature pouvaient être remises en question. D'une part les analyses sur la structuration des peptides dans le TFE sont sujets à controverse. En effet le TFE permet de créer un environnement apolaire qui va forcer les peptides à se structurer. Cependant il y a toujours un débat pour savoir si cette méthode favorise une structuration qui existe à l'état naturel ou si elle force une structure « artificielle » qui pourrait exister au vu des acides aminés présents dans sa séquence et de leurs interactions potentielles. D'autre part, les valeurs obtenues par le groupe de Wong¹⁴³ diffèrent de celles que nous avons pu obtenir au laboratoire. Nous avons effectivement confirmé la structuration majoritaire sous forme d'hélice α cependant, là où Wong obtenait un pourcentage maximum de 75% d'hélice α nous avons seulement obtenu 54%. Cela pourrait signifier que cette structure secondaire est plus courte que celle suggérée par Wong. En effet, si l'hélice α représente environ 50% du peptide elle ne serait, en théorie, composée que de sept acides aminés.

En nous basant sur les résultats obtenus par Wong et al., nous avons également modélisé nos dérivés agrafés au sein du récepteur GalR₂. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que seul le **LIT-01-398** permettrait une liaison efficace au récepteur tandis que le motif photoisomérisable des **LIT-01-405** & **LIT-01-438** interférait avec des résidus clés du récepteur, empêchant une liaison optimale. Néanmoins ces observations ont été infirmées par les expériences pratiques. En effet tandis que les **LIT-01-398** & **LIT-01-438** n'entraînaient aucune activation du récepteur GalR₂, seul le **LIT-01-405** conservait une activité pour ce récepteur. Ces observations remettaient donc en question les résultats de modélisation précédemment décrits.

De très récents travaux ont pu établir la structure du complexe spexine/GalR₂²⁸⁰ par cryomicroscopie électronique (cryo-EM) (PDB DOI : [10.2210/pdb7XJL/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb7XJL/pdb)). Cela nous a permis de constater que, contrairement aux autres neuropeptides et à ce qu'avait modélisé Wong et al., la spexine se lie à la surface du récepteur de manière quasi parallèle à la membrane plasmique (Figure 58). Nous avons également confirmé la structuration en hélice α de la spexine en observant toutefois une certaine différence par rapport à ce qui a été précédemment suggéré. En effet, nous avons remarqué que cette hélice α se situait entre les acides aminés Gln⁵-Lys¹¹ et non jusqu'à la Gln¹⁴ comme l'avait laissé entendre les travaux de Wong et al.. Enfin, l'analyse de la spexine au sein du récepteur

GalR₂ a montré que les chaînes latérales des résidus Met⁷ & Gln¹⁴ sont dirigées vers l'extérieur du récepteur contrairement aux résidus Gln⁵, Ala⁶ & Gly¹². L'introduction d'un motif photoisomérisable sous forme d'agrafe en Met⁷-Gln¹⁴ (**LIT-01-405**) ne doit donc pas interférer avec la liaison du peptide à son récepteur, à la différence des deux autres dérivés agrafés (**LIT-01-398** & **LIT-01-438**). Cela nous a ainsi permis d'expliquer que, parmi les dérivés agrafés de la spexine, seul le **LIT-01-405** présente toujours une activité pour le récepteur.

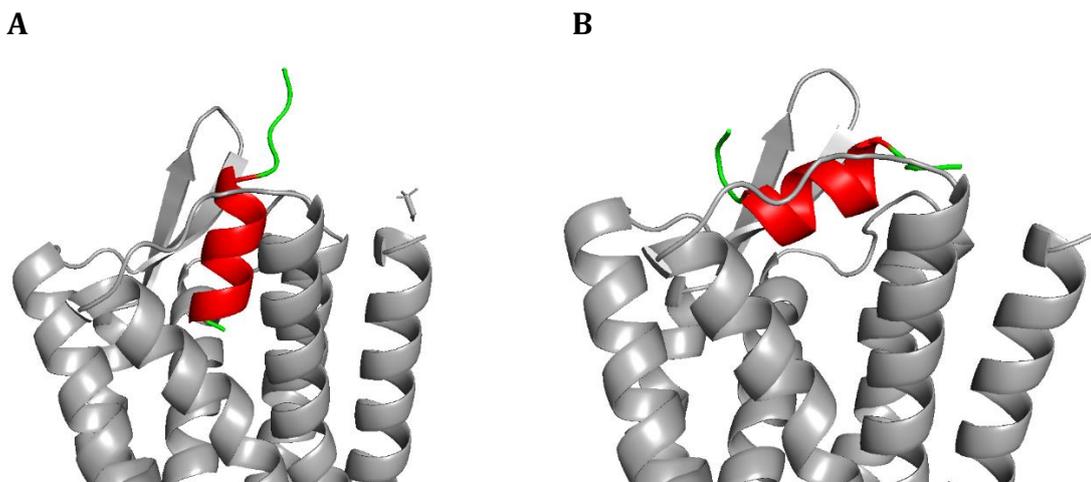


Figure 58. Structures du complexe spexine/GalR₂ obtenues par (A) docking moléculaire¹⁴³ et (B) cryomicroscopie électronique²⁸⁰

Grâce à ces toutes nouvelles données qui ont permis de repositionner la structure secondaire en hélice α de la spexine nous pouvons maintenant rationaliser certains de nos résultats. Et notamment la perte d'activité observée pour les dérivés **LIT-01-308**, **LIT-01-309** & **LIT-01-310**. En effet, il s'agit des seuls dérivés où le motif AMPP a été inséré au sein de l'hélice α . L'introduction d'un motif azobenzène à ce niveau doit très certainement conduire à la perte de la structure secondaire. Ces nouvelles conclusions permettent donc de confirmer l'importance de cette structure secondaire dans la liaison de la spexine au récepteur GalR₂.

Associé à cela les travaux de modélisation de Wong et al. ont montré l'importance des acides aminés Lys¹¹, Gly¹², Ala¹³ & Gln¹⁴ dans la liaison du peptide au récepteur GalR₂. Cependant de précédentes données laissaient à penser que ces acides aminés n'avaient que peu d'importance dans l'activité du peptide pour le récepteur GalR₂. Ce qui semble

être confirmé par le fait que les **LIT-01-307**, **LIT-01-378**, **LIT-01-379** & **LIT-01-380** conservent une activité biologique voisine de la spexine native. En plus de cela les acides aminés Lys¹¹ à Gln¹⁴ sont censés se trouver au sein même de l'hélice α de la spexine tel que suggéré par Wong. Or nous avons ici pu constater que l'introduction du motif photoisomérisable AMPP au niveau de ces résidus ne modifie en rien l'activité biologique du peptide pour le récepteur GalR₂. Toutefois nous avons noté une certaine amélioration de l'EC₅₀ lorsque le motif a été inséré en substituant la Gly¹². Cela pourrait nous amener à suggérer que, bien que ces résidus ne soient pas impliqués dans l'activité, leur optimisation pourrait conduire à une amélioration de l'activité et ou des propriétés biologiques du peptide vis-à-vis du récepteur GalR₂.

Bien que la structure du complexe sepxine/GalR₂ obtenue par cryomicroscopie électronique ait permis d'expliquer les résultats observés, elle ne laisse pas présager le développement de nouveaux dérivés photoisomérisables de la spexine. En effet, la structure générale de la spexine reste similaire à ce qui a été initialement suggéré et les motifs photoisomérisables déjà utilisés ont été introduits aux différentes positions clés du peptide. Cependant, cette structure a permis d'établir de nouvelles données qui seront particulièrement utiles dans le cadre du développement de nouveaux dérivés de la spexine.

Dans une optique similaire nous avons pu voir que l'agrafe du motif photoisomérisable sur les positions Met⁷ et Gln¹⁴ (**LIT-01-405**) permettait de conserver une activité similaire à celle de la spexine native. Sachant cela il serait donc concevable d'agrafer un motif, non photoisomérisable cette fois, sur ces positions dans le but d'améliorer la stabilité plasmatique du peptide²⁸¹.

CHAPITRE 2 :

Conception, synthèse et
évaluation biologique de
dérivés photocages de la
spexine

1. Conception et synthèse des acides aminés photocages pour l'introduction dans la spexine

Dans le chapitre précédent, nous avons tiré parti de la photoisomérisation qui est le premier des deux aspects de la photopharmacologie. Nous allons maintenant développer la deuxième approche qui introduit la conception de dérivés photocages de la spexine. Comme pour la première stratégie, l'objectif de cette méthode est de synthétiser un peptide inactif et cela grâce à l'introduction de différents groupements protecteurs photolabiles. L'exposition à la lumière permettra ensuite d'éliminer ces groupements de manière à retrouver le ligand natif qui sera alors en mesure d'activer le récepteur GalR₂ (Figure 59). Cependant, à la différence de la première stratégie où les peptides s'isomérisent de manière réversible, la libération des groupements protecteurs est ici irréversible.

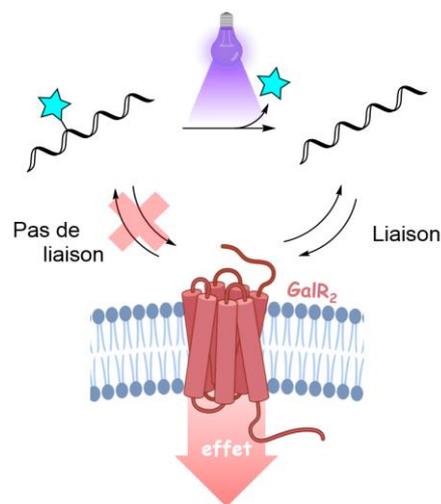


Figure 59. Principe de fonctionnement de la spexine photocage

Encore une fois, le peu d'études concernant les relations structure – activité de la spexine nous ont été quelque peu préjudiciables. Néanmoins certaines d'entre elles ont permis d'identifier la Tyr⁹ comme étant l'un des acides aminés essentiels à l'activité de la spexine pour le récepteur GalR₂¹⁴⁴. En protégeant ce résidu à l'aide d'un GPP nous avons donc bon espoir de réduire voire abolir l'activité biologique de la spexine pour le récepteur GalR₂. Cette activité pouvant ensuite être rétablie grâce au clivage du GPP après son exposition à la lumière. Comme évoqué précédemment, d'autres acides aminés peuvent être protégés par des groupements photolabiles¹⁹⁹. La Lys¹¹ présente dans la structure de la spexine étant le seul acide aminé chargée de la séquence¹⁴³, elle est

potentiellement impliquée dans la liaison du peptide au récepteur GalR₂. C'est pourquoi sa protection à l'aide d'un groupement photolabile pourrait également perturber l'activité biologique de la spexine. En résumé, nous avons donc choisi de synthétiser une tyrosine et une lysine photocages (Figure 60) qui ont ensuite pu être introduites au sein de la séquence peptidique et ainsi obtenir les premières spexines photocage.

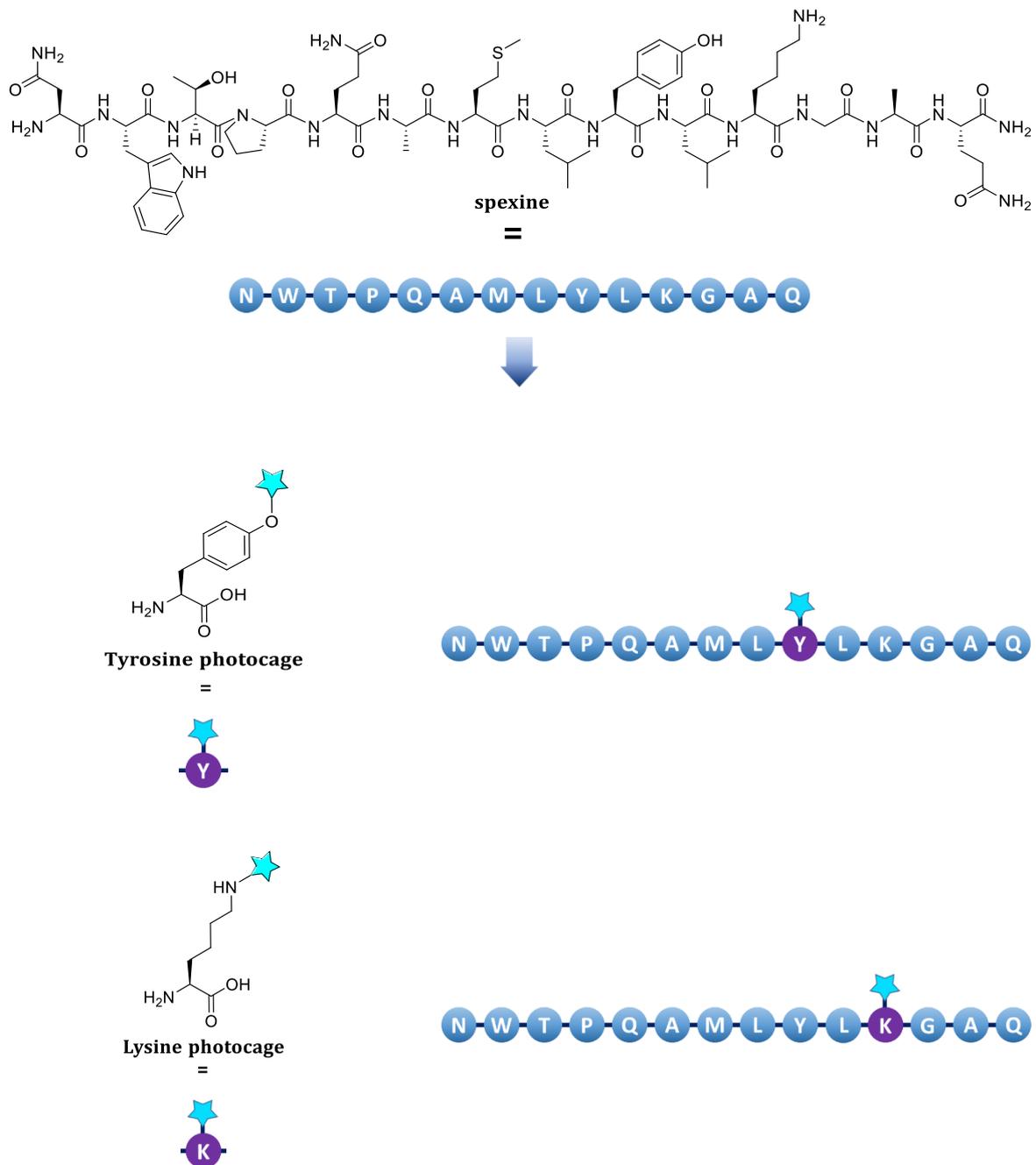


Figure 60. Structures des acides aminés et spexines photocage

1.1 Dérivés de la tyrosine

Plusieurs dérivés photocages de la tyrosine ont pu être synthétisés par le passé^{229,282,283} mais à ce jour, seul un petit nombre a été incorporé au sein d'un peptide^{196,284,285}. Comme nous avons pu le constater, plusieurs GPPs ont été utilisés et pour notre projet nous avons tout d'abord choisi de protéger la tyrosine avec un groupement *o*-NB. Etant le groupement photolabile le plus connu et le plus utilisé dans ce type d'étude, il nous servira de référence. En considérant le fait que l'objectif final de ces travaux sera d'utiliser ces peptides *in vivo*, nous avons également décidé d'utiliser des dérivés coumarin-4-ylméthyles car ce sont des composés qui ont de meilleures caractéristiques que les *o*-NB pour ce genre d'application²⁰⁴. En effet, ils présentent une bonne stabilité chimique ainsi que des coefficients d'absorption molaire plus larges à des longueurs d'ondes plus élevées (> 300 nm), leur photoclivage est rapide et leurs propriétés de fluorescence permettent de suivre efficacement leur libération. Ils restent également plus simples à utiliser que les BODIPYs du fait de l'instabilité de ces derniers en milieu acide concentré²⁸⁶.

Une fois les groupements photolabiles sélectionnés, nous nous sommes posés la question du type de lien à utiliser pour relier le GPP et l'acide aminé. En effet ce lien doit être stable chimiquement afin de résister aux différentes étapes de synthèse organique, y compris la synthèse peptidique sur support solide. Mais il doit aussi pouvoir être clivé de manière efficace par la lumière. Concernant les dérivés *o*-nitrobenzyles, ils sont généralement introduits sur les fonctions alcools via un lien éther qui est connu pour être stable durant la SPPS²⁸⁵ (Figure 61). Pour ce qui est des dérivés coumarin-4-ylméthyles, le lien éther ne peut pas être utilisé car le photoclivage entraîne des réarrangements radicalaires de type photo-Claisen^{287,288}. Pour s'affranchir de ce problème nous avons donc opté pour un lien carbonate (Figure 61).

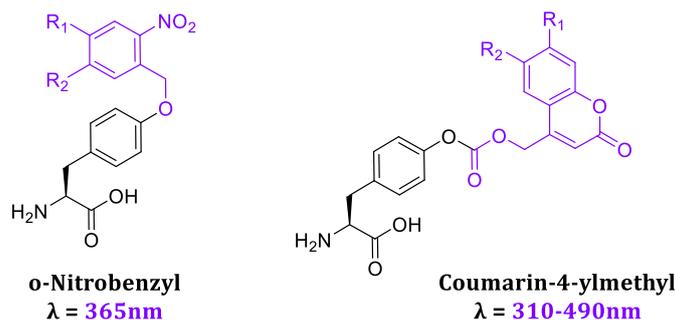


Figure 61. Structures des tyrosines photocages

1.1.1 Synthèse de la tyrosine protégée par l'ortho-nitrobenzyle

Comme évoqué en introduction de ce chapitre, il s'agit des premiers GPPs à avoir été utilisés et bien qu'ils fassent encore partis des groupements photolabiles les plus utilisés à l'heure actuelle, leurs propriétés (ϵ & φ) restent peu adaptées à une application sur le vivant. Pour ce projet notre objectif principal était d'avoir une différence claire et nette d'activité après le clivage du GPP. Afin de simplifier la synthèse, nous avons choisi d'utiliser un ortho-nitrobenzyle classique, sans substituants.

Pour synthétiser la tyrosine photocage nous avons initialement décidé d'exploiter un protocole décrit par l'équipe d'Alexander Deiters²⁸³ et basé sur la réaction de Biuret (Schéma 6). L'utilisation du sulfate de cuivre permet de complexer les fonctions $-\text{NH}_2$ et $-\text{COOH}$ de la L-tyrosine **2.1** de manière à ce que le bromure de 2-nitrobenzyle utilisé dans l'étape suivante ne puisse réagir qu'avec la fonction phénolique. Cependant après plusieurs essais nous n'avons pas été en mesure d'obtenir le produit **2.2** souhaité.

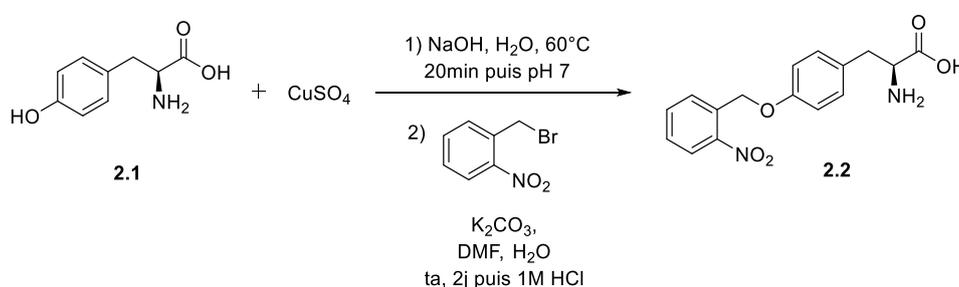


Schéma 6. Synthèse de la tyrosine o-NB décrite par Deiters et al.²⁸⁹

Nous avons ensuite utilisé une autre méthode de synthèse²⁸⁴ en partant de l'alcool 2-nitrobenzylique (Schéma 7). La synthèse initiale du dérivé mésylé **2.4** nous a aidés à introduire un bon groupe partant afin de rendre possible la substitution nucléophile permettant de former le lien éther. Sa réaction avec la Boc-L-Tyr-OtBu nous a permis d'obtenir le premier acide aminé photocage **2.5** avec un rendement quantitatif. Par la suite les groupements protecteurs Boc et tBu de la tyrosine ont pu être éliminés à l'aide d'acide trifluoroacétique pour finalement introduire le fluorénylméthoxycarbonyle sur la fonction amine et ainsi synthétiser l'acide aminé **2.6**.

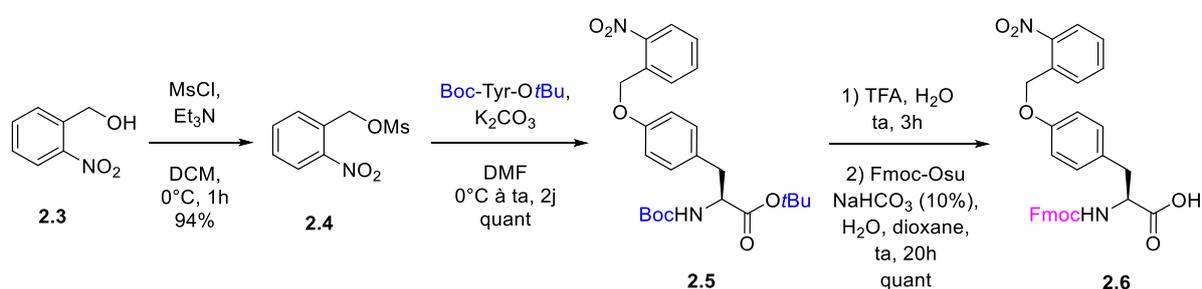


Schéma 7. Synthèse de la Fmoc-L-Tyr(o-NB)-OH **2.6**

Cet acide aminé a ensuite pu être introduit au sein de la séquence peptidique grâce à une stratégie de synthèse Fmoc/tBu sur support solide pour obtenir le premier dérivé photocage de la spexine (**LIT-01-441**) (Figure 62).

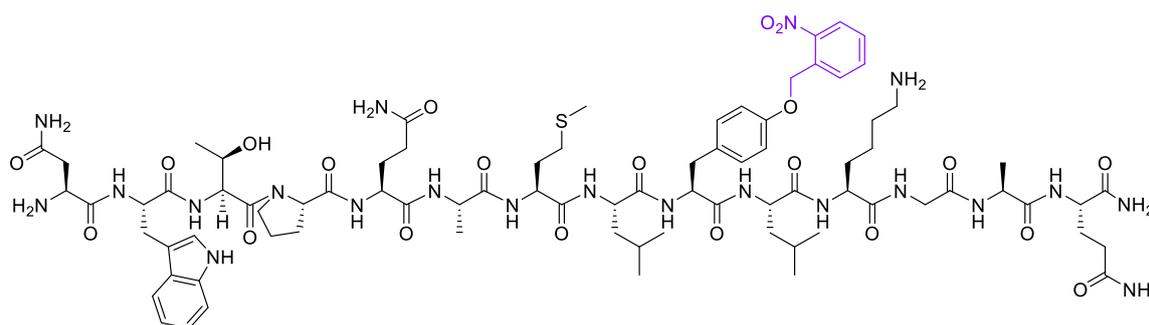


Figure 62. Structure de la spexine Tyr(o-NB) (**LIT-01-441**)

1.1.2 Synthèse de la tyrosine protégée par la coumarin-4-ylméthyle

Après les *ortho*-nitrobenzyles, les groupements photolabiles les plus utilisés restent sans doute les dérivés coumarin-4-ylméthyles. De ce fait, il existe beaucoup de ces dérivés ayant une utilisation plus ou moins spécifique. En ce qui concerne notre projet, nous nous sommes basés sur les travaux réalisés par Suzuki et al.²²⁹. L'objectif de leur étude a été de comparer le photoclivage de plusieurs GPPs introduits sur différentes fonctions alcools via un lien carbonate. Leur première observation a été que les dérivés coumarin-4-ylméthyles présentaient un meilleur rendement quantique que le 6-nitrovéranyle. Mais le plus important restait le fait que, parmi tous les GPPs évalués, c'est la 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylméthyle qui présentait le meilleur rendement quantique. Associé à cela, nous avons déjà mentionné que la présence de l'atome de brome en C₆ entraîne une diminution du pKa de l'hydroxyle en C₇ conduisant à sa déprotonation complète au pH physiologique ce qui permet d'augmenter la solubilité aqueuse^{204,232,290}. L'ensemble de ces paramètres nous ont donc amené à exploiter ce composé comme groupement photolabile de la tyrosine.

Comme pour la Tyr(*o*-NB), nous souhaitons obtenir un acide aminé final présentant un groupement Fmoc sur la fonction α -NH₂ de manière à pouvoir l'utiliser en synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc/*t*Bu. Une rapide analyse rétrosynthétique de l'acide aminé **2.7** (Schéma 8) nous a permis de mettre en avant deux synthons : le dérivé coumarin-4-ylméthyle **2.8** et la Fmoc-L-tyrosine **2.9** (Schéma 8). Il est également important de mentionner que la fonction phénolique du noyau coumarine ainsi que l'acide carboxylique de la tyrosine devront être protégés en amont de la formation du lien carbonate de manière à éviter toute réaction secondaire. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une protection de type benzyle (Bn) qui présentait l'avantage d'être orthogonale au groupement Fmoc.

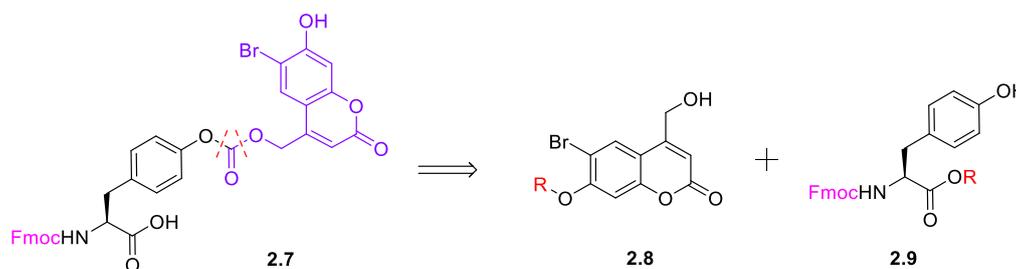


Schéma 8. Analyse rétrosynthétique de la tyrosine photocage

Nous avons commencé par la synthèse de l'acide aminé **2.9**²⁹¹ (Schéma 9) en partant de la Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH que nous avons benzylé à l'aide de bromure de benzyle avec une catalyse par l'iodure de tétrabutylammonium selon le principe de la réaction de Finkelstein. La fonction phénolique a ensuite pu être déprotégée en présence d'une solution d'acide chlorhydrique dans le dioxane pour obtenir le composé **2.12** avec un rendement de 87%.

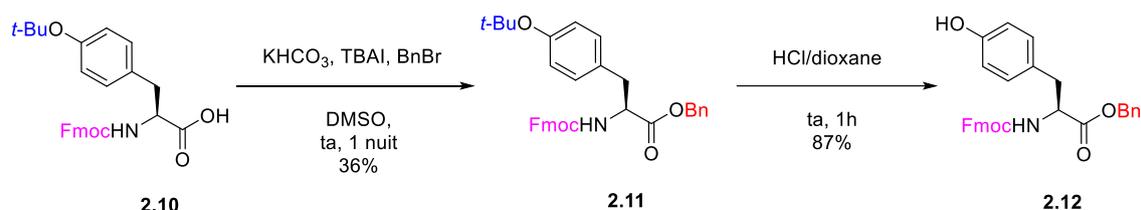
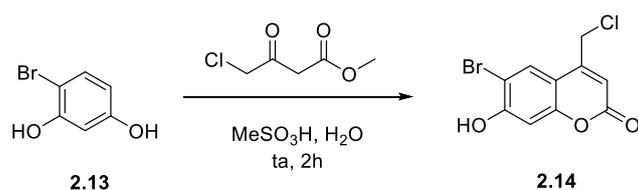


Schéma 9. Synthèse de la Fmoc-Tyr-OBn **2.12**

En parallèle, nous avons également réalisé la synthèse du dérivé **2.8** en combinant plusieurs protocoles trouvés dans la littérature²⁹²⁻²⁹⁴. Nous avons initié la synthèse par la formation du noyau coumarine grâce à une condensation de Pechmann entre le 4-bromoresorcinol et le 4-chloroacétoacétate de méthyle dans l'acide méthanesulfonique (Figure 63). Une fois cette réaction terminée plusieurs systèmes de recristallisation ont été explorés afin de récupérer le produit **2.14** pur (Figure 63) et le meilleur rendement (74%) a été obtenu en utilisant une combinaison pentane/acétate d'éthyle.



	Système	Rendement isolé (%)
1	Heptane/AcOEt	50
2	EtOH	41
3	Isopropanol	48
4	Pentane/AcOEt	74

Figure 63. Optimisation de la recristallisation du composé **2.14**

Pour l'étape suivante d'hydrolyse du dérivé chloré (Schéma 10) nous avons initialement chauffé le composé **2.14** dans l'eau à reflux pendant 48h avant de passer à un chauffage par microondes²⁹⁴. Cela nous a permis de réduire le temps de réaction à trente minutes tout en conservant des rendements similaires pour l'obtention du composé **2.15**. Enfin, la dernière étape de protection de la fonction 7-hydroxyle à l'aide du bromure de benzyle nous a permis d'obtenir la 7-benzyloxy-6-bromocoumarin-4-ylméthyle **2.16** avec un rendement de 34% (Schéma 10).

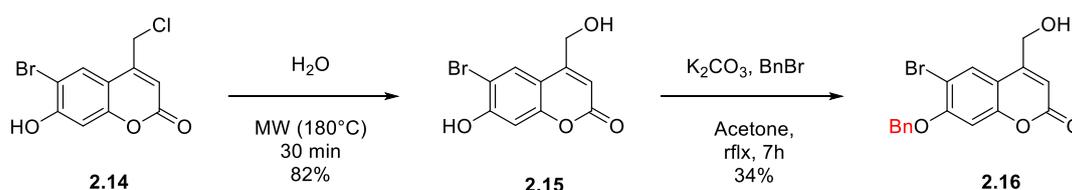
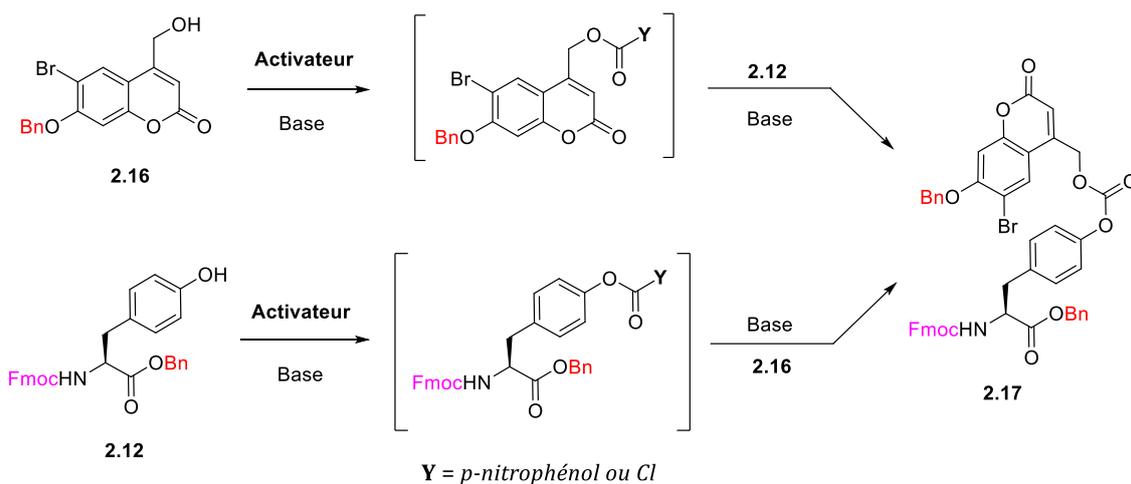


Schéma 10. Synthèse de la 7-benzyloxy-6-bromocoumarin-4-ylméthyle

Après avoir synthétisé les deux synthons nous avons entrepris de les condenser grâce à la formation du lien carbonate. Comme illustré en figure 64, cette réaction nécessitait la formation préalable d'une liaison carbonate activée, c'est-à-dire reliée à un groupement électroattracteur, sur l'un des deux substrats. Pour cela plusieurs conditions réactionnelles ont été testées (Figure 64).

La première tentative a consisté à utiliser du triphosgène qui pourrait activer la fonction phénolique de la tyrosine **2.12** sous forme d'un chloroformate. Cependant nous n'avons pas été en mesure d'activer l'acide aminé. En effet, l'activation de la coumarine **2.16** par cette méthode a entraîné sa conversion en dérivé chlorure, comme décrit précédemment par Ayala et al.²⁹⁵ pour les alcools primaires. Dans un second temps, nous avons décidé d'activer l'alcool **2.16** à l'aide du 4-nitrophénylchloroformate (*p*-NPC). Cette stratégie nous a alors permis de synthétiser et d'isoler le carbonate activé qui a ensuite été engagé dans la réaction avec l'acide aminé **2.12** dans le DCM en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) à température ambiante pendant 18 heures jusqu'à la disparition de l'intermédiaire de départ. Cependant, un mélange complexe a été obtenu et après purification, isolation et analyse RMN des différents produits de la réaction, nous avons pu mettre en évidence une élimination du groupement Fmoc²⁹⁶ responsable d'une cascade de réactions secondaires.

Cette dernière observation nous a conduits à modifier les groupements protecteurs de la tyrosine. En remplaçant notamment le Fmoc par une protection carboxybenzylique (Cbz), plus stable en conditions basiques. Pour cela nous avons donc synthétisé l'acide aminé **2.19** à partir de la Cbz-L-Tyr commerciale (Schéma 11) que nous avons fait réagir avec le bromure de benzyle et le carbonate de sodium dans le DMF afin d'obtenir la Cbz-L-Tyr-OBn **2.19** avec un rendement isolé de 89%.



Substrat	Activateur	Nature du substrat activé	Substrat activé	Observations
2.12	BTC	chloroformate	non identifié	pas de réaction de 2.12 avec le BTC
2.16	BTC	chloroformate	non identifié	conversion de la fonction alcool en chlorure
2.16	<i>p</i> -NPC	carbonate activé	isolé	formation de traces du produit désiré & clivage du groupement Fmoc

Figure 64. Conditions de formation du lien carbonate entre les substrats **2.12** et **2.16** (BTC : carbonate de bis(trichlorométhyle) ou triphosgène ; *p*-NPC : *para*-nitrophénylchloroformate)

Nous avons également saisi l'opportunité de remplacer le groupement protecteur benzylique du phénol de la coumarine par le méthyle-O-méthyle (MOM) (Schéma 12). Ce dernier présente l'avantage de pouvoir être éliminé grâce aux conditions de coupure

finale (acide trifluoroacétique concentré) de la synthèse peptidique qui suivra. En engageant la coumarine **2.15** dans une réaction avec l'éther méthylique de chlorométhyle en présence de DIEA dans le DCM nous avons pu obtenir la coumarine **2.20** en une étape. Son activation a ensuite été menée comme décrite précédemment, en utilisant le *p*-NPC (Schéma 12). L'acide aminé **2.22** a finalement pu être synthétisé avec un rendement de 89% après que le carbonate activé **2.21** ait été mis à réagir avec la tyrosine **2.19** en présence de DIEA dans le DCM (Schéma 12).

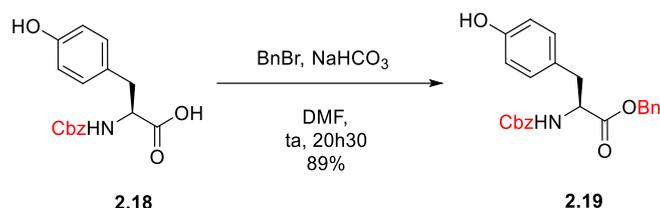


Schéma 11. Synthèse de la Cbz-L-Tyr-OBn **2.19**

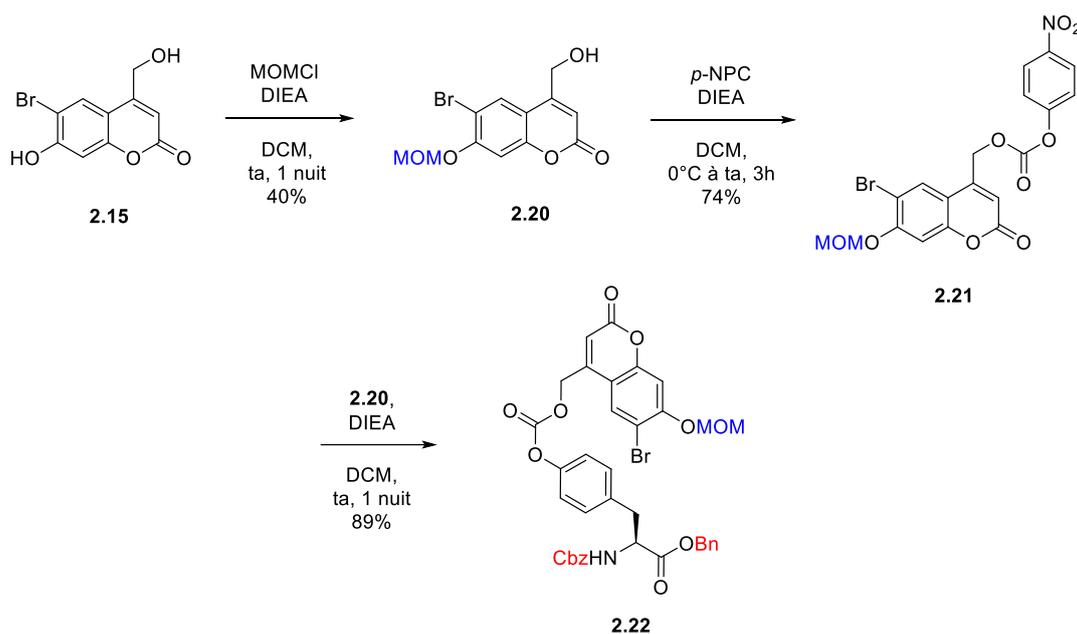


Schéma 12 Synthèse de la tyrosine photocage **2.22**

Une fois cet acide aminé formé il nous restait à substituer le groupement Cbz par le Fmoc, indispensable à la synthèse sur support solide en stratégie Fmoc/*t*Bu. Cependant, lorsque nous avons tenté d'éliminer les protections Cbz et Bn par hydrogénolyse dans des conditions douces (Pd/C dans le méthanol, pression atmosphérique et température ambiante), nous avons observé une déhalogénéation du noyau de la coumarine associée à

une déprotection partielle de la tyrosine (Schéma 13). Comme l'élimination du brome en C6 de la coumarine lui faisait perdre tous ses avantages cela nous a amené à modifier notre dérivé coumarin-4-ylméthyle.

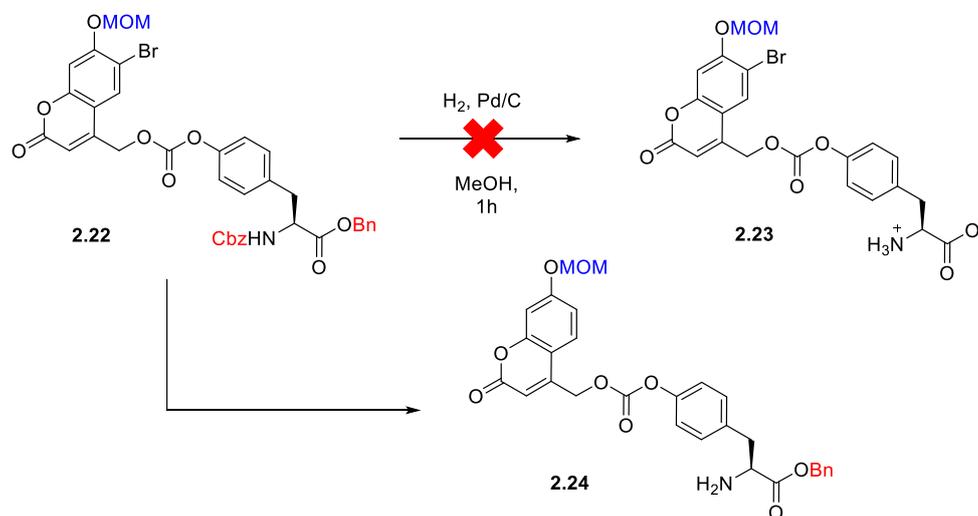


Schéma 13. Réaction d'hydrogénolyse du composé **2.22**

Notre choix s'est porté sur la 7-diéthylaminocoumarin-4-ylméthyle **2.28** (DEACM) dont le spectre d'absorption est décalé dans le domaine du visible. Un autre avantage de cette coumarine de deuxième génération est que ses fonctions ne nécessitent pas de protection durant la synthèse multi-étapes. Cette DEACM a pu être synthétisée en trois étapes à partir de la 7-diéthylamino-4-méthylcoumarine **2.25** commerciale (Schéma 14). Cette dernière a tout d'abord été convertie avec un rendement de 70% en énamine **2.26** grâce à sa réaction dans le DMF en présence de DMA. Cette même énamine a ensuite pu être transformée en aldéhyde **2.27** sous l'action du periodate de sodium. Finalement, l'aldéhyde a été réduit en présence de NaBH₄ pour former l'alcool **2.28** souhaité.

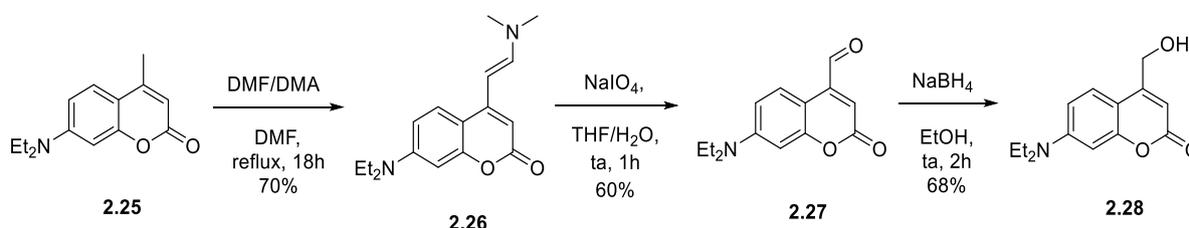


Schéma 14. Synthèse de la 7-diéthylaminocoumarin-4-ylméthyle (DEACM)

Après avoir été préalablement activé à l'aide de *p*-NPCl₂, la diéthylaminocoumarine **2.28** a ensuite pu être couplée à la Cbz-L-Tyr-OBn **2.19** pour obtenir l'acide aminé protégé

2.30 (Schéma 15). Cependant, lors du clivage des groupements Cbz et Bn par hydrogénolyse nous avons observé la dégradation du lien carbonate, notamment grâce à l'identification du composé **2.25** dans le mélange réactionnel.

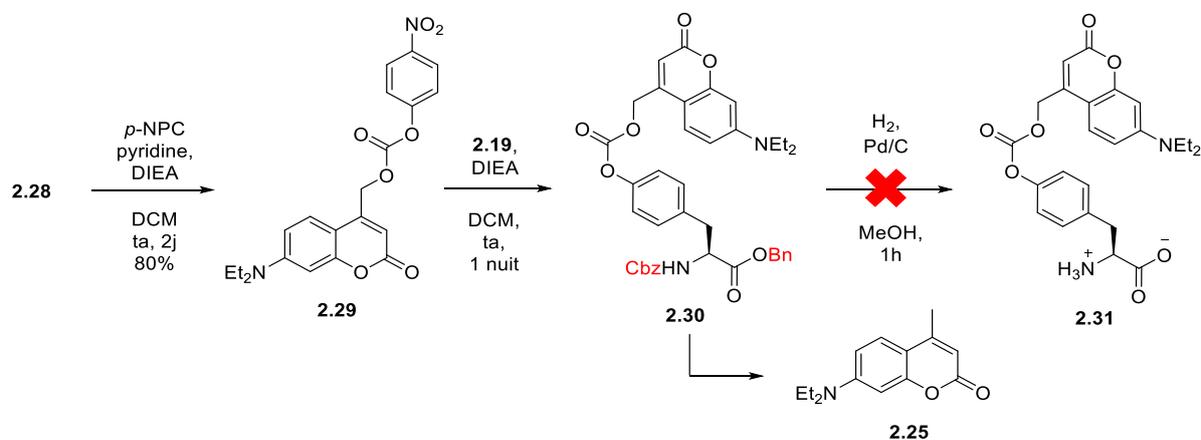


Schéma 15. Synthèse de l'acide aminé photocage **2.31**

Devant ce nouveau problème nous n'avons eu d'autre choix que de modifier une nouvelle fois les groupements protecteurs de la tyrosine. Etant donné que nous nous sommes affranchis de la protection MOM cela nous a permis d'utiliser les groupements Boc/*t*Bu. Ainsi, la Boc-L-Tyr-*Ot*Bu **2.33** a pu être synthétisée en protégeant par estérification la fonction acide carboxylique de la tyrosine commerciale **2.32** à l'aide de di-*tert*-butyl-dicarbonat (Schéma 16). La tyrosine **2.33** a ensuite été couplée avec la diéthylaminocoumarine **2.28** grâce à la formation de l'intermédiaire **2.29** à l'aide de *p*-NPC. Après la déprotection des groupements Boc/*t*Bu de la tyrosine en présence d'acide trifluoroacétique nous avons finalement été en mesure d'introduire le groupement Fmoc sur l'acide aminé et ainsi obtenir la tyrosine photocage **2.35** en une seule étape avec un rendement de 68%.

Bien que cet acide aminé ait ensuite pu être introduit dans la séquence peptidique de la spexine durant la synthèse sur support solide, le lien carbonate s'est avéré être instable dans les conditions de déprotection du groupement *N*-Fmoc (DMF/pipéridine (20%) ou DBU/pipéridine/DMF (1/1/48, v/v/v) ou DMF/DBU(2%)/pipérazine(5%)).

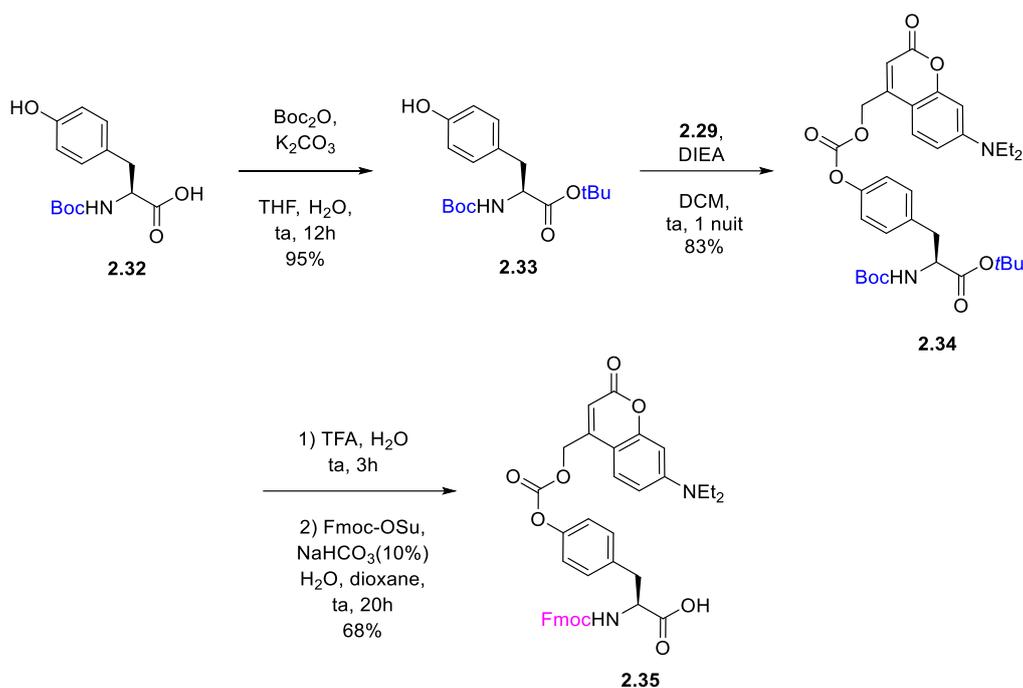


Schéma 16. Synthèse de la Fmoc-Tyr(DEACM)-OH 2.35

Ayant ainsi établi l'instabilité chimique du lien carbonate durant la synthèse peptidique, nous avons recherché une alternative en modifiant le lien unissant le GPP et l'acide aminé. La première option aurait été d'utiliser un lien éther, de la même manière que pour la Tyr(*o*-NB) 2.6. Cependant de précédents travaux font mention d'un réarrangement de type photo-Claisen à la suite du clivage de dérivés coumarin-4-ylméthyles reliés au ligand via un lien éther²⁸⁸. Cette difficulté a néanmoins pu être surmontée en remplaçant le lien carbonate par des liens carbamates grâce à l'introduction d'un linker autoimmolable *N,N'*-diméthyléthylènediamine entre le groupement photolabile et le ligand (Schéma 17).

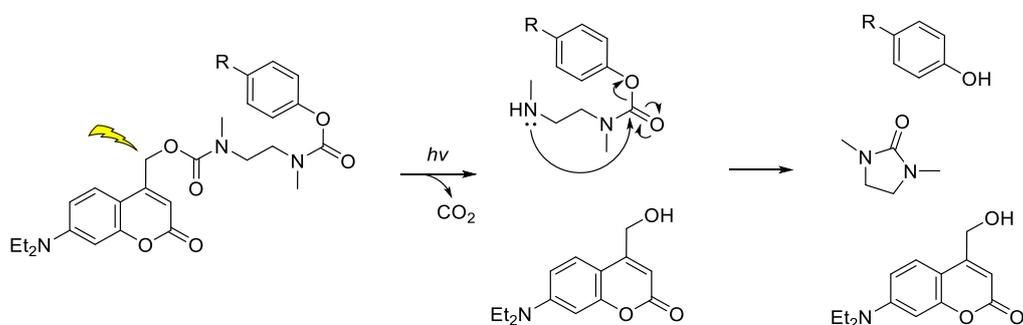


Schéma 17. Principe du clivage à l'aide du linker autoimmolable

L'acide aminé **2.39** a ensuite pu être introduit au sein du peptide par synthèse sur support solide selon une stratégie Fmoc/*t*Bu. La présence des liens carbamates a permis de conserver un acide aminé photocage stable durant l'ensemble de la synthèse peptidique afin d'obtenir un nouveau dérivé photocage de la spexine (**LIT-01-453**) (Figure 65).

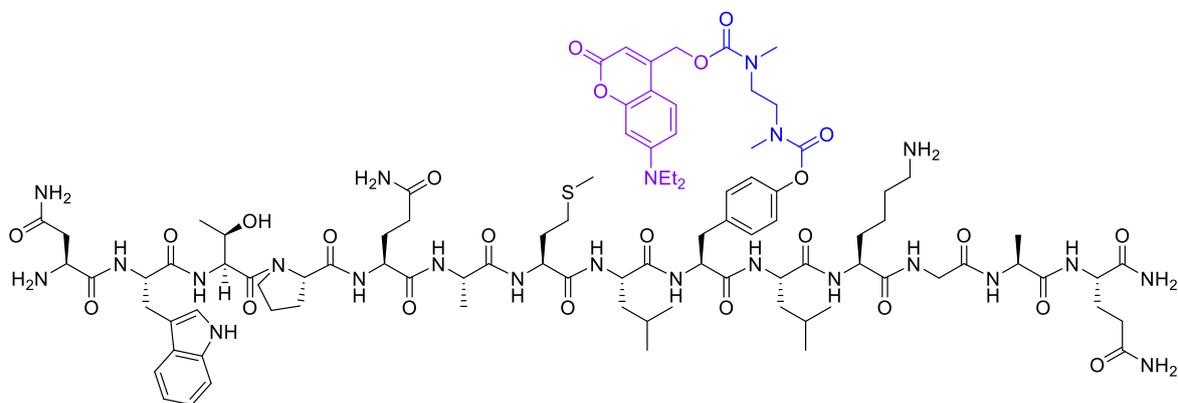


Figure 65. Structure de la spexine Tyr(linkerDEACM) (**LIT-01-453**)

1.2 Dérivé de la lysine

Comme il a été mentionné précédemment, la Lys¹¹ se trouve être le seul acide aminé chargé de la spexine¹⁴³ et sa protection à l'aide d'un GPP pourrait perturber l'activité biologique du peptide.

Afin de protéger cet acide aminé, nous avons décidé d'utiliser directement un dérivé coumarin-4-ylméthyle, plus adapté à une utilisation sur le vivant. Etant donné que la 7-diéthylaminocoumarin-4-ylméthyle a pu être introduite avec succès sur la tyrosine nous avons choisi de la réutiliser ici. Pour cela nous avons appliqué un protocole²⁸² où la coumarine activée **2.29** a été introduite sur la Fmoc-L-lysine commerciale afin d'obtenir l'acide aminé photocage **2.40** avec un rendement quantitatif (Schéma 19). Ce dernier a ensuite pu être introduit au sein de la spexine par synthèse peptidique sur support solide afin d'obtenir le troisième dérivé photocage de la spexine (**LIT-01-445**) (Figure 66).

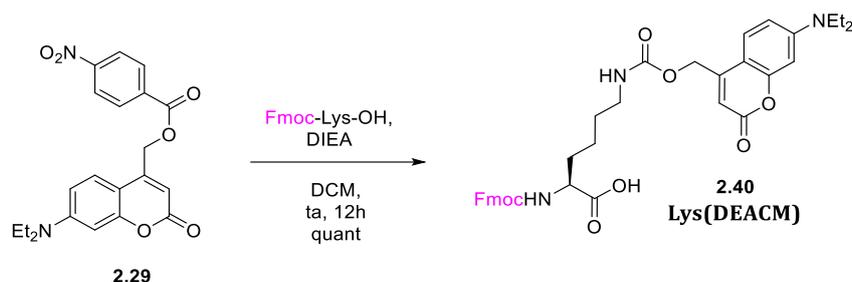


Schéma 19. Synthèse de la Fmoc-L-Lys(DEACM) 2.40

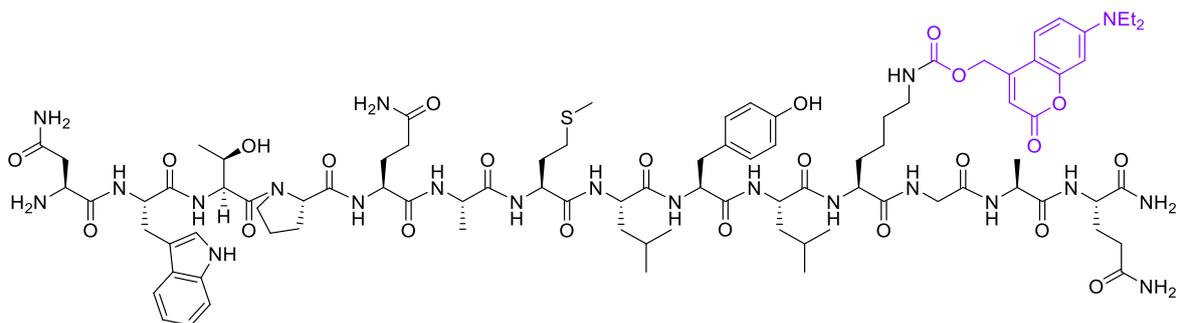


Figure 66 Structure de la spexine Lys(DEACM) (LIT-01-445)

2. Evaluation du photoclivage des peptides photocage

Afin d'étudier le photoclivage de nos nouveaux dérivés photochromiques de la spexine nous avons procédé comme pour l'étude des précédents dérivés photoisomérisables. A savoir l'analyse initiale de leur spectre d'absorption de manière à confirmer leur longueur d'onde d'excitation (Figure 67). Cela nous a permis d'observer une λ_{\max} de 259 nm pour le **LIT-01-441** (Tyr-*o*NB) contre 396 nm et 390 nm pour le **LIT-01-453** (Tyr-linkerDEACM) & **LIT-01-445** (Lys-DEACM) respectivement. Toutes ces valeurs étant en accord avec les intervalles de λ_{\max} déjà observées dans la littérature pour ce genre de GPP^{204,297}. Ces résultats nous ont permis de confirmer qu'une irradiation de nos composés à 365 nm serait parfaitement adaptée pour permettre le clivage de nos composés. En ce qui concerne le **LIT-01-441** nous avons pu voir que l'absorption à 365 nm était assez faible en comparaison du spectre général. Cependant plusieurs GPPs de type *o*-NB retrouvés dans la littérature ont pu être clivés à cette longueur d'onde^{283,289}. En connaissant cela, nous avons donc présumé que l'exposition à une longueur d'onde de 365 nm serait susceptible de cliver le groupement photolabile du **LIT-01-441**.

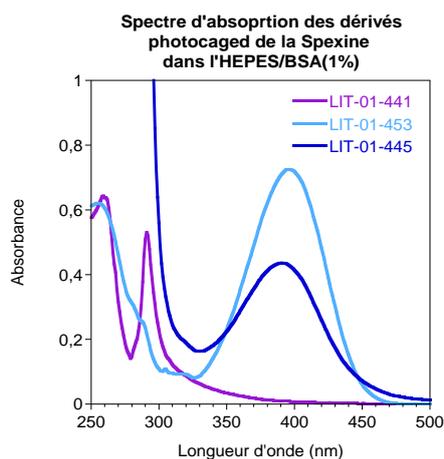


Figure 67. Spectres d'absorption du **LIT-01-441** (*o*-NB), **LIT-01-445** (DEACM) & **LIT-01-453** (DEACM)

Une fois ce paramètre établi, nous sommes passés au photoclivage à proprement parler. Pour se faire nous avons réalisé le test dans des conditions similaires à celles utilisées lors de l'évaluation biologique de nos composés, notamment au niveau de la concentration la plus élevée (50 μ M) et de la composition du tampon biologique (HEPES/BSA(1%)) utilisé comme solvant. Les composés en solution ont été exposés à une lumière ayant une longueur d'onde de 365 nm en réalisant un suivi du clivage par HPLC analytique. Cela nous a permis d'apprécier la disparition du produit de départ associée à l'apparition des produits du photoclivage dont l'identité a pu être confirmée par spectrométrie de masse. Le temps de photoclivage a ainsi été défini comme le temps nécessaire pour observer la disparition complète du substrat de départ.

Pour le **LIT-01-441** (Tyr-*o*NB), il a fallu vingt minutes d'exposition lumineuse à 365 nm pour constater l'élimination complète du groupement photolabile (Figure 68). Nous avons alors remarqué l'apparition d'un nouveau produit qui, après analyse par spectrométrie de masse, s'est avéré être la spexine native. Nous n'avons cependant pas été en mesure d'observer le dérivé *o*-NB sur le chromatogramme, probablement en raison de sa faible absorption aux longueurs d'ondes utilisées pour le suivi HPLC ($\lambda = 210$ nm, 220 nm, 254 nm & 365 nm). De la même manière, l'émission de lumière à une longueur d'onde de 365 nm pendant trente minutes a été suffisante pour cliver la DEACM présente sur la Lys¹¹ du **LIT-01-445** (Lys-DEACM) (Figure 68). Contrairement à l'élimination du dérivé *o*-NB du **LIT-01-441**, nous avons ici été à même d'observer l'apparition du groupement photolabile libéré, conjointement au peptide natif, grâce à son coefficient d'absorption molaire plus important.

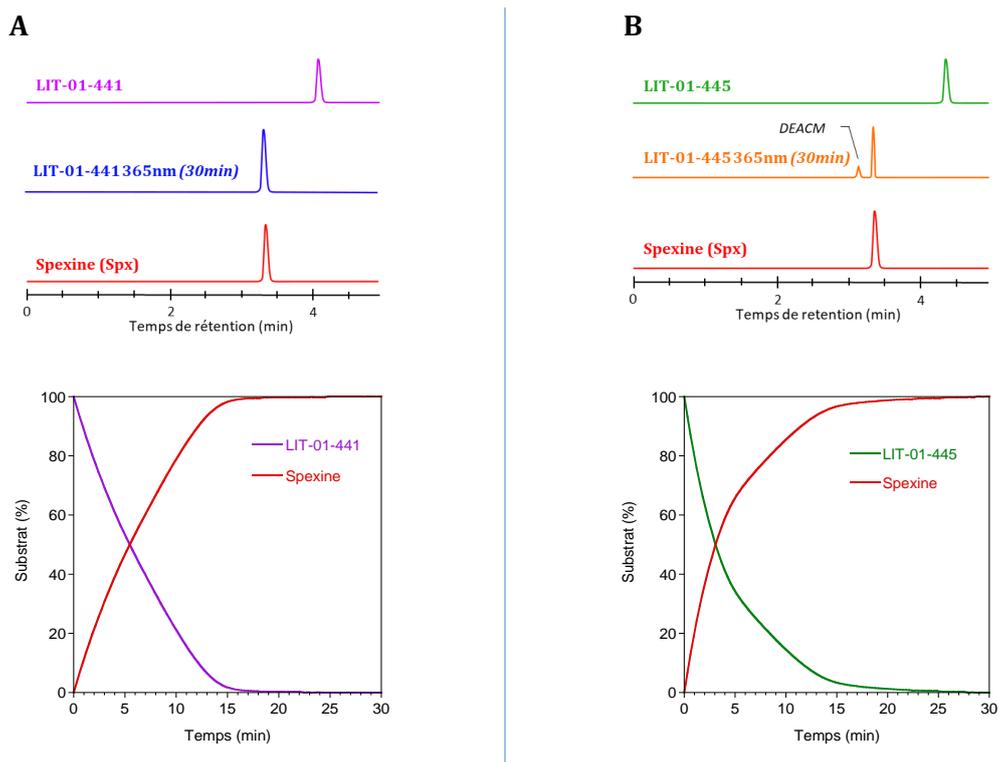


Figure 68. Evaluation du photoclivage du (A) **LIT-01-441** (Spx Tyr(*o*-NB)), (B) **LIT-01-445** (Spx Lys(DEACM)) à [50µM] dans un tampon HEPES/BSA(1%) après une exposition à la lumière ($\lambda = 365 \text{ nm}$) par HPLC analytique (détection à $\lambda = 220 \text{ nm}$)

Concernant le **LIT-01-453** (Tyr-linkerDEACM) nous avons également pu confirmer l'élimination du dérivé coumarin-4-ylméthyle après l'exposition à une lumière de longueur d'onde 365 nm (Figure 69). Bien que les groupements photolabiles du **LIT-01-445** & **LIT-01-453** soient similaires et introduits via un lien carbamate, soixante minutes d'exposition à la lumière ont été nécessaires pour observer une élimination complète de la DEACM du **LIT-01-453**. Soit le double de ce qu'il a fallu pour déprotéger le **LIT-01-445**. Associé à cela, nous avons mis en lumière une élimination lente du linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine. Le photoclivage à 365 nm pendant soixante minutes permet effectivement d'éliminer le GPP et bien qu'une certaine quantité de spexine native ait pu être identifiée, le substrat majoritaire restait le peptide associé au linker autoimmolable. Afin d'étudier le temps total permettant de retrouver la spexine native à partir du **LIT-01-453** nous avons réalisé un suivi de l'élimination du linker après la libération du groupement photolabile (Figure 69). La quantification par chromatographie analytique en phase inverse à des intervalles de temps réguliers des proportions de spexine avec et sans linker nous a permis de suivre l'évolution de la réaction. Nous avons

ainsi pu observer une inversion de la proportion des substrats témoignant de l'élimination du linker (Figure 69). Toutefois nous avons constaté que la présence de BSA dans le tampon biologique entraînait une réduction significative de la cinétique d'élimination (Figure 69). En effet, en absence de BSA, plus de dix heures sont nécessaires pour observer une élimination quasi complète du linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine (94% de spexine native après 10h45) alors qu'en présence de 1% de BSA, ce temps passe à plus de quarante-huit heures (83% de spexine native après 48h).

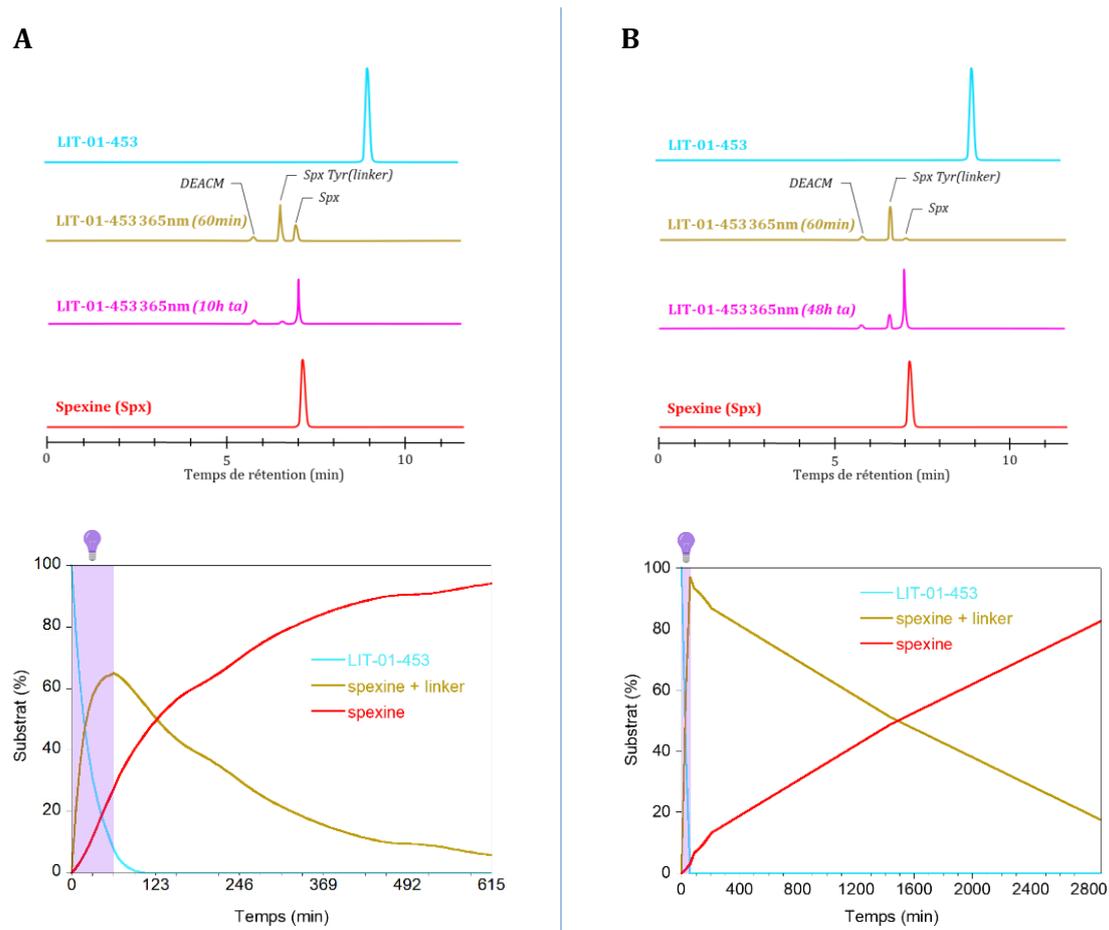


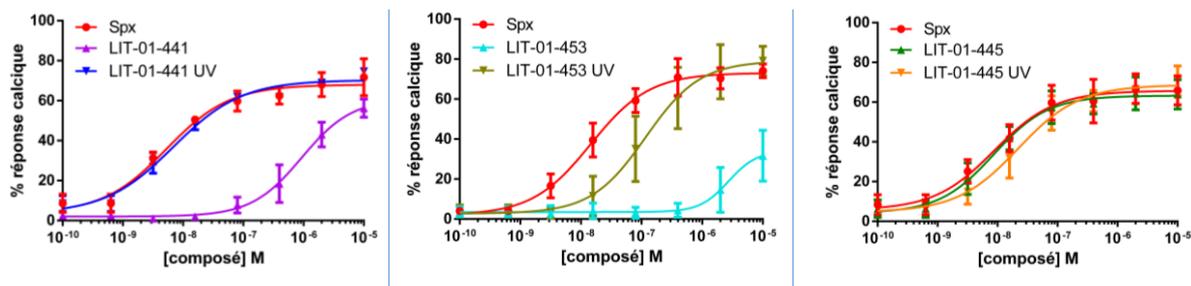
Figure 69. Evaluation du photoclivage et de l'élimination du linker auto-immolable du (A) **LIT-01-453** (Spx Tyr(DEACM)) à $[50\mu\text{M}]$ dans un tampon HEPES sans BSA ou (B) contenant 1% de BSA après une exposition à la lumière ($\lambda = 365\text{ nm}$) par HPLC analytique (détection à $\lambda = 220\text{ nm}$; ta : température ambiante)

En résumé, les groupements photolabiles des trois dérivés photocages de la spexine ont pu être éliminés après différents temps d'exposition à une lumière ayant une longueur d'onde de 365 nm afin de générer la spexine native. Trente minutes ont suffi à éliminer l'*ortho*-nitrobenzyle et la 7-diéthylaminocoumarin-4-ylméthyle pour le **LIT-01-441** et le

LIT-01-445 respectivement. A la différence de ces deux dérivés, le **LIT-01-453** a dû être exposé à la lumière pendant soixante minutes. Cela a effectivement permis le clivage du dérivé coumarin-4-ylméthyle mais il a fallu dix heures supplémentaires (en l'absence de BSA) pour constater l'élimination complète du linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine. Ce qui est cohérent avec ce que nous avons pu trouver dans la littérature^{298,299}. En ce qui concerne cette cinétique d'élimination du linker autoimmolable, nous avons vu qu'elle était ralentie en présence de BSA (plus de 48h). Cette observation est sans doute la conséquence d'une interaction entre l'amine nucléophile libérée après le clivage du GPP et la BSA empêchant la cyclisation du linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine permettant son élimination. Nous avons toutefois constaté que la BSA n'avait aucune influence sur le temps de clivage de la DEACM du **LIT-01-453**.

3. Evaluation biologique fonctionnelle des peptides photocage sur GalR₂

Dès lors que le photoclivage du GPP des trois dérivés photocages de la spexine a été établi, nous avons évalué leur activité biologique fonctionnelle sur des cellules HEK exprimant de manière stable le récepteur GalR₂ (Figure 70). Comme pour les dérivés photoisomérisables, nous avons évalué l'activité fonctionnelle de nos composés par leur capacité à entraîner la libération de Ca²⁺ intracellulaire, détectée à l'aide du Fluo-4. De manière similaire, chaque composé a été évalué en comparaison avec la spexine (Genecust®) avant et après son exposition à la lumière de façon à pouvoir observer une éventuelle modification de leur activité. Toutefois, à la différence des composés photoisomérisables, une première série de composés a été introduite dans la plaque 96 puits et exposée à la lumière ($\lambda = 365 \text{ nm}$) le temps nécessaire au clivage du GPP, établi durant les précédentes analyses. Une fois cette étape effectuée, les composés encore protégés ont été intégrés au sein de la même plaque pour être évalués durant la même expérience.



	Motif	Position	EC ₅₀ (± SEM) (nM)		E _{max} (± SEM) (%)	
			Sans lumière	UV	Sans lumière	UV
spexine			11.7 ± 2.1		100	
LIT-01-441	<i>o</i> -NB	Tyr ⁹	996 ± 3	9 ± 2.1	92 ± 4	101 ± 1
LIT-01-453	linker-DEACM	Tyr ⁹	> 2 000	90.9 ± 14.3	43.8 ± 0.8	107 ± 2
LIT-01-445	DEACM	Lys ¹¹	7.9 ± 0.2	19.6 ± 0.2	99 ± 0.1	106 ± 2

Figure 70. Evaluation de l'effet (EC₅₀) de concentrations croissantes de ligands photoisomérisables (*n* = 2) et de spexine (*n* = 6) sur la libération intracellulaire de calcium de cellules HEK-GalR₂ avant et après l'exposition à la lumière UV (λ = 365 nm) (SEM : erreur standard à la moyenne)

Grâce à ces résultats nous avons tout d'abord constaté que l'introduction d'un groupement protecteur sur la Lys¹¹ n'entraînait aucune modification de l'activité. En effet, l'EC₅₀ du **LIT-01-445** était similaire à celle de la spexine native (7.9 ± 0.2 nM contre 11.7 ± 2.1 nM respectivement). De ce fait nous avons raisonnablement pu conclure que la Lys¹¹ n'est pas un acide aminé essentiel à l'activité de la spexine pour le récepteur GalR₂, comme l'avait laisser entendre les travaux de Wong et al.¹⁴³. Ces observations sont renforcées par les précédents résultats obtenus avec les **LIT-01-378** & **LIT-01-379** où la substitution de la Lys¹¹ par un motif photoisomérisable n'a pas entraîné une perte claire de l'EC₅₀ du peptide. Nous avons toutefois observé une diminution significative de l'activité biologique vis-à-vis de GalR₂ pour les dérivés de la spexine comportant une tyrosine photocage, soit les **LIT-01-441** & **LIT-01-453** (respectivement 996 ± 3 nM et > 2 μM contre 11.7 ± 2.1 nM pour la spexine native). Associé à cette perte d'activité nous avons également pu constater une diminution notable de l'efficacité du **LIT-01-453** (43.8% de celle de la spexine native). Ces premières observations ont donc confirmé l'importance de la Tyr⁹ dans l'activité biologique de la spexine pour le récepteur GalR₂.

Après l'exposition à la lumière du **LIT-01-441** pendant trente minutes afin de permettre le photoclivage du groupement *o*-NB, nous avons d'une part pu mettre en évidence une augmentation significative de l'activité du peptide pour le récepteur GalR₂. D'autre part, nous avons également constaté que cette activité (9 ± 2.1 nM) était similaire à celle de la spexine native (11 ± 2.1 nM). Ces résultats permettent de démontrer que le **LIT-01-441** constitue la première sonde photoactivable du récepteur GalR₂ qui présente une augmentation de son activité d'un facteur 100 fois après l'exposition à la lumière.

Concernant le **LIT-01-453**, qui porte la Tyr protégée par la DEACM, nous avons également montré qu'après son exposition à la lumière le peptide présente une amélioration de son efficacité mais également de son activité, d'un facteur 20. Tandis que l'efficacité a doublé pour revenir à celle de la spexine native, l' EC_{50} du peptide après l'exposition à la lumière était plus faible que pour la spexine native (90.9 ± 14.3 nM contre 11.7 ± 2.1 nM respectivement). Ce phénomène peut être expliqué par la persistance du linker autoimmolable en présence de BSA comme nous l'avons démontré précédemment.

4. Développement d'un nouveau groupement photoclivable dérivé du fluorophore Nile Red

4.1 Le Nile red, un fluorophore sensible à son environnement

De nos jours il existe une multitude de fluorophores. Pour certains d'entre eux, leur capacité à émettre de la fluorescence dépendra de l'environnement dans lequel ils se trouvent³⁰⁰. Lorsque les conditions permettent de moduler l'intensité de la fluorescence nous parlons de sonde fluorogène alors que si elles conduisent à une modification des longueurs d'ondes d'absorption et/ou d'émission il s'agit de solvatochromisme. Cet aspect d'un fluorophore peut impliquer différents mécanismes tels que le transfert de proton, le transfert de charge intramoléculaire, des changements conformationnels, l'isomérisation ou encore l'agrégation.

Le Nile red (Figure 71) est un fluorophore qui est à la fois solvatochrome et fluorogène³⁰¹. Il fait partie de la famille des benzo[*a*]phénoxazines réputées pour leur haut rendement quantique, leur lipophile et leur photostabilité qui font d'eux des fluorophores efficaces en milieu apolaire.

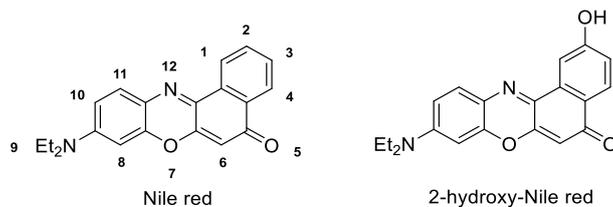


Figure 71. Structure du Nile red (NR) et de son dérivé 2-hydroxylé (NR-OH)

Leur fluorescence en milieu polaire est cependant réduite. Cette caractéristique fluorogène du Nile red s'explique grâce à la stabilisation du Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) du groupement $-NEt_2$ dans les solvants polaires protiques associé au transfert de charge photoinduit^{302,303}. Le solvatochromisme dans les milieux polaires protiques s'opère également grâce à la stabilisation du TICT³⁰¹. En ce qui concerne les autres solvants il peut être expliqué par une meilleure stabilisation de l'état excité obtenu après le transfert de charge photoinduit. Cela a pour conséquence un déplacement bathochrome des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission suite à l'augmentation de la polarité du solvant (Figure 72). Ces longueurs d'onde d'absorption peuvent ainsi aller de 500 nm dans le cyclohexane à 570 nm dans l'eau. Pour ce qui est des longueurs d'onde d'émission, elles débutent à 554 nm dans le cyclohexane pour aller jusqu'à 666 nm dans l'eau³⁰⁴. Ces propriétés intéressantes ont fait de ce fluorophore un outil de choix pouvant être appliqué à l'étude de biomembranes³⁰⁵, au marquage d'organites cellulaires³⁰⁶ ou encore comme senseur de thiol³⁰⁷. Le Nile red a également été exploité par notre équipe dans le but de développer les premières sondes turn-on (fluorogènes) pour les récepteurs couplés aux protéines G qui fluorescent dans le rouge³⁰⁸.

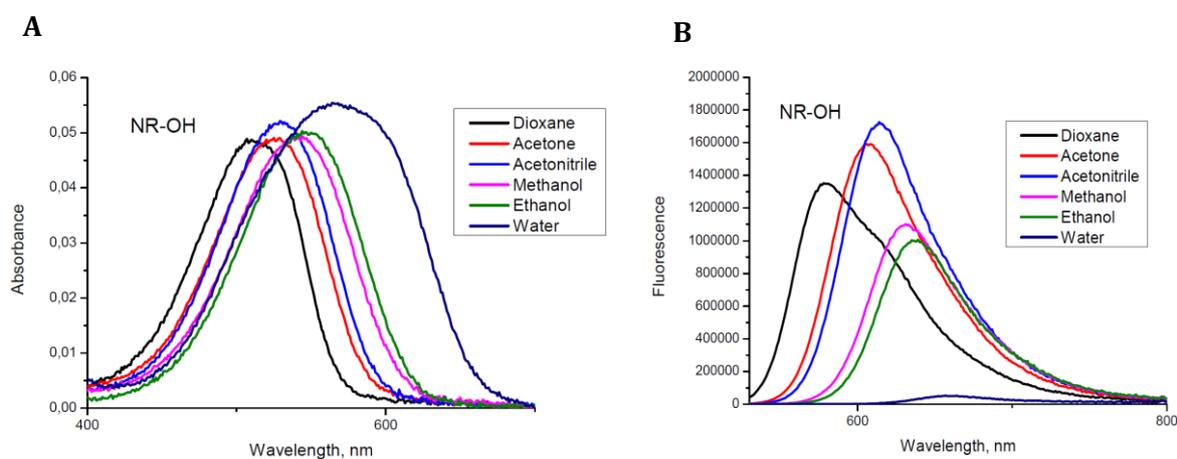


Figure 72. (A) Spectres d'absorption et (B) de fluorescence du 2-hydroxy-Nile red

Le développement de nouveaux groupements photolabiles fait encore aujourd'hui l'objet de nombreuses études comme nous avons pu le voir au début de ce chapitre. Certaines d'entre elles ont particulièrement approfondi la description des états électroniques de certains GPP après leur exposition à la lumière. Cela a notamment permis d'en apprendre un peu plus le mécanisme de clivage de plusieurs groupements photolabiles^{207,309}. Il a été mis en évidence que leur photoclivage serait en partie dû à une différence de densité électronique des orbitales frontières au niveau du carbone en position β (C_β) du groupement partant. Le passage à un état excité S_1 (ou T_1) faisant suite à l'absorption d'un photon entraîne un transfert d'électron de l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO) vers l'orbitale moléculaire vacante de plus faible énergie (LUMO). Ce phénomène conduit à une augmentation de la densité électronique du C_β , défini comme l'« effet méta » décrit par Zimmerman³¹⁰. Dans le cas des GPPs, la présence d'un $-CH_2-$ adjacent portant le groupement partant va permettre le recouvrement de l'orbitale du C_β avec l'orbitale σ^* du $-CH_2-$. S'en suivra alors une polarisation de la liaison entre le GPP et le ligand qui facilitera sa coupure hétérolytique. Ce principe a pu être appliqué afin de rationaliser le photoclivage des dérivés coumarin-4-ylméthyle, BODIPY et cyanine (Figure 73). Il a récemment été utilisé par le groupe de Ben Feringa dans le but de développer un GPP excitable dans le domaine de l'infrarouge²⁴⁹.

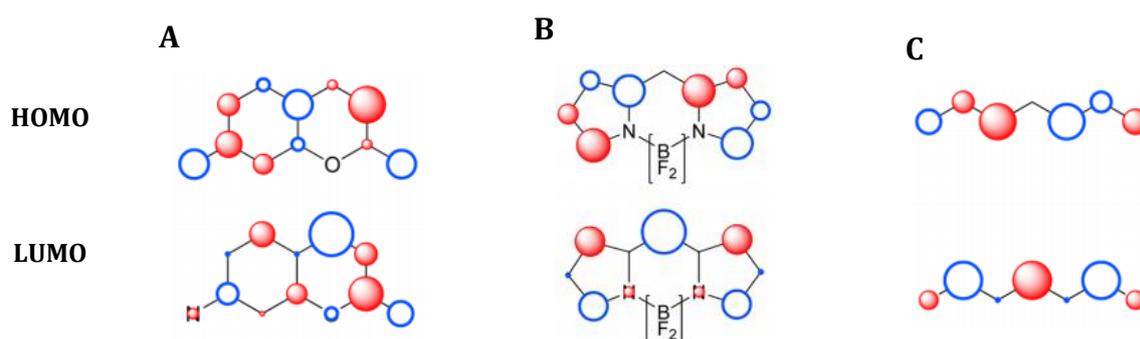


Figure 73. Densité électronique des HOMO et LUMO de chromophores (A) coumarine, (B) BODIPY & (C) cyanine³⁰⁹

Plusieurs études ont également mis en lumière la répartition électronique du Nile red^{302,311–313} (Figure 74). Bien que les électrons de la LUMO se trouvent en majorité répartis sur le cycle phénoxazine, il est intéressant de constater une légère augmentation de la densité électronique de la LUMO par rapport à la HOMO au niveau du C_2 . En se basant

sur le principe décrit précédemment et sur le fait que le C₂ est une des positions classiques de fonctionnalisation du Nile red³¹⁴, nous avons donc envisagé d'exploiter le Nile red afin de développer un nouveau groupement protecteur photolabile excitable par la lumière verte/jaune ($\lambda = 500-570$ nm). De plus, les propriétés solvatochromiques d'un tel fluorophore vont certainement influencer l'efficacité du photoclivage à une longueur d'onde donnée ce qui conduirait au développement du premier groupement photoclivable sensible à son environnement.

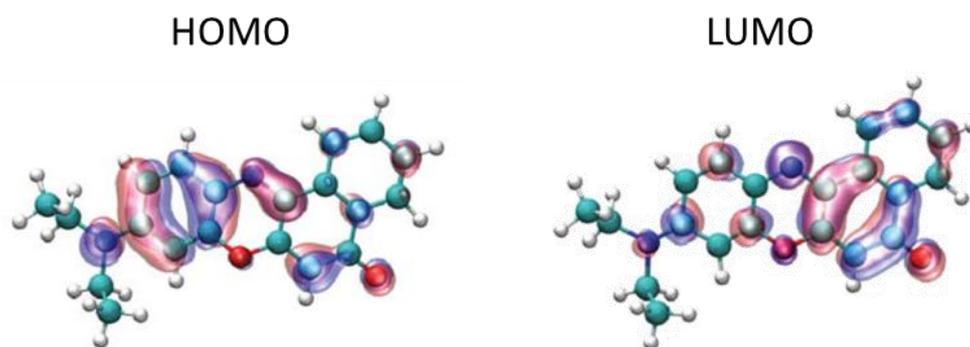


Figure 74. Répartition électronique de la HOMO et LUMO du Nile red dans un système aqueux³¹¹

4.2 Synthèse et étude du photoclivage du Nile red

Nous avons pu voir dans ce chapitre que seule la protection de la Tyr⁹ permettait d'obtenir une diminution significative de l'activité biologique de la spexine pour le récepteur GalR₂. C'est pourquoi l'objectif final serait d'introduire ce nouveau GPP sur cette tyrosine. Nous avons également mis en évidence l'instabilité du lien carbonate durant les étapes de synthèse peptidique. Toutefois, ce problème a pu être surmonté en remplaçant le lien carbonate par des liens carbamates grâce à l'introduction d'un linker auto-immolable *N,N'*-diméthyléthylènediamine. L'ensemble de ces paramètres nous ont finalement amené à concevoir l'acide aminé **2.41** (Schéma 20) à l'aide du dérivé 2-hydroxyméthyle-Nile red **2.42** afin de respecter le principe de photoclivage appliqué aux dérivés coumarin-4-ylméthyle, BODIPY et cyanine. Ce dérivé hydroxyméthylé du Nile red (**2.42**) peut être obtenu grâce à la réaction entre le diéthylaminonitrosophénol **2.43** et l'hydroxyméthyle naphthol **2.44**, lui-même obtenu à partir de l'acide naphthoïque **2.45**.

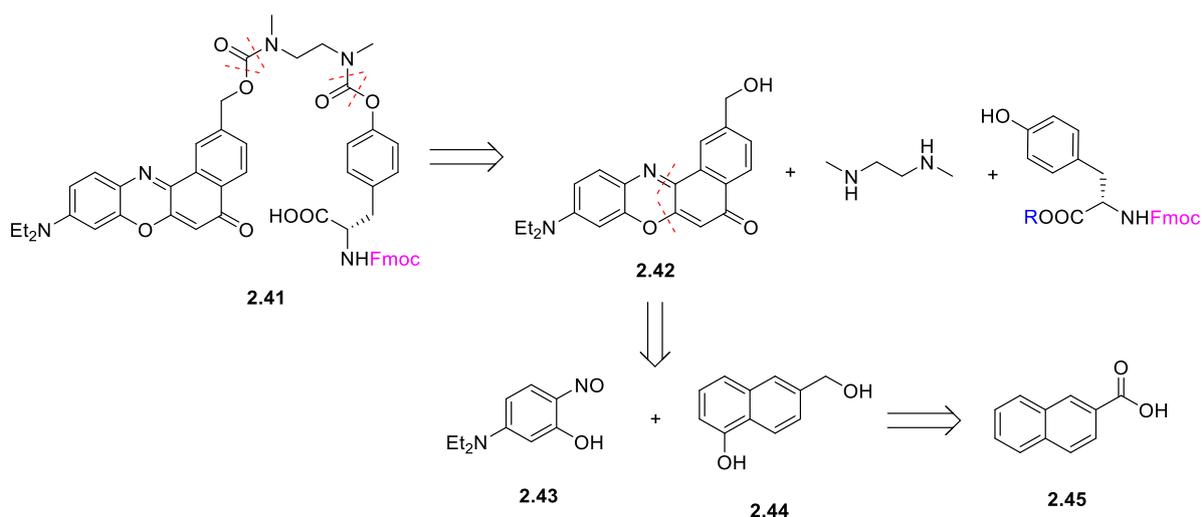


Schéma 20. Rétrosynthèse de l'acide aminé **2.41**

Nous avons tout d'abord commencé par former le 6-hydroxyméthyl-naphtol **2.44** en utilisant la voie de synthèse décrite par Bautista-Gomez et al.³¹⁵ à partir de l'intermédiaire **2.46** (Schéma 21). Ce dernier a pu être synthétisé à l'échelle du gramme à partir de l'acide 2-naphtoïque commercial **2.45** grâce à une réaction de bromation catalysée à l'iode. Une fois l'acide 5-bromo-2-naphtoïque obtenu, il a été engagé dans une réaction de type Ullmann catalysée au cuivre ce qui a permis la substitution du brome en C5 par un groupement hydroxyle afin d'obtenir le composé **2.47**. L'intermédiaire obtenu a ensuite été mis à réagir avec le chlorure de thionyle à reflux dans le méthanol pendant 19h, permettant ainsi l'estérification de la fonction acide afin d'obtenir le composé **2.48** avec un rendement de 94%. Le 6-hydroxyméthyl-naphtol **2.44** a finalement pu être synthétisé après réduction de la fonction ester en présence de tétrahydruroaluminat de lithium (LiAlH₄).

Afin d'obtenir le dérivé hydroxyméthylé du Nile red il a fallu au préalable synthétiser l'intermédiaire **2.43** grâce à une réaction de nitrosation du diéthylaminophénol **2.49** en présence de nitrite de *tert*-butyle (Schéma 21). Le diéthylaminonitrosophénol formé a ensuite pu être mis à réagir avec le 6-hydroxyméthyl-naphtol **2.44** dans le DMF à 110 °C afin d'obtenir le 2-hydroxyméthyle Nile red **2.42** avec un rendement isolé de 6% (Schéma 21). Ce faible rendement est malheureusement une caractéristique récurrente dans la synthèse des dérivés du Nile red³¹⁴. Ceci est en grande partie dû à la décomposition du diéthylaminonitrosophénol durant la réaction de cyclisation oxydante intermoléculaire permettant la formation du Nile red. De plus, ces réactions sont également connues pour

être difficiles à purifier comme en témoigne la purification par colonne sur gel de silice suivie d'une deuxième purification par chromatographie semi préparative en phase inverse qui ont été nécessaires afin d'isoler le composé **2.42**. Le faible rendement de la réaction associé à une purification complexe permet ainsi d'expliquer le rendement de 6% que nous avons obtenu. Nous avons néanmoins estimé que nous disposions de suffisamment de produit pour introduire ce dérivé hydroxyméthylé du Nile red sur un composé modèle afin d'évaluer ses propriétés de photoclivage.

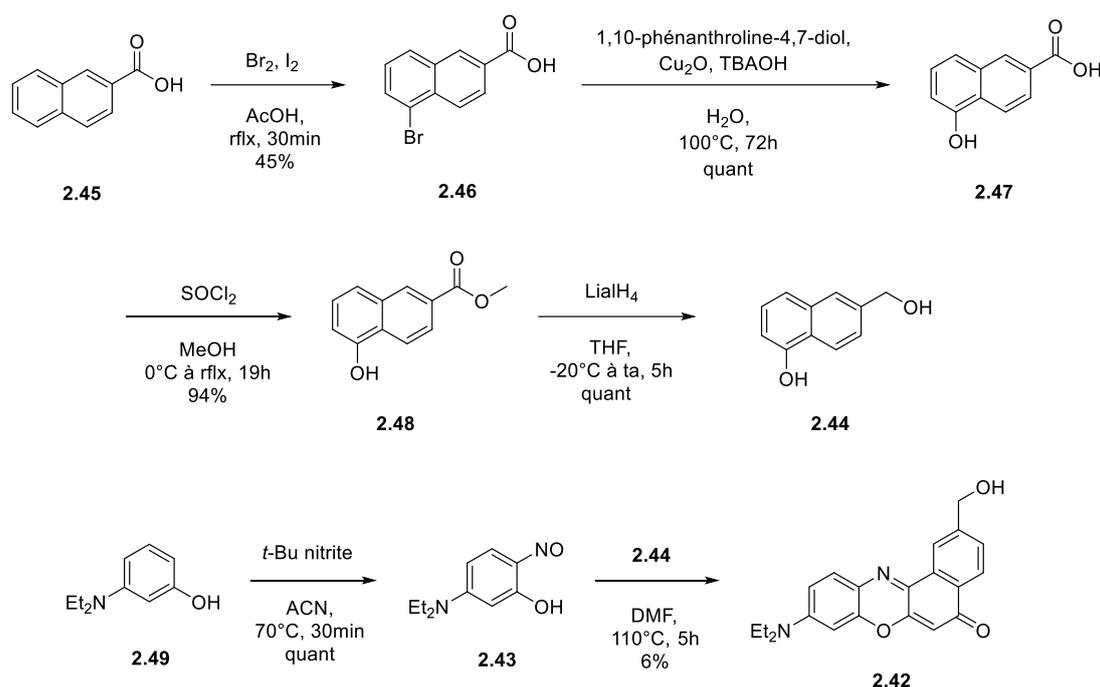


Schéma 21. Synthèse du dérivé 2-hydroxyméthylé du Nile red

Ce potentiel nouveau GPP a donc été introduit sur un composé modèle, la phényléthylamine **2.50**, afin d'évaluer le photoclivage du 2-hydroxyméthyle Nile red. En effet, le cycle benzénique permettra de simuler la présence de la tyrosine alors que la fonction amine donnera lieu à la formation d'un lien carbamate entre le dérivé Nile red et la phényléthylamine. Quant à la chaîne éthyle séparant la fonction amine du cycle benzénique, son rôle sera de mimer la chaîne carbonée du linker auto-immolable.

En raison des faibles quantités de composé **2.42** à notre disposition c'est donc la fonction amine de la phényléthylamine **2.50** qui a été préalablement activée par le *p*-NPC en présence de pyridine afin de former l'intermédiaire **2.51** (Schéma 22). Ce dernier a ensuite pu être mis à réagir avec le 2-hydroxyméthyle Nile red en présence de DIEA dans

le DCM à température ambiante. La mise en œuvre de deux purifications successives, l'une sur gel de silice suivie d'une autre par chromatographie semi-préparative en phase inverse, ajoutée aux faibles quantités de dérivé **2.42** engagées dans la réaction permettent d'expliquer le rendement de 3% obtenu pour cette réaction. Cela nous a tout de même permis d'obtenir le composé **2.52** dont la quantité a pu être déterminée grâce à un dosage du composé par mesure de son absorption dans le méthanol (Figure 75).

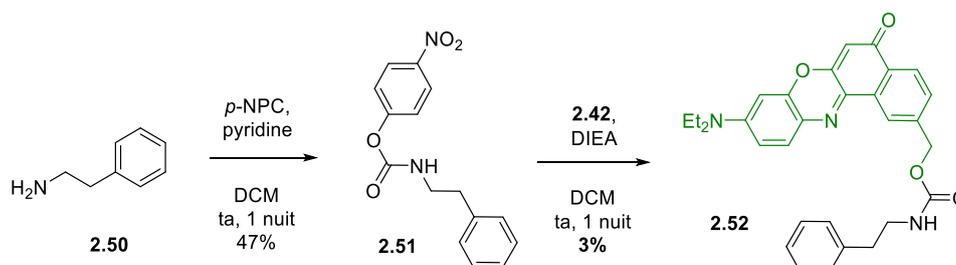


Schéma 22. Synthèse d'un composé Nile red photolabile modèle

La mesure du spectre d'absorption du composé **2.52** nous a également permis d'observer que notre composé a une longueur d'onde d'absorption maximale de 557 nm dans le méthanol, ce qui est cohérent avec ce qui est mentionné dans la littérature concernant les dérivés du Nile red³⁰⁴. Une fraction de la solution stock du composé **2.52** dans le DMSO a été diluée dans l'eau pour obtenir un échantillon à une concentration de 50 μ M. Ce dernier a ensuite été exposé à une lumière d'une longueur d'onde de 520 nm pendant une heure sans pouvoir observer le moindre signe d'un clivage du Nile red (Figure 76). Malheureusement, la diminution de la concentration de l'échantillon, le changement de solvant (MeOH/eau (50/50, v/v), ACN/eau (10/90, v/v) ou ACN pur) ou l'exposition à des longueurs d'ondes de plus forte énergie (365 & 254 nm) n'ont pas permis de déclencher le photoclivage. Ces résultats nous permettent donc de conclure que, dans nos conditions, le dérivé 2-hydroxyméthyl-Nile red **2.42** lié à la phényléthylamine **2.50** par un lien carbamate ne peut pas être clivé après une exposition à la lumière.

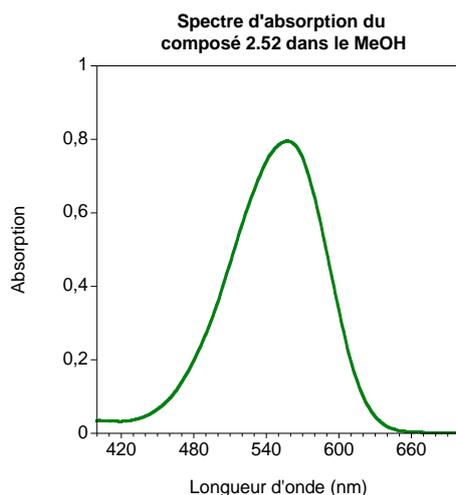
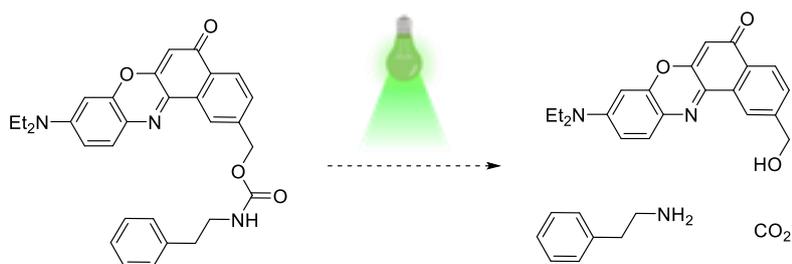


Figure 75. Spectre d'absorption du composé 2.52 dans le méthanol



	Concentration	Solvant	Longueur(s) d'onde(s)	Temps d'exposition	Observation
1	50 μ M	H ₂ O	520 nm	1 h	Pas de clivage
2	5 μ M	H ₂ O	520 nm		
3	5 μ M	H ₂ O/ACN (90/10, v/v)	520 nm		
4	5 μ M	H ₂ O/MeOH (50/50, v/v)	520, 365 & 254 nm		
5	5 μ M	ACN	520 & 365 nm		

Figure 76. Etude du photoclivage du Nile red

5. Conclusion et Perspectives

Au cours de cette partie du projet nous avons trouvé le moyen de synthétiser les trois premiers dérivés photocages de la spexine. Cela a été possible grâce à l'introduction de groupements protecteurs photolabiles de type *o*-NB et coumarin-4-ylméthyle sur la Tyr⁹ et la Lys¹¹ du neuropeptide. L'élimination de ces GPPs permettant la libération du peptide natif a pu être confirmée après l'exposition à la lumière ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Suite à cela nous avons analysé l'activité biologique fonctionnelle de chaque peptide sur des cellules HEK exprimant de manière stable le récepteur GalR₂.

A la faveur de ces résultats, nous avons pu mettre en lumière la possibilité d'appliquer le concept du photoclivage à la spexine. Nous avons ainsi pu constater que l'introduction d'un groupement protecteur photolabile sur la Tyr⁹ (**LIT-01-441** & **LIT-01-453**) a entraîné une perte significative de l'activité pour le récepteur GalR₂. Cela confirme donc l'importance de cet acide aminé dans l'activation du récepteur. Nous avons également pu remarquer que lorsque le GPP est plus imposant, la perte d'activité est plus importante. En effet, l'EC₅₀ est quasiment diminuée d'un facteur 2 lorsque l'*o*-NB est remplacé par un dérivé coumarin-4-ylméthyle. Cela nous amène donc à suggérer que des groupements photolabiles plus volumineux pourraient amener une perte plus importante de l'activité biologique voire une absence complète d'activité.

Bien qu'un dérivé coumarin-4-ylméthyle ait pu être introduit sur la tyrosine, la synthèse de cet acide aminé photocage a représenté un véritable défi, nous amenant à changer de stratégie un certain nombre de fois. Elle a finalement été rendue possible grâce à l'introduction d'un linker auto-immolable *N,N'*-diméthyléthylènediamine. Toutefois nous avons pu constater que l'élimination de ce linker représente une étape limitante durant le photoclivage du **LIT-01-453**. D'une part nous avons relevé que l'élimination de la DEACM fixée sur le linker (**LIT-01-453**) a nécessité un temps d'exposition à la lumière deux fois plus long que lorsqu'elle était reliée directement à l'acide aminé (**LIT-01-445**). D'autre part, un temps supplémentaire a été nécessaire après la libération du GPP afin de permettre la cyclisation et l'élimination complète du linker autoimmolable. Associé à cela nous avons constaté que la présence de BSA dans le tampon biologique utilisé entraînait un ralentissement significatif de l'élimination de ce linker (environ 10h en absence de BSA contre plus de 48h en présence de 1% de BSA). Cette particularité est vraisemblablement due à la faible vitesse de la réaction de cyclisation permettant l'élimination complète du

linker qui est d'autant plus réduite de par sa possible interaction avec la BSA. Même si cette caractéristique permettrait une libération progressive du ligand elle ne reste pas appropriée pour l'étude d'un effet localisée qui est l'objectif de ce projet. Les GPPs adaptés à une application *in vivo* tels que les BODIPYs ou les cyanines présentent un mécanisme de clivage équivalent à celui des coumarin-4-ylméthyle. Afin d'introduire de tels GPPs sur la Tyr⁹ l'utilisation d'un linker auto-immolable semble indispensable. Ajouté à cela il faut exclure les linkers qui seraient introduits via des liaisons carbonates, démontrées comme étant instables dans les conditions de synthèse peptidique. Au vu de ces conditions il serait possible d'utiliser un espaceur (S)-2-(aminométhyl)pyrrolidine récemment développé par Dal Corso et al.²⁹⁸ et qui a démontré une amélioration de la vitesse d'élimination des liens carbamates pour la libération de ligands hydroxylés. Afin d'augmenter cette cinétique de clivage, il serait également envisageable de nous affranchir de cette réaction de cyclisation qui semble être l'étape limitante de la réaction de clivage. Cela serait permis grâce au remplacement du linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine par un dérivé *p*-aminobenzyle qui s'élimine après une cascade électronique³¹⁶ et qui a déjà montré son efficacité dans la libération de ligands hydroxylés via des liens éthers^{317,318}.

Concernant l'activité des peptides après le clivage des GPPs nous avons pu constater une amélioration de l'activité du **LIT-01-441** d'un facteur 100 avec un retour à une activité similaire à celle de la spexine native (9 ± 2.1 nM pour le **LIT-01-441** et 11.7 ± 2.1 nM pour la spexine). Pour ce qui est du **LIT-01-453** nous avons également observé une amélioration significative de l'activité, d'un facteur 20, après l'exposition à la lumière. Toutefois, cette activité était légèrement éloignée de celle de la spexine native (90 ± 14.3 nM pour le **LIT-01-453** contre 11.7 ± 2.1 nM pour la spexine). Ce résultat peut sans doute s'expliquer par la persistance du linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine en présence de BSA durant les tests sur cellules. Les conditions inhérentes à l'évaluation biologique de ce composé (présence de BSA et temps d'incubation des cellules) ne nous ont, pour le moment, pas permis d'en étudier l'activité après un clivage complet du linker autoimmolable. Toutefois nous avons pu confirmer que l'élimination de la DEACM permettait de libérer la spexine. Il serait alors pertinent d'adapter le protocole d'évaluation de ce dérivé photoactivable de la spexine afin de prouver un retour à l'activité du peptide natif.

En parallèle de cela nous avons exploité la possibilité d'utiliser le Nile red, un fluorophore sensible à son environnement et excitable par la lumière visible, comme nouveau groupement protecteur photolabile original. Après avoir synthétisé un dérivé du Nile red où une fonction $-CH_2OH$ a été introduite en C_2 nous l'avons couplé à une amine modèle via un lien carbamate afin d'étudier son photoclivage. Malheureusement aucune des conditions d'exposition à la lumière que nous avons testées ne nous a permis d'observer un clivage du Nile red. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'augmentation de la densité électronique du C_2 sur la LUMO ne semble pas être suffisante pour permettre le clivage. Pour améliorer ce point, une solution pourrait être d'ajouter des groupements électroattracteurs sur ou autour du C_2 ³¹⁹. Cela permettrait une augmentation plus franche de la densité électronique à ce niveau pour potentiellement observer un photoclivage. L'utilisation d'atomes lourds tels que les halogènes pourrait également permettre de favoriser le clivage du Nile red. En effet ces atomes sont connus pour être d'excellents quenchers de la fluorescence qui favorisent la formation des états excités triplets¹⁴⁸. Leur introduction au sein de la structure du Nile red provoquerait l'augmentation de la population des états triplets non-émissifs, ce qui pourrait alors promouvoir la désexcitation par d'autres mécanismes tel que le clivage de liaison.

Conclusion générale

La douleur chronique est un problème de santé publique majeur qui touche entre 11 et 40% de la population mondiale et dont le coût total est estimé en milliards d'euros chaque année. Malgré les récentes avancées dans la compréhension de la douleur, les stratégies thérapeutiques restent basées sur l'utilisation des antalgiques de palier III. Malheureusement, ces opioïdes présentent de nombreux effets secondaires mais également une tendance à induire des phénomènes de tolérance et d'addiction chez les patients. Il est donc urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la douleur afin de proposer une alternative à ces dérivés opioïdes. Les GalRs sont une famille de RCPGs impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la modulation centrale et périphérique de la nociception. Il a notamment été mis évidence que les effets antinociceptifs de ces récepteurs au niveau périphérique, et plus précisément des DRGs, sont médiés par GalR₂. Toutefois, certaines observations concernant le rôle de ce récepteur dans la modulation de la douleur sont contradictoires et c'est pourquoi son implication précise reste à établir. Les modèles animaux knock-out (KO GalR₂) ainsi que les études histochimiques et pharmacologiques n'ont, pour le moment, pas permis d'éclaircir la question. C'est pour cela que nous avons porté notre intérêt sur la spexine, un neuropeptide endogène qui a récemment montré une sélectivité pour les récepteurs GalR_{2/3}. En effet, le développement d'outils chimiques dérivés de la spexine permettant un contrôle spatio-temporel précis de l'activation de GalR₂ nous aiderait à mieux comprendre l'implication de ce récepteur dans la modulation périphérique de la nociception et ainsi le valider comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la douleur. La photopharmacologie est un domaine en développement constant où les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un ligand sont modulées par la lumière. Les ligands photoactivables sont ainsi considérés comme des outils de choix ayant prouvé leur efficacité dans le contrôle optique de canaux ioniques, d'enzymes ou encore de RCPGs. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le développement de dérivés photoactivables de la spexine permettant d'étudier l'implication du récepteur GalR₂ dans les voies non opioïdes de la douleur.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au développement de dérivés photoisomérisables de la spexine. Pour cela nous avons choisi d'utiliser un motif photoisomérisable de type azobenzène qui est connu pour être un motif idéal. Après avoir synthétisé les dérivés azobenzènes adéquats, nous avons pu les

introduire au sein de la spexine à des positions où, selon les données de RSA dont nous disposons, l'isomérisation pouvait avoir le plus d'impact sur l'activité pour le récepteur GalR₂. Nous avons ainsi été en mesure de synthétiser les quatorze premiers dérivés photoisomérisables de la spexine par synthèse peptidique sur support solide où le motif azobenzène a été introduit sur la chaîne latérale d'un acide aminé, directement au sein de la séquence peptidique ou agrafé sur le peptide.

La photoisomérisation *trans* → *cis* de chaque peptide en condition biologique après une exposition à la lumière ultraviolette a ensuite pu être confirmée. L'étude du spectre d'absorption nous a permis d'apprécier l'isomérisation *trans* → *cis* jusqu'à atteindre l'état photostationnaire en quelques minutes. Les proportions des deux isomères ont ensuite pu être quantifiées grâce à une analyse par HPLC analytique et nous avons observé des pourcentages d'isomères *cis* allant de 35 à 85% ce qui est cohérent avec ce que nous avons pu trouver dans la littérature. Nous avons également pu mettre en évidence que la relaxation thermique *cis* → *trans* après l'exposition à la lumière se produit en quelques minutes pour les dérivés où le motif est agrafé sur le peptide alors que, pour les deux autres stratégies, les isomères *cis* sont stables plusieurs heures.

Une analyse par dichroïsme circulaire de la structuration des dérivés agrafés de la spexine nous a permis de constater une absence de structuration chez l'un d'entre eux alors que les deux autres présentaient toujours une structure majoritairement sous forme d'hélice α . Nous avons également pu démontrer l'augmentation de cette structuration en hélice α après la photoisomérisation *trans* → *cis* de ces deux peptides.

L'évaluation biologique fonctionnelle (EC₅₀) vis-à-vis du récepteur GalR₂ de ces dérivés photoisomérisables de la spexine a ensuite été réalisée *in vitro*. Nous avons ainsi pu observer que l'introduction du motif azobenzène a eu différents impacts sur l'activité des peptides. Certains ont perdu leur capacité à activer le récepteur, d'autres ont vu leur activité diminuer alors que, pour quelques-uns, cette activité restait similaire voire meilleure (EC₅₀ = 0,7 ± 1,1 nM pour le **LIT-01-380**) que celle de la spexine native (EC₅₀ = 11.7 ± 2.1. nM). Après leur photoisomérisation nous avons observé une diminution de l'activité biologique d'un facteur 2 à 10 pour tous les peptides excepté pour le **LIT-01-405** qui présentait une amélioration d'un facteur 2 de son EC₅₀ à l'état photostationnaire (EC₅₀ = 6.3 nM contre 13.6 nM). Toutefois nous avons estimé que cette différence d'activité ne permettrait pas d'observer un effet *in cellulo* ou chez l'animal.

Au début du projet, le manque d'informations concernant le mode d'interaction de la spexine avec le récepteur GalR₂ a rendu difficile l'obtention des résultats escomptés. Malgré cela, l'étude des dérivés photoisomérisables de la spexine nous a permis de mettre en évidence les déterminants importants du peptide pour l'activation du récepteur GalR₂. Nous avons ainsi été en mesure de confirmer le fait que les résidus de la partie C-terminale du peptide (Gly¹², Ala¹³ & Gln¹⁴) n'ont que peu d'importance dans l'activité du peptide et peuvent même être substitué pour améliorer l'activité, comme cela a été le cas pour le **LIT-01-380**. L'ensemble des résultats obtenus nous ont également amené à remettre en question l'importance de la structure en hélice α dans la liaison du peptide au récepteur GalR₂ comme cela avait été suggéré dans la littérature. De récentes données de structuration du complexe spexine/GalR₂ ont néanmoins permis de confirmer la présence de cette structure secondaire. Cela nous a permis de rationaliser plusieurs résultats et notamment ceux obtenus avec le **LIT-01-405** qui a inspiré le développement de nouveaux dérivés agrafés dont le but serait d'améliorer la stabilité plasmatique de la spexine. La structure cryo-EM associée aux différentes données que nous avons pu collecter durant cette partie du projet ouvre la voie vers une optimisation des outils chimiques dérivés de la spexine. Cela permettra non seulement d'étudier l'implication du récepteur GalR₂ dans la modulation de la douleur mais également de développer de nouveaux neuropeptides dont l'activité anti-nociceptive serait améliorée.

Pour le deuxième chapitre de ces travaux, nous avons eu pour objectif de développer les premiers dérivés photocages de la spexine. En nous basant sur les premières données de RSA qui ont été collectées nous avons pu présumer de l'importance des résidus Tyr⁹ & Lys¹¹ pour l'activation du récepteur GalR₂. Ces deux acides aminés ont donc été fonctionnalisés à l'aide de groupements protecteurs photolabiles de type *ortho*-nitrobenzyle et coumarin-4-ylméthyle. La synthèse de la tyrosine photocage protégée par un dérivé coumarin-4-ylméthyle s'est notamment révélée assez complexe. Cela nous a obligé à modifier la stratégie de synthèse à plusieurs reprises pour finalement obtenir le **LIT-01-453** qui se trouve être, à notre connaissance, le premier acide aminé photocage possédant un linker auto-immolable.

L'exposition aux rayonnements ultraviolets des dérivés photocages de la spexine en conditions biologiques nous a permis de mettre en évidence le clivage de tous les GPPs en quelques minutes. En ce qui concerne le **LIT-01-453** nous avons cependant constaté que,

malgré le photoclivage efficace de la DEACM, l'élimination complète du linker auto-immolable *N,N'*-diméthyléthylènediamine n'a pu être observée qu'après plusieurs heures.

De la même manière que pour les dérivés photoisomérisables l'évaluation pharmacologique (EC_{50}) vis-à-vis du récepteur GalR₂ des dérivés photocage de la spexine a ensuite été réalisée *in vitro*. Cela nous a tout d'abord permis de constater que la protection de la Lys¹¹ n'a que peu d'impact sur l'activité fonctionnelle du peptide, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus dans le premier chapitre. Nous pouvons donc raisonnablement conclure que la Lys¹¹ n'est pas impliquée dans l'activation de GalR₂. Au contraire, nous avons observé une diminution significative de l'activité et de l'efficacité pour le **LIT-01-441** ($EC_{50} = 996 \pm 3$ nM) et le **LIT-01-453** ($EC_{50} = > 2$ μ M, $E_{max} = 43.8 \pm 0.8$ % de la spexine native), possédant une tyrosine photocage. L'évaluation de l'activité fonctionnelle de ces deux peptides après le photoclivage de leur GPP a montré une amélioration de l'activité d'un facteur 100 pour le **LIT-01-441** ($EC_{50} = 9 \pm 2.1$ nM). Nous avons également pu constater l'amélioration de l'activité du **LIT-01-453** ($EC_{50} = 90.9 \pm 14.3$ nM) d'un facteur 20.

En parallèle de cela nous avons également cherché à développer un nouveau groupement protecteur photolabile dérivé du Nile red excitable par la lumière verte et sensible à son environnement. Un dérivé hydroxyméthylé du Nile red a ainsi pu être synthétisé puis introduit sur un composé modèle via un lien carbamate. Cependant aucune des conditions expérimentales que nous avons étudiées ne nous a permis d'observer un clivage du Nile red. Pour favoriser ce photoclivage, une solution pourrait être d'ajouter des groupements électroattracteurs au voisinage du site de coupure ou encore d'utiliser des atomes lourds tels que les halogènes afin de quencher la fluorescence du Nile red.

L'ensemble de ces travaux de thèse ont abouti au développement du **LIT-01-441** qui se trouve être la première sonde photoactivable du récepteur GalR₂ pouvant être utilisée pour étudier l'implication de ce récepteur dans les voies non-opioïdes de la douleur. Pour compléter notre étude nous avons également développé le **LIT-01-453** possédant un GPPs de type coumarin-4-ylméthyle possédant des longueurs d'ondes d'absorption dans le domaine du visible. Nous avons cependant pu montrer que l'élimination du linker auto-immolable de ce dérivé était lente et pouvait représenter un paramètre limitant pour son utilisation lors d'expériences *in vivo*.

En perspective, il serait pertinent d'utiliser le LIT-01-441 sur coupe de tissus afin d'étudier localement l'activation spatio-temporelle du récepteur GalR₂. Pour une future étude dans l'animal entier, il serait important d'évaluer la stabilité plasmatique du **LIT-01-441**. Concernant le **LIT-01-453**, le linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine pourrait être remplacé par les linkers (*S*)-2-(aminométhyl)pyrrolidine ou encore *p*-aminobenzyle dont l'élimination en conditions biologiques serait plus rapide et permettrait d'envisager l'utilisation d'un tel dérivé photoactivable *in vivo*. Pour une utilisation sur tissus natifs et sur animal entier, il serait également intéressant d'utiliser un GPP dont les longueurs d'onde de clivage se situent dans le domaine du proche infrarouge comme les dérivés de cyanine par exemple.

Experimental part

1. General methods

1.1 General methods for solution phase synthesis

1.1.1 Starting materials and reagents

Reagents were obtained from commercial sources and used without any further purification.

1.1.2 Chemical synthesis monitoring

Thin-layer chromatography was performed on silica gel 60F₂₅₄ plates.

Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography separations were performed on an Agilent Technologies 1200 series HPLC system with the detection set at 200 nm, 210 nm, 220 nm, 254 nm, 280 nm, 365 nm and 530 nm using the following methods:

. Method A (VISMIONES): Ascentis Express C₁₈ column (2.7 μm, 4.6 mm × 75 mm) using a linear gradient of 5% to 100% (v/v) of solvent B (0.1% TFA (v/v) in ACN) in solvent A (0.1% TFA (v/v) in H₂O) in 7.39 min with a flow rate of 1.6 mL.min⁻¹,

. Method B (7MIN JOUR GRDE COL): Kinetex C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient of 5% to 95% (v/v), of solvent B (0.1% TFA (v/v) in ACN) in solvent A (0.1% TFA (v/v) in H₂O) in 7.3 min with a flow rate of 1.5 mL.min⁻¹

. Method C (20MIN JOUR GRDE COL): Kinetex C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient of 5% to 95% (v/v), of solvent B (0.1% TFA (v/v) in ACN) in solvent A (0.1% TFA (v/v) in H₂O) in 20 min with a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹,

. Method D (PINCE 7MIN JOUR): Kinetex C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient of 30% to 100% (v:v) in 6 min, of solvent B (0.1% TFA (v:v) in ACN) in solvent A (0.1% TFA (v:v) in H₂O) flow rate of 2.0 mL.min⁻¹,

1.1.3 Chemical purification

VWR silica gel (40-63 μm) was used for chromatography columns.

Reverse-phase semi-preparative HPLC purifications were performed on a Waters SunFire C₁₈ OBD Prep column (5 μ m, 19 \times 150 mm) on a Gilson PLC2020 and PLC2050 system.

Reverse-phase flash purifications were performed on prepacked Interchim Puriflash C₁₈ columns (PF-30C18HP-F0012, PF-30C18HP-F0025 and PF-30C18HP-F0040, 30 μ m) on a Gilson PLC2020 system.

1.1.4 Chemical characterization

All the compounds already described in the literature were only characterized by ¹H NMR and compared to the data reported in the literature. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker (500 MHz/125 MHz and 400 MHz/100 MHz) spectrometer. Conditions are specified for each spectrum (temperature 25 °C unless specified). 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), dd (doublet of doublets), dt (doublet of triplets), ddt (doublet of doublet of triplets), td (triplet of doublet), br s (broad singlet), br d (broad doublet), br q (broad quadruplet) and br dd (broad doublet of doublets). Deuterated solvents were purchased from Euriso-top®.

Low resolution mass spectra (LRMS) and 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 μ m, 2.1 \times 50 mm) using electrospray ionization (ESI) and a time-of-flight analyzer (TOF).

1.2 General method for peptide synthesis

1.2.1 Reagents

Reagents were obtained from commercial sources and used without any further purification. Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(t-Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH were purchased from Novabiochem, Polypeptides and Iris Biotech. Fmoc-Amide Rink resin was purchased from Iris Biotech and the overall yields were calculated based on the initial loading provided by the supplier (0.69 mmol.g⁻¹ or 0.4 mmol.g⁻¹).

All unnatural amino acids were synthesized according to the procedure described below.

1.2.2 Manual solid phase peptide synthesis

1.2.2.1 Method A

Manual Solid Phase Peptide Syntheses (SPPS) were performed in polypropylene tubes equipped with polyethylene frits and polypropylene caps on orbital agitator shaking device. The Fmoc-Amide Rink resin (1 eq) was swollen for 1h in DCM or DMF and the excess of solvent was removed by filtration under vacuum. All *N*-terminal-Fmoc groups were removed by using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (15 min, 2 times). The piperidine solution was removed by filtration under vacuum and the resin was washed successively with DMF and DCM (3 times). All Fmoc-protected amino acids (4 eq) were coupled in DMF (1 mL per 0.06 mmol of resin) during 45 min using HATU (3.9 eq) and DIEA (12 eq) as activating agents. The excess of solvent was removed by filtration under vacuum and the resin was washed successively with DMF and DCM (3 times).

1.2.2.2 Method B

Manual Solid Phase Peptide Syntheses (SPPS) were performed in polypropylene tubes equipped with polyethylene frits and polypropylene caps stirred at room temperature at 40 rpm using a Stuart Rotator Model SB3. The Fmoc-Amide Rink resin (1 eq) was swollen for 1h in DCM or DMF and the excess of solvent was removed by filtration under vacuum. All *N*-terminal-Fmoc groups were removed by using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (15 min, 2 times). The piperidine solution was removed by filtration using a Supelco Visiprep SPE 12-port vacuum manifold and the resin was washed successively with DMF and DCM (3 times). All Fmoc-protected amino acids (4 eq) were coupled in DMF (1 mL per 0.06 mmol of resin) during 45 min using HATU (3.9 eq) and DIEA (12 eq) as activating agents. The excess of solvent was removed by filtration under vacuum and the resin was washed successively with DMF and DCM (2 times), then MeOH (1 time), DMF and DCM. At the end of the synthesis the resin was washed with diethyl ether and dried under vacuum.

For all Fmoc-protected unnatural amino acids (1.5 eq or 2eq) were coupled in DMF (1 mL per 0.06 mmol of resin) during 45 min using HATU (3.9 eq or 1.9 eq) and DIEA (12 eq or 8 eq) as activating agents.

1.2.3 Automated solid phase peptide synthesis

Automated SPPS was carried out using a CEM Liberty Blue automated microwave-assisted peptide synthesizer. Fmoc protecting groups were removed using 20% v/v piperidine in DMF at 90 °C for 4 min. The coupling of all amino acids (0.2 M in DMF peptide grade, 10 eq.) was performed at 90 °C for 4 min using DIC/Oxyma in DMF peptide grade. For 100 µmol-scale synthesis, a 0.5 M solution of DIC in DMF peptide grade and a 1 M solution of Oxyma in DMF peptide grade were used. At the end of the synthesis, the beads were transferred from the microwave reactor to polypropylene tubes equipped with polyethylene frits and polypropylene caps and was washed successively with DMF and DCM (3 times) then diethyl ether and dried under vacuum.

1.2.4 Monitoring of solid phase peptide synthesis reactions

The completion was monitored with the colorimetric TNBS, Kaiser and Chloranil tests as well as by analytical HPLC following cleavages of small aliquots of resin with cleavage cocktails only during manual solid phase peptide synthesis.

1.2.4.1 Colorimetric tests

Kaiser test and TNBS test were used for all amino acids except proline where only Chloranil test was used. For Kaiser test, few resin beads were transferred to a small glass tube which contains a mixture of 0.3 M ninhydrin solution in EtOH, 43 M phenol solution in EtOH and 20 µM KCN solution in 2% H₂O in pyridine (1:1:1, v:v). The glass tube was then heated and the appearance of dark blue resin beads indicates the presence of resin-attached primary amines synonym of a Fmoc-deprotected amino acids. An absence of dark blue coloration indicates the absence of free primary amines. For TNBS test few resin beads were transferred to a small glass tube which contains one drop of picrylsulfonyl acid. Then one drop of a 10% DIPEA solution in DMF was added. The appearance of red/deep orange resin beads after few minutes indicates the presence of resin attached primary amines synonym of a Fmoc-deprotected amino acids. For Chloranil test few resin beads were transferred to a small glass tube which contains one drop of acetaldehyde solution (17.9 M) in DMF. Then one drop of a Chloranil solution in DMF (81.3 mM) was added. The appearance of blue resin beads after few minutes indicates the presence of resin attached primary amines synonym of a Fmoc-deprotected amino acids.

1.2.4.2 *Microcleavage tests*

A small amount of resin beads were transferred to a 1.5 mL microtube containing 1mL of cleavage cocktail :

- TFA:Phenol:Thioanisole:H₂O:EDT (82.5:5:5:5:2.5, v:v) (Method A)
- TFA:Phenol:Thioanisole:H₂O:EDT:TIS (81.5:5:5:5:2.5:1, v:v) (Method B)
- TFA:H₂O:TIS (95:2.5:2.5, v:v) (Method C)

The cleavage cocktail solution was then shaken on an orbital agitator shaking device for 30 min to 1h. The solution was then filtered in polypropylene tubes equipped with polyethylene frits and polypropylene caps and poured into 4 mL cold diethyl ether to precipitate the peptides. The resulted precipitates were then centrifuged 2 min at 4400 rpm and 4°C. Diethyl ether was then removed, the residue was resuspended in cold diethyl ether and centrifuged another time for 2 min at 4400 rpm and 4°C. After elimination of diethyl ether, the residue was dissolved in H₂O:ACN (7:3, v:v) and analysed by HPLC.

1.2.5 *Peptide cleavage and deprotection*

Final peptides were cleaved from the resin under acidic conditions in polypropylene tubes equipped with polyethylene frits and polypropylene caps with a corresponding cleavage mixture (7 mL/0.1 mmol of peptide)

- TFA:Phenol:Thioanisole:H₂O:EDT (82.5:5:5:5:2.5, v:v) (Method A)
- TFA:Phenol:Thioanisole:H₂O:EDT:TIS (81.5:5:5:5:2.5:1, v:v) (Method B)
- TFA:H₂O:TIS (95:2.5:2.5, v:v) (Method C)

The cleavage cocktail solution was then shaken on an orbital agitator shaking device for 3h (Method A & C) to 4h (Method B) then filtered and poured into 40 mL of cold diethyl ether to precipitate the peptides. The resulted precipitates were then centrifuged 2 min at 4.4 rpm and 4°C. Diethyl ether was then removed, the float was resuspended in cold diethyl ether and centrifuged another time for 2 min at 4400 rpm and 4°C. After elimination of diethyl ether, the residue was dissolved in DMSO and purified.

1.2.6 Peptide purification

Crude peptides were purified by semi preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC 2020 system) on a SunFire C18 column (5 μ m, 19 x 150 mm) using a linear gradient of 5% to 95% in 40 min, of solvent B (0.1% TFA in MeCN, v:v) in solvent A (0.1% TFA in H₂O, v:v) with a flow rate of 18 mL/min. Detection was set at 210, 220, 254, 365 or 530 nm. Fractions containing the desired peptide were freeze-dried after MeCN removal on a rotary evaporator.

1.3 Photophysical characterization

Absorption measurement, isomerisation of photoswitchable peptides and photocleavage of photocage peptides were performed in 114F-QS and 114F-10-40 10 mm quartz precision cells (Hellma Analytics).

Absorption measurement were performed on a UV-Visible UV-2401PC recording spectrometer (Shimadzu) with a fast scan speed and a 1 nm sampling intervalling using UV probe V.2.34 software (Shimadzu).

Photoisomerization and photocleavage were performed using a VL-6.LC UV lamp (12W, 6W 365nm and 6W 254nm) and a Nichia NCSG219B-V1 LED Lichtquelle (3x 525 nm, 3x 450 mW).

1.4 Cell line culture*

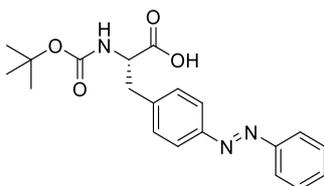
HEK-SnapTag GalR₂ were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM, Gibco) with 10% FBS, 100 U/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin, 2 mM of glutamine and 500 μ g/mL of G418 at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Optimal cell confluence was maintained by dilution of the culture and replacement with fresh medium twice a week. Cells were seeded into a 100 x 20 mm tissue culture cell dishes (Falcon, Ref 353003) then washed with 5 mL PBS at 37°C, detached using 1 mL of trypsin/EDTA at 37°C, resuspended with 10 mL of culture medium and seeded into another 100 x 20 mm tissue culture cell dish (Falcon, Ref 353003).

* Performed with the help of Valérie Utard & Rosine Fellmann-Clauss under the supervision of Dr. Frédéric Simonin (UMR7242, BSC)

2. Chapter 1: Design, synthesis and biological evaluation of photoswitch spexine derivatives

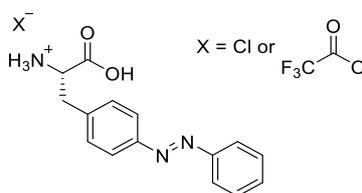
2.1 Chemical synthesis

N-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-phenylazo-L-phenylalanine (**1.2**)



To a solution of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalanine (1 eq., 1 g, 3.57 mmol) in glacial acetic acid (100 mL) was added nitrosobenzene (1.5 eq., 0.58 g, 5.41 mmol) and let stirred for 19h at room temperature. The reaction mixture was then quenched with saturated NaHCO₃ aqueous solution (300 mL) and extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The product was then purified by silica gel column eluted with 10% MeOH in DCM (v/v) to obtain an orange solid (1.07 g, 2.89 mmol, 81%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.89 (dt, *J* = 8.3 Hz, 1.5 Hz, 2H) ; [7.54-7.45] (m, 3H) ; 7.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H) ; 4.97 (br s, 1H) ; 4.65 (br s, 1H) ; [3.34-3.26] (m, 1H) ; [3.23-3.13] (m, 1H) ; 1.43 (s, 9H).

4-phenylazo-L-phenylalanine, TFA salt (*Method A*) or HCl salt (*Method B*) (**1.3**)

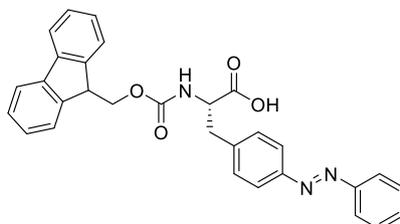


Method A: To a solution of **1.2** (1eq., 250 mg, 0.68 mmol) in DCM (15 mL) cooled to 0°C, trifluoroacetic acid (10 mL) was slowly added and the mixture was stirred 1h at room temperature. The reaction mixture was then concentrated under vacuum to get an orange solid (256 mg, 0.67 mmol, quantitative).

Method B: **1.2** (1 eq., 500 mg, 1.36 mmol) was dissolved in HCl 4N/dioxane (6.4 mL). The mixture was stirred 1h at room temperature and then co-evaporated to dryness with toluene to get an orange solid (413 mg, 1.35 mmol, quantitative).

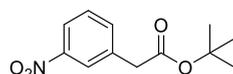
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.45 (br s, 2H) ; [7.90-7.86] (m, 4H) ; [7.63-7.55] (m, 3H) ; 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) ; 4.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H) ; 3.24 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H).

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-4-phenylazo-L-phenylalanine (1.4)**



To a solution of **1.3** (1 eq., 256 mg, 0.95 mmol) in dioxane (10.5 mL) cooled to 0°C, saturated aqueous solution of Na₂CO₃ (4.1 mL) and Fmoc-*N*-hydroxysuccinimide ester (1 eq., 320 mg, 0.95 mmol) in dioxane (13 mL) were added. This reaction mixture was then stirred for 1h at 0°C and for 1h at room temperature. The resulting mixture was diluted with water (37 mL) and washed with EtOAc. The aqueous layer was cooled down to 0°C and acidified with 1 M aqueous solution of HCl to reach pH 2. The obtained suspension was extracted 4 times with EtOAc. After that, organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then purified by silica gel column eluted with 2% of MeOH and 0.5% of AcOH in DCM (v/v/v) to get an orange solid (330 mg, 0.67 mmol, 71%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.45 (br s, 2H) ; [7.90-7.86] (m, 4H) ; [7.63-7.55] (m, 3H) ; 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) ; 4.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H) ; 3.24 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H).

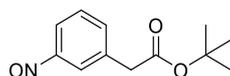
***tert*-butyl 2-(3-nitrophenyl)acetate (1.7)**



To a solution of 3-nitrophenylacetic acid (1 eq., 100 mg, 0.55 mmol) in *tert*-butanol (2.5 mL), Boc₂O (2 eq., 241 mg, 1.10 mmol) and DMAP (0.3 eq., 20 mg, 0.16 mmol) were added. The reaction was then stirred for 1h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude was then purified using a silica gel column eluted with 10% EtOAc in *n*-heptane (v/v) to get a yellowish oil (126 mg, 0.53 mmol, 96%). **¹H**

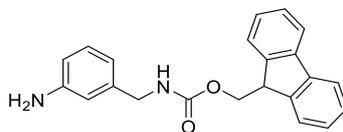
NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) [8.1-8.15] (m, 1H) ; [8.14-8.11] (m, 1H) ; 7.61 (dt, J = 7.7 Hz, 1.4 Hz, 1H) ; 7.50 (t, J = 7.9 Hz, 1H) ; 3.64 (s, 2H) ; 1.45 (s, 9H).

***tert*-butyl 2-(3-nitrosophenyl)acetate (1.8)**



To a solution of **1.7** (1 eq., 232 mg, 0.98 mmol) in 2-methoxyethanol (2.3 mL), a solution of NH₄Cl (1.15 eq., 60 mg, 1.13 mmol) in H₂O (1.4 mL) was added and the mixture was stirred under argon atmosphere for 1h. Then, zinc dust (2.22 eq., 142 mg, 2.17 mmol) was added portion wise over 1h and the reaction was stirred until the starting material disappeared. The reaction mixture was then filtered over celite. The filtrate was added dropwise (3-4 drops per second) to a solution of FeCl₃·6H₂O (1.53 eq., 405 mg, 1.5 mmol) in a mixture of H₂O/EtOH (2/1, v/v) (5.9 mL) cooled to -10°C and let stirred for 1h at -10°C. The reaction mixture was then diluted with H₂O and extracted 2 times with EtOAc. The organic layer was dried over Na₂SO₄, concentrated under vacuum and the product was purified by silica gel column eluted with 10% of EtOAc in n-heptane (v/v) to obtain a green oil (13 mg, 0.06 mmol, 41%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.86 (dt, J = 7.7 Hz, 1.7 Hz, 1H) ; 7.76 (t, J = 1.6 Hz, 1H) ; 7.64 (dt, J = 7.6 Hz, 1.5 Hz, 1H) ; 7.59 (t, J = 7.6 Hz, 1H) ; 3.68 (s, 2H) ; 1.45 (s, 9H).

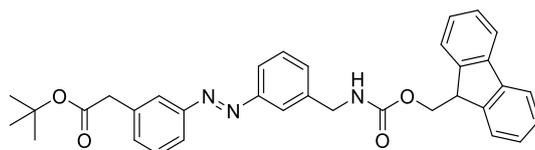
***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(3-aminobenzyl)carbamate (1.10)**



To a solution of 3-aminobenzylamine (1 eq., 0.9 mL, 8.19 mmol) and NEt₃ (1 eq., 1.1 mL, 8.19 mmol) in a mixture of 10% of ACN in DMF (v/v) (6.2 mL) a solution of Fmoc-*N*-hydroxysuccinimide ester (1 eq., 2.76 g, 8.19 mmol) in ACN (20 mL) was added. The reaction mixture was stirred during 5h at room temperature then quenched with H₂O (10 mL). The resulted precipitate was filtered under vacuum, washed with a mixture of *tert*-butyl methyl ether and trifluoroethanol (1/1, v/v) and dried under vacuum to get a white solid (940 mg, 2.73 mmol, 76%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.89 (d, J = 7.6 Hz,

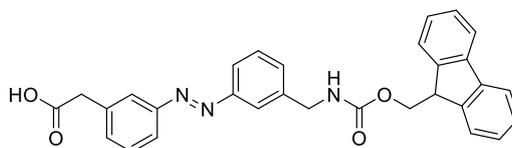
2H) ; 7.76 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H) ; 7.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H) ; 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H) ; 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H) ; 6.93 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H) ; 6.45 (s, 1H) ; 6.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H) ; 6.37 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H) ; 5.01 (s, 2H) ; 4.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H) ; 4.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H) ; 4.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H).

***tert*-Butyl (*E*)-2-(3-{{[3-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}methyl]-phenyl]diazenyl}phenyl)acetate (1.11)**



To a solution of **1.8** (1 eq., 1 g, 4.7 mmol) in glacial acetic acid (23 mL) a solution of **1.10** (1 eq., 1.62 g, 4.7 mmol) in glacial acetic acid (23 mL) was added dropwise. The reaction mixture was then stirred overnight at room temperature under argon. The solvent was removed under vacuum and the crude was purified by silica gel column eluted with 20% of EtOAc in n-heptane (v/v) to get an orange solid (1.5 g, 2.74 mmol, 58%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) [7.86-7.81] (m, 4H) ; 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H) ; 7.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H) ; [7.51-7.46] (m, 2H) ; [7.42-7.38] (m, 4H) ; 7.31 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H) ; 5.19 (br s, 1H) ; 4.49 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H) ; 4.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H) ; 3.64 (s, 2H) ; 1.46 (s, 9H).

(*E*)-2-{{3-{{[3-{{[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl]amino}methyl]phenyl}diazenyl}phenyl}acetic acid, chlorohydrate (Method B) (1.12)

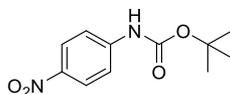


Method A: To a solution of **1.11** (570 mg, 1.04 mmol) in DCM (41 mL), trifluoroacetic acid (4.1 mL) was slowly added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was washed with water until neutral pH then once with brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to get an orange solid (511 mg, 1.04 mmol, quantitative).

Method B: **1.11** (69.5 mg, 0.13 mmol) was dissolved in HCl 4N/dioxane (0.6 mL). The mixture was stirred 3 days at room temperature and then co-evaporated to dryness with toluene. The crude was purified by silica gel column eluted with 30% of EtOAc in n-heptane:EtOAc (v/v) to get an orange solid (38.2 mg, 0.078 mmol, 61%).

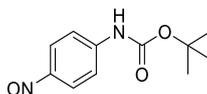
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) [7.85-7.81] (m, 4H) ; 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H) ; 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H) ; [7.50-7.46] (m, 2H) ; 7.39 (t, *J* = 9.4 Hz, 4H) ; 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H) ; 5.20 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H) ; [4.48-4.47] (m, 4H) ; 4.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H) ; 3.76 (s, 2H).

***tert*-butyl (4-nitrophenyl)carbamate (1.14)**



To a solution of *p*-nitroaniline (1 eq., 2 g, 14.48 mmol), NEt₃ (2 eq., 4 mL, 28.96 mmol) and DMAP (0.5 eq., 0.88 g, 7.24 mmol) in DCM (69 mL), a solution of Boc₂O (1.2 eq., 3.79 g, 17.38 mmol) in DCM (6.9 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was washed with H₂O (2x) and brine (1x), then the solvents were removed under vacuum. The crude was purified by silica gel column eluted with 10% to 20% of EtOAc in n-heptane to get a pale yellow solid (2.67 g, 11.19 mmol, 77%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.18 (dt, *J* = 9.2 Hz, 2.1 Hz, 2H) ; 7.52 (dt, *J* = 9.2 Hz, 2.0 Hz, 2H) ; 6.84 (br s, 1H) ; 1.53 (s, 9H).

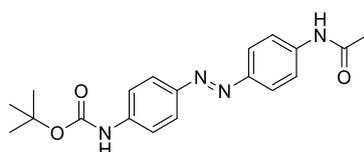
***tert*-butyl (4-nitrosophenyl)carbamate (1.15)**



1.14 (1 eq., 2.49 g, 10.44 mmol) was dissolved in 2-methoxyethanol (90 mL). Then, a solution of NH₄Cl (1.5 eq., 0.84 g, 15.66 mmol) in H₂O (15 mL) was added and the mixture was stirred under argon for 1h. After that, zinc dust (2.5 eq., 1.7 g, 26.10 mmol) was added portionwise over 1h and the reaction mixture was stirred for 3h under argon. The solution was filtered over celite and the filtrate was added slowly to a solution of FeCl₃·6H₂O (1.53 eq., 4.32 g, 15.97 mmol) in a mixture of H₂O/EtOH (2/1, v/v) (10 mL)

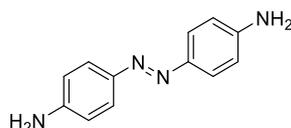
cooled to -10°C and let stirred for 2h30 at -10°C under argon. The reaction mixture was then diluted with H_2O and extracted 2 times with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude (greenish oil) was purified by silica gel column eluted with 10% EtOAc in n-heptane (v/v) to get the desired compound as a green solid (1.4 g, 222.2 mmol, 61%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.89 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H) ; 7.58 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H) ; 6.89 (br s, 1H) ; 1.54 (s, 9H).

***tert*-butyl (*E*)-{4-[(4-acetamidophenyl)diazenyl]phenyl}carbamate (1.16)**



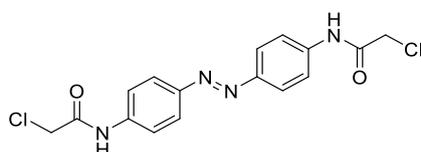
A solution of 4'-aminoacetanilide (1 eq., 322 mg, 2.15 mmol) in glacial acetic acid (10 mL) was added portionwise to a solution of **1.15** (1 eq., 477 mg, 2.15 mmol) in glacial acetic acid (10 mL). The reaction mixture was then stirred overnight at room temperature under argon and protected from light. The solvent was removed under vacuum and the crude was diluted with EtOAc, washed with saturated aqueous solution of Na_2CO_3 and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude was then purified by silica gel column eluted with 50% of EtOAc in n-heptane (v/v) to get the product as an orange solid (443 mg, 1.25 mmol, 58%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 10.25 (s, 1H), 9.76 (s, 1H) [7.83-7.77] (m, 6H) ; 7.65 (dt, $J = 8.9$ Hz, 2.1 Hz, 2H) ; 6.89 (br s, 1H) ; 2.09 (s, 3H) ; 1.50 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 168.68, 152.57, 147.54, 146.94, 142.36, 141.81, 123.34, 123.23, 119.10, 118.13, 79.60, 40.15, 39.94, 39.73, 39.52, 39.31, 39.10, 38.89, 28.05, 24.12. **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 355.1770, found : 355.1776

(*E*)-4,4'-diaminoazobenzene (1.17)



To a solution of **1.16** (1 eq., 60 mg, 0.17 mmol) in MeOH (5 mL), a 6 M aqueous solution of HCl (8 mL) was added and the reaction was refluxed (75°C) during 5h. MeOH was removed under vacuum and the pH of the solution was increased to pH 8 using a 1 M aqueous solution of NaOH. The formed precipitate was recovered by filtration and washed with cold water to get the product as a brown solid (35.2 mg, 0.17 mmol, 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H) ; 6.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H) ; 5.54 (br s, 1H).

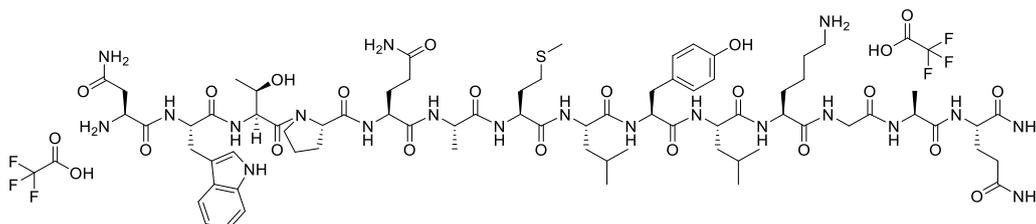
(*E*)-4,4'-bis(2-chloroacetamido)azobenzene (**1.18**)



To a solution of **1.17** (1 eq., 388 mg, 1.83 mmol) in DCM (125 mL) previously stirred under argon and protected from light for 15 min, NEt₃ (10 eq., 2.5 mL, 18.27 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 5 min under argon and protected from light before the addition of chloroacetyl chloride (5 eq., 0.73 mL, 9.13 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 2h20 then a new portion of chloroacetyl chloride (4.5 eq, 660 μL, 8.24 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2h10 more. The reaction mixture was quenched with H₂O and the organic layer was washed with water (2x), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then recrystallized in a mixture of DCM/*n*-heptane/DMF (20/20/1, v/v/v) to get the product as a brown solid (79 mg, 0.22 mmol, 12%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.54 (s, 2H) ; 7.88 (dt, *J* = 8.9 Hz, 1.9 Hz, 4H) ; 7.81 (dt, *J* = 9.0 Hz, 2.0 Hz, 4H) ; 4.31 (s, 4H).

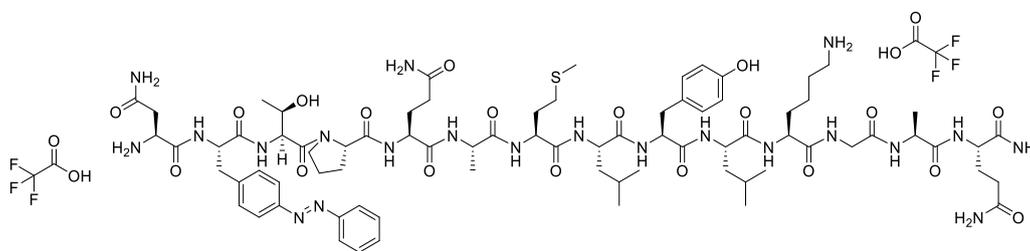
2.2 Peptide synthesis

NWTPQAMLYLKGAQ, 2 TFA (spexin)



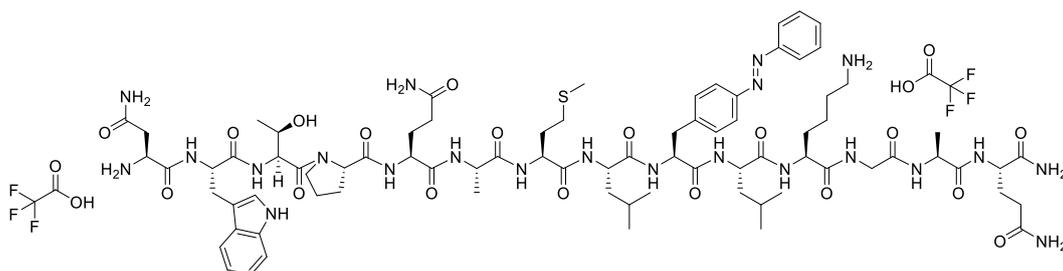
Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g⁻¹), N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P-Q(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis** then cleaved of the resin and purified according to the **General method for cleavage and deprotection (Method A)** & **General method for peptide purification** to get a white powder (20 mg, 5%). **HPLC** t_R = 3.20 min (>95% purity at 220 and 254 nm, Method B), 6.95 min (Method C). **LRMS** (ESI) calculated for C₇₄H₁₁₄N₂₀O₁₉S [M+H]⁺: 1619.84, found: 1619.86

N(AzoF)TPQAMLYLKGAQ, 2 TFA (LIT-01-277)



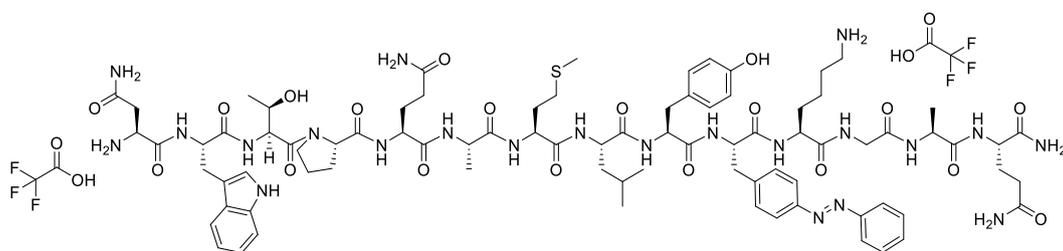
Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g⁻¹), T(t-Bu)-P-Q(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-AzoF-T(t-Bu)-P-Q(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin and purified according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** & **General method for peptide purification** to get an orange powder (22 mg, 13%). **HPLC** t_R = 8.08 min (*trans*) & 7.29 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for C₇₈H₁₁₉N₂₁O₁₉S [M+2H]²⁺: 842.9356, found: 842.9332

NWTPQAML(AzoF)LKGAQ, 2 TFA (LIT-01-322)



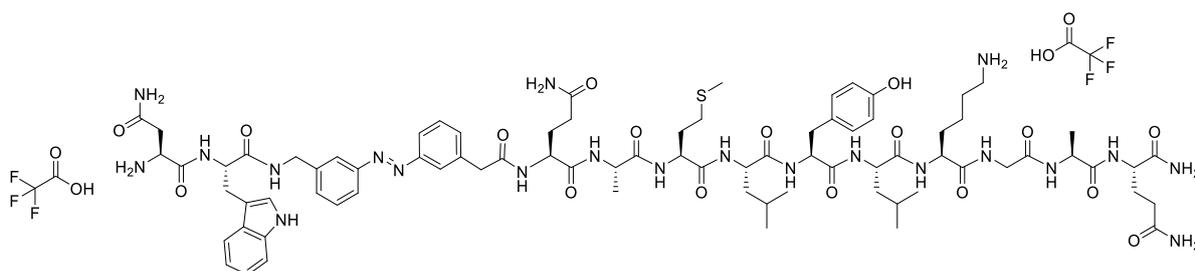
Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.69 mmol.g⁻¹), N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P-Q(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method A)** and purified according to **General method for peptide purification** to get an orange powder (5.6 mg, 4%). **HPLC** t_R = 8.96 min (*trans*) & 8.12 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for C₈₀H₁₂₀N₂₂O₁₈S [M+2H]²⁺/2: 854.4436, found: 854.4449

NWTPQAMLY(AzoF)KGAQ, 2 TFA (LIT-01-276)



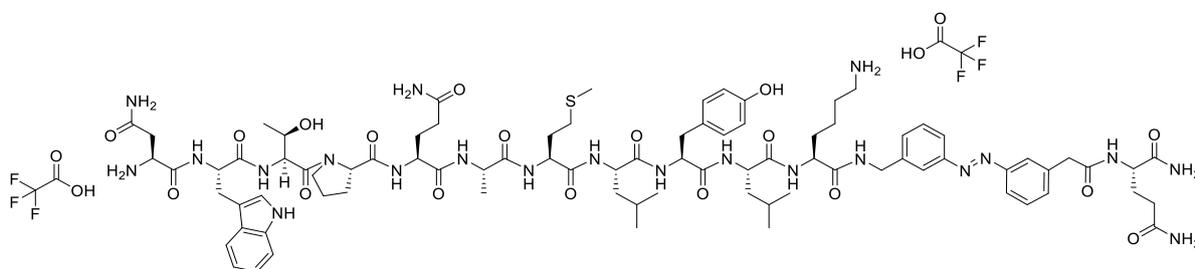
Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g⁻¹), Y(t-Bu)-AzoF-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P-Q(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-AzoF-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin and purified according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** & **General method for peptide purification** to get an orange powder (20 mg, 10%). **HPLC** t_R = 8.29 min (*trans*) & 7.42 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for C₈₃H₁₁₈N₂₂O₁₉S [M+2H]²⁺/2: 879.4332, found: 879.4313

NW(AMPP)QAMLYLKGAQ, 2 TFA (LIT-01-278)



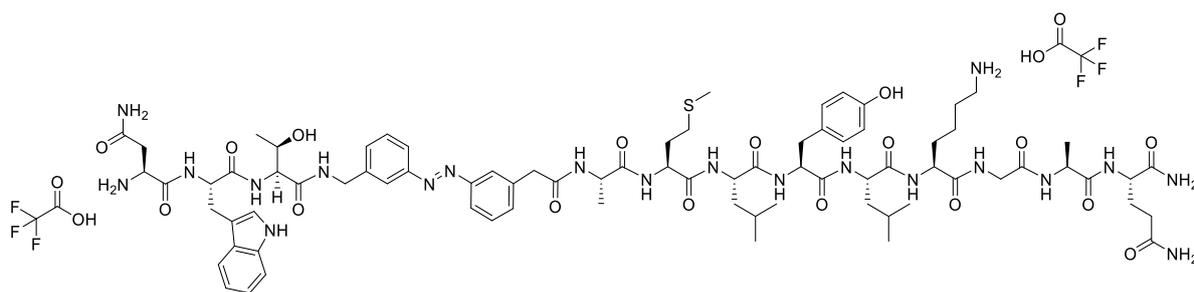
Starting from 0.081 mmol Rink amide Resin (0.69 mmol.g^{-1}), N(Trt)-W(Boc)-AMPP-Q(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get an orange powder (5.7 mg, 2%). **HPLC** $t_R = 8.47 \text{ min (trans)}$ & 7.79 min (cis) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{80}\text{H}_{115}\text{N}_{21}\text{O}_{17}\text{S}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$: 836.9250, found: 836.9236

NWTPQAMLYLK(AMPP)Q, 2 TFA (LIT-01-307)



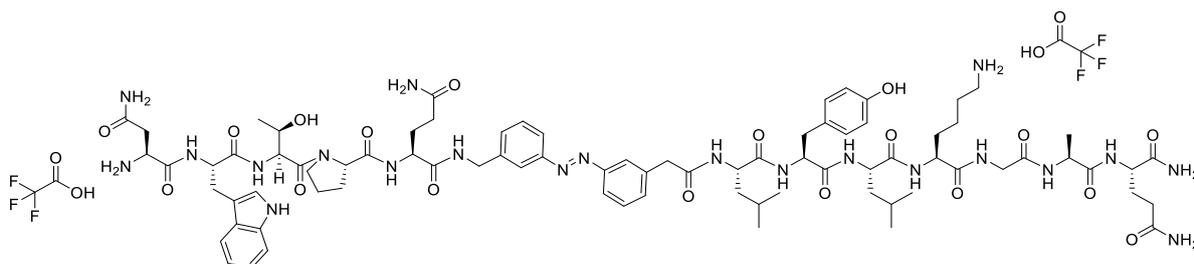
Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g^{-1}), K(Boc)-AMPP-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P-Q(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-AMPP-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get an orange powder (1 mg, 1%). **HPLC** $t_R = 8.37 \text{ min (trans)}$ & 7.89 min (cis) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{84}\text{H}_{121}\text{N}_{21}\text{O}_{18}\text{S}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$: 871.9460, found: 871.9475

NWT(AMPP)AMLYLKGAQ, 2 TFA (LIT-01-308)



Starting from 0.25 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g⁻¹), A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-AMPP-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-AMPP-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get an orange powder (2.5 mg, 2%). **HPLC** t_R = 8.67 min (*trans*) & 7.96 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for C₇₉H₁₁₄N₂₀O₁₇S [M+2H]²⁺/2: 823.4196, found: 823.4127

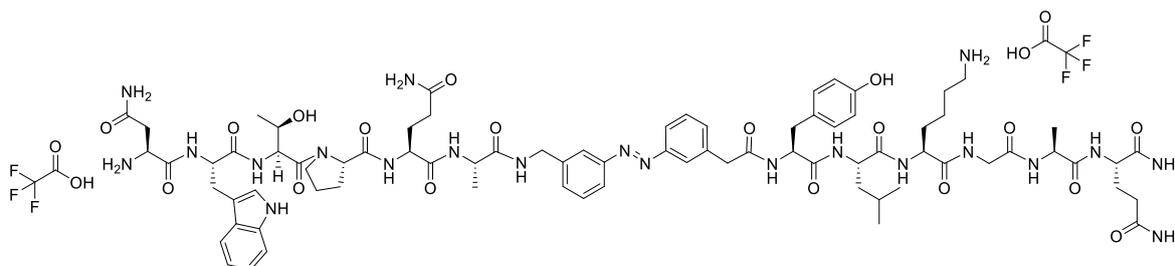
NWTPQ(AMPP)LYLKGAQ, 2 TFA (LIT-01-309)



Starting from 0.25 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g⁻¹), Y(t-Bu)-L-K(Boc)-AMPP-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P(Boc)-G(Trt)-AMPP-L-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get an orange powder

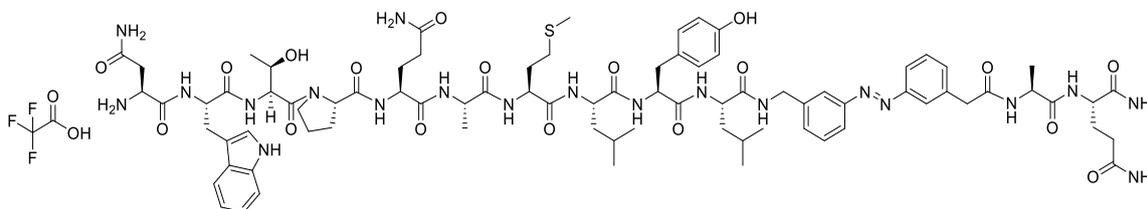
(2.1 mg, 2%). **HPLC** t_R = 8.06 min (*trans*) & 7.39 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $C_{81}H_{115}N_{21}O_{18}$ $[M+2H]^{2+}/2$: 834.9364, found: 834.9295

NWTPQA(AMPP)YLKGAQ, 2 TFA (LIT-01-310)



Starting from 0.25 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g^{-1}), Y(t-Bu)-L-K(Boc)-AMPP-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P(Boc)-G(Trt)-A-AMPP-Y(t-Bu)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved from the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get an orange powder (2.1 mg, 2%). **HPLC** t_R = 7.46 min (*trans*) & 6.74 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $C_{78}H_{109}N_{21}O_{18}$ $[M+2H]^{2+}/2$: 813.9130, found: 813.9117.

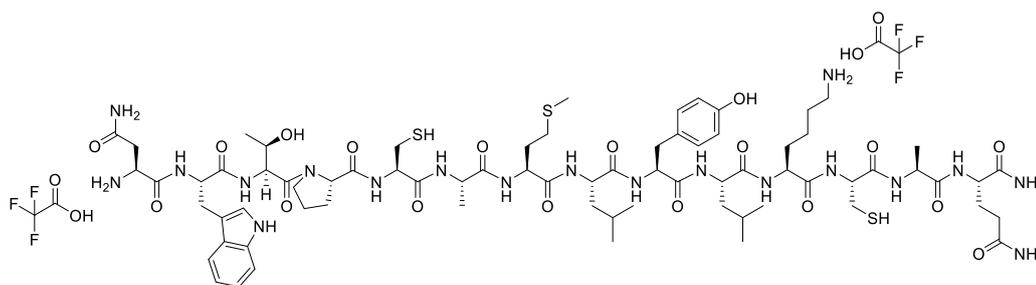
NWTPQAMLYL(AMPP)AQ, 1 TFA (LIT-01-378)



Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g^{-1}), L-AMPP-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P(Boc)-G(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-AMPP-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for**

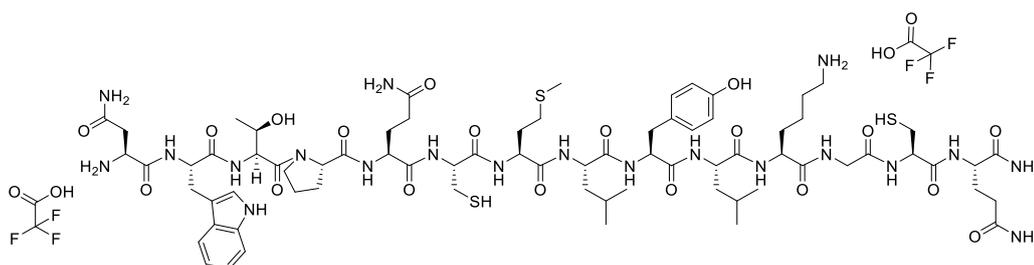
Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g⁻¹), K-AMPP-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P(Boc)-G(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K-AMPP-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get an orange powder (11.6 mg, 6%). **HPLC** t_R = 8.80 min (*trans*) & 8.33 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for C₈₇H₁₂₆N₂₂O₁₉S [M+2H]²⁺/2: 907.4645, found: 907.463.

NWTPCAMLKCAQ, 2 TFA (LIT-01-397)



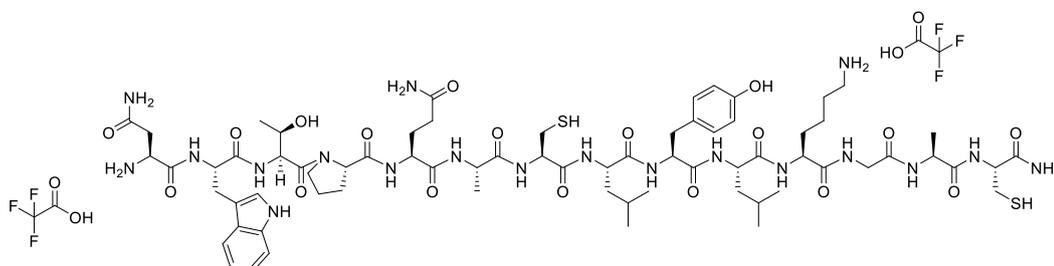
Starting from 0.1 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g⁻¹), N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P(Boc)-C(Trt)-A-M-L-Y(t-Bu)-L-K-C(Trt)-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get a white powder (6 mg, 3%). **HPLC** t_R = 8.36 min (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for C₇₃H₁₁₅N₁₉O₁₈S₃ [M+2H]²⁺/2: 820.8915, found: 820.8908

NWTPQCMLYLKGCQ, 2 TFA (LIT-01-437)



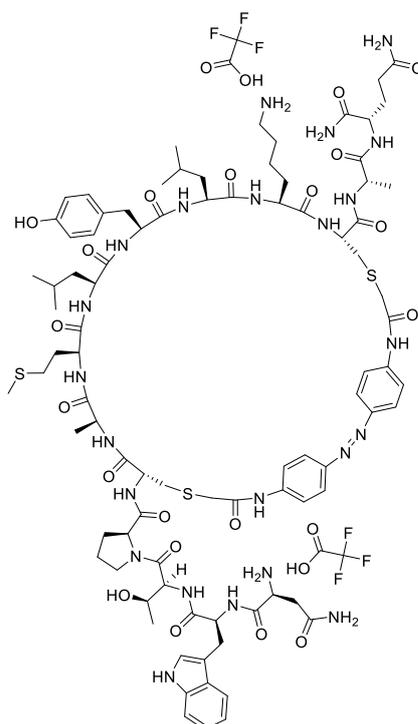
Starting from 0.25 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g^{-1}), N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P(Boc)-Q-C(Trt)-M-L-Y(t-Bu)-L-K-G-C(Trt)-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get a white powder (25 mg, 5%). **HPLC** $t_R = 11.12 \text{ min}$ (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{74}\text{H}_{116}\text{N}_{20}\text{O}_{19}\text{S}_3$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$: 842.3944, found: 842.3942

NWTPQACLYLKGAC, 2 TFA (LIT-01-404)



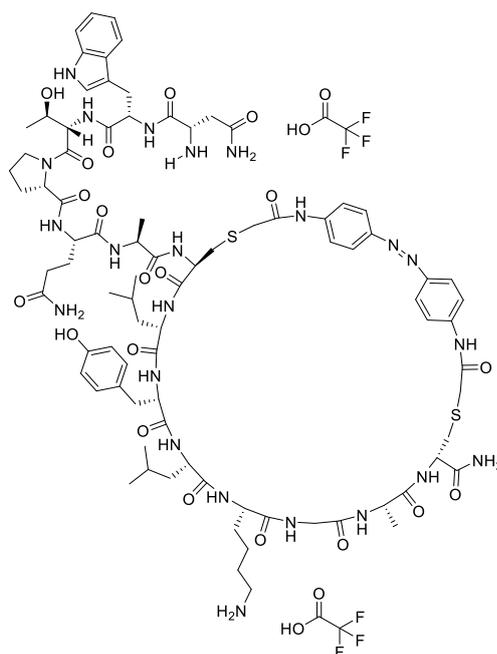
Starting from 0.25 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g^{-1}), N(Trt)-W(Boc)-T(t-Bu)-P(Boc)-Q-C(Trt)-M-L-Y(t-Bu)-L-K-G-C(Trt)-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get a white powder (13.2 mg, 3%). **HPLC** $t_R = 3.71 \text{ min}$ (>95% purity at 220 and 254 nm, Method B). **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{70}\text{H}_{109}\text{N}_{19}\text{O}_{18}\text{S}_2$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$: 783.8820, found: 783.8838

NWTPCAMLKCAQ, 2 TFA (LIT-01-398)



To a solution of LIT-01-397 (1 eq., 6 mg, 0.0032 mmol) in Tris HCl buffer (pH 8) (6.4 mL), tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride (2 eq., 1.84 mg, 0.0064 mmol) was added and the reaction was stirred 1h at room temperature under argon. Then a solution of **1.18** (1 eq., 1.17 mg, 0.0032 mmol) in DMF (6.4 mL) was added dropwise and the reaction was stirred under argon and light exclusion at room temperature for 21h30. The solvents were partially removed under vacuum to only keep less than 1 mL of liquid which was then lyophilized. The crude was then dissolved in a small amount of DMSO and purified following **General method for peptide purification** to get a yellow solid (3.2 mg, 46%). **HPLC** t_R = 9.44 min (*trans*) & 9.27 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $C_{89}H_{127}N_{23}O_{20}S_3$ $[M+2H]^{2+}/2$: 966.9395, found: 966.9379

NWTPQACLYLKGAC, 2 TFA (LIT-01-405)



To a solution of LIT-01-404 (1 eq., 6.3 mg, 0.0035 mmol) in Tris HCl buffer (pH 8) (7 mL), tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride (2 eq., 2.012 mg, 0.007 mmol) was added and the reaction was stirred 1h at room temperature under Argon. Then a solution of **1.18** (1 eq., 1.28 mg, 0.0035 mmol) in DMF (7 mL) was added dropwise and the reaction was stirred under Argon and light exclusion at room temperature for 21h30. The solvents were removed under vacuum and the crude was dissolved in a small amount of DMSO then purified following **General method for peptide purification** to get yellow solid (2.7 mg, 37%). **HPLC** t_R = 9.82 min (*trans*) & 9.43 min (*cis*) (>95% purity at 220 and 254 nm, Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $C_{86}H_{121}N_{23}O_{20}S_2$ $[M+2H]^{2+}/2$: 929.9300, found: 929.9311

2.3 Molecular modelling[†]

2.3.1 3D structure of the spexine and of the spexine with the stapled azobenzene photoswitch motif

3D structure of the spexine was prepared using « Protein Builder » module from MOE software (Chemical Computing Group, Montréal, Québec, Canada) version 2020.1.

[†] Performed by Dr. Celien Jacquemard under the supervision of Dr. Esther Kellenberger (UMR7200, LIT)

Spexin residues were added following the order of the amino acid sequence with an imposed α helix structuration between residues 5 and 14.

3D structure of the *trans* stapled azobenzene photoswitch motif was constructed by hand using « Build Molecule » module from MOE software version 2020.1.

3D structure of the *cis* stapled azobenzene photoswitch motif was constructed from azobenzene crystallographic structure from Cambridge Structural Database (CSD, code: AZBENC01, downloaded on the 4th of October 2021). The two amide functions and missing hydrogens were manually added using « Build Molecule » module from MOE software version 2020.1.

The two residues allowing the introduction of the stapled azobenzene photoswitch motif were mutated *in silico* into cysteine. The stapled azobenzene photoswitch motif was then manually introduced in order to create a single bond between the sulphur of a cysteine and the carbon α of the amide. The structure of the final peptide was then minimized using « Energy Minimize » module from MOE software version 2020.1 using Amber10:EHT force field and default options.

2.3.2 Modelling of the photoswitch stapled spexine derivatives with GalR₂

Galanin receptor 2 (GalR₂) was constructed by homology starting from the opioid related nociceptin receptor 1 (OPRL1, 68.4% homology for GalR₂ and 75.1% for GalR₃) as described by Wong & collaborators¹⁴³. OPRL1 structure was downloaded from Protein Data Bank (PDB, code: 4EA3, downloaded the 19th of January 2022). From this structure only the A chain of the protein was conserved. Human GalR₂ sequence was downloaded from UniProt (code: O43603, downloaded th 19th of January 2022). GalR₂ model was constructed by homology using MOE software version 2020.01 with default options.

The spexin (without the stapled azobenzene photoswitch motif) was manually placed into GalR₂ cavity with respect of the spexin binding mode described by Wong & collaborators¹⁴³. Then the three photoswitch stapled spexin derivatives were aligned on the previously placed spexin.

2.4 Isomerisation of photoswitchable peptides

Stock solutions of 10 mM photoswitchable spexins in DMSO analytical grade were prepared. Then 5 μL of these stock solutions was diluted in 995 μL HEPES physiological buffer (10 mM HEPES, 0.4 mM NaH_2PO_4 , 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl_2 , 1.25 mM CaCl_2 , 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, pH = 7.4) containing or not 1% (W/V) or 0.1% (W/V) of Bovine Serum Albumin (BSA). These 50 μM solutions were then transferred in a 1 mL quartz cell then placed at 5 cm from a UV lamp (VL-6.LC, n°18101512, 6W, 230 Volts, 50/60 Hz) and irradiated during a define time.

Absorption measurement and analytical HPLC analysis were performed before light exposition (t_0) and after different time of light exposure.

To perform analytical HPLC analysis 100 μL of the 50 μM sample were placed in a 1.5 mL microtube then 100 μL of ACN were added to precipitate BSA. After 1 min of vortex and centrifugation at 13000 rpm during 2 min 150 μL of the supernatant were transferred into an HPLC vial. Then 100 μL were injected and analysis by analytical HPLC using method C (*see Chemical synthesis monitoring*). Percentages of each isomer were obtained after calculation of the area under curve of the corresponding HPLC peaks recorded at 210 nm.

2.5 Circular dichroism[‡]

Circular dichroism spectra were performed on a J-820 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) using a 1 mm quartz tank and a 69 μM sample diluted in a solvent system composed of distilled water and increasing levels of TFE from 0 to 100%. Each spectrum was recorded three times with 0.1 nm steps from 185 to 260 nm and a scanning speed of 50 nm/min, combined and the spectrum of the corresponding solvent was then subtracted. The abundance of secondary structure elements was calculated by deconvolution analysis based on the ellipticity, peptide concentration and optical path using different algorithms and data banks from dichroweb software (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb> interactive webserver).

2.6 Evaluation of the functional activity of photoswitched peptides on GalR₂[§]

[‡] Performed with the help of Dr. Nicolas Humbert (UMR7021, LBP)

[§] Performed by Valérie Utard & Rosine Fellmann-Clauss under the supervision of Dr. Frédéric Simonin (UMR7242, BSC)

2.6.1 Cells preparation

HEK-SnapTag GalR₂ were treated with 10 µL of 1 mM of Fluo-4AM (Molecular Probes) diluted in 5 mL of HEPES physiological buffer containing 1% (W/V) of BSA previously heated at 37°C. After their incubation at 37°C for 1h, the cells were rinsed with 5 mL PBS and removed from the tissue culture cell dish using 2 mL of versene solution (5 mM of EDTA in PBS). The cells were then diluted with 8 mL of HEPES/1% BSA buffer and centrifuged at 1000 rpm during 5 min. The supernatant was then removed and the pellet was suspended in HEPES/1% BSA buffer (volume depend of the initial confluence of the cells). They were then distributed in black 96-well plate (Greiner®, Ref 655090) using an 8-canals micropipette (100 µL per well). The well plate was then centrifuged at 800 rpm during 5 min.

2.6.2 Compounds preparation

2.6.2.1 Method A

Solutions of 10 mM photoswitchable spexins in DMSO analytical grade were prepared and then diluted in HEPES/1% BSA (10 mM HEPES, 0.4 mM NaH₂PO₄, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1% (W/V) BSA, pH = 7.4) physiological buffer. Two series of each compound were diluted at 50 µM, 10 µM, 2 µM, 400 nM, 80 nM, 16 nM and 3.2 nM and transferred into half part of two transparent 96-well plate (Greiner®, Ref 65101) using an 8-canals micropipette (140 µL per well). Each well plate containing the same series of compounds (one per column) with Spexin (Genecust®) as control for GalR₂ activation and Carbachol as a control of the calcium response of the cells, which endogenously express M3 muscarinic receptor. For only one of the 96-well plates compounds were exposed to 365 nm UV light during 15 min and an absorption spectrum of highly concentrated compounds and buffer between 250 and 550 nm with 10 nm steps before and after light exposure was performed on a reader-pipettor FlexStationIII (Molecular Devices) of the PCBIS platform (UMS3286, Illkirch) to confirm the isomerisation.

2.6.2.2 Method B

Solutions of 10 mM photoswitchable spexine derivatives in DMSO analytical grade were prepared and then diluted in HEPES/1% BSA (10 mM HEPES, 0.4 mM NaH₂PO₄, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1% (W/V)

BSA, pH = 7.4) physiological buffer. Two series of each compound were diluted at 50 μ M, 10 μ M, 2 μ M, 400 nM, 80 nM, 16 nM and 3.2 nM and transferred into a transparent 96-well plate (Greiner[®], Ref 65101) using an 8-canals micropipette (140 μ L per well) with spexin (Genecust[®]) as control for GalR₂ activation and Carbachol as a control of the calcium response of the cells. For testing of irradiated compounds, the 96-well plate was exposed to 365 nm UV light using a VL-6.LC UV lamp (12W, 6W 365nm and 6W 254nm) during 15 min and an absorption spectrum of highly concentrated compounds and buffer between 250 and 550 nm with 10 nm steps before and after light exposure was performed on a reader-pipettor FlexStationIII (Molecular Devices) of the PCBIS platform (UMS3286, Illkirch) to confirm the isomerisation.

2.6.3 Measurement

The 96-well plates containing cells and compounds were placed in a reader-pipettor FlexStationIII (Molecular Devices) of the PCBIS platform (UMS3286, Illkirch) and pre-heated at 37°C for 5 min. Cells were excited at 488 nm and their fluorescence at 520 nm was measured over time at 37 °C. After 30 sec the compounds were added by the device for testing at 10 μ M, 2 μ M, 400 nM, 80 nM, 16 nM, 3.2 nM and 640 pM final concentrations. At the end of the kinetics, the cells were lysed with 150 μ M digitonin in order to saturate the calcium probe.

Once the first well plate containing the compounds was tested (Method A) it was removed and the second well plate was placed the in a reader-pipettor FlexStationIII (Molecular Devices).

2.6.4 Data analysis

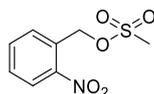
Data analysis were performed on a KaleidaGraph software (SynergySoftware)

The basal mean values before addition of the agonists were deduced and the amplitude of response to each dose of agonist was normalized to the maximum fluorescence intensity of the well obtained after cell lysis. Finally, the amplitudes obtained after this normalization were plotted to obtain a dose/response curve that allowed us to calculate the EC₅₀ value of the compounds.

3. Chapter 2: Design, synthesis and biological evaluation of photocage spexin derivatives

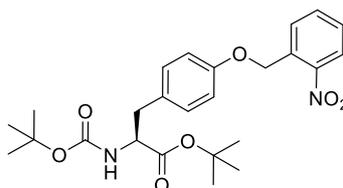
3.1 Chemical synthesis

2-nitrobenzyl methanesulfonate (2.4)



To a solution of 2-nitrobenzyl alcohol (1 eq., 500 mg, 3.27 mmol) and NEt₃ (1.5 eq., 680 μ L, 4.9 mmol) in DCM (4 mL) cooled to 0°C, a solution of MsCl (1.2 eq., 303 μ L, 3.92 mmol) in DCM (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 1h at 0°C. The solvent was removed under vacuum and the crude was dissolved in EtOAc, washed 3 times with a 10% aqueous solution of HCl, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (x3) and brine (x3). The organic layer was then dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to get a white solid (713 mg, 3.08 mmol, 94%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.17 (dd, J = 8.2 Hz, 1.2 Hz, 1H) ; [7.81-7.68] (m, 2H) ; 7.56 (ddd, J = 8.2 Hz, 7.0 Hz, 1.9 Hz, 1H) ; 5.66 (s, 2H) ; 3.12 (s, 3H).

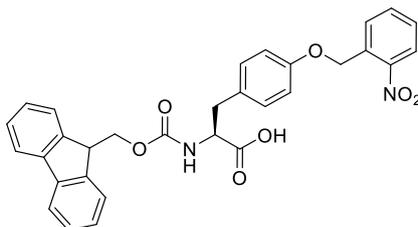
tert-butyl *N*-*tert*-butyl-*O*-(2-nitrobenzyl)-*L*-tyrosine ester (2.5)



To a solution of *tert*-butyl-*N*-*tert*-butyl-*L*-tyrosine ester (1 eq., 400 mg, 1.19 mmol) and K₂CO₃ (2 eq., 328 mg, 2.37 mmol) in DMF (10 mL) cooled down to 0°C and previously stirred during 10 min, tetrabutylammonium iodide (0.1 eq., 44 mg, 0.12 mmol) and a solution of **2.4** (2 eq., 548 mg, 2.37 mmol) in DMF (6 mL) were added. The reaction mixture was stirred for 1h at 0°C then for 48h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude was dissolved in EtOAc. The organic layer was washed with H₂O, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The crude was purified by silica gel column eluted with 0% to 1% of EtOAc in pentane (v/v) to get a colourless oil (550 mg, 1.16 mmol, 98%) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.33 (dd, J

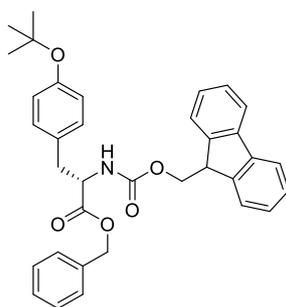
= 8.2 Hz, 1.3 Hz, 1H) ; 8.05 (dd, $J = 7.9$ Hz, 1.3 Hz, 1H) ; 7.84 (td, $J = 7.6$ Hz, 1.3 Hz, 1H) ; [7.72-7.60] (m, 1H) ; 7.27 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H) ; 7.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H) ; 5.63 (s, 2H) ; 5.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H) ; 4.58 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H) ; 3.17 (dd, $J = 6.1$ Hz, 3.4 Hz, 2H) ; 1.58 (d, $J = 6.2$ Hz, 18H).

***N*-{[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}-*O*-(2-nitrobenzyl)-L-tyrosine (2.6)**



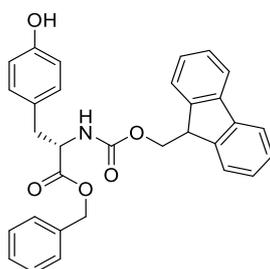
To a solution of **2.5** (1 eq., 550 mg, 1.16 mmol) in H₂O (1 mL), trifluoroacetic acid (7.7 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 3h at room temperature. The solvent was removed under vacuum to get a white which was dissolved in a 10% aqueous solution of NaHCO₃ (11.6 mL). Then a solution of Fmoc-N-hydroxysuccinimide ester (1.2 eq., 470 mg, 1.39 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 20h at room temperature. The solution was acidified with a 0.1 M aqueous solution of HCl until it reached pH 2 and the crude was extracted with EtOAc and purified by silica gel column eluted with 17% to 50% of EtOAc and 2% of AcOH in pentane (v/v/v) then by reverse phase semi-preparative HPLC eluted with a linear gradient of 5% to 95% of ACN(0.1% TFA, v/v) in H₂O(0.1% TFA, v/v) (v/v) to get a white solid (499 mg, 1.16 mmol, quant) **1H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.15 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.3 Hz, 1H) ; 7.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H) ; 7.75 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H) ; [7.68-7.60] (m, 1H) ; 7.55 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H) ; [7.49-7.43] (m, 1H) ; 7.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H) ; [7.32-7.27] (m, 2H) ; 7.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H) ; 6.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H) ; 5.43 (s, 2H) ; 5.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H) ; 4.67 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H) ; 4.47 (dd, $J = 10.4$ Hz, 7.0 Hz, 1H) ; 4.36 (dd, $J = 10.6$ Hz, 6.8 Hz, 1H) ; 4.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H) ; [3.24-3.00] (m, 2H).

***N*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl-*O*-*tert*-butoxy-L-tyrosine benzyl ester (2.11)**



To a solution of Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (1 eq., 250 mg, 0.54 mmol) in DMSO (1.3 mL), KHCO_3 (3.1 eq., 166 mg, 1.66 mmol), TBAI (0.21 eq., 42 mg, 0.11 mmol) and benzyl bromide (6 eq., 0.39 mL, 3.28 mmol) were added. The reaction mixture was then let stirred overnight at room temperature. The solution was quenched with water, diluted with EtOAc and washed successively with saturated aqueous solutions of NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and brine. The organic layer was then concentrated under vacuum and the crude was recrystallized from EtOAc to get the product as a white powder (239 mg, 0.44 mmol, 80%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H) ; 7.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), [7.42-7.28] (m, 10H), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.15 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 4.68 (q, $J = 6.1$ Hz, 1H), [4.44-4.32] (m, 3H) ; 4.20 (t, $J = 7$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 1.31 (s, 9H).

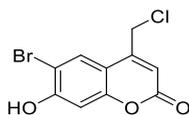
***N*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl-L-tyrosine benzyl ester (2.12)**



2.11 (1 eq., 285 mg, 0.52 mmol) was dissolved in HCl 4N/dioxane (3 mL) and stirred for 2h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under vacuum and lyophilized to get the desired compound as a white powder (240 mg, 0.49 mmol, 94%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 9.24 (s, 1H) ; 7.90 (dd, $J = 7.8$ Hz, 3.3 Hz, 3H), 7.66 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.41 (dt, $J = 7.5$ Hz, 1.6 Hz, 2H), [7.36-

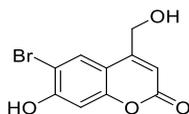
7.25] (m, 7H), [7.08-6.99] (m, 2H), [6.70-6.61] (m, 2H), 5.10 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), [4.30-4.13] (m, 4H), 2.95 (dd, $J = 13.8$ Hz, 5.5 Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 13.9$ Hz, 9.8 Hz, 1H).

6-bromo-4-(chloromethyl)-7-hydroxy-2H-chromen-2-one (2.14)



4-bromoresorcinol (1 eq., 1 g, 5.29 mmol) was dissolved in methanesulfonic acid (23.3 eq., 8 mL, 123.29 mmol). Methyl 4-chloroacetoacetate (1.48 eq., 0.92 mL, 7.82 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred for 2h at room temperature. The solution was then slowly poured into cold H₂O (24 mL) and let stirred for 30 min at room temperature. The resulting precipitate was then collected by filtration, washed with cold water and purified by recrystallization with pentane and EtOAc to get the product as a beige solid (1.09 g, 3.76 mmol, 71%). %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.56 (s, 1H) ; 8.00 (s, 1H) ; 6.92 (s, 1H) ; 6.48 (s, 1H) ; 5.00 (s, 1H).

6-bromo-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (2.15)

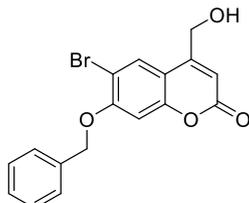


Method A: A suspension of **2.14** (1 eq., 1 g, 3.45 mmol) in H₂O (250 mL) was refluxed over 2 days. The reaction mixture was cooled to room temperature, concentrated under vacuum and the resulting solid was triturated with a mixture of n-heptane/Et₂O (2/1, v/v) (6 mL) to get the product as a beige/brown solid (930 mg, 3.77 mmol, 99%)

Method B: A suspension of **2.14** (1 eq., 500 mg, 1.73 mmol) in H₂O (4.5 mL) was heated under microwave assistance at 180°C during 30 min then cooled to room temperature. Water was removed under vacuum and the resulting solid was triturated with a mixture of n-heptane/Et₂O (2/1, v/v) to get the product as a brown solid (382.2mg, 1.41 mmol, 82%).

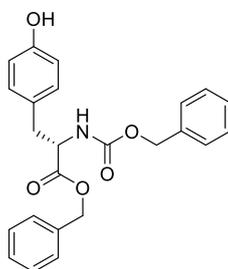
¹H NMR (400 MHz, MeOD) (AL0080): δ (ppm) 7.81 (s, 1H) ; 6.84 (s, 1H) ; 6.38 (t, J = 1.53 Hz, 1H) ; 4.77 (t, J = 1.51 Hz, 2H) ; (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.40 (s, 1H) ; 7.84 (s, 1H) ; 6.90 (s, 1H) ; 6.27 (t, J = 1.6 Hz, 1H) ; 5.62 (t, J = 5.5 Hz, 1H) ; 4.70 (dd, J = 5.5 Hz, 1.6 Hz, 2H).

7-(benzyloxy)-6-bromo-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (2.16)



To a suspension of **2.15** (1 eq., 430 mg, 1.59 mmol) in acetone (19.8 mL), K_2CO_3 (1.75 eq., 383 mg, 2.78 mmol) and benzyl bromide (1.5 eq., 0.28 mL, 2.38 mmol) were added and the reaction mixture was refluxed (60°C) overnight. Then K_2CO_3 (1 eq., 220 mg, 1.59 mmol) and benzyl bromide (1eq., 0.19 mL, 1.59 mmol) were added to the reaction mixture which was refluxed for 1h. The reaction mixture was filtered under vacuum while hot and the solvent was removed under vacuum. The crude was then purified by silica gel column eluted with 1% of MeOH in DCM (v/v) to get the product as a beige solid (303 mg, 0.84 mmol, 53%). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.81 (s, 1H) ; 6.84 (s, 1H) ; 6.38 (t, 1H, J = 1.5 Hz) ; 4.77 (t, 2H, J = 1.5 Hz)

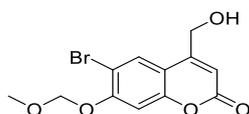
N-benzyloxycarbonyl-L-tyrosine benzyl ester (2.19)



To a vigorously stirring suspension of *N*-benzyloxycarbonyl-L-tyrosine (1 eq., 1 g, 3.17 mmol) and $NaHCO_3$ (1.99 eq., 0.529 g, 6.3 mmol) in DMF (50 mL), benzyl bromide (5 eq., 1.9 mL, 15.9 mmol) was added. The reaction mixture was then stirred at room temperature during 20h30. Iced water (50 mL) was added and the product was extracted

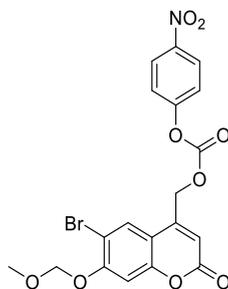
with EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with water (50 mL) and brine (50 mL) then dried over Na₂SO₄ and co-evaporated with n-hexane to get a yellowish oil. The crude was then purified by silica gel column eluted with 10% to 40% of EtOAc in n-heptane(v/v) to get the product as a white powder (1.15 g, 2.84 mmol, 89%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.34 (tdd, J = 12.3 Hz, 7.0, 3.5 Hz, 10H) ; 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 2H) ; 6.64 (d, J = 8.5 Hz, 2H) ; [5.31-4.97] (m, 4H) ; 4.66 (dt, J = 8.2 Hz, 5.8 Hz, 1H) ; [3.12-2.94] (m, 2H).

6-bromo-4-(hydroxymethyl)-7-(methoxymethoxy)-2H-chromen-2-one (2.20)



A solution of 2.15 (1 eq., 800 mg, 2.95 mmol) in dry DCM (18 mL) was cooled down to 0°C. Then DIPEA (1.1 eq., 0.54 mL, 3.25 mmol) and chloro(methoxy)methane (1.2 eq., 67 μL, 0.88 mmol) were added. The reaction mixture was then stirred at 0°C for 2h. The mixture was poured into 0.5 M aqueous solution of citric acid and extracted with CHCl₃. The combined organic layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed under vacuum and the crude was triturated with n-heptane to get a beige solid (870 mg, 2.76 mmol, 94%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.94 (s, 1H) ; 7.25 (s, 1H) ; 6.36 (t, J = 1.6 Hz, 1H) ; 5.66 (t, J = 5.5 Hz, 1H) ; 5.42 (s, 1H) ; 4.72 (dd, J = 5.5 Hz, 1.6 Hz, 2H) ; 3.42 (s, 1H).

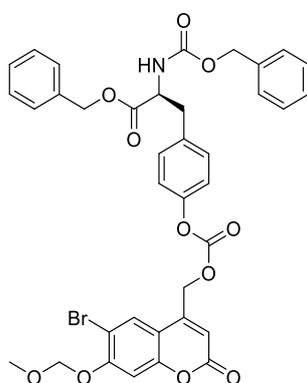
(6-bromo-7-(methoxymethoxy)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl-(4-nitrophenyl) carbonate (2.21)



To a solution of 2.20 (1 eq., 500 mg, 1.59 mmol) and 4-nitrophenylchloroformate (4 eq., 1.59 g, 6.35 mmol) in dry DCM (15 mL) cooled down to 0°C, DIPEA (5 eq., 1.3 mL,

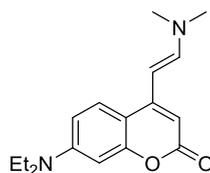
7.93 mmol) was added. The reaction mixture was then stirred for 3h at room temperature. The mixture was washed with 0.1M aqueous solution of HCl (3x) then brine and recrystallized with pentane and EtOAc to get a beige solid (564 mg, 1.17 mmol, 74%). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.36 (dt, *J* = 9.2 Hz, 2.1 Hz, 2H) ; 8.11 (s, 1H) ; 7.66 (dt, *J* = 9.3 Hz, 2.1 Hz, 2H) ; 7.32 (s, 1H) ; 6.51 (s, 1H) ; 5.59 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H) ; 5.46 (s, 2H) ; 3.44 (s, 1H).

***N*-(benzyloxycarbonyl)-*O*-((((6-bromo-7-(methoxymethoxy)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-tyrosine benzyl ester (2.22).**



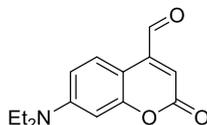
To a solution of **2.21** (1 eq., 50 mg, 0.095 mmol) and **2.19** (1.1 eq., 42 mg, 0.104 mmol) in a mixture of DCM/ACN (1/1, v/v) (4 mL), DMAP (1 eq., 11.6 mg, 0.0947 mmol) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature then DIPEA (3.6 eq., 60 μL, 0.344 mmol) was added and the reaction was stirred for 2h at room temperature. The mixture was diluted with DCM then washed with 0.5 M aqueous solution of citric acid and brine. The crude was purified by silica gel column treated with NEt₃ and eluted with 0% to 1% of MeOH in DCM (v/v) to get a white solid (63 mg, 0.084 mmol, 89%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.71 (s, 1H) ; 7.34 (tq, *J* = 11.0 Hz, 3.5 Hz, 13H) ; 7.19 (s, 1H), [7.07-6.95] (m, 4H) ; 6.48 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H) ; 5.37 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H) ; 5.33 (s, 2H) ; 5.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H) ; [5.15-5.07] (m, 4H) ; 4.70 (q, *J* = 8.2 Hz, 1H) ; 3.53 (s, 3H), [3.20-3.04] (m, 2H) **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.08, 159.83, 156.59, 155.58, 154.29, 152.91, 149.92, 146.94, 136.19, 134.96, 133.98, 130.58, 128.72, 128.69, 128.67, 128.55, 128.25, 128.15, 127.49, 120.85, 112.22, 112.05, 108.71, 104.18, 95.21, 67.41, 67.06, 64.73, 56.74, 54.73, 37.52 **HRMS** (ESI) calculated for C₃₇H₃₃BrNO₁₁ [M+H]⁺: 746.1237, found : 746.1229

(E)-7-*N,N*-(diethylamino)-4-(2-(dimethylamino)vinyl)-2H-chromen-2-one (2.26)



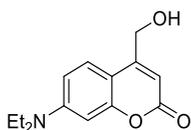
To a solution of 7-*N,N*-(diethylamino)-4-methyl-2H-chromen-2-one (1 eq., 1 g, 4.32 mmol) in DMF (10 mL), DMF/DMA (2 eq., 1.2 mL, 8.65 mmol) was added. The reaction mixture was then refluxed overnight. The solvent was removed under vacuum. The crude was diluted in DCM, washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃ then dried over Na₂SO₄ and purified by silica gel column eluted with 30% of EtOAc in DCM (v/v) to get a brown solid (1 g, 3.49 mmol, 81%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.59 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H) ; 7.28 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H) ; 6.61 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H) ; 6.54 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H) ; 5.91 (s, 1H) ; 5.28 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H) ; 3.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H) ; 3.05 (s, 5H) ; 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

7-*N,N*-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde (2.27)



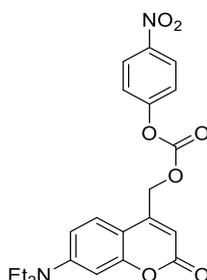
To a solution of **2.26** (1 eq., 1 g, 3.49 mmol) in a mixture of THF/H₂O (1/1, v/v) (8 mL), NaIO₄ (3 eq., 2.24 g, 10.48 mmol) was added. The reaction mixture was then stirred for 2h at room temperature. The precipitate was recovered by filtration and washed with EtOAc. It was then dissolved in DCM, washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃, dried over Na₂SO₄ and purified by silica gel column eluted with 30% EtOAc in pentane (v/v) to get a brown solid (553 mg, 2.25 mmol, 65%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 10.02 (s, 1H) ; 8.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H) ; 6.63 (dd, *J* = 9.2 Hz, 2.6 Hz, 1H) ; 6.52 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H) ; 6.45 (s, 1H) ; 3.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H) ; 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 7H).

7-*N,N*-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (2.28)



To a solution of **2.27** (1 eq., 553 mg, 2.25 mmol) in THF (6.3 mL) cooled down to 0°C, NaBH₄ (2 eq., 170 mg, 4.509 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 5h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude was dissolved in DCM. The solution was washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃ then dried over Na₂SO₄ and purified by silica gel column eluted with 50% of EtOAc in pentane (v/v) to get a yellow solid (452 mg, 1.83 mmol, 81%). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) (CM06-0078): δ (ppm) 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H) ; 6.67 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.6 Hz, 1H) ; 6.53 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H) ; [6.11-6.00] (m, 1H) ; 5.51 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H) ; 4.67 (dd, *J* = 5.6 Hz, *J* = 1.5 Hz, 2H) ; 3.42 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H) ; 1.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

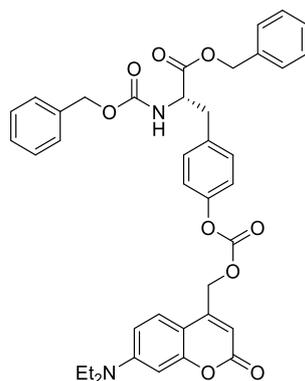
(7-*N,N*-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl-(4-nitrophenyl) carbonate (2.29).



To a suspension of **2.28** (1 eq., 265 mg, 1.072 mmol) in DCM (25 mL), pyridine (5 eq., 0.43 mL, 5.36 mmol) and 4-nitrophenylchloroformate (3eq., 648 mg, 3.21 mmol) were added and the reaction mixture was stirred for 18h at room temperature. Then DIPEA (5 eq., 0.89 mL, 5.36 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 2 days. The solution was washed with 1 M aqueous solution of NaHSO₄ then purified by silica gel column eluted with 0% to 1% of MeOH in DCM (v/v) to get a yellow solid (355 mg, 0.86 mmol, **80%**). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.31 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H) ; 7.42 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H) ; 7.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H) ; 6.61 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.6 Hz, 1H) ; 6.54 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H) ; 6.23 (t, *J* = 1.2 Hz, 1H) ; 5.40 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H) ; 3.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H) ; 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 161.53, 156.42, 155.24, 152.16, 150.89,

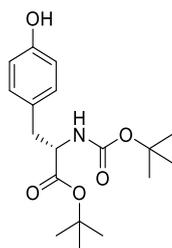
147.63, 125.42, 124.30, 121.73, 108.81, 107.04, 105.62, 97.99, 65.78, 44.82, 12.43 **HRMS** (ESI) calculated for C₂₁H₂₁N₂O₇ [M+H]⁺: 413.1349, found : 413.1357

***N*-(benzylxoycarbonyl)-*O*-(((7-*N,N*-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-tyrosine benzyl ester (2.30)**



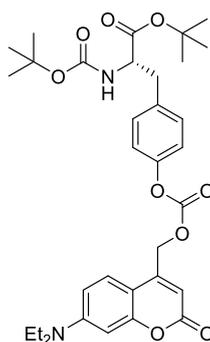
To a solution of **2.29** (1 eq., 310 mg, 0.75 mmol) and DIPEA (5 eq., 0.65 mL, 3.76 mmol) in DCM (30 mL), benzyl (2*S*)-2-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate (1.2 eq., 365 mg, 0.902 mmol) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted with DCM then washed with 0.1 M aqueous solution of HCl, 0.1 M aqueous solution of NaHCO₃ and brine. The crude was purified by silica gel column eluted with 0% to 1% of MeOH in DCM (v/v) to get a yellow solid (478 mg, 0.7 mmol, 94%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) [7.41-7.38] (m, 12H) ; 7.03 (q, J = 7.6 Hz, 4H) ; 6.60 (dd, J = 9.0 Hz, 2.6 Hz, 1H) ; 6.53 (d, J = 2.5 Hz, 1H) ; 6.22 (t, J = 1.3 Hz, 1H) ; 5.36 (d, J = 1.3 Hz, 2H) ; [5.20-5.06] (m, 5H) ; [4.72-4.63] (m, 1H) ; 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H) ; 3.07 (m, 2H) ; 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 171.23, 161.77, 155.92, 153.19, 150.09, 148.64, 148.28, 136.12, 135.00, 133.94, 130.65, 128.84, 128.81, 128.69, 128.42, 128.27, 125.03, 121.04, 112.13, 109.34, 108.99, 101.53, 77.48, 77.16, 76.84, 67.62, 67.36, 65.14, 54.89, 47.40, 37.60, 11.95, **HRMS** (ESI) calculated for C₃₉H₃₉N₂O₉ [M+H]⁺: 679.2656, found : 679.2657

***tert*-butyl-*N*-*tert*-butyl-L-tyrosine ester (2.33)**



To a solution of *N*-*tert*-butyl-L-tyrosine (1 eq., 2 g, 8.43 mmol) in a mixture of THF/H₂O (1/1, v/v) (20 mL), a solution of K₂CO₃ (2 eq., 2.33 g, 16.86 mmol) in H₂O (10 mL) was added followed by a solution of Boc₂O (1.1 eq., 2 g, 9.27 mmol) in THF (10 mL). The reaction mixture was stirred for 12h at room temperature. Then the organic solvent was removed under vacuum and the product was extracted with EtOAc. The crude was purified by silica gel column eluted with 20% of EtOAc in pentane (v/v) to get a white solid (2.73 g, 8.091 mmol, 96%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H) ; 6.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H) ; 5.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H) ; 4.40 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H) ; 2.96 (dd, *J* = 6.3 Hz, 3.4 Hz, 2H) ; 1.42 (s, 18H).

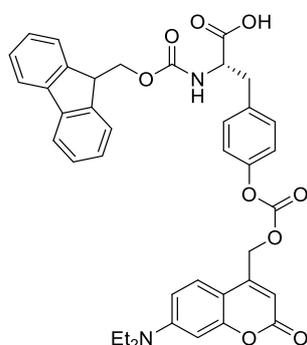
***tert*-butyl-*N*-*tert*-butyl-*O*-[(((7-*N,N*-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methoxy)carbonyl)-L-tyrosine ester (2.34)**



To a solution of **2.29** (1 eq., 300 mg, 0.73 mmol) in DCM (29 mL), **2.33** (1.2 eq., 294 mg, 0.87 mmol) and DIPEA (5 eq., 0.63 mL, 3.64 mmol) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature then it was diluted with DCM, washed with 0.1 M aqueous solution of HCl, 0.1 M aqueous solution of NaHCO₃ and brine. The crude was purified by silica gel column eluted with 0% to 1% of MeOH in DCM (v/v) to get a yellow solid (368 mg, 0.603 mmol, 83%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.37 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H) ; 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H) ; 7.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H) ; 6.65 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.6 Hz,

1H) ; 6.57 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H) ; 6.26 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H) ; 5.42 (d, $J = 1.3$ Hz, 2H) ; 5.13 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H) ; 4.50 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H) ; 3.47 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H) ; 3.12 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H) ; 1.48 (s, 9H) ; 1.45 (s, 8H) ; 1.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 170.90, 161.89, 156.28, 155.26, 153.35, 149.95, 148.51, 134.83, 130.80, 124.63, 120.86, 82.52, 80.09, 77.41, 77.16, 76.91, 65.29, 54.86, 45.59, 38.05, 28.44, 28.06, 12.39 HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 611.2969, found : 677.2970

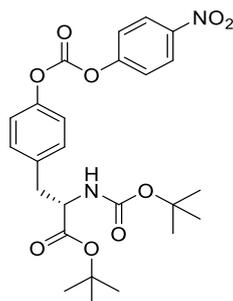
***N*-{[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}-*O*-[(((7-*N,N*-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-tyrosine (2.35)**



A solution of 2.34 (1 eq., 368 mg, 0.603 mmol) in TFA (6 mL) and H_2O (1.5 mL) was stirred for 3h at room temperature. The reaction mixture was diluted with DCM then washed with 0.1 M aqueous solution of HCl, 0.1 M aqueous solution of NaHCO_3 and brine. The crude was purified by silica gel column eluted with 0% to 1% of MeOH in DCM (v/v) to get a white solid which was dissolved in a 10% aqueous solution of NaHCO_3 (6 mL). Then a solution of Fmoc-*N*-hydroxysuccinimide ester (1.2 eq., 247 mg, 0.73 mmol) in dioxane (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 20h at room temperature. The mixture was then acidified with 0.1 M aqueous solution of HCl until the solution reach pH 2. The crude was extracted with EtOAc then purified by silica gel column eluted with 17% to 50% of EtOAc and 2% of AcOH in pentane (v/v/v) to get a yellow solid (279 mg, 0.41 mmol, 68%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 10.31 (s, 1H) ; 7.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H) ; 7.53 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H) ; 7.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H) ; 7.25 (ddd, $J = 15.4$ Hz, 7.7 Hz, 2.0 Hz, 3H) ; 7.15 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H) ; 7.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H) ; 6.57 (dd, $J = 9.0$ Hz, 2.6 Hz, 1H) ; 6.48 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H) ; 6.00 (s, 1H) ; 5.50 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H) ; [5.38-5.21] (m, 2H) ; 4.66 (s, 1H) ; 4.44 (dd, $J = 10.7$ Hz, 7.1 Hz, 1H) ; 4.34 (dd, $J = 10.6$ Hz, 6.7 Hz, 1H) ; 4.16 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H) ; 3.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H) ; 3.13 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H) ; 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H) ^{13}C

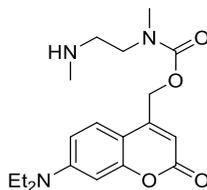
NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 156.03, 150.84, 150.19, 149.02, 143.67, 141.37, 130.68, 127.76, 127.10, 125.09, 125.02, 124.19, 121.00, 120.01, 109.33, 105.66, 105.53, 98.00, 66.91, 65.17, 47.22, 44.92, 12.38. **HRMS** (ESI) calculated for C₃₉H₃₆N₂O₉ [M+H]⁺ : 677.2421, found : 677.2515

***tert*-butyl-*N*-*tert*-butyl-*O*-[(4-nitrophenoxy)carbonyl]-*L*-tyrosine ester (2.36)**



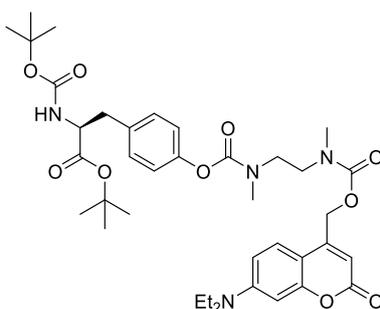
To a solution of **2.33** (1 eq., 200 mg, 0.59 mmol) and DIPEA (5 eq., 0.49 mL, 2.96 mmol) in dry DCM (4.8 mL) previously stirred during 15 min, a solution of 4-nitrophenyl chloroformate (2.5 eq., 373 mg, 1.48 mmol) in dry DCM (7.2 mL) was added dropwise. The reaction mixture was then stirred for 1h at room temperature under argon. The solution was diluted with DCM and then washed with 0.1 M aqueous solution of HCl (x1), saturated aqueous solution of NaHCO₃ (until the yellow coloration disappeared) and brine (x1). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude was then purified by silica gel column eluted with 1% of EtOAc in n-heptane (v/v) to get the desired product as a pale yellow oil (230 g, 0.46 mmol, 79%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.31 (dt, J = 9.1 Hz, 2.1 Hz, 2H) ; 7.48 (dt, J = 9.1 Hz, 2.1 Hz, 2H) ; [7.26-7.19] (m, 4H) ; 5.05 (d, J = 8.1 Hz, 1H) ; 4.45 (q, J = 6.7 Hz, 1H) ; [3.08-3.06] (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.40 (s, 9H) **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.87, 155.40, 155.24, 151.12, 149.73, 145.74, 135.32, 130.90, 125.52, 121.87, 120.67, 82.53, 80.06, 77.48, 77.16, 76.84, 54.91, 38.12, 28.42, 28.06. **HRMS** (ESI) calculated for C₂₅H₃₁NaN₂O₉ [M+Na]⁺: 525.1849, found : 525.1851

[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methyl-N-methyl-N-[2-(methylamino)ethyl]carbamate (2.37)



To a solution of *N,N'*-dimethylethylenediamine (1.48 eq., 19 μ L, 0.18 mmol) in THF (1.5 mL) cooled to 0°C, a solution of **2.29** (1 eq., 50 mg, 0.12 mmol) in DCM (1.5 mL) was added dropwise. The mixture was then stirred for 2h in an ice bath. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc (3x). The organic layer was then dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to get the product as a yellow oil (36 mg, 0.104 mmol, 91%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H) ; 6.57 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.6 Hz, 1H) ; 6.50 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H) ; 6.12 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H) ; 5.25 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H) ; 3.45 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H) ; 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H) ; 3.01 (d, *J* = 11.5 Hz, 3H) ; 2.78 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H) ; 2.45 (d, *J* = 12.5 Hz, 3H) ; 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

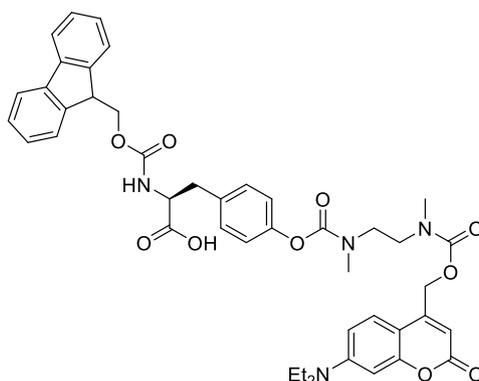
***tert*-butyl *N*-*tert*-butyl-*O*-[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methyl-*N*-methyl-*N*-[2-(methylamino)ethyl]carbamate)carbonyl]-L-tyrosine ester (2.38)**



2.37 (1 eq., 18 mg, 0.052 mmol), DIPEA (1.97 eq., 17 μ L, 0.102 mmol) and DMAP (0.99 eq., 6.2 mg, 0.051 mmol) were dissolved in dry DCM (1 mL) and cooled at 0°C. The reaction mixture was stirred for 10 min before a solution of **2.36** (1 eq., 18 mg, 0.052 mmol) in dry DCM (1 mL) was added dropwise. The reaction was then stirred for 6h at room temperature and protected from light. The solution was diluted with DCM and washed with 0.1 M aqueous solution of HCl (x1), saturated aqueous solution of NaHCO₃ (until the yellow coloration disappeared) and brine (x1). The organic layer was dried over

Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude was then purified by silica gel column eluted with 60% of EtOAc in n-heptane (v/v) to get the desired compound as a pale yellow oil (19 mg, 0.026 mmol, 51%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.30 (m, 1H) ; 7.14 (dt, *J* = 8.4 Hz, 1.8 Hz, 2H) ; [7.03-7.00] (m, 2H) ; 6.56 (dd, *J* = 10.5 Hz, 2.0 Hz, 1H) ; [6.50-6.48] (m, 1H) ; [6.10-6.06] (m, 1H) ; [5.27-5.23] (m, 2H) ; 4.97(d, *J* = 8.8 Hz, 1H) ; 4.41 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H) ; [3.62-3.51] (m, 4H) ; 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H) ; 3.13 (s, 1H) ; [3.07-3.02] (m, 6H) ; 2.99 (s, 1H) ; 1.41 (s, 9H) ; 1.40 (s, 9H) ; 1.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 171.17, 170.89, 162.03, 161.96, 156.30, 155.72, 155.56, 155.34, 155.18, 155.01, 154.85, 154.67, 154.57, 150.76, 150.38, 133.69, 133.52, 130.41, 125.08, 124.60, 124.46, 124.42, 122.31, 121.66, 121.54, 108.76, 106.24, 106.10, 106.04, 105.87, 97.85, 82.16, 79.72, 77.41, 77.16, 76.91, 62.78, 62.71, 62.55, 60.43, 54.89, 47.60, 47.53, 47.35, 46.95, 46.90, 46.85, 46.37, 44.79, 37.74, 35.70, 35.55, 35.43, 35.35, 35.32, 35.03, 34.82, 30.97, 29.75, 28.38, 28.03, 22.74, 21.10, 14.26, 14.17, 12.50 **HRMS** (ESI) calculated for C₃₈H₅₃N₄O₁₀ [M+H]⁺: 725.3762, found : 725.3788.

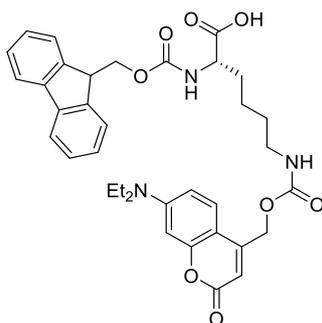
***N*-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*[(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl-*N*-methyl-*N*-[2-(methylamino)ethyl]carbamate)carbonyl]-*L*-tyrosine (2.39)**



To a solution of **2.38** (1 eq., 70 mg, 0.097 mmol) in DCM (3.6 mL), TFA (3.7 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature under dark for 3h. The solvents were removed under vacuum and the resulting pale red oil was resuspended in a 10% aqueous solution of NaHCO₃ (0.97 mL). Then, a solution of Fmoc-*N*-hydroxysuccinimide ester (1.2 eq., 39 mg, 0.12 mmol) in dioxane (0.5 mL) was added and the reaction was stirred overnight at room temperature and protected from light. The

solution was diluted with water and acidified with a 1 M aqueous solution of HCl to pH 2. The mixture was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude was then purified by silica gel column eluted with 70% of EtOAc and 2% of AcOH in n-heptane (v/v/v) to get the desired compound as a pale yellow solid (73.5 mg, 0.093 mmol, 96%). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H) ; 7.72 (dd, *J* = 8.9 Hz, 3.7 Hz, 1H) ; 7.65 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H) ; 7.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H) ; [7.43-7.35] (m, 3H) ; 7.29 (p, *J* = 7.9 Hz, 2H) ; 7.24 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H) ; 6.98 (td, *J* = 10.1 Hz, 5.5 Hz, 2H) ; 6.62 (dd, *J* = 9.1 Hz, 2.5 Hz, 1H) ; [6.57-6.48] (m, 1H) ; [5.96-5.92] (m, 1H), [5.25-5.15] (m, 2H) ; [4.21-4.14] (m, 4H) ; [3.55-3.46] (m, 4H) ; [3.41-3.35] (m, 4H) ; [3.09-2.83] (m, 8H) ; 1.09 (td, *J* = 7.0 Hz, 3.3 Hz, 6H) **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ (ppm) 173.29, 160.65, 158.84, 158.53, 158.23, 157.93, 155.97, 155.80, 155.00, 151.31, 150.97, 150.40, 149.83, 143.80, 143.75, 140.68, 134.75, 129.84, 127.60, 127.05, 125.31, 125.22, 121.44, 120.05, 118.59, 116.29, 114.00, 111.70, 108.78, 105.37, 104.73, 96.92, 65.64, 62.37, 62.25, 62.07, 55.50, 46.59, 46.18, 44.01, 40.11, 40.02, 39.95, 39.85, 39.78, 39.69, 39.61, 39.52, 39.44, 39.35, 39.19, 39.02, 35.75, 34.98, 34.79, 34.62, 34.15, 34.01, 12.26. **HRMS** (ESI) calculated for C₄₄H₄₇N₄O₁₀ [M+H]⁺: 791.3292, found : 791.3286

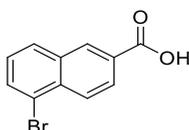
***N*-{[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}-*N'*-{[7-*N,N*-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy}carbonyl)-*L*-lysine (2.40)**



To a solution of **2.29** (1 eq., 254 mg, 0.62 mmol) in DCM (25 mL), *N*-Fmoc-*L*-lysine hydrochloride (1.25 eq., 311.7 mg, 0.77 mmol) and DIPEA (5 eq., 0.54 mL, 3.08 mmol) were added. The solution was stirred for 12h at room temperature. The reaction mixture was then concentrated under vacuum and the crude was purified by silica gel column eluted with 100% DCM to 100 % DCM with one drop of MeOH to get a pale yellow solid (400 mg, 0.62 mmol, quantitative). HPLC *t*_R = 5.48 min (220 nm, Method B) ; **¹H NMR**

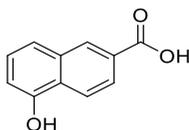
(400 MHz, DMSO- d_6) : δ (ppm) 12.56 (s, 1H) ; 7.90 (d, J = 7.5 Hz, 2H) ; 7.73 (d, J = 7.5 Hz, 2H) ; 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H) ; 7.53 (t, J = 5.7 Hz, 1H) ; 7.42 (t, J = 7.7 Hz, 3H) ; 7.33 (td, J = 7.5 Hz, 1.2 Hz, 2H) ; 6.68 (dd, J = 9.1 Hz, 2.6 Hz, 1H) ; 6.54 (d, J = 2.5 Hz, 1H) ; 5.97 (s, 1H) ; 5.20 (s, 2H) ; [4.32-4.15] (m, 3H) ; 3.92 (td, J = 8.9 Hz, 4.6 Hz, 1H) ; 3.43 (q, J = 7.0 Hz, 4H) ; 3.03 (q, J = 6.5 Hz, 2H) ; [1.79-1.53] (m, 2H), [1.53-1.25] (m, 4H) ; 1.12 (t, J = 7.0 Hz, 6H)
 $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12.78, 23.37, 29.37, 30.86, 44.46, 47.14, 54.23, 61.31, 66.06, 97.33, 104.96, 109.21, 120.57, 125.74, 125.77, 127.53, 128.10 **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 641.2815, found : 641.2817

5-bromo-2-naphthoic acid (2.46)



To a boiling solution of 2-naphthoic acid (1 eq., 2 g, 11.62 mmol) in AcOH (10 mL), bromine (1 eq., 600 μL , 11.68 mmol) containing iodine (0.017 eq., 10 μL , 0.2 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was then refluxed for 30 min. The mixture was then cooled to form a white precipitate which was recovered by filtration and washed with AcOH and H_2O . The crude was then recrystallized from MeOH to get a white solid (1.3 g, 5.18 mmol, 45%) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ (ppm) 8.66 (d, J = 1.7 Hz, 1H) ; 8.31 (d, J = 8.8 Hz, 1H) ; 8.18 (dd, J = 8.9 Hz, 1.7 Hz, 1H) ; 8.06 (d, J = 8.2 Hz, 1H) ; 7.96 (dd, J = 7.5 Hz, 1.1 Hz, 1H) ; 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H).

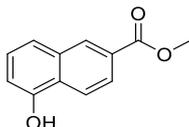
5-hydroxy-2-naphthoic acid (2.47)



2.46 (1 eq., 500 mg, 1.99 mmol), tetrabutylammonium hydroxide (190.8 eq., 9.5 mL, 380 mmol), Cu_2O (0.049 eq., 14 mg, 0.098 mmol) and 1,10-phenanthroline-4,7-diol (0.1 eq., 42 mg, 0.2 mmol) were dissolved in H_2O (5 mL). The reaction mixture was placed in a sealed tube and heated at 100°C for 72h. The mixture was acidified with 2 N aqueous solution of HCl until it reached pH 2-3. The crude was extracted with EtOAc and purified

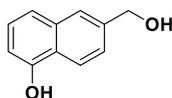
by silica gel column eluted with 10% of MeOH in DCM (v/v) to get a white solid (374 mg, 1.99 mmol, quant) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 13.05 (s, 1H) ; 10.36 (s, 1H) ; 8.50 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H) ; 8.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H) ; 7.91 (dd, $J = 8.8$ Hz, 1.7 Hz, 1H) ; 7.53 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H) ; [7.43-7.32] (m, 1H) ; 7.00 (dd, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H).

methyl 5-hydroxy-2-naphthoate (2.48)



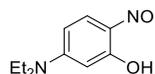
To a solution of **2.47** (1 eq., 376 mg, 2 mmol) in MeOH (17.6 mL) and cooled to -20°C, SOCl_2 (3 eq., 713 mg, 6 mmol) was added. The reaction was warmed to room temperature then refluxed for 19h. The solvent was removed under vacuum and the crude was dissolved in EtOAc then washed with brine and purified by silica gel column eluted with 30% of EtOAc in pentane (v/v) to get a brown solid (380 mg, 1.88 mmol, 94%) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) [8.61-8.52] (m, 1H) ; 8.25 (dt, $J = 8.8$ Hz, 0.8 Hz, 1H) ; 8.06 (dd, $J = 8.8$ Hz, 1.7 Hz, 1H) ; 7.54 (dt, $J = 8.4$ Hz, 0.9 Hz, 1H) ; 7.37 (dd, $J = 8.3$ Hz, 7.5 Hz, 1H) ; 6.95 (dd, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H) ; 3.99 (s, 4H).

6-(hydroxymethyl)naphthalen-1-ol (2.44)



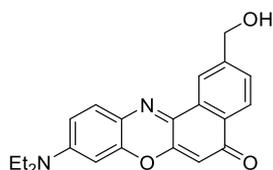
To a solution of **2.48** (1 eq., 341 mg, 1.69 mmol) in THF (28 mL) cooled at 0°C, LiAlH_4 (2 eq., 3.3 mL, 3.37 mmol) was added over a period of 15 min. The reaction was warmed to room temperature then stirred for 5h. The mixture was cooled to 0°C and 128 μL of H_2O then 128 μL of a 15% aqueous solution of NaOH and 383 μL of H_2O were successively added. The suspension was then filtered to get a green solid (294 mg, 1.69 mmol, quant) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) : δ (ppm) 8.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H) ; 7.59 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H) ; 7.24 (dd, $J = 8.6$ Hz, 1.7 Hz, 1H) ; 7.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H) ; 6.97 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H) ; 6.70 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H) ; 4.62 (s, 2H).

5-(diethylamino)-2-nitrosophenol (2.43)



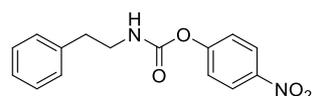
To a solution of 3-diethylaminophenol (1 eq., 1 g, 6.05 mmol) in ACN (20 mL), *tert*-butyl nitrite (1.2 eq, 750 mg, 7.26 mmol) was added and the reaction was stirred at 70°C for 30min. The mixture was cooled down to room temperature and the solvent was removed under vacuum to get a brown solid (1.17 g, 6.02 mmol, quant) **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.31 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H) ; 6.53 (dd, *J* = 9.9 Hz, 2.5 Hz, 1H) ; 5.66 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H) ; 3.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H) ; 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H).

9-(diethylamino)-2-(hydroxymethyl)-5H-benzo[*a*]phenoxazin-5-one (2.42)



A solution of **2.43** (1.1 eq., 61 mg, 0.32 mmol) and **2.44** (1 eq., 50 mg, 0.29 mmol) in DMF (6.6 mL) was refluxed for 5h. The solvent was removed under vacuum and the crude was purified by silica gel column eluted with 60% of EtOAc in pentane (v/v) then by reverse phase semi-preparative HPLC eluted with a linear gradient of 5% to 95% of ACN(0.1% TFA, v/v) in H₂O(0.1% TFA, v/v) (v/v) to get a purple solid (6 mg, 0.017 mmol, 6%) **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.55 (s, 1H) ; 8.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) ; 7.65 (dd, *J* = 11.4 Hz, 8.4 Hz, 2H) ; 6.85 (dd, *J* = 9.1 Hz, 2.7 Hz, 1H) ; 6.69 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H) ; 6.29 (s, 1H) ; 4.73 (s, 2H) ; 3.52 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) ; 1.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

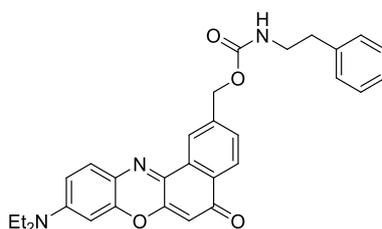
4-nitrophenyl-N-(2-phenylethyl)carbamate (2.51).



To a solution of phenethylamine (1.1 eq., 288 mg, 2.38 mmol) in DCM (12 mL), 4-nitrophenylchloroformate (1 eq., 528 mg, 2.62 mmol) and pyridine (1.1 eq, 210 μL, 2.62 mmol) were added and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was

then washed successively with H₂O, 1 M aqueous solution of HCl and 1 M aqueous solution of NaOH. The crude was purified by silica gel column eluted with 100% DCM to get a white solid (321 mg, 1.12 mmol, 47%) **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.22 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H) ; [7.41-7.17] (m, 7H) ; 5.13 (s, 1H) ; 3.56 (td, *J* = 6.9 Hz, 6.0 Hz, 2H) ; 2.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H).

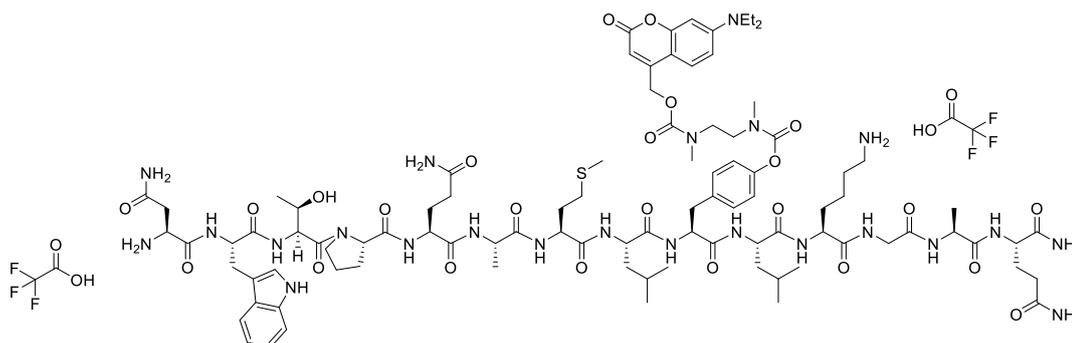
(9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)methyl phenethylcarbamate (2.52).



A solution of **2.42** (1.15 eq., 9 mg, 0.028 mmol), **2.51** (1 eq., 6.4 mg, 0.022 mmol) and DIEA (5 eq., 20 μL, 0.11 mmol) in DCM (1 mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with DCM then washed successively with 0.1 M aqueous solution of HCl, 0.1 M aqueous solution of NaHCO₃ and brine. The crude was purified by silica gel column eluted with 0.1% of MeOH in DCM (v/v) then by reverse phase semi-preparative HPLC eluted with a linear gradient of 5% to 95% of ACN(0.1% TFA, v/v) in H₂O(0.1% TFA, v/v) (v/v) to get a purple solid (0.4 mg, 0.8 μmol, 3%) **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) ; 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H) ; 7.50 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H) ; 7.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H) ; 7.19 (tt, *J* = 7.2, 1.4 Hz, 1H) ; 6.85 (dd, *J* = 9.1 Hz, 2.7 Hz, 1H) ; 6.69 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H) ; 6.30 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H) ; 3.51 (q, *J* = 7.2 Hz, 5H) ; 3.25 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H) ; 2.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H) ; 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 7H). **HRMS** (ESI) calculated for C₃₀H₃₀N₃O₄ [M+H]⁺: 496.2236, found : 496.2266

purified following **General method for peptide purification** to get a white powder (1.2 mg, 1%). **HPLC** t_R = 4.28 min (>95% purity at 220 and 254 nm, Method B), 9.75 min (Method C). **HRMS** (ESI) calculated for $C_{89}H_{131}N_{21}O_{23}S$ $[M+2H]^{2+}/2$: 946.9724, found: 946.9717

NWTPQAMLY(linker-DEACM)LKGAQ, 2 TFA (LIT-01-453)



Starting from 0.25 mmol Rink amide Resin (0.4 mmol.g^{-1}), L-K-G-C(Trt)-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for automated solid phase peptide synthesis** then N(Trt)-W(Boc)-T(Boc)-P(Boc)-Q(Trt)-A-M-L-Y(linker-DEACM)-L-K(Boc)-G-A-Q(Trt)-Rink amide sequence was synthesized following **General method for manual solid phase peptide synthesis**. The peptide was cleaved of the resin according to the **General method for cleavage and deprotection (Method B)** and purified following **General method for peptide purification** to get a white powder (7.3 mg, 10%). **HPLC** t_R = 3.93 min (>95% purity at 220 and 254 nm, Method B), 9.03 min (Method C) **HRMS** (ESI) calculated for $C_{94}H_{142}N_{23}O_{24}S$ $[M+3H]^{3+}/3$: 669.6773, found: 669.6787

3.3 Photocleavage of photocaged peptides

Method A: Stock solutions of 10 mM photocage spexins in DMSO analytical grade were prepared. Then 5 μL of this stock solution was diluted in 995 μL HEPES physiological buffer (10 mM HEPES, 0.4 mM NaH_2PO_4 , 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl_2 , 1.25 mM CaCl_2 , 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, pH = 7.4) containing 1% (W/V) of Bovine Serum Albumin (BSA). This 50 μM solution was then transferred in a 1 mL quartz cuvette then placed at 5 cm from a UV lamp (VL-6.LC, n°18101512, 6W, 230 Volts, 50/60 Hz) and irradiated at 365 nm during a define time.

Method B: Stock solutions of 10 mM photocage spexins in DMSO analytical grade were prepared. Then 10 μ L of this stock solution was diluted in 1990 μ L HEPES physiological buffer (10 mM HEPES, 0.4 mM NaH_2PO_4 , 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl_2 , 1.25 mM CaCl_2 , 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, pH = 7.4) containing or not 1% (W/V) of Bovine Serum Albumin (BSA). This 50 μ M solution was then transferred in a 35 mm high glass bottom 81156 μ -dish (Ibidi®) then placed uncovered at 5 cm from a UV lamp ((VL-6.LC, n°18101512, 6W, 230 Volts, 50/60 Hz)) and irradiated at 365 nm during a define time.

Analytical HPLC analysis were performed before light exposition (t_0) and after different times of light exposure:

100 μ L of the 50 μ M sample were placed in a 1.5 mL plastic microtube then 100 μ L of ACN were added to precipitate BSA. After 1 min of vortex and centrifugation at 13000 rpm during 2 min on a 5415R centrifuge (Eppendorf) 150 μ L of the supernatant were transferred into an HPLC vial. Then 100 μ L were injected and analysis by analytical HPLC using method B or C (*see Chemical synthesis monitoring*).

3.4 Evaluation of the functional activity of photocaged peptides on GalR₂**

3.4.1 Cells preparation

HEK-SnapTag GalR₂ were treated with 10 μ L of 1 mM of Fluo-4AM (Molecular Probes) diluted in 5 mL of HEPES physiological buffer containing 1% BSA (W/V) previously heated at 37°C. After their incubation at 37°C for 1h, the cells were rinsed with 5 mL PBS and removed from the tissue culture cell dish using 2 mL of versene solution (5 mM of EDTA in PBS). The cells were then diluted with 8 mL of HEPES/1% BSA buffer and centrifuged at 1000 rpm during 5 min. The supernatant was then removed and the pellet was resuspended in HEPES/1% BSA buffer (volume depend of the initial confluence of the cells). They were then distributed in black 96-well plate (Greiner®, Ref 655090) using an 8-canal micropipette (100 μ L per well). The well plate was then centrifuged at 800 rpm during 5 min

** Performed by Valérie Utard & Rosine Fellmann-Clauss under the supervision of Dr. Frédéric Simonin (UMR7242, BSC)

3.4.2 Compounds preparation

Solutions of 10 mM photocaged spexine derivatives in DMSO analytical grade were prepared and then diluted in HEPES/1% BSA (10 mM HEPES, 0.4 mM NaH₂PO₄, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1% BSA (W/V), pH = 7.4) physiological buffer. Two series of each compounds were diluted at 50 μM, 10 μM, 2 μM, 400 nM, 80 nM, 16 nM and 3.2 nM concentrations. Only one series of compound was transferred into a transparent 96-well plate (100 μL per well) using an 8-canals micropipette and was exposed to 365 nm UV light using a VL-6.LC UV lamp (12W, 6W 365nm and 6W 254nm) during 30 or 60min. Then the other series of compounds was transferred into the same well plate (125 μL per well) using an 8-canals micropipette.

3.4.3 Measurement

The 96-well plates containing cells and compounds were placed in a reader-pipettor FlexStationIII (Molecular Devices) of the PCBIS platform (UMS3286, Illkirch) and pre-heated at 37°C for 5 min. Cells were excited at 488 nm and their fluorescence at 520 nm was measured over time at 37 °C. After 30 sec the compounds were added by the device for testing at 10 μM, 2 μM, 400 nM, 80 nM, 16 nM, 3.2 nM and 640 pM final concentrations. At the end of the kinetics, the cells were lysed with 150 μM digitonin in order to saturate the calcium probe.

3.4.4 Data analysis

Data analysis were performed on a KaleidaGraph software (SynergySoftware)

The basal mean values before addition of the agonists were deduced and the amplitude of response to each dose of agonist was normalized to the maximum fluorescence intensity of the well obtained after cell lysis. Finally, the amplitudes obtained after this normalization were plotted to obtain a dose/response curve that allowed us to calculate the EC₅₀ value of the compounds.

Bibliographie

- (1) *Terminology* / International Association for the Study of Pain. International Association for the Study of Pain (IASP). <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/> (accessed 2023-01-12).
- (2) Loeser, J. D.; Treede, R.-D. The Kyoto Protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* **2008**, *137* (3), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>.
- (3) *WHO Guidelines on the Pharmacological Treatment of Persisting Pain in Children with Medical Illnesses*; WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee; World Health Organization: Geneva, 2012.
- (4) Karcioglu, O.; Topacoglu, H.; Dikme, O.; Dikme, O. A Systematic Review of the Pain Scales in Adults: Which to Use? *Am J Emerg Med* **2018**, *36* (4), 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2018.01.008>.
- (5) Loeser, J. D.; Melzack, R. Pain: An Overview. *The Lancet* **1999**, *353* (9164), 1607–1609. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01311-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01311-2).
- (6) Breivik, H.; Eisenberg, E.; O'Brien, T. The Individual and Societal Burden of Chronic Pain in Europe: The Case for Strategic Prioritisation and Action to Improve Knowledge and Availability of Appropriate Care. *BMC Public Health* **2013**, *13*, 1229. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1229>.
- (7) Szewczyk, A. K.; Jamroz-Wiśniewska, A.; Haratym, N.; Rejdak, K. Neuropathic Pain and Chronic Pain as an Underestimated Interdisciplinary Problem. *Int J Occup Med Environ Health* **2022**. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01676>.
- (8) Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur. *Livre blanc de la douleur, Etat des lieux et propositions pour un système de santé éthique, moderne et citoyen*, Med-Line.; 2017.
- (9) Dahlhamer, J. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2018**, *67*. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>.
- (10) Kuner, R. Central Mechanisms of Pathological Pain. *Nat Med* **2010**, *16* (11), 1258–1266. <https://doi.org/10.1038/nm.2231>.
- (11) Swieboda, P.; Filip, R.; Prystupa, A.; Drozd, M. Assessment of Pain: Types, Mechanism and Treatment. *Ann Agric Environ Med* **2013**, *Spec no. 1*, 2–7.
- (12) Woolf, C. J.; Ma, Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* **2007**, *55* (3), 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.016>.
- (13) Kweon, H.-J.; Suh, B.-C. Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Therapeutic Targets for Neurological Diseases and Their Regulation. *BMB Rep* **2013**, *46* (6), 295–304. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.6.121>.
- (14) Basbaum, A. I.; Bautista, D. M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **2009**, *139* (2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
- (15) Zhang, M.; Wang, Y.; Geng, J.; Zhou, S.; Xiao, B. Mechanically Activated Piezo Channels Mediate Touch and Suppress Acute Mechanical Pain Response in Mice. *Cell Reports* **2019**, *26* (6), 1419–1431.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.056>.
- (16) Meyer, R. A.; Ringkamp, M.; Campbell, J. N.; Raja, S. N. Peripheral Mechanisms of Cutaneous Nociception; Elsevier, 2006; pp 3–34. <https://doi.org/10.1016/B0-443-07287-6/50006-0>.

- (17) Sherrington, C. S. Flexion-Reflex of the Limb, Crossed Extension-Reflex, and Reflex Stepping and Standing. *The Journal of Physiology* **1910**, *40* (1–2), 28–121. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1910.sp001362>.
- (18) Derderian, C.; Shumway, K. R.; Tadi, P. Physiology, Withdrawal Response. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
- (19) Rexed, B. The Cytoarchitectonic Organization of the Spinal Cord in the Cat. *J Comp Neurol* **1952**, *96* (3), 414–495. <https://doi.org/10.1002/cne.900960303>.
- (20) D’Mello, R.; Dickenson, A. H. Spinal Cord Mechanisms of Pain. *Br J Anaesth* **2008**, *101* (1), 8–16. <https://doi.org/10.1093/bja/aen088>.
- (21) Martyn, J. A. J.; Mao, J.; Bittner, E. A. Opioid Tolerance in Critical Illness. *N Engl J Med* **2019**, *380* (4), 365–378. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1800222>.
- (22) Corder, G.; Castro, D. C.; Bruchas, M. R.; Scherrer, G. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu Rev Neurosci* **2018**, *41*, 453–473. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061522>.
- (23) Apkarian, A. V.; Bushnell, M. C.; Treede, R.-D.; Zubieta, J.-K. Human Brain Mechanisms of Pain Perception and Regulation in Health and Disease. *Eur J Pain* **2005**, *9* (4), 463–484. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>.
- (24) Melzack, R.; Wall, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. *Science* **1965**, *150* (3699), 971–979. <https://doi.org/10.1126/science.150.3699.971>.
- (25) Heinricher, M. M.; Tavares, I.; Leith, J. L.; Lumb, B. M. Descending Control of Nociception: Specificity, Recruitment and Plasticity. *Brain Res Rev* **2009**, *60* (1), 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.009>.
- (26) Reynolds, D. V. Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. *Science* **1969**, *164* (3878), 444–445. <https://doi.org/10.1126/science.164.3878.444>.
- (27) Millan, M. J. Descending Control of Pain. *Progress in Neurobiology* **2002**, *66* (6), 355–474. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6).
- (28) Fields, H. L. Recent Advances in Research on Pain and Analgesia. *NIDA Res Monogr* **1983**, *45*, 3–18.
- (29) Vortherms, T. A.; Roth, B. L. Receptorome Screening for CNS Drug Discovery. *IDrugs* **2005**, *8* (6), 491–496.
- (30) Shang, Y.; Filizola, M. Opioid Receptors: Structural and Mechanistic Insights into Pharmacology and Signaling. *European Journal of Pharmacology* **2015**, *763*, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.012>.
- (31) Cook, S. P.; McCleskey, E. W. Cell Damage Excites Nociceptors through Release of Cytosolic ATP. *Pain* **2002**, *95* (1–2), 41–47. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(01\)00372-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(01)00372-4).
- (32) Paterson, K. J.; Zambreau, L.; Bennett, D. L. H.; McMahon, S. B. Characterisation and Mechanisms of Bradykinin-Evoked Pain in Man Using Iontophoresis. *Pain* **2013**, *154* (6), 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.01.003>.
- (33) Ren, K.; Dubner, R. Interactions between the Immune and Nervous Systems in Pain. *Nat Med* **2010**, *16* (11), 1267–1276. <https://doi.org/10.1038/nm.2234>.
- (34) Julius, D.; Basbaum, A. I. Molecular Mechanisms of Nociception. *Nature* **2001**, *413* (6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>.
- (35) Ji, R.-R.; Kohno, T.; Moore, K. A.; Woolf, C. J. Central Sensitization and LTP: Do Pain and Memory Share Similar Mechanisms? *Trends in Neurosciences* **2003**, *26* (12), 696–705. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.017>.
- (36) Corder, G.; Doolen, S.; Donahue, R. R.; Winter, M. K.; Jutras, B. L.; He, Y.; Hu, X.; Wieskopf, J. S.; Mogil, J. S.; Storm, D. R.; Wang, Z. J.; McCarter, K. E.; Taylor, B. K.

- Constitutive μ -Opioid Receptor Activity Leads to Long-Term Endogenous Analgesia and Dependence. *Science* **2013**, *341* (6152), 1394–1399. <https://doi.org/10.1126/science.1239403>.
- (37) Gerum, M.; Simonin, F. Behavioral Characterization, Potential Clinical Relevance and Mechanisms of Latent Pain Sensitization. *Pharmacol Ther* **2022**, *233*, 108032. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108032>.
- (38) Article L1110-5 - Code de la santé publique - Légifrance. https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006685747/2002-03-05 (accessed 2022-12-13).
- (39) Ventafridda, V.; Saita, L.; Ripamonti, C.; De Conno, F. WHO Guidelines for the Use of Analgesics in Cancer Pain. *Int J Tissue React* **1985**, *7* (1), 93–96.
- (40) Mattson, C. L. Trends and Geographic Patterns in Drug and Synthetic Opioid Overdose Deaths — United States, 2013–2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2021**, *70*. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7006a4>.
- (41) Chisholm-Burns, M. A.; Spivey, C. A.; Sherwin, E.; Wheeler, J.; Hohmeier, K. The Opioid Crisis: Origins, Trends, Policies, and the Roles of Pharmacists. *American Journal of Health-System Pharmacy* **2019**, *76* (7), 424–435. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxy089>.
- (42) Bockaert, J.; Philippe Pin, J. Molecular Tinkering of G Protein-Coupled Receptors: An Evolutionary Success. *The EMBO Journal* **1999**, *18* (7), 1723–1729. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1723>.
- (43) Alexander, S. P.; Davenport, A. P.; Kelly, E.; Marrion, N.; Peters, J. A.; Benson, H. E.; Faccenda, E.; Pawson, A. J.; Sharman, J. L.; Southan, C.; Davies, J. A.; Collaborators, C. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G Protein-Coupled Receptors. *British Journal of Pharmacology* **2015**, *172* (24), 5744–5869. <https://doi.org/10.1111/bph.13348>.
- (44) Foord, S. M.; Bonner, T. I.; Neubig, R. R.; Rosser, E. M.; Pin, J.-P.; Davenport, A. P.; Spedding, M.; Harmar, A. J. International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacol Rev* **2005**, *57* (2), 279–288. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.5>.
- (45) Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G-Proteins: A Short History. *British Journal of Pharmacology* **2006**, *147* (S1), S46–S55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>.
- (46) Congreve, M.; Graaf, C. de; Swain, N. A.; Tate, C. G. Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. *Cell* **2020**, *181* (1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.003>.
- (47) Weis, W. I.; Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87* (1), 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>.
- (48) Thal, D. M.; Glukhova, A.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. Structural Insights into G-Protein-Coupled Receptor Allostery. *Nature* **2018**, *559* (7712), 45–53. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0259-z>.
- (49) Wacker, D.; Stevens, R. C.; Roth, B. L. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **2017**, *170* (3), 414–427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.009>.
- (50) Faron-Górecka, A.; Szlachta, M.; Kolasa, M.; Solich, J.; Górecki, A.; Kuśmider, M.; Żurawek, D.; Dziejzicka-Wasylewska, M. Understanding GPCR Dimerization. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier, 2019; Vol. 149, pp 155–178. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.08.005>.

- (51) Smith, J. S.; Lefkowitz, R. J.; Rajagopal, S. Biased Signalling: From Simple Switches to Allosteric Microprocessors. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17* (4), 243–260. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.229>.
- (52) Jean-Charles, P.-Y.; Kaur, S.; Shenoy, S. K. G Protein–Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin–Dependent Mechanisms: *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **2017**, *70* (3), 142–158. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000482>.
- (53) Lohse, M. J.; Benovic, J. L.; Codina, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. β -Arrestin: A Protein That Regulates β -Adrenergic Receptor Function. *Science* **1990**, *248* (4962), 1547–1550. <https://doi.org/10.1126/science.2163110>.
- (54) Goodman, M.; Kossoy, A. Conformational Aspects of Polypeptide Structure. XIX. Azoaromatic Side-Chain Effects^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (21), 5010–5015. <https://doi.org/10.1021/ja00973a042>.
- (55) Luttrell, L. M.; Ferguson, S. S.; Daaka, Y.; Miller, W. E.; Maudsley, S.; Della Rocca, G. J.; Lin, F.; Kawakatsu, H.; Owada, K.; Luttrell, D. K.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Beta-Arrestin-Dependent Formation of Beta2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science* **1999**, *283* (5402), 655–661. <https://doi.org/10.1126/science.283.5402.655>.
- (56) Insel, P. A.; Wilderman, A.; Zambon, A. C.; Snead, A. N.; Murray, F.; Aroonsakool, N.; McDonald, D. S.; Zhou, S.; McCann, T.; Zhang, L.; Sriram, K.; Chinn, A. M.; Michkov, A. V.; Lynch, R. M.; Overland, A. C.; Corriden, R. G Protein–Coupled Receptor (GPCR) Expression in Native Cells: “Novel” EndoGPCRs as Physiologic Regulators and Therapeutic Targets. *Mol Pharmacol* **2015**, *88* (1), 181–187. <https://doi.org/10.1124/mol.115.098129>.
- (57) 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. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2106>.
- (58) Liu, Z.; Xu, Y.; Wu, L.; Zhang, S. Evolution of Galanin Receptor Genes: Insights from the Deuterostome Genomes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2010**, *28* (1), 97–106. <https://doi.org/10.1080/07391102.2010.10507346>.
- (59) Habert-Ortoli, E.; Amiranoff, B.; Loquet, I.; Laburthe, M.; Mayaux, J. F. Molecular Cloning of a Functional Human Galanin Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91* (21), 9780–9783. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9780>.
- (60) Howard, A. D.; Tan, C.; Shiao, L.-L.; Palyha, O. C.; McKee, K. K.; Weinberg, D. H.; Feighner, S. D.; Cascieri, M. A.; Smith, R. G.; Van Der Ploeg, L. H. T.; Sullivan, K. A. Molecular Cloning and Characterization of a New Receptor for Galanin. *FEBS Letters* **1997**, *405* (3), 285–290. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00196-8).
- (61) 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24612>.
- (62) Fathi, Z.; Battaglino, P. M.; Iben, L. G.; Li, H.; Baker, E.; Zhang, D.; McGovern, R.; Mahle, C. D.; Sutherland, G. R.; Iismaa, T. P.; Dickinson, K. E. J.; Antal Zimanyi, I. Molecular Characterization, Pharmacological Properties and Chromosomal Localization of the Human GALR2 Galanin Receptor. *Molecular Brain Research* **1998**, *58* (1–2), 156–169. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00116-8).

- (63) Borowsky, B.; Walker, M. W.; Huang, L.-Y.; Jones, K. A.; Smith, K. E.; Bard, J.; Branchek, T. A.; Gerald, C. Cloning and Characterization of the Human Galanin GALR2 Receptor. *Peptides* **1998**, *19* (10), 1771–1781. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00133-8).
- (64) Wang, S.; He, C.; Hashemi, T.; Bayne, M. Cloning and Expressional Characterization of a Novel Galanin Receptor: IDENTIFICATION OF DIFFERENT PHARMACOPHORES WITHIN GALANIN FOR THE THREE GALANIN RECEPTOR SUBTYPES. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (51), 31949–31952. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.31949>.
- (65) Kolakowski, L. F.; O'Neill, G. P.; Howard, A. D.; Broussard, S. R.; Sullivan, K. A.; Feighner, S. D.; Sawzdargo, M.; Nguyen, T.; Kargman, S.; Shiao, L.-L.; Hreniuk, D. L.; Tan, C. P.; Evans, J.; Abramovitz, M.; Chateauneuf, A.; Coulombe, N.; Ng, G.; Johnson, M. P.; Tharian, A.; Khoshbouei, H.; George, S. R.; Smith, R. G.; O'Dowd, B. F. Molecular Characterization and Expression of Cloned Human Galanin Receptors GALR2 and GALR3. *Journal of Neurochemistry* **2002**, *71* (6), 2239–2251. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71062239.x>.
- (66) Wang, S.; Hashemi, T.; Fried, S.; Clemmons, A. L.; Hawes, B. E. Differential Intracellular Signaling of the GalR1 and GalR2 Galanin Receptor Subtypes. *Biochemistry* **1998**, *37* (19), 6711–6717. <https://doi.org/10.1021/bi9728405>.
- (67) 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23321>.
- (68) Lang, R.; Gundlach, A. L.; Holmes, F. E.; Hobson, S. A.; Wynick, D.; Hökfelt, T.; Kofler, B. Physiology, Signaling, and Pharmacology of Galanin Peptides and Receptors: Three Decades of Emerging Diversity. *Pharmacol Rev* **2015**, *67* (1), 118–175. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006536>.
- (69) Pang, L.; Hashemi, T.; Lee, H.-J. J.; Maguire, M.; Graziano, M. P.; Bayne, M.; Hawes, B.; Wong, G.; Wang, S. The Mouse GalR2 Galanin Receptor: Genomic Organization, cDNA Cloning, and Functional Characterization. *Journal of Neurochemistry* **2002**, *71* (6), 2252–2259. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71062252.x>.
- (70) Wittau, N.; Grosse, R.; Kalkbrenner, F.; Gohla, A.; Schultz, G.; Gudermann, T. The Galanin Receptor Type 2 Initiates Multiple Signaling Pathways in Small Cell Lung Cancer Cells by Coupling to Gq, Gi and G12 Proteins. *Oncogene* **2000**, *19* (37), 4199–4209. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203777>.
- (71) Robinson, J.; Smith, A.; Sturchler, E.; Tabrizifard, S.; Kamenecka, T.; McDonald, P. Development of a High-Throughput Screening-Compatible Cell-Based Functional Assay to Identify Small Molecule Probes of the Galanin 3 Receptor (GalR3). *ASSAY and Drug Development Technologies* **2013**, *11* (8), 468–477. <https://doi.org/10.1089/adt.2013.526>.
- (72) Neumann, J.-M.; Couvineau, A.; Murail, S.; Lacapère, J.-J.; Jamin, N.; Laburthe, M. Class-B GPCR Activation: Is Ligand Helix-Capping the Key? *Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33* (7), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.05.001>.
- (73) Sollenberg, U. E.; Lundström, L.; Bartfai, T.; Langel, Ü. M871—A Novel Peptide Antagonist Selectively Recognizing the Galanin Receptor Type 2. *Int J Pept Res Ther* **2006**, *12* (2), 115–119. <https://doi.org/10.1007/s10989-005-9008-x>.
- (74) Swanson, C. J.; Blackburn, T. P.; Zhang, X.; Zheng, K.; Xu, Z.-Q. D.; Hökfelt, T.; Wolinsky, T. D.; Konkel, M. J.; Chen, H.; Zhong, H.; Walker, M. W.; Craig, D. A.; Gerald, C. P. G.; Branchek, T. A. Anxiolytic- and Antidepressant-like Profiles of the Galanin-3

- Receptor (Gal3) Antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (48), 17489–17494. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508970102>.
- (75) Reyes-Alcaraz, A.; Lee, Y.-N.; Yun, S.; Hwang, J.-I.; Seong, J. Y. Conformational Signatures in β -Arrestin2 Reveal Natural Biased Agonism at a G-Protein-Coupled Receptor. *Commun Biol* **2018**, *1* (1), 128. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0134-3>.
- (76) Lang, R.; Berger, A.; Santic, R.; Geisberger, R.; Hermann, A.; Herzog, H.; Kofler, B. Pharmacological and Functional Characterization of Galanin-like Peptide Fragments as Potent Galanin Receptor Agonists. *Neuropeptides* **2005**, *39* (3), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2004.12.015>.
- (77) Saar, K.; Mahlapuu, R.; Laidmäe, E.; Valkna, A.; Kahl, U.; Karelson, E.; Langel, U. Characterisation of a New Chimeric Ligand for Galanin Receptors: Galanin(1-13)-[D-Trp(32)]-Neuropeptide Y(25-36)Amide. *Regul Pept* **2001**, *102* (1), 15–19. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(01\)00298-1](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(01)00298-1).
- (78) Lundström, L.; Sollenberg, U.; Brewer, A.; Kouya, P. F.; Zheng, K.; Xu, X.-J.; Sheng, X.; Robinson, J. K.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Xu, Z.-Q.; Hökfelt, T.; Bartfai, T.; Langel, Ü. A Galanin Receptor Subtype 1 Specific Agonist. *Int J Pept Res Ther* **2005**, *11* (1), 17–27. <https://doi.org/10.1007/s10989-004-1717-z>.
- (79) 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. <https://doi.org/10.1007/s10989-009-9197-9>.
- (80) Runesson, J.; Saar, I.; Lundström, L.; Järv, J.; Langel, Ü. A Novel GalR2-Specific Peptide Agonist. *Neuropeptides* **2009**, *43* (3), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2009.04.004>.
- (81) Saar, I.; Runesson, J.; McNamara, I.; Järv, J.; Robinson, J. K.; Langel, Ü. Novel Galanin Receptor Subtype Specific Ligands in Feeding Regulation. *Neurochemistry International* **2011**, *58* (6), 714–720. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.02.012>.
- (82) Saar, I.; Runesson, J.; Järv, J.; Kurrikoff, K.; Langel, Ü. Novel Galanin Receptor Subtype Specific Ligand in Depression Like Behavior. *Neurochem Res* **2013**, *38* (2), 398–404. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0933-8>.
- (83) Liu, H.-X.; Brumovsky, P.; Schmidt, R.; Brown, W.; Payza, K.; Hodzic, L.; Pou, C.; Godbout, C.; Hökfelt, T. Receptor Subtype-Specific Pronociceptive and Analgesic Actions of Galanin in the Spinal Cord: Selective Actions via GalR1 and GalR2 Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98* (17), 9960–9964. <https://doi.org/10.1073/pnas.161293598>.
- (84) Saar, I.; Lahe, J.; Langel, K.; Runesson, J.; Webling, K.; Järv, J.; Rytönen, J.; Närvänen, A.; Bartfai, T.; Kurrikoff, K.; Langel, Ü. Novel Systemically Active Galanin Receptor 2 Ligands in Depression-like Behavior. *J. Neurochem.* **2013**, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/jnc.12274>.
- (85) Bartfai, T.; Lu, X.; Badie-Mahdavi, H.; Barr, A. M.; Mazarati, A.; Hua, X.-Y.; Yaksh, T.; Haberhauer, G.; Ceide, S. C.; Trembleau, L.; Somogyi, L.; Krock, L.; Rebeck, J. Galmic, a Nonpeptide Galanin Receptor Agonist, Affects Behaviors in Seizure, Pain, and Forced-Swim Tests. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (28), 10470–10475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403802101>.
- (86) Bloomquist, B. T.; Beauchamp, M. R.; Zhelnin, L.; Brown, S.-E.; Gore-Willse, A. R.; Gregor, P.; Cornfield, L. J. Cloning and Expression of the Human Galanin Receptor GalR2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, *243* (2), 474–479. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8133>.

- (87) Lu, X.; Lundström, L.; Langel, U.; Bartfai, T. Galanin Receptor Ligands. *Neuropeptides* **2005**, *39* (3), 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2004.12.012>.
- (88) 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 Journal of Neuroscience* **2000**, *12* (8), 2901–2917. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00184.x>.
- (89) Parker, E. M.; Izzarelli, D. G.; Nowak, H. P.; Mahle, C. D.; Iben, L. G.; Wang, J.; Goldstein, M. E. Cloning and Characterization of the Rat GALR1 Galanin Receptor from Rin14B Insulinoma Cells. *Molecular Brain Research* **1995**, *34* (2), 179–189. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00159-P](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00159-P).
- (90) O'Donnell, D.; Ahmad, S.; Wahlestedt, C.; Walker, P. Expression of the Novel Galanin Receptor Subtype GALR2 in the Adult Rat CNS: Distinct Distribution from GALR1. *Journal of Comparative Neurology* **1999**, *409* (3), 469–481. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990705\)409:3<469::AID-CNE10>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990705)409:3<469::AID-CNE10>3.0.CO;2-Q).
- (91) Sullivan, K. A.; Shiao, L.-L.; Cascieri, M. A. Pharmacological Characterization and Tissue Distribution of the Human and Rat GALR1 Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *233* (3), 823–828. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6542>.
- (92) Fathi, Z.; Cunningham, A. M.; Iben, L. G.; Battaglino, P. B.; Ward, S. A.; Nichol, K. A.; Pine, K. A.; Wang, J.; Goldstein, M. E.; Iismaa, T. P.; Zimanyi, I. A. Cloning, Pharmacological Characterization and Distribution of a Novel Galanin Receptor. *Molecular Brain Research* **1998**, *53* (1), 348. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00359-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00359-8).
- (93) Mennicken, F.; Hoffert, C.; Pelletier, M.; Ahmad, S.; O'Donnell, D. Restricted Distribution of Galanin Receptor 3 (GalR3) mRNA in the Adult Rat Central Nervous System. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **2002**, *12*.
- (94) Lang, R.; Gundlach, A.; Kofler, B. The Galanin Peptide Family: Receptor Pharmacology, Pleiotropic Biological Actions, and Implications in Health and Disease. *Pharmacology & Therapeutics* **2007**, *115* (2), 177–207. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.05.009>.
- (95) Freimann, K.; Kurrikoff, K.; Langel, Ü. Galanin Receptors as a Potential Target for Neurological Disease. *Expert Opin Ther Targets* **2015**, *19* (12), 1665–1676. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1072513>.
- (96) Fonseca-Rodrigues, D.; Almeida, A.; Pinto-Ribeiro, F. A New Gal in Town: A Systematic Review of the Role of Galanin and Its Receptors in Experimental Pain. *Cells* **2022**, *11* (5), 839. <https://doi.org/10.3390/cells11050839>.
- (97) Dong, Y.; Li, C.-Y.; Zhang, X.-M.; Liu, Y.-N.; Yang, S.; Li, M.-N.; Xu, S.-L. The Activation of Galanin Receptor 2 Plays an Antinociceptive Effect in Nucleus Accumbens of Rats with Neuropathic Pain. *J Physiol Sci* **2021**, *71* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12576-021-00790-5>.
- (98) Zhang, X.-Y.; Zhang, Y.-M.; Zhang, M.-L.; Yu, L.-C. Involvement of Galanin Receptor 2 and CaMKII in Galanin-Induced Antinociception in Periaqueductal Grey of Rats. *Neuroscience Letters* **2015**, *604*, 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.005>.
- (99) Kerekes, N.; Mennicken, F.; O'Donnell, D.; Hokfelt, T.; Hill, R. H. Galanin Increases Membrane Excitability and Enhances Ca²⁺ Currents in Adult, Acutely Dissociated

- Dorsal Root Ganglion Neurons. *Eur J Neurosci* **2003**, *18* (11), 2957–2966. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03057.x>.
- (100) Chen, S.-H.; Lue, J.-H.; Hsiao, Y.-J.; Lai, S.-M.; Wang, H.-Y.; Lin, C.-T.; Chen, Y.-C.; Tsai, Y.-J. Elevated Galanin Receptor Type 2 Primarily Contributes to Mechanical Hypersensitivity after Median Nerve Injury. *PLoS ONE* **2018**, *13* (6), e0199512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199512>.
- (101) Metcalf, C. S.; Klein, B. D.; McDougale, D. R.; Zhang, L.; Smith, M. D.; Bulaj, G.; White, H. S. Analgesic Properties of a Peripherally Acting and GalR2 Receptor–Preferring Galanin Analog in Inflammatory, Neuropathic, and Acute Pain Models. *J Pharmacol Exp Ther* **2015**, *352* (1), 185–193. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.219063>.
- (102) Lyu, C.; Xia, S.; Lyu, G.-W.; Dun, X.-P.; Zheng, K.; Su, J.; Barde, S.; Xu, Z.-Q. D.; Hökfelt, T.; Shi, T.-J. S. A Preliminary Study on DRGs and Spinal Cord of a Galanin Receptor 2-EGFP Transgenic Mouse. *Neuropeptides* **2020**, *79*, 102000. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.102000>.
- (103) Hulse, R. P.; Donaldson, L. F.; Wynick, D. Peripheral Galanin Receptor 2 as a Target for the Modulation of Pain. *Pain Research and Treatment* **2012**, *2012*, e545386. <https://doi.org/10.1155/2012/545386>.
- (104) Jimenez-Andrade, J. M.; Zhou, S.; Du, J.; Yamani, A.; Grady, J. J.; Castañeda-Hernandez, G.; Carlton, S. M. Pro-Nociceptive Role of Peripheral Galanin in Inflammatory Pain. *Pain* **2004**, *110* (1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.02.032>.
- (105) Hulse, R. P.; Wynick, D.; Donaldson, L. F. Activation of the Galanin Receptor 2 in the Periphery Reverses Nerve Injury-Induced Allodynia. *Mol Pain* **2011**, *7*, 1744–8069-7–26. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-26>.
- (106) Hobson, S.-A.; Holmes, F. E.; Kerr, N. C. H.; Pope, R. J. P.; Wynick, D. Mice Deficient for Galanin Receptor 2 Have Decreased Neurite Outgrowth from Adult Sensory Neurons and Impaired Pain-like Behaviour: Phenotypic Characterization of GalR2-MUT Mice. *Journal of Neurochemistry* **2006**, *99* (3), 1000–1010. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04143.x>.
- (107) Shi, T.-J. S.; Hua, X.; Lu, X.; Malkmus, S.; Kinney, J.; Holmberg, K.; Wirz, S.; Ceccatelli, S.; Yaksh, T.; Bartfai, T.; Hökfelt, T. Sensory Neuronal Phenotype in Galanin Receptor 2 Knockout Mice: Focus on Dorsal Root Ganglion Neurone Development and Pain Behaviour. *European Journal of Neuroscience* **2006**, *23* (3), 627–636. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04593.x>.
- (108) 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 Research* **2007**, *17* (3), 320–327. <https://doi.org/10.1101/gr.5755407>.
- (109) Sonmez, K.; Zaveri, N. T.; Kerman, I. A.; Burke, S.; Neal, C. R.; Xie, X.; Watson, S. J.; Toll, L. Evolutionary Sequence Modeling for Discovery of Peptide Hormones. *PLoS Comput Biol* **2009**, *5* (1), e1000258. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000258>.
- (110) Du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Trippett, S. The Sequence of Amino Acids in Oxytocin, with a Proposal for the Structure of Oxytocin. *J Biol Chem* **1953**, *205* (2), 949–957.
- (111) Corbière, A.; Vaudry, H.; Chan, P.; Walet-Balieu, M.-L.; Lecroq, T.; Lefebvre, A.; Pineau, C.; Vaudry, D. Strategies for the Identification of Bioactive Neuropeptides in Vertebrates. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 948. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00948>.
- (112) Liu, Y.; Li, S.; Qi, X.; Zhou, W.; Liu, X.; Lin, H.; Zhang, Y.; Cheng, C. H. K. A Novel Neuropeptide in Suppressing Luteinizing Hormone Release in Goldfish, *Carassius*

- Auratus. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2013**, 374 (1–2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.008>.
- (113) Wong, M. K. H.; Sze, K. H.; Chen, T.; Cho, C. K.; Law, H. C. H.; Chu, I. K.; Wong, A. O. L. Goldfish Spexin: Solution Structure and Novel Function as a Satiety Factor in Feeding Control. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2013**, 305 (3), E348–E366. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00141.2013>.
- (114) Wan, B.; Wang, X.-R.; Zhou, Y.-B.; Zhang, X.; Huo, K.; Han, Z.-G. C12ORF39, a Novel Secreted Protein with a Typical Amidation Processing Signal. *Bioscience Reports* **2010**, 30 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1042/BSR20080156>.
- (115) Lim, C. H.; Lee, M. Y. M.; Soga, T.; Parhar, I. Evolution of Structural and Functional Diversity of Spexin in Mammalian and Non-Mammalian Vertebrate Species. *Front. Endocrinol.* **2019**, 10, 379. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00379>.
- (116) Li, S.; Liu, Q.; Xiao, L.; Chen, H.; Li, G.; Zhang, Y.; Lin, H. Molecular Cloning and Functional Characterization of Spexin in Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2016**, 196–197, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.009>.
- (117) Deng, S.; Chen, H.; Zhai, Y.; Jia, L.; Liu, J.; Wang, M.; Jiang, D.; Wu, T.; Zhu, C.; Li, G. Molecular Cloning, Characterization and Expression Analysis of Spexin in Spotted Scat (Scatophagus Argus). *General and Comparative Endocrinology* **2018**, 266, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.018>.
- (118) 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.015>.
- (119) Rholam, M.; Fahy, C. Processing of Peptide and Hormone Precursors at the Dibasic Cleavage Sites. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66 (13), 2075–2091. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0007-5>.
- (120) Eipper, B. A.; Mains, R. E. Peptide α -Amidation. *Annu. Rev. Physiol.* **1988**, 50 (1), 333–344. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.50.030188.002001>.
- (121) Porzionato, A.; Rucinski, M.; Macchi, V.; Stecco, C.; Malendowicz, L. K.; De Caro, R. Spexin Expression in Normal Rat Tissues. *J Histochem Cytochem* **2010**, 58 (9), 825–837. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956300>.
- (122) 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. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.018>.
- (123) Sassek, M.; Kolodziejski, P. A.; Szczepankiewicz, D.; Pruszyńska-Oszmalek, E. Spexin in the Physiology of Pancreatic Islets—Mutual Interactions with Insulin. *Endocrine* **2019**, 63 (3), 513–519. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1766-2>.
- (124) Sassek, M.; Kolodziejski, P. A.; Strowski, M. Z.; Nogowski, L.; Nowak, K. W.; Mackowiak, P. Spexin Modulates Functions of Rat Endocrine Pancreatic Cells: *Pancreas* **2018**, 47 (7), 904–909. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001083>.
- (125) 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. <https://doi.org/10.1159/000493482>.
- (126) 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:

- HODGES et Al. *Pediatr Diabetes* **2018**, *19* (2), 212–216. <https://doi.org/10.1111/pedi.12549>.
- (127) Walewski, J. L.; Ge, F.; Gagner, M.; Inabnet, W. B.; Pomp, A.; Branch, A. D.; Berk, P. D. Adipocyte Accumulation of Long-Chain Fatty Acids in Obesity Is Multifactorial, Resulting from Increased Fatty Acid Uptake and Decreased Activity of Genes Involved in Fat Utilization. *OBES SURG* **2010**, *20* (1), 93–107. <https://doi.org/10.1007/s11695-009-0002-9>.
- (128) Walewski, J. L.; Ge, F.; Lobdell, H.; Levin, N.; Schwartz, G. J.; Vasselli, J. R.; Pomp, A.; Dakin, G.; Berk, P. D. Spexin Is a Novel Human Peptide That Reduces Adipocyte Uptake of Long Chain Fatty Acids and Causes Weight Loss in Rodents with Diet-Induced Obesity: Spexin Is a Novel Human Peptide. *Obesity* **2014**, *22* (7), 1643–1652. <https://doi.org/10.1002/oby.20725>.
- (129) Wu, H.; Lin, F.; Chen, H.; Liu, J.; Gao, Y.; Zhang, X.; Hao, J.; Chen, D.; Yuan, D.; Wang, T.; Li, Z. Ya-Fish (Schizothorax Prenanti) Spexin: Identification, Tissue Distribution and mRNA Expression Responses to Periprandial and Fasting. *Fish Physiol Biochem* **2016**, *42* (1), 39–49. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0115-0>.
- (130) Zheng, B.; Li, S.; Liu, Y.; Li, Y.; Chen, H.; Tang, H.; Liu, X.; Lin, H.; Zhang, Y.; Cheng, C. H. K. Spexin Suppress Food Intake in Zebrafish: Evidence from Gene Knockout Study. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 14643. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15138-6>.
- (131) Rucinski, M.; Porzionato, A.; Ziolkowska, A.; Szyszka, M.; Macchi, V.; De Caro, R.; Malendowicz, L. K. Expression of the Spexin Gene in the Rat Adrenal Gland and Evidences Suggesting That Spexin Inhibits Adrenocortical Cell Proliferation. *Peptides* **2010**, *31* (4), 676–682. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.12.025>.
- (132) Wang, S.; Wang, B.; Chen, S. Spexin in the Half-Smooth Tongue Sole (Cynoglossus Semilaevis): Molecular Cloning, Expression Profiles, and Physiological Effects. *Fish Physiol Biochem* **2018**, *44* (3), 829–839. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0472-6>.
- (133) 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. <https://doi.org/10.1096/fj.11-192831>.
- (134) Pirzeh, L.; Taherianfard, M. Effect of Intra Hippocampal CA1 Injection of Spexin on Pain Sensitivity in Female Rat. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* **2014**, *3* (7), 71–74.
- (135) Moazen, P.; Taherianfard, M.; Ahmadi Soleimani, M.; Norozpor, M. Synergistic Effect of Spexin and Progesterone on Pain Sensitivity Attenuation in Ovariectomized Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2018**, *45* (4), 349–354. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12862>.
- (136) 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. *The American Journal of Pathology* **2019**, *189* (4), 886–899. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.12.009>.
- (137) Bannon, A. W.; Malmberg, A. B. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience* **2007**, *41* (1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s41>.
- (138) Lin, C.; Zhang, M.; Huang, T.; Yang, L.; Fu, H.; Zhao, L.; Zhong, L. L.; Mu, H.; Shi, X.; Leung, C. F.; Fan, B.; Jiang, M.; Lu, A.; Zhu, L.; Bian, Z. Spexin Enhances Bowel Movement through Activating L-Type Voltage-Dependent Calcium Channel via

- Galanin Receptor 2 in Mice. *Sci Rep* **2015**, *5* (1), 12095. <https://doi.org/10.1038/srep12095>.
- (139) Lin, C.; Zhao, L.; Huang, T.; Lu, L.; Khan, M.; Liu, J.; Zhong, L. L. D.; Cai, Z.; Fan, B.; Wong, A. O. L.; Bian, Z. Spexin Acts as Novel Regulator for Bile Acid Synthesis. *Front Physiol* **2018**, *9*, 378. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00378>.
- (140) Pałasz, A.; Suszka-Świtek, A.; Filipczyk, Ł.; Bogus, K.; Rojczyk, E.; Worthington, J.; Krzystanek, M.; Wiaderkiewicz, R. Escitalopram Affects Spexin Expression in the Rat Hypothalamus, Hippocampus and Striatum. *Pharmacological Reports* **2016**, *68* (6), 1326–1331. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.09.002>.
- (141) Morris, M. B.; Ralston, G. B.; Biden, T. J.; Browne, C. L.; King, G. F.; Iismaa, T. P. Structural and Biochemical Studies of Human Galanin: NMR Evidence for Nascent Helical Structures in Aqueous Solution. *Biochemistry* **1995**, *34* (14), 4538–4545. <https://doi.org/10.1021/bi00014a006>.
- (142) Duan, J.; Shen, D.-D.; Zhao, T.; Guo, S.; He, X.; Yin, W.; Xu, P.; Ji, Y.; Chen, L.-N.; Liu, J.; Zhang, H.; Liu, Q.; Shi, Y.; Cheng, X.; Jiang, H.; Eric Xu, H.; Zhang, Y.; Xie, X.; Jiang, Y. Molecular Basis for Allosteric Agonism and G Protein Subtype Selectivity of Galanin Receptors. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 1364. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29072-3>.
- (143) Wong, M. K. H.; He, M.; Sze, K. H.; Huang, T.; Ko, W. K. W.; Bian, Z.-X.; Wong, A. O. L. Mouse Spexin: (I) NMR Solution Structure, Docking Models for Receptor Binding, and Histological Expression at Tissue Level. *Frontiers in Endocrinology* **2021**, *12*.
- (144) 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. <https://doi.org/10.1038/srep21453>.
- (145) Fenno, L.; Yizhar, O.; Deisseroth, K. The Development and Application of Optogenetics. *Annu Rev Neurosci* **2011**, *34*, 389–412. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113817>.
- (146) Pourbadie, H. G.; Sayyah, M. Optogenetics: Control of Brain Using Light. *Iran Biomed J* **2018**, *22* (1), 4–5.
- (147) Zeki, S.; Crick, F. The Impact of Molecular Biology on Neuroscience. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **1999**, *354* (1392), 2021–2025. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0541>.
- (148) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (149) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. Light-Controlled Tools. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (34), 8446–8476. <https://doi.org/10.1002/anie.201202134>.
- (150) Deisseroth, K. Optogenetics. *Nat Methods* **2011**, *8* (1), 26–29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f324>.
- (151) Nagel, G.; Szellas, T.; Huhn, W.; Kateriya, S.; Adeishvili, N.; Berthold, P.; Ollig, D.; Hegemann, P.; Bamberg, E. Channelrhodopsin-2, a Directly Light-Gated Cation-Selective Membrane Channel. *PNAS* **2003**, *100* (24), 13940–13945.
- (152) Boyden, E. S.; Zhang, F.; Bamberg, E.; Nagel, G.; Deisseroth, K. Millisecond-Timescale, Genetically Targeted Optical Control of Neural Activity. *Nat Neurosci* **2005**, *8* (9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>.
- (153) Matsuno-Yagi, A.; Mukohata, Y. Two Possible Roles of Bacteriorhodopsin; a Comparative Study of Strains of Halobacterium Halobium Differing in Pigmentation.

- Biochemical and Biophysical Research Communications* **1977**, *78* (1), 237–243.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)91245-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)91245-1).
- (154) Zhang, F.; Wang, L.-P.; Brauner, M.; Liewald, J. F.; Kay, K.; Watzke, N.; Wood, P. G.; Bamberg, E.; Nagel, G.; Gottschalk, A.; Deisseroth, K. Multimodal Fast Optical Interrogation of Neural Circuitry. *Nature* **2007**, *446* (7136), 633–639.
<https://doi.org/10.1038/nature05744>.
- (155) Oesterhelt, D.; Stoeckenius, W. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium Halobium. *Nature New Biology* **1971**, *233* (39), 149–152.
<https://doi.org/10.1038/newbio233149a0>.
- (156) Kramer, R. H.; Mourot, A.; Adesnik, H. Optogenetic Pharmacology for Control of Native Neuronal Signaling Proteins. *Nat Neurosci* **2013**, *16* (7), 816–823.
<https://doi.org/10.1038/nn.3424>.
- (157) Fehrentz, T.; Schönberger, M.; Trauner, D. Optochemical Genetics. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (51), 12156–12182.
<https://doi.org/10.1002/anie.201103236>.
- (158) Häusser, M. Optogenetics: The Age of Light. *Nat Methods* **2014**, *11* (10), 1012–1014.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3111>.
- (159) Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. In Vivo Photopharmacology. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (21), 10710–10747. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00037>.
- (160) Velema, W. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (6), 2178–2191.
<https://doi.org/10.1021/ja413063e>.
- (161) Ricart-Ortega, M.; Font, J.; Llebaria, A. GPCR Photopharmacology. *Mol Cell Endocrinol* **2019**, *488*, 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.03.003>.
- (162) Broichhagen, J.; Trauner, D. The in Vivo Chemistry of Photoswitched Tethered Ligands. *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *21*, 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.07.008>.
- (163) Berizzi, A. E.; Goudet, C. Strategies and Considerations of G-Protein-Coupled Receptor Photopharmacology. *Advances in Pharmacology* **2020**, *88*, 143–172.
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.12.001>.
- (164) Beharry, A. A.; Woolley, G. A. Azobenzene Photoswitches for Biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (8), 4422–4437. <https://doi.org/10.1039/C1CS15023E>.
- (165) Hartley, G. S. The Cis -Form of Azobenzene. *Nature* **1937**, *140* (3537), 281–281.
<https://doi.org/10.1038/140281a0>.
- (166) Rau, H. Photoisomerization of Azobenzenes. *ChemInform* **2003**, *34* (22).
<https://doi.org/10.1002/chin.200322260>.
- (167) Dias, A. R.; Minas Da Piedade, M. E.; Martinho Simões, J. A.; Simoni, J. A.; Teixeira, C.; Diogo, H. P.; Meng-Yan, Y.; Pilcher, G. Enthalpies of Formation of Cis-Azobenzene and Trans-Azobenzene. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **1992**, *24* (4), 439–447.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9614\(05\)80161-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9614(05)80161-2).
- (168) Fliegl, H.; Köhn, A.; Hättig, C.; Ahlrichs, R. Ab Initio Calculation of the Vibrational and Electronic Spectra of Trans- and Cis-Azobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (32), 9821–9827. <https://doi.org/10.1021/ja034433o>.
- (169) Tsuji, T.; Takeuchi, H.; Egawa, T.; Konaka, S. Effects of Molecular Structure on the Stability of a Thermotropic Liquid Crystal. Gas Electron Diffraction Study of the Molecular Structure of Phenyl Benzoate. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (26), 6381–6387. <https://doi.org/10.1021/ja010192d>.

- (170) Duarte, L.; Fausto, R.; Reva, I. Structural and Spectroscopic Characterization of E- and Z-Isomers of Azobenzene. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (32), 16919–16930. <https://doi.org/10.1039/C4CP00240G>.
- (171) Rau, H. Spectroscopic Properties of Organic Azo Compounds. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1973**, *12* (3), 224–235. <https://doi.org/10.1002/anie.197302241>.
- (172) Vetráková, L.; Ladányi, V.; Anshori, J. A.; Dvořák, P.; Wirz, J.; Heger, D. The Absorption Spectrum of Cis-Azobenzene. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16* (12), 1749–1756. <https://doi.org/10.1039/C7PP00314E>.
- (173) Griffiths, J. II. Photochemistry of Azobenzene and Its Derivatives. *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1* (4), 481–493. <https://doi.org/10.1039/CS9720100481>.
- (174) Azo-Group Dihedral Angle Torsion Dependence on Temperature: A Theoretical–Experimental Study. *Chemical Physics Letters* **2010**, *487* (4–6), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.039>.
- (175) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825. <https://doi.org/10.1039/C1CS15179G>.
- (176) Casellas, J.; Bearpark, M. J.; Reguero, M. Excited-State Decay in the Photoisomerisation of Azobenzene: A New Balance between Mechanisms. *ChemPhysChem* **2016**, *17* (19), 3068–3079. <https://doi.org/10.1002/cphc.201600502>.
- (177) Albert, L.; Vázquez, O. Photoswitchable Peptides for Spatiotemporal Control of Biological Functions. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (69), 10192–10213. <https://doi.org/10.1039/C9CC03346G>.
- (178) Kienzler, M. A.; Reiner, A.; Trautman, E.; Yoo, S.; Trauner, D.; Isacoff, E. Y. A Red-Shifted, Fast-Relaxing Azobenzene Photoswitch for Visible Light Control of an Ionotropic Glutamate Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (47), 17683–17686. <https://doi.org/10.1021/ja408104w>.
- (179) Schütt, C.; Heitmann, G.; Wendler, T.; Krahwinkel, B.; Herges, R. Design and Synthesis of Photodissociable Ligands Based on Azoimidazoles for Light-Driven Coordination-Induced Spin State Switching in Homogeneous Solution. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (3), 1206–1215. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02817>.
- (180) Wendler, T.; Schütt, C.; Näther, C.; Herges, R. Photoswitchable Azoheterocycles via Coupling of Lithiated Imidazoles with Benzenediazonium Salts. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (7), 3284–3287. <https://doi.org/10.1021/jo202688x>.
- (181) Crespi, S.; Simeth, N. A.; König, B. Heteroaryl Azo Dyes as Molecular Photoswitches. *Nature reviews chemistry* **2019**, *3* (3), 133–146. <https://doi.org/10.1038/s41570-019-0074-6>.
- (182) Stricker, L.; Böckmann, M.; Kirse, T. M.; Doltsinis, N. L.; Ravoo, B. J. Arylazopyrazole Photoswitches in Aqueous Solution: Substituent Effects, Photophysical Properties, and Host–Guest Chemistry. *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24* (34), 8639–8647. <https://doi.org/10.1002/chem.201800587>.
- (183) Weston, C. E.; Richardson, R. D.; Haycock, P. R.; White, A. J. P.; Fuchter, M. J. Arylazopyrazoles: Azoheteroarene Photoswitches Offering Quantitative Isomerization and Long Thermal Half-Lives. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (34), 11878–11881. <https://doi.org/10.1021/ja505444d>.
- (184) Schulte, A. M.; Kolarski, D.; Sundaram, V.; Srivastava, A.; Tama, F.; Feringa, B. L.; Szymanski, W. Light-Control over Casein Kinase 1δ Activity with

- Photopharmacology: A Clear Case for Arylazopyrazole-Based Inhibitors. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (10), 5326. <https://doi.org/10.3390/ijms23105326>.
- (185) Dudek, M.; Tarnowicz-Staniak, N.; Deiana, M.; Pokładek, Z.; Samoć, M.; Matczyszyn, K. Two-Photon Absorption and Two-Photon-Induced Isomerization of Azobenzene Compounds. *RSC Adv.* **2020**, *10* (66), 40489–40507. <https://doi.org/10.1039/D0RA07693G>.
- (186) Valeur, E.; Guéret, S. M.; Adihou, H.; Gopalakrishnan, R.; Lemurell, M.; Waldmann, H.; Grossmann, T. N.; Plowright, A. T. New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (35), 10294–10323. <https://doi.org/10.1002/anie.201611914>.
- (187) Murawska, G. M.; Poloni, C.; Simeth, N. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Comparative Study of Photoswitchable Zinc-Finger Domain and AT-Hook Motif for Light-Controlled Peptide–DNA Binding. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25* (19), 4965–4973. <https://doi.org/10.1002/chem.201900090>.
- (188) Broichhagen, J.; Podewin, T.; Meyer-Berg, H.; von Ohlen, Y.; Johnston, N. R.; Jones, B. J.; Bloom, S. R.; Rutter, G. A.; Hoffmann-Röder, A.; Hodson, D. J.; Trauner, D. Optical Control of Insulin Secretion Using an Incretin Switch. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54* (51), 15565–15569. <https://doi.org/10.1002/anie.201506384>.
- (189) Lachmann, D.; Konieczny, A.; Keller, M.; König, B. Photochromic Peptidic NPY Y4 Receptor Ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (9), 2467–2478. <https://doi.org/10.1039/C8OB03221A>.
- (190) Barltrop, J. A.; Schofield, P. Photosensitive Protecting Groups. *Tetrahedron Letters* **1962**, *3* (16), 697–699. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)70935-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)70935-X).
- (191) Engels, J.; Schlaeger, E. J. Synthesis, Structure, and Reactivity of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate-Benzyltriesters. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (7), 907–911. <https://doi.org/10.1021/jm00217a008>.
- (192) Kaplan, J. H.; Forbush, B.; Hoffman, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog: Utilization by the Sodium:Potassium Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. *Biochemistry* **1978**, *17* (10), 1929–1935. <https://doi.org/10.1021/bi00603a020>.
- (193) Agarwal, H. K.; Janicek, R.; Chi, S.-H.; Perry, J. W.; Niggli, E.; Ellis-Davies, G. C. R. Calcium Uncaging with Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (11), 3687–3693. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11606>.
- (194) Bandara, H. M. D.; Walsh, T. P.; Burdette, S. C. A Second-Generation Photocage for Zn²⁺ Inspired by TPEN: Characterization and Insight into the Uncaging Quantum Yields of ZinCleave Chelators. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17* (14), 3932–3941. <https://doi.org/10.1002/chem.201001982>.
- (195) Font, J.; López-Cano, M.; Notartomaso, S.; Scarselli, P.; Di Pietro, P.; Bresolí-Obach, R.; Battaglia, G.; Malhaire, F.; Rovira, X.; Catena, J.; Giraldo, J.; Pin, J.-P.; Fernández-Dueñas, V.; Goudet, C.; Nonell, S.; Nicoletti, F.; Llebaria, A.; Ciruela, F. Optical Control of Pain in Vivo with a Photoactive mGlu5 Receptor Negative Allosteric Modulator. *eLife* **2021**, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.23545>.
- (196) Banghart, M. R.; Sabatini, B. L. Photoactivatable Neuropeptides for Spatiotemporally Precise Delivery of Opioids in Neural Tissue. *Neuron* **2012**, *73* (2), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.016>.
- (197) Nguyen, A.; Rothman, D. M.; Stehn, J.; Imperiali, B.; Yaffe, M. B. Caged Phosphopeptides Reveal a Temporal Role for 14-3-3 in G1 Arrest and S-Phase Checkpoint Function. *Nat Biotechnol* **2004**, *22* (8), 993–1000. <https://doi.org/10.1038/nbt997>.

- (198) Kawakami, T.; Cheng, H.; Hashiro, S.; Nomura, Y.; Tsukiji, S.; Furuta, T.; Nagamune, T. A Caged Phosphopeptide-Based Approach for Photochemical Activation of Kinases in Living Cells. *ChemBioChem* **2008**, *9* (10), 1583–1586. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800116>.
- (199) Courtney, T.; Deiters, A. Recent Advances in the Optical Control of Protein Function through Genetic Code Expansion. *Current Opinion in Chemical Biology* **2018**, *46*, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.07.011>.
- (200) Courtney, T. M.; Deiters, A. Optical Control of Protein Phosphatase Function. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12260-z>.
- (201) Silva, J. M.; Silva, E.; Reis, R. L. Light-Triggered Release of Photocaged Therapeutics - Where Are We Now? *Journal of Controlled Release* **2019**, *298*, 154–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.006>.
- (202) Ellis-Davies, G. C. R. Caged Compounds: Photorelease Technology for Control of Cellular Chemistry and Physiology. *Nat Methods* **2007**, *4* (8), 619–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth1072>.
- (203) Dunkel, P. Photoremovable Protecting Groups. *Encyclopedia* **2022**, *2* (3), 1225–1236. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2030082>.
- (204) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem Rev* **2013**, *113* (1), 119–191. <https://doi.org/10.1021/cr300177k>.
- (205) Hansen, M. J.; Velema, W. A.; Lerch, M. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Wavelength-Selective Cleavage of Photoprotecting Groups: Strategies and Applications in Dynamic Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (11), 3358–3377. <https://doi.org/10.1039/C5CS00118H>.
- (206) Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J.-B.; Neveu, P.; Jullien, L. O-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (26), 6865–6879. <https://doi.org/10.1002/chem.200501393>.
- (207) Šolomek, T.; Mercier, S.; Bally, T.; Bochet, C. G. Photolysis of Ortho-Nitrobenzyl Derivatives: The Importance of the Leaving Group. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11* (3), 548. <https://doi.org/10.1039/c1pp05308f>.
- (208) Bardhan, A.; Deiters, A. Development of Photolabile Protecting Groups and Their Application to the Optochemical Control of Cell Signaling. *Current Opinion in Structural Biology* **2019**, *57*, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.028>.
- (209) Barltrop, J. A.; Plant, P. J.; Schofield, P. Photosensitive Protective Groups. *Chem. Commun. (London)* **1966**, No. 22, 822–823. <https://doi.org/10.1039/C19660000822>.
- (210) Josa-Culleré, L.; Llebaria, A. In the Search for Photocages Cleavable with Visible Light: An Overview of Recent Advances and Chemical Strategies. *ChemPhotoChem* **2021**, *5* (4), 296–314. <https://doi.org/10.1002/cptc.202000253>.
- (211) Wettermark, G. Photochromism of O-Nitrotoluenes. *Nature* **1962**, *194* (4829), 677–677. <https://doi.org/10.1038/194677a0>.
- (212) Schmierer, T.; Laimgruber, S.; Haiser, K.; Kiewisch, K.; Neugebauer, J.; Gilch, P. Femtosecond Spectroscopy on the Photochemistry of Ortho-Nitrotoluene. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (48), 15653. <https://doi.org/10.1039/c004025h>.
- (213) Il'ichev, Y. V.; Schwörer, M. A.; Wirz, J. Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (14), 4581–4595. <https://doi.org/10.1021/ja039071z>.

- (214) Il'ichev, Y. V.; Wirz, J. Rearrangements of 2-Nitrobenzyl Compounds. 1. Potential Energy Surface of 2-Nitrotoluene and Its Isomers Explored with Ab Initio and Density Functional Theory Methods. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (33), 7856–7870. <https://doi.org/10.1021/jp000261v>.
- (215) Schwörer, M.; Wirz, J. Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds in Solution, I. 2-Nitrotoluene: Thermodynamic and Kinetic Parameters of Theaci-Nitro Tautomer. *HCA* **2001**, *84* (6), 1441–1458. [https://doi.org/10.1002/1522-2675\(20010613\)84:6<1441::AID-HLCA1441>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1522-2675(20010613)84:6<1441::AID-HLCA1441>3.0.CO;2-W).
- (216) Patchornik, A.; Amit, B.; Woodward, R. B. Photosensitive Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (21), 6333–6335. <https://doi.org/10.1021/ja00724a041>.
- (217) Mitchison, T. J.; Sawin, K. E.; Theriot, J. A.; Gee, K.; Mallavarapu, A. [4] Caged Fluorescent Probes. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1998; Vol. 291, pp 63–78. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)91007-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)91007-2).
- (218) Boinapally, S.; Huang, B.; Abe, M.; Katan, C.; Noguchi, J.; Watanabe, S.; Kasai, H.; Xue, B.; Kobayashi, T. Caged Glutamates with π -Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (17), 7822–7830. <https://doi.org/10.1021/jo501425p>.
- (219) Hasan, A.; Stengele, K.-P.; Giegrich, H.; Cornwell, P.; Isham, K. R.; Sachleben, R. A.; Pfeleiderer, W.; Foote, R. S. Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Synthesis and Photodeprotection Rates. *Tetrahedron* **1997**, *53* (12), 4247–4264. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00154-3).
- (220) Schelkle, K. M.; Griesbaum, T.; Ollech, D.; Becht, S.; Buckup, T.; Hamburger, M.; Wombacher, R. Light-Induced Protein Dimerization by One- and Two-Photon Activation of Gibberellic Acid Derivatives in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (9), 2825–2829. <https://doi.org/10.1002/anie.201409196>.
- (221) Beier, M. Production by Quantitative Photolithographic Synthesis of Individually Quality Checked DNA Microarrays. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28* (4), 11e–111. <https://doi.org/10.1093/nar/28.4.e11>.
- (222) Donato, L.; Mourot, A.; Davenport, C. M.; Herbivo, C.; Warther, D.; Léonard, J.; Bolze, F.; Nicoud, J.-F.; Kramer, R. H.; Goeldner, M.; Specht, A. Water-Soluble, Donor-Acceptor Biphenyl Derivatives in the 2-(o-Nitrophenyl)Propyl Series: Highly Efficient Two-Photon Uncaging of the Neurotransmitter γ -Aminobutyric Acid at $\lambda=800$ Nm. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (8), 1840–1843. <https://doi.org/10.1002/anie.201106559>.
- (223) Givens, R. S.; Matuszewski, B. Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (22), 6860–6861. <https://doi.org/10.1021/ja00334a075>.
- (224) Štacko, P.; Šolomek, T. Photoremovable Protecting Groups: Across the Light Spectrum to Near- Infrared Absorbing Photocages. *Chimia (Aarau)* **2021**, *75* (10), 873–881. <https://doi.org/10.2533/chimia.2021.873>.
- (225) Schade, B.; Hagen, V.; Schmidt, R.; Herbrich, R.; Krause, E.; Eckardt, T.; Bendig, J. Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-Yl)Methyl Derivatives. 1. Photocleavage of (7-Methoxycoumarin-4-Yl)Methyl-Caged Acids with Fluorescence Enhancement. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (25), 9109–9117. <https://doi.org/10.1021/jo9910233>.

- (226) Schmidt, R.; Geissler, D.; Hagen, V.; Bendig, J. Mechanism of Photocleavage of (Coumarin-4-Yl)Methyl Esters. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111* (26), 5768–5774. <https://doi.org/10.1021/jp071521c>.
- (227) Schmidt, R.; Geissler, D.; Hagen, V.; Bendig, J. Kinetics Study of the Photocleavage of (Coumarin-4-Yl)Methyl Esters. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (23), 5000–5004. <https://doi.org/10.1021/jp050581k>.
- (228) Bourbon, P.; Peng, Q.; Ferraudi, G.; Stauffacher, C.; Wiest, O.; Helquist, P. Synthesis, Photophysical, Photochemical, and Computational Studies of Coumarin-Labeled Nicotinamide Derivatives. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (6), 2756–2762. <https://doi.org/10.1021/jo2025527>.
- (229) Suzuki, A. Z.; Watanabe, T.; Kawamoto, M.; Nishiyama, K.; Yamashita, H.; Ishii, M.; Iwamura, M.; Furuta, T. Coumarin-4-Ylmethoxycarbonyls as Phototriggers for Alcohols and Phenols. *Org. Lett.* **2003**, *5* (25), 4867–4870. <https://doi.org/10.1021/ol0359362>.
- (230) Furuta, T.; Watanabe, T.; Tanabe, S.; Sakyō, J.; Matsuba, C. Phototriggers for Nucleobases with Improved Photochemical Properties. *Org. Lett.* **2007**, *9* (23), 4717–4720. <https://doi.org/10.1021/ol702106t>.
- (231) Furuta, T.; Wang, S. S.-H.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. Brominated 7-Hydroxycoumarin-4-Ylmethyls: Photolabile Protecting Groups with Biologically Useful Cross-Sections for Two Photon Photolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (4), 1193–1200.
- (232) Hagen, V.; Kilic, F.; Schaal, J.; Dekowski, B.; Schmidt, R.; Kotzur, N. [8-[Bis(Carboxymethyl)Aminomethyl]-6-Bromo-7-Hydroxycoumarin-4-Yl]Methyl Moieties as Photoremovable Protecting Groups for Compounds with COOH, NH₂, OH, and C=O Functions. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (9), 2790–2797. <https://doi.org/10.1021/jo100368w>.
- (233) Eckardt, T.; Hagen, V.; Schade, B.; Schmidt, R.; Schweitzer, C.; Bendig, J. Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-Yl)Methyl Derivatives. 2. Photocleavage of Selected (Coumarin-4-Yl)Methyl-Caged Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphates with Fluorescence Enhancement. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (3), 703–710. <https://doi.org/10.1021/jo010692p>.
- (234) Bao, C.; Fan, G.; Lin, Q.; Li, B.; Cheng, S.; Huang, Q.; Zhu, L. Styryl Conjugated Coumarin Caged Alcohol: Efficient Photorelease by Either One-Photon Long Wavelength or Two-Photon NIR Excitation. *Org. Lett.* **2012**, *14* (2), 572–575. <https://doi.org/10.1021/ol203188h>.
- (235) Olson, J. P.; Kwon, H.-B.; Takasaki, K. T.; Chiu, C. Q.; Higley, M. J.; Sabatini, B. L.; Ellis-Davies, G. C. R. Optically Selective Two-Photon Uncaging of Glutamate at 900 Nm. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (16), 5954–5957. <https://doi.org/10.1021/ja4019379>.
- (236) Klausen, M.; Dubois, V.; Clermont, G.; Tonnelé, C.; Castet, F.; Blanchard-Desce, M. Dual-Wavelength Efficient Two-Photon Photorelease of Glycine by π -Extended Dipolar Coumarins. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (15), 4209–4219. <https://doi.org/10.1039/C9SC00148D>.
- (237) Fournier, L.; Gauron, C.; Xu, L.; Aujard, I.; Le Saux, T.; Gagey-Eilstein, N.; Maurin, S.; Dubruille, S.; Baudin, J.-B.; Bensimon, D.; Volovitch, M.; Vriza, S.; Jullien, L. A Blue-Absorbing Photolabile Protecting Group for in Vivo Chromatically Orthogonal Photoactivation. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (7), 1528–1536. <https://doi.org/10.1021/cb400178m>.

- (238) Fournier, L.; Aujard, I.; Le Saux, T.; Maurin, S.; Beaupierre, S.; Baudin, J.; Jullien, L. Coumarinylmethyl Caging Groups with Redshifted Absorption. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (51), 17494–17507. <https://doi.org/10.1002/chem.201302630>.
- (239) Umeda, N.; Takahashi, H.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T.; Urano, Y. Boron Dipyrromethene As a Fluorescent Caging Group for Single-Photon Uncaging with Long-Wavelength Visible Light. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (10), 2242–2246. <https://doi.org/10.1021/cb500525p>.
- (240) Takeda, A.; Komatsu, T.; Nomura, H.; Naka, M.; Matsuki, N.; Ikegaya, Y.; Terai, T.; Ueno, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T.; Urano, Y. Unexpected Photo-Instability of 2,6-Sulfonamide-Substituted BODIPYs and Its Application to Caged GABA. *ChemBioChem* **2016**, *17* (13), 1233–1240. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600097>.
- (241) Rubinstein, N.; Liu, P.; Miller, E. W.; Weinstain, R. Meso-Methylhydroxy BODIPY: A Scaffold for Photo-Labile Protecting Groups. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (29), 6369–6372. <https://doi.org/10.1039/C5CC00550G>.
- (242) Peterson, J. A.; Fischer, L. J.; Gehrman, E. J.; Shrestha, P.; Yuan, D.; Wijesooriya, C. S.; Smith, E. A.; Winter, A. H. Direct Photorelease of Alcohols from Boron-Alkylated BODIPY Photocages. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (8), 5712–5717. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00044>.
- (243) Sitkowska, K.; Feringa, Ben. L.; Szymański, W. Green-Light-Sensitive BODIPY Photoprotecting Groups for Amines. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (4), 1819–1827. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02729>.
- (244) Li, M.; Dove, A. P.; Truong, V. X. Additive-Free Green Light-Induced Ligation Using BODIPY Triggers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (6), 2284–2288. <https://doi.org/10.1002/anie.201912555>.
- (245) Slanina, T.; Shrestha, P.; Palao, E.; Kand, D.; Peterson, J. A.; Dutton, A. S.; Rubinstein, N.; Weinstain, R.; Winter, A. H.; Klán, P. In Search of the Perfect Photocage: Structure–Reactivity Relationships in Meso-Methyl BODIPY Photoremovable Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (42), 15168–15175. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b08532>.
- (246) Peterson, J. A.; Wijesooriya, C.; Gehrman, E. J.; Mahoney, K. M.; Goswami, P. P.; Albright, T. R.; Syed, A.; Dutton, A. S.; Smith, E. A.; Winter, A. H. Family of BODIPY Photocages Cleaved by Single Photons of Visible/Near-Infrared Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (23), 7343–7346. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04040>.
- (247) Rodat, T.; Krebs, M.; Döbber, A.; Jansen, B.; Steffen-Heins, A.; Schwarz, K.; Peifer, C. Restricted Suitability of BODIPY for Caging in Biological Applications Based on Singlet Oxygen Generation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19* (10), 1319–1325. <https://doi.org/10.1039/D0PP00097C>.
- (248) Gorka, A. P.; Nani, R. R.; Zhu, J.; Mackem, S.; Schnermann, M. J. A Near-IR Uncaging Strategy Based on Cyanine Photochemistry. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (40), 14153–14159. <https://doi.org/10.1021/ja5065203>.
- (249) Alachouzos, G.; Schulte, A. M.; Mondal, A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Computational Design, Synthesis, and Photochemistry of Cy7-PPG, an Efficient NIR-Activated Photolabile Protecting Group for Therapeutic Applications**. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *n/a* (n/a), e202201308. <https://doi.org/10.1002/anie.202201308>.
- (250) Janeková, H.; Russo, M.; Ziegler, U.; Štacko, P. Photouncaging of Carboxylic Acids from Cyanine Dyes with Near-Infrared Light**. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61* (33), e202204391. <https://doi.org/10.1002/anie.202204391>.

- (251) Nani, R. R.; Kelley, J. A.; Ivanic, J.; Schnermann, M. J. Reactive Species Involved in the Regioselective Photooxidation of Heptamethine Cyanines. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (11), 6556–6563. <https://doi.org/10.1039/C5SC02396C>.
- (252) Vorobev, A. Yu.; Moskalensky, A. E. Long-Wavelength Photoremovable Protecting Groups: On the Way to in Vivo Application. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2020**, *18*, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.007>.
- (253) Mangubat-Medina, A. E.; Ball, Z. T. Triggering Biological Processes: Methods and Applications of Photocaged Peptides and Proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (18), 10403–10421. <https://doi.org/10.1039/D0CS01434F>.
- (254) Lawrence, D. S. The Preparation and in Vivo Applications of Caged Peptides and Proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9* (6), 570–575. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.09.002>.
- (255) Adams, S. R.; Tsien, R. Y. Controlling Cell Chemistry with Caged Compounds. *Annual Review of Physiology* **1993**, *55* (1), 755–784. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.003543>.
- (256) Taura, J.; Nolen, E. G.; Cabré, G.; Hernando, J.; Squarzialupi, L.; López-Cano, M.; Jacobson, K. A.; Fernández-Dueñas, V.; Ciruela, F. Remote Control of Movement Disorders Using a Photoactive Adenosine A2A Receptor Antagonist. *Journal of Controlled Release* **2018**, *283*, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.033>.
- (257) Muralidharan, S.; Nerbonne, J. M. Photolabile “Caged” Adrenergic Receptor Agonists and Related Model Compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1995**, *27* (2), 123–137. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(94\)07063-T](https://doi.org/10.1016/1011-1344(94)07063-T).
- (258) Banghart, M. R.; Williams, J. T.; Shah, R. C.; Lavis, L. D.; Sabatini, B. L. Caged Naloxone Reveals Opioid Signaling Deactivation Kinetics. *Mol Pharmacol* **2013**, *84* (5), 687–695. <https://doi.org/10.1124/mol.113.088096>.
- (259) So, W. H.; Wong, C. T. T.; Xia, J. Peptide Photocaging: A Brief Account of the Chemistry and Biological Applications. *Chinese Chemical Letters* **2018**, *29* (7), 1058–1062. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.05.015>.
- (260) Banghart, M. R.; He, X. J.; Sabatini, B. L. A Caged Enkephalin Optimized for Simultaneously Probing Mu and Delta Opioid Receptors. *ACS Chem Neurosci* **2018**, *9* (4), 684–690. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00485>.
- (261) Wood, J. S.; Koszelak, M.; Liu, J.; Lawrence, D. S. A Caged Protein Kinase Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (28), 7145–7146. <https://doi.org/10.1021/ja980960+>.
- (262) Vázquez, M. E.; Nitz, M.; Stehn, J.; Yaffe, M. B.; Imperiali, B. Fluorescent Caged Phosphoserine Peptides as Probes to Investigate Phosphorylation-Dependent Protein Associations. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (34), 10150–10151. <https://doi.org/10.1021/ja0351847>.
- (263) Nguyen, L. T.; Oien, N. P.; Allbritton, N. L.; Lawrence, D. S. Lipid Pools As Photolabile “Protecting Groups”: Design of Light-Activatable Bioagents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (38), 9936–9939. <https://doi.org/10.1002/anie.201305510>.
- (264) Ohmuro-Matsuyama, Y.; Tatsu, Y. Photocontrolled Cell Adhesion on a Surface Functionalized with a Caged Arginine-Glycine-Aspartate Peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7527–7529. <https://doi.org/10.1002/anie.200802731>.
- (265) Walker, J. W.; Gilbert, S. H.; Drummond, R. M.; Yamada, M.; Sreekumar, R.; Carraway, R. E.; Ikebe, M.; Fay, F. S. Signaling Pathways Underlying Eosinophil Cell Motility Revealed by Using Caged Peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95* (4), 1568–1573.
- (266) Tatsu, Y.; Shigeri, Y.; Ishida, A.; Isamu, K.; Fujisawa, H.; Yumoto, N. Synthesis of Caged Peptides Using Caged Lysine: Application to the Synthesis of Caged AIP, a Highly

- Specific Inhibitor of Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9* (8), 1093–1096. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00140-7).
- (267) Janett, E.; Bernardinelli, Y.; Müller, D.; Bochet, C. G. Synthesis of FMRFaNV, a Photoreleasable Caged Transmitter Designed to Study Neuron–Glia Interactions in the Central Nervous System. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (12), 2408–2418. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00473>.
- (268) Duffet, L.; Tatarskiy, P. V.; Harada, M.; Williams, E. T.; Hartrampf, N.; Patriarchi, T. A Photocaged Orexin-B for Spatiotemporally Precise Control of Orexin Signaling. *Cell Chemical Biology* **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.11.007>.
- (269) Lang, R.; Gundlach, A. L.; Holmes, F. E.; Hobson, S. A.; Wynick, D.; Hökfelt, T.; Kofler, B. Physiology, Signaling, and Pharmacology of Galanin Peptides and Receptors: Three Decades of Emerging Diversity. *Pharmacol Rev* **2015**, *67* (1), 118–175. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006536>.
- (270) 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. <https://doi.org/10.1101/gr.5755407>.
- (271) 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. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2106>.
- (272) Falenczyk, C.; Schiedel, M.; Karaman, B.; Rumpf, T.; Kuzmanovic, N.; Grötli, M.; Sippl, W.; Jung, M.; König, B. Chromo-Pharmacophores: Photochromic Diarylmaleimide Inhibitors for Sirtuins. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (12), 4794–4799. <https://doi.org/10.1039/C4SC01346H>.
- (273) Aravanis, A. M.; Wang, L.-P.; Zhang, F.; Meltzer, L. A.; Mogri, M. Z.; Schneider, M. B.; Deisseroth, K. An Optical Neural Interface: In Vivo Control of Rodent Motor Cortex with Integrated Fiberoptic and Optogenetic Technology. *J. Neural Eng.* **2007**, *4* (3), S143. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/4/3/S02>.
- (274) Li, W.; Park, I.; Kang, S.-K.; Lee, M. Smart Hydrogels from Laterally-Grafted Peptide Assembly. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (70), 8796–8798. <https://doi.org/10.1039/C2CC34528E>.
- (275) Podewin, T.; Rampp, M. S.; Turkanovic, I.; Karaghiosoff, K. L.; Zinth, W.; Hoffmann-Röder, A. Photocontrolled Chignolin-Derived β -Hairpin Peptidomimetics. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (19), 4001–4004. <https://doi.org/10.1039/C4CC10304A>.
- (276) Blanco, B.; Palasis, K. A.; Adwal, A.; Callen, D. F.; Abell, A. D. Azobenzene-Containing Photoswitchable Proteasome Inhibitors with Selective Activity and Cellular Toxicity. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25* (19), 5050–5054. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.011>.
- (277) Aemissegger, A.; Hilvert, D. Synthesis and Application of an Azobenzene Amino Acid as a Light-Switchable Turn Element in Polypeptides. *Nat Protoc* **2007**, *2* (1), 161–167. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.488>.
- (278) Richardson, J. S. The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. In *Advances in Protein Chemistry*; Elsevier, 1981; Vol. 34, pp 167–339. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60520-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60520-3).
- (279) Dong, S.-L.; Löweneck, M.; Schrader, T. E.; Schreier, W. J.; Zinth, W.; Moroder, L.; Renner, C. A Photocontrolled β -Hairpin Peptide. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (4), 1114–1120. <https://doi.org/10.1002/chem.200500986>.

- (280) Jiang, W.; Zheng, S. Structural Insights into Galanin Receptor Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2022**, *119* (21), e2121465119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121465119>.
- (281) Moiola, M.; Memeo, M. G.; Quadrelli, P. Stapled Peptides—A Useful Improvement for Peptide-Based Drugs. *Molecules* **2019**, *24* (20), 3654. <https://doi.org/10.3390/molecules24203654>.
- (282) Bojtár, M.; Németh, K.; Domahidy, F.; Knorr, G.; Verkman, A.; Kállay, M.; Kele, P. Conditionally Activatable Visible-Light Photocages. *J Am Chem Soc* **2020**, *142* (35), 15164–15171. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c07508>.
- (283) Luo, J.; Torres-Kolbus, J.; Liu, J.; Deiters, A. Genetic Encoding of Photocaged Tyrosines with Improved Light-Activation Properties for the Optical Control of Protease Function. *ChemBioChem* **2017**, *18* (14), 1442–1447. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700147>.
- (284) Liu, X.; Malins, L. R.; Roche, M.; Sterjovski, J.; Duncan, R.; Garcia, M. L.; Barnes, N. C.; Anderson, D. A.; Stone, M. J.; Gorry, P. R.; Payne, R. J. Site-Selective Solid-Phase Synthesis of a CCR5 Sulfopeptide Library To Interrogate HIV Binding and Entry. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (9), 2074–2081. <https://doi.org/10.1021/cb500337r>.
- (285) Yoshikawa. Solid-Phase Synthesis of Caged Peptides Using Tyrosine Modified with a Photocleavable Protecting Group: Application to the Synthesis of Caged Neuropeptide Y. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *227* (3), 688–693. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1570>.
- (286) Rumyantsev, E. V.; Alyoshin, S. N.; Marfin, Y. S. Kinetic Study of Bodipy Resistance to Acids and Alkalis: Stability Ranges in Aqueous and Non-Aqueous Solutions. *Inorganica Chimica Acta* **2013**, *408*, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2013.08.015>.
- (287) Galindo, F. The Photochemical Rearrangement of Aromatic Ethers: A Review of the Photo-Claisen Reaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2005**, *6* (2), 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2005.08.001>.
- (288) Wong, P. T.; Roberts, E. W.; Tang, S.; Mukherjee, J.; Cannon, J.; Nip, A. J.; Corbin, K.; Krummel, M. F.; Choi, S. K. Control of an Unusual Photo-Claisen Rearrangement in Coumarin Caged Tamoxifen through an Extended Spacer. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (4), 1001–1010. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00999>.
- (289) Deiters, A.; Groff, D.; Ryu, Y.; Xie, J.; Schultz, P. G. A Genetically Encoded Photocaged Tyrosine. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (17), 2728–2731. <https://doi.org/10.1002/anie.200600264>.
- (290) Kim, Y. A.; Ramirez, D. M. C.; Costain, W. J.; Johnston, L. J.; Bittman, R. A New Tool to Assess Ceramide Bioactivity: 6-Bromo-7-Hydroxycoumarinyl-Caged Ceramide. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (32), 9236–9238. <https://doi.org/10.1039/C1CC12345A>.
- (291) Wang, P.; Nilsson, J.; Brinkmalm, G.; Larson, G.; Huang, X. Synthesis Aided Structural Determination of Amyloid- β (1–15) Glycopeptides, New Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (95), 15067–15070. <https://doi.org/10.1039/C4CC05085A>.
- (292) Müller, A.-K.; Jung, D.; Sun, J.; Kuckling, D. Synthesis and Characterization of Light-Degradable Bromocoumarin Functionalized Polycarbonates. *Polym. Chem.* **2020**, *11* (3), 721–733. <https://doi.org/10.1039/C9PY01405E>.
- (293) Ji, W.; Liu, G.; Wang, F.; Zhu, Z.; Feng, C. Galactose-Decorated Light-Responsive Hydrogelator Precursors for Selectively Killing Cancer Cells. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (85), 12574–12577. <https://doi.org/10.1039/C6CC05707A>.

- (294) Tiapko, O.; Bacsa, B.; Cruz, G. G. de la; Glasnov, T.; Groschner, K. Optopharmacological Control of TRPC Channels by Coumarin-Caged Lipids Is Associated with a Phototoxic Membrane Effect. *Sci. China Life Sci.* **2016**, *59* (8), 802–810. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5095-5>.
- (295) Ayala, C. E.; Villalpando, A.; Nguyen, A. L.; McCandless, G. T.; Kartika, R. Chlorination of Aliphatic Primary Alcohols via Triphosgene–Triethylamine Activation. *Org. Lett.* **2012**, *14* (14), 3676–3679. <https://doi.org/10.1021/ol301520d>.
- (296) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, 2006.
- (297) Karthik, S.; Kumar, B. N. P.; Gangopadhyay, M.; Mandal, M.; Singh, N. D. P. A Targeted, Image-Guided and Dually Locked Photoresponsive Drug Delivery System. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (5), 728–732. <https://doi.org/10.1039/C4TB01583E>.
- (298) Dal Corso, A.; Borlandelli, V.; Corno, C.; Perego, P.; Belvisi, L.; Pignataro, L.; Gennari, C. Fast Cyclization of a Proline-Derived Self-Immolative Spacer Improves the Efficacy of Carbamate Prodrugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (10), 4176–4181. <https://doi.org/10.1002/anie.201916394>.
- (299) Keppel, P.; Sohr, B.; Kuba, W.; Goldeck, M.; Skrinjar, P.; Carlson, J. C. T.; Mikula, H. Tetrazine-Triggered Bioorthogonal Cleavage of Trans-Cyclooctene-Caged Phenols Using a Minimal Self-Immolative Linker Strategy**. *ChemBioChem* **2022**, *23* (20), e202200363. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200363>.
- (300) Klymchenko, A. S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (2), 366–375. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00517>.
- (301) Martinez, V.; Henary, M. Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22* (39), 13764–13782. <https://doi.org/10.1002/chem.201601570>.
- (302) Guido, C. A.; Mennucci, B.; Jacquemin, D.; Adamo, C. Planar vs. Twisted Intramolecular Charge Transfer Mechanism in Nile Red: New Hints from Theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (28), 8016. <https://doi.org/10.1039/b927489h>.
- (303) Golini, C. M.; Williams, B. W.; Foresman, J. B. Further Solvatochromic, Thermochromic, and Theoretical Studies on Nile Red. *Journal of Fluorescence* **1998**, *8* (4), 395–404. <https://doi.org/10.1023/A:1020584801600>.
- (304) Samsonova, L. G.; Selivanov, N. I.; Kopylova, T. N. Spectral Properties of Nile Red in Solutions and Thin Films. *Opt. Spectrosc.* **2014**, *116* (1), 72–76. <https://doi.org/10.1134/S0030400X14010196>.
- (305) Kucherak, O. A.; Oncul, S.; Darwich, Z.; Yushchenko, D. A.; Arntz, Y.; Didier, P.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. Switchable Nile Red-Based Probe for Cholesterol and Lipid Order at the Outer Leaflet of Biomembranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (13), 4907–4916. <https://doi.org/10.1021/ja100351w>.
- (306) Jose, J.; Loudet, A.; Ueno, Y.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K. Intracellular Imaging of Organelles with New Water-Soluble Benzophenoxazine Dyes. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (9), 2052–2059. <https://doi.org/10.1039/B925845K>.
- (307) Chen, S.-J.; Chang, H.-T. Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles for Selective Determination of Thiols Based on Energy Transfer and Aggregation. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (13), 3727–3734. <https://doi.org/10.1021/ac049787s>.
- (308) Karpenko, I. A.; Kreder, R.; Valencia, C.; Villa, P.; Mendre, C.; Mouillac, B.; Mély, Y.; Hibert, M.; Bonnet, D.; Klymchenko, A. S. Red Fluorescent Turn-On Ligands for Imaging and Quantifying G Protein-Coupled Receptors in Living Cells. *ChemBioChem* **2014**, *15* (3), 359–363. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300738>.

- (309) Šolomek, T.; Wirz, J.; Klán, P. Searching for Improved Photoreleasing Abilities of Organic Molecules. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (12), 3064–3072. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00400>.
- (310) Zimmerman, H. E. The Meta Effect in Organic Photochemistry: Mechanistic and Exploratory Organic Photochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (35), 8988–8991. <https://doi.org/10.1021/ja00140a014>.
- (311) Murugan, N. A.; Rinkevicius, Z.; Ågren, H. Modeling Solvatochromism of Nile Red in Water: Solvatochromism of NR in Water. *Int. J. Quantum Chem.* **2011**, *111* (7–8), 1521–1530. <https://doi.org/10.1002/qua.22655>.
- (312) Marazzi, M.; Gattuso, H.; Monari, A. Nile Blue and Nile Red Optical Properties Predicted by TD-DFT and CASPT2 Methods: Static and Dynamic Solvent Effects. *Theor Chem Acc* **2016**, *135* (3), 57. <https://doi.org/10.1007/s00214-016-1814-z>.
- (313) Ya. Freidzon, A.; Safonov, A. A.; Bagaturyants, A. A.; Alfimov, M. V. Solvatofluorochromism and Twisted Intramolecular Charge-Transfer State of the Nile Red Dye. *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112* (18), 3059–3067. <https://doi.org/10.1002/qua.24233>.
- (314) Hornum, M.; Mulberg, M. W.; Szomek, M.; Reinholdt, P.; Brewer, J. R.; Wüstner, D.; Kongsted, J.; Nielsen, P. Substituted 9-Diethylaminobenzo[a]Phenoxazin-5-Ones (Nile Red Analogues): Synthesis and Photophysical Properties. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (2), 1471–1488. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02346>.
- (315) Bautista-Gomez, J.; Usman, A.; Zhang, M.; J. Rafferty, R.; H. Bossmann, S.; L. Hohn, K.; A. Higgins, D. Fluorescence Spectroscopy Studies of Crossed Aldol Reactions: A Reactive Nile Red Dye Reveals Catalyst-Dependent Product Formation. *Catalysis Science & Technology* **2020**, *10* (16), 5579–5592. <https://doi.org/10.1039/D0CY00806K>.
- (316) Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure–Property Relationships, and Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (26), 7492–7509. <https://doi.org/10.1002/anie.201500088>.
- (317) Davies, S.; Oliveira, B. L.; Bernardes, G. J. L. Development of a Self-Immolative Linker for Tetrazine-Triggered Release of Alcohols in Cells. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (23), 5725–5730. <https://doi.org/10.1039/C9OB01167F>.
- (318) Meyer, Y.; Richard, J.-A.; Delest, B.; Noack, P.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. A Comparative Study of the Self-Immolation of Para-Aminobenzylalcohol and Hemithioaminal-Based Linkers in the Context of Protease-Sensitive Fluorogenic Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (8), 1777. <https://doi.org/10.1039/b926316k>.
- (319) Rong, X.; Xu, Z.-Y.; Yan, J.-W.; Meng, Z.-Z.; Zhu, B.; Zhang, L. Nile-Red-Based Fluorescence Probe for Selective Detection of Biothiols, Computational Study, and Application in Cell Imaging. *Molecules* **2020**, *25* (20), 4718. <https://doi.org/10.3390/molecules25204718>.

Arthur LAURENT

Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux neuropeptides photoactivables impliqués dans la modulation de la douleur

Résumé

La douleur chronique est un problème de santé publique majeur et les analgésiques opioïdes présentent de nombreux effets secondaires et sont connus pour induire de la tolérance et de l'addiction. Il y a donc un besoin urgent de trouver des traitements alternatifs. GalR₂ est un RCPG connu pour être impliqué dans la modulation de la douleur, toutefois son rôle précis n'est pas encore clair. Afin de permettre un contrôle spatio-temporel précis de ce récepteur nous avons utilisé la photopharmacologie pour développer les premiers dérivés photoactivables de la spexine, un neuropeptide endogène qui active spécifiquement GalR₂. Nous avons synthétisé des dérivés photoisomérisables portant un motif azobenzène qui ont montré différents profils d'activité vis-à-vis de GalR₂. À côté de cela, les dérivés photocage de la spexine comprenant une tyrosine protégée avec un o-NB ou une DEACM ont montré une photoactivation significative ce qui a amené au développement de la première sonde photoactivable de GalR₂ qui pourra être utilisée sur l'animal vivant.

Mots clés : douleur, GalR₂, RCPG, photopharmacologie, spexine, photoisomérisable, photocage

Abstract

Chronic pain is a major public health issue and opioid analgesics present many side effects and they are known to prone tolerance and addiction. So there is an urgent need for alternative treatments. GalR₂ is a GPCR know to be involved in pain modulation, however its precise role is still unclear. To allow a precise spatio-temporal control of this receptor, we used photopharmacology to develop the first photoactivatable derivatives of the spexin, an endogenous neuropeptide that specifically activate GalR₂. We synthesized photoswitchable derivatives bearing an azobenzene moiety and they demonstrated different activity patterns towards GalR₂. On the other hand, photocage spexin derivatives bearing a tyrosine protected with o-NB or DEACM showed significant photoactivation leading to the development of the first photoactivatable probe for GalR₂ which could be further use in living animal.

Keywords: pain, GalR₂ GPCR, photopharmacology, spexin, photoswitchable, photocage