



HAL
open science

Stabilité plasmatique et biodistribution d'un inhibiteur d'EPAC1, le (R)-CE3F4, et modifications apportées par les nanovecteurs lipidiques

Balthazar Toussaint

► **To cite this version:**

Balthazar Toussaint. Stabilité plasmatique et biodistribution d'un inhibiteur d'EPAC1, le (R)-CE3F4, et modifications apportées par les nanovecteurs lipidiques. Pharmacie galénique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ030 . tel-03774274

HAL Id: tel-03774274

<https://theses.hal.science/tel-03774274v1>

Submitted on 10 Sep 2022

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

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

Stabilité plasmatique et biodistribution d'un
inhibiteur d'EPAC1, le (R)-CE3F4, et modifications
apportées par les nanovecteurs lipidiques
*Plasma stability and biodistribution of the EPAC1 inhibitor
(R)-CE3F4, and its modulation by lipid-based nanocarriers*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué, ITFA
Spécialité de doctorat : pharmacotechnie et biopharmacie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296,
Châtenay-Malabry, France
Réfèrent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 08 septembre 2021, par**

Balthazar TOUSSAINT

Composition du Jury

Vincent JULLIEN Professeur, Université Sorbonne Paris Nord	Président
Karine ANDRIEUX Professeure, Université de Paris	Rapporteur & Examinatrice
Béatrice HEURTAULT Maîtresse de conférences, HDR Université de Strasbourg	Rapporteur & Examinatrice
Guillaume PIDOUX Chargé de recherche Inserm, Université Paris-Saclay	Examineur

Direction de la thèse

Elias FATTAL Professeur, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Hervé HILLAIREAU Professeur, Université Paris-Saclay	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Elias Fattal, ainsi que mon co-directeur, le Pr. Hervé Hillaireau. Vous m'avez fait confiance jusqu'au bout malgré un contexte peu adapté avec l'internat, mon temps de présence limité, et un sujet finalement plus contraignant qu'attendu. Merci pour vos conseils et remarques qui m'ont permis de m'améliorer, et qui me serviront pour l'avenir.

Merci Elias. Dès que je t'ai contacté (la semaine où j'ai su que j'avais le concours de l'internat), tu étais partant pour une thèse, et cela m'a rassuré. Je pense avoir eu de la chance d'être passé par l'UMR8612, dans ton équipe, pour mon master et ma thèse. Dans cette équipe, l'ambiance était toujours plaisante et cela a beaucoup compté pour moi ces 5 dernières années. Merci pour ton côté direct, et ton expérience.

Merci Hervé pour ton calme, ta patience, ta manière de rassurer et de canaliser le positif. J'ai eu beaucoup de doutes, dans ma manière de faire, de réfléchir, dans mes résultats, et j'en passe... Cela m'a fait du bien d'entendre parfois « Non, mais Balthazar... ces résultats, ils sont supers intéressants ! ». Ton enthousiasme et ta capacité à voir le positif ont été moteurs dans ce travail.

Je remercie le Pr. Karine Andrieux et le Dr. Béatrice Heurtault d'avoir accepté d'être les rapporteurs et examinatrices de mon travail, ainsi que le Dr. Guillaume Pidoux d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le Pr. Vincent Jullien d'examiner aussi ce travail, et surtout pour avoir toujours été présent dans mon parcours hospitalier et universitaire. Une partie de ce travail n'aurait pas été accessible « facilement » si je n'avais pas croisé ta route.

Je remercie nos collaborateurs au sein de ce projet LabEx Lermite. Notamment le Dr. Rodolphe Fischmeister qui a porté le projet global dont l'un des versants était mon sujet de thèse, et le Dr. Yves Ambroise qui m'a rapidement mis à l'aise parmi toutes les équipes présentes aux réunions. Merci Yves pour ta sympathie et ta disponibilité quand nous avons eu besoin de toi (merci pour le CE3F4, le métabolite et le ^3H -CE3F4...). Merci aussi à l'équipe de R&D de Sanofi (Chilly-Mazarin), et particulièrement Frédéric Puech avec qui j'ai pu échanger au cours de la collaboration « ciblage ».

Merci à Catherine Caillaud pour le versant « animal » ainsi qu'à Assia Hessani pour le versant « radioactivité ». Grâce à vous les manip ont pu se faire simplement

et sympathiquement. Sans vous, cela aurait été vraiment compliqué avec les transports trop longs et les nuits trop courtes... Merci pour votre calme, votre gentillesse et votre efficacité.

Merci au Dr. Emmanuel Jaccoulet, dont j'ai croisé la route il y a 6 ans. Ta pédagogie et nos discussions me font toujours plaisir. Merci à toi pour ta fraîcheur et ta motivation à me solliciter dans tes projets.

Merci au (presque) Dr. Pauline Legrand qui a apporté ses compétences de massiste dans l'une des parties de ce travail. Je tiens surtout à te remercier pour ton amitié, ton écoute, et ton soutien. Voir qu' « on n'est pas seul » à galérer entre vie personnelle et les versants H/U/enseignements... c'est bête mais ça fait bien.

Merci à TOUTE l'équipe 5 de l'UMR8612 qui est une belle équipe avec de belles personnes. Je remercie particulièrement le Dr. Nicolas Tsapis, le Dr. Laurence Moine et le Pr. Amélie Bochot, dont j'ai pu apprécier la bienveillance et la sympathie, ainsi que les conseils et avis.

Un grand merci au « Top Bureau » et sa « pyramide » magnifique & thérapeutique. Depuis sa création et jusqu'à mon départ du bureau : Caroline Twarog, Céline Jaudoin, Federica Costamagna, Maud Taulen, Clélia Mathieu, Serra Gurcan, Ludmila Nascimento... Vous êtes au top, chacune de vous a apporté quelque chose dans ce bureau. Merci de m'avoir toujours gardé une place malgré ma faible présence et mes défauts (humour graveleux, jeux de mots laids, nuisances sonores et problématiques analytiques)... ça aurait compliqué sans vous. Je tiens à remercier aussi Raul Diaz Salmeron, et Thomas Isoardo pour leur amitié (et leur bonne humeur !).

J'en profite pour remercier un ancien de l'UMR8612, le Dr. Félix Sauvage. Merci de continuer à partager ton humour « un peu décalé », j'y suis trop réceptif. Merci aussi pour les discussions qu'on a pu avoir, même à distance.

Merci à mes anciens co-internes qui m'ont soutenu et aidé à décompresser pendant l'internat. Merci à mes collègues de l'AGEPS, mes collègues de réglementaire à la fac, avec qui j'apprécie tous les jours mon travail tant sur le plan professionnel qu'humain. Merci au Dr. Vincent Boudy de m'avoir permis de dégager un peu de temps pour la thèse et pour sa confiance. Merci au Dr. Amélie Wojcicki pour son soutien et sa motivation. De plus, merci à Gabriel Alviset qui me supporte en face à face depuis presque deux an, quelle patience !

Je remercie le Pr. Patrice Prognon, que j'ai pu rencontrer notamment au début de mon externat à l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Merci pour votre temps, votre implication pour les étudiants et votre bienveillance. Vous avez su me rassurer concernant le choix de la filière IPR, l'organisation (pas facile) de mon double cursus « analytique » à l'hôpital et « galénique » pour la thèse de science à la fac.

Merci au Dr. Antoine Tarjus, (ex)voisin d'enfance, et encadrant de mon tout premier stage de recherche quand j'étais en 4^e année de pharma. Merci de m'avoir montré suffisamment tôt ce que pouvait être vraiment la recherche, avec ses hauts, ses bas... mais surtout que recherche et café étaient indissociables !

Merci à ma famille, mes amis, qui continue de me tenir au courant et de proposer des choses, bien que je sois aux abonnés absents depuis bien longtemps...

Et un merci particulier à toi Anne-Laure. Merci pour ta patience vis-à-vis de mes études à rallonge, de mon travail trop présent à la maison. Je te remercie pour ton soutien, ta confiance, ta patience, et ton amour.

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	19
<u>Partie bibliographique</u>	23
1. Généralités sur l'insuffisance cardiaque & traitements associés.....	23
1.1. Présentation & prévalence.....	23
1.2. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque.....	25
1.3. Mécanismes d'adaptation délétères à long terme.....	27
1.4. Prise en charge de l'insuffisance cardiaque chronique.....	28
1.4.1. Evaluation de la qualité de vie.....	28
1.4.2. Objectifs de la prise en charge.....	29
1.4.3. Les mesures hygiéno-diététiques.....	30
1.4.4. Les traitements.....	31
1.4.4.1. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion et antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II AT1.....	31
1.4.4.2. Bêtabloquants.....	32
1.4.4.3. Antialdostérones.....	33
1.4.4.4. Diurétiques, sauf antialdostérones.....	33
1.4.4.5. Autres médicaments associés.....	33
1.4.5. Traitements non-médicamenteux.....	34
1.5. Conclusions sur l'insuffisance cardiaque.....	34
2. Stratégie de développement d'un nouveau traitement de l'insuffisance cardiaque....	35
2.1. Le CE3F4, nouvelle molécule d'intérêt.....	35
2.1.1. Généralités sur la famille de protéines Epac.....	35
2.1.2. Différences entre Epac1 et Epac2.....	39
2.1.2.1. Distributions tissulaires d'Epac1 et Epac2.....	40
2.1.2.2. Localisations intracellulaires d'Epac1 et d'Epac2.....	42
2.1.3. Implication d'Epac dans l'insuffisance cardiaque.....	45
2.1.4. Le CE3F4.....	47
2.2. Intérêt des peptides de ciblage pour la distribution de nanoparticules au cœur.....	48
2.2.1. Stratégie de ciblage passif des nanoparticules au niveau cardiaque.....	51
2.2.1.1. Distribution chez l'animal sain.....	51
2.2.1.2. Mécanisme passif de ciblage dans un contexte d'insuffisance cardiaque aiguë d'origine ischémique.....	51

2.2.2.Stratégies de ciblage actif utilisant les peptides à tropisme cardiaque	56
2.2.2.1. Le CRPPR.....	56
2.2.2.2. Le CTP.....	58
2.2.2.3. Le PCM.....	59
2.2.2.4. Autres peptides pour le ciblage cardiaque.....	61
2.2.2.5. Associations au peptide de pénétration TAT.....	65
2.2.3.Conclusions.....	66
Références bibliographiques.....	68

Partie Expérimentale

Chapitre 1 : Comparaison interespèces du métabolisme plasmatique et stabilisation d'échantillons en bioanalyse : application au (R)-CE3F4 en développement préclinique, et identification d'un métabolite par spectrométrie de masse à haute résolution 85

Résumé :	85
Abstract.....	88
1. Introduction.....	89
2. Materials and methods.....	91
2.1. Chemicals	91
2.2. Biological samples.....	92
2.3. Preparation of (R)-CE3F4 stock solutions, calibration standards, and quality controls.....	92
2.4. Sample treatment.....	93
2.5. Stock solutions of enzyme inhibitors	94
2.6. Instruments.....	94
2.6.1.UV/Visible spectrophotometer.....	94
2.6.2.Liquid chromatography with UV detection.....	95
2.6.3.Liquid chromatography with MS/MS detection.....	95
2.7. Analytical method validation for (R)-CE3F4 plasma stability studies	96
2.7.1.Specificity.....	96
2.7.2.Quantitative validation	96
2.7.3.Extraction recovery and stability	98
2.8. Applications for the evaluation of (R)-CE3F4 ex vivo stability in human or murine plasma	98
2.8.1.(R)-CE3F4 behaviour in plasma at 37°C.....	98

2.8.2. Stabilization studies of (R)-CE3F4 in murine plasma at 37°C with EDTA, paraoxon, BNPP, or benzil.....	99
2.8.3. Storage conditions suitable for (R)-CE3F4 in murine plasma.....	99
2.8.4. HPLC-MS/MS for metabolite identification	100
3. Results and discussion.....	100
3.1. Spectral analysis of (R)-CE3F4 & method validation.....	100
3.1.1. Spectral analysis.....	100
3.1.2. Validation of the (R)-CE3F4 method quantification in human plasma	100
3.1.3. Human plasma samples stability	104
3.2. Application of the LC-UV method to the evaluation of (R)-CE3F4 ex vivo stability in human or murine plasma	105
3.2.1. Chromatograph difference in specificity between human and murine plasma	105
3.2.2. (R)-CE3F4 and ex vivo plasmatic metabolism at 37°C.....	106
3.2.3. Stabilization studies of (R)-CE3F4 in murine plasma at 37°C with paraoxon	109
3.2.4. Validation of the (R)-CE3F4 method quantification in murine plasma loaded with paraoxon	112
3.2.5. Murine sample storage.....	113
3.3. Identity of the main metabolite	113
3.3.1. HPLC-UV analysis.....	114
3.3.2. HPLC-MS/MS analysis.....	114
4. Conclusion.....	116
Acknowledgment	117
Conflict of Interest	117
References.....	117

Chapitre 2 : Stabilité, pharmacocinétique et biodistribution chez la souris du (R)-CE3F4, un inhibiteur d'EPAC1, encapsulé dans des liposomes et des nanocapsules lipidiques **131**

Résumé :	131
Abstract.....	133
1. Introduction.....	134
2. Materials & methods.....	135
2.1. Chemicals	135
2.2. (R)-CE3F4 quantification	136
2.2.1. Chromatographic system	137

2.2.2. Sample treatment.....	137
2.3. (R)-CE3F4 encapsulation	138
2.3.1. Liposomes	138
2.3.1.1. Liposome preparation	138
2.3.1.2. Evaluation of drug encapsulation.....	138
2.3.2. Encapsulation in lipid nanocapsules.....	140
2.3.3. Size and zeta potential measurements.....	140
2.3.4. Calculation of (R)-CE3F4 surface density and content per particle.....	140
2.4. Vehicle for in vivo administration of free (R)-CE3F4.....	141
2.5. (R)-CE3F4 stability study in murine plasma, evaluation of the impact of formulations	142
2.6. <i>In vivo</i> studies	142
2.6.1. Pharmacokinetic study	142
2.6.2. Biodistribution study	143
2.6.2.1. Design of the study	143
2.6.2.2. Free ³ H-CE3F4.....	143
2.6.2.3. ³ H-CE3F4 in ¹⁴ C-LNC	143
2.6.2.4. Sample treatment.....	144
2.6.2.5. Data analysis	144
2.7. Statistical analysis	145
3. Results & Discussion	145
3.1. (R)-CE3F4 encapsulation	145
3.1.1. Liposomes	145
3.1.2. Lipid nanocapsules.....	147
3.2. (R)-CE3F4 degradation in plasma	148
3.3. (R)-CE3F4 fate in vivo	151
3.3.1. Vehicle choice for the administration of free (R)-CE3F4	151
3.3.2. Pharmacokinetic study	151
3.3.3. Biodistribution studies	152
4. Conclusions.....	156
Acknowledgment	156
Conflict of Interest	157
References.....	157
Suppl. Methods.....	161
Suppl. Results.....	163

Discussion générale **167**

1. Développement analytique pour le dosage plasmatique du CE3F4.....	168
1.1. Validation et recherche d'un inhibiteur enzymatique efficace	168
1.2. Hypothèses sur l'enzyme impliquée dans la dégradation plasmatique du CE3F4.....	169
2. Formulation du CE3F4 à l'aide de nanovecteurs lipidiques	171
2.1. Discussion sur les formulations mises au point.....	171
2.2. Autres formulations explorées.....	175
2.2.1. Liposomes	175
2.2.2. Nanocapsules lipidiques	176
2.3. Corrélation entre la stabilité plasmatique du CE3F4 et les paramètres de formulation	177
2.3.1. Choix des facteurs explicatifs	177
2.3.2. Corrélations observées pour les liposomes	178
2.3.3. Corrélations observées pour les nanocapsules lipidiques.....	179
2.3.4. Corrélations sur l'ensemble des formulations.....	179
2.4. Nouvelles stratégies pour l'inhibition d'EPAC1	181
2.4.1. Systèmes encapsulant le CE3F4.....	181
2.4.2. Utilisation d'analogues du CE3F4 pour l'inhibition d'EPAC1	182
Références bibliographiques.....	183

Annexe 1 : Résultats préliminaires sur l'intérêt du diCRPPR pour le ciblage cardiaque de nanovecteurs **189**

Conclusion générale **205**

Introduction générale

L'insuffisance cardiaque est une maladie d'origine multifactorielle qui se traduit dans sa finalité par l'incapacité du cœur à assurer correctement son rôle, et se caractérise par une mortalité importante. Elle peut être aiguë comme dans l'infarctus du myocarde, ou bien chronique à la suite d'un remodelage cardiaque causé par une hypertension artérielle chronique. Dans le cas de l'insuffisance cardiaque chronique, plusieurs traitements pharmacologiques existent, mais ils ne suffisent pas à eux seuls à traiter la pathologie. Ces traitements n'ont qu'un rôle de frein sur l'évolution délétère de l'insuffisance cardiaque, ce qui se traduit par une détérioration progressive et irréversible de la qualité de vie du patient jusqu'à son décès. C'est pourquoi la recherche de nouvelles cibles pharmacologiques et de nouvelles stratégies pour atteindre et soigner le cœur est toujours un sujet d'actualité.

C'est dans ce contexte que se situent les travaux exposés dans ce manuscrit. En 2012, l'énantiomère (*R*) du CE3F4, un analogue de la tétrahydroquinoléine, a été identifié comme inhibiteur de la protéine ubiquitaire EPAC1 (*exchange protein directly activated by cAMP*). Depuis, différentes études ont révélé l'intérêt d'utiliser cette molécule pour traiter différentes pathologies, et notamment pour inhiber le remodelage cardiaque. Les travaux de cette thèse menée à l'Institut Galien Paris-Saclay (UMR 8612 CNRS – Université Paris-Saclay) sous la direction du Pr Elias Fattal et du Pr Hervé Hillaireau, s'inscrivent dans un partenariat pluridisciplinaire coordonné par le Dr Rodolphe Fischmeister (Inserm, UMR-S 1180 « Signalisation et physiopathologie cardiaque ») au sein du LabEx « LERMIT » ayant pour but d'étudier le (*R*)-CE3F4 dans différents domaines de la recherche (caractérisation de la cible, modélisation, chimie, biologie, pharmacologie) en raison du peu de données fondamentales disponibles sur cette molécule, tant sur l'interaction avec sa cible EPAC1 que son devenir dans l'organisme.

L'intérêt de proposer une formulation adaptée au CE3F4 a été identifié en raison (1) de résultats préliminaires montrant l'instabilité métabolique du (*R*)-CE3F4 en présence de microsomes hépatiques et de plasma de rats (Alain Pruvost, CEA), nécessitant la mise en œuvre de moyens de protection de cette molécule afin qu'elle puisse exercer son activité ; (2) de la présence ubiquitaire d'EPAC1 dans l'ensemble des cellules, pouvant causer des effets pharmacologiques secondaires si le CE3F4 atteint des tissus qui ne sont pas à traiter.

Afin de répondre à ces deux problématiques de protection contre la dégradation enzymatique et de contrôle de la distribution du (*R*)-CE3F4 pour cibler le cœur, nous avons proposé l'encapsulation du CE3F4 dans des nanovecteurs lipidiques (liposomes et nanocapsules lipidiques). Ces nanoparticules peuvent être modifiées afin de présenter un ligand de ciblage à leur surface, et conférer aux particules un tropisme tissulaire ou cellulaire particulier. Les objectifs de cette thèse furent ainsi :

- Encapsuler le (*R*)-CE3F4 dans des liposomes et nanocapsules lipidiques ;
- Développer les outils analytiques adaptés pour évaluer l'intérêt de ces formulations, *in vitro* et *in vivo* ;
- Comprendre le devenir biologique du (*R*)-CE3F4 encapsulé ou non ;
- Modifier ces nanovecteurs par un peptide de ciblage cardiaque.

Ce manuscrit se divise en deux parties principales :

- Une partie bibliographique portant sur (1) l'insuffisance cardiaque, (2) le (*R*)-CE3F4 et sa cible, et (3) les ligands peptidiques de ciblage utilisés pour favoriser la distribution cardiaque de nanoparticules ;
- Une partie expérimentale divisée en deux chapitres. Le premier concerne le développement et la validation d'une méthode pour la quantification du (*R*)-CE3F4 dans le plasma, la mise en évidence d'une différence inter-espèces sur le métabolisme plasmatique de la molécule, et l'identification du métabolite observé. Le deuxième chapitre porte sur l'encapsulation du (*R*)-CE3F4 dans des

nanovecteurs lipidiques et leur capacité à le protéger du métabolisme plasmatique *in vitro*, ainsi que sur le devenir *in vivo* du (R)-CE3F4 et des nanoparticules sélectionnées.

Ces deux parties sont suivies d'une discussion générale portant sur les parties expérimentales. Les résultats préliminaires de ciblage cardiaque par des liposomes fonctionnalisés par le peptide CRPPR sont décrits en annexe.

Partie bibliographique

1. Généralités sur l'insuffisance cardiaque & traitements associés

1.1. Présentation & prévalence

L'insuffisance cardiaque (IC) est une pathologie définie par l'incapacité du cœur à assurer un débit suffisant pour répondre aux besoins métaboliques des tissus périphériques. C'est une maladie systémique aiguë ou chronique qui apparaît sur un terrain pathologique préexistant (Tableau 1). Les symptômes sont généralement des dyspnées ou fatigues, associées à d'autres signes tels que des œdèmes périphériques, tachycardie, ou augmentation de la pression veineuse jugulaire (1,2), mais selon l'atteinte cardiaque les signes fonctionnels et cliniques sont variés (Tableau 2).

Tableau 1 : Etiologies de l'insuffisance cardiaque gauche et droite. (1-3)

IC gauche	IC droite
Atteinte ischémique (athérosclérose coronarienne) 1 ^{ère} cause d'IC	Hypertension pulmonaire causée par : - insuffisance ventriculaire gauche - rétrécissement mitral - pathologie pulmonaire chronique - embolie pulmonaire
Cardiomyopathie : - dilatée (majoritairement idiopathique) - hypertrophique obstructive et non obstructive - restrictive - hypertensive - rythmique (généralement réversible) - toxique (anthracyclines, alcool) - carentielle (avitaminose B1 => béribéri) - du post-partum	Hypertension artérielle pulmonaire (primitive ou associée à une connectivite)
	Cardiopathie congénitale avec shunt gauche-droit (communication interauriculaire, ou interventriculaire)
	Péricardite constrictive, tamponnade
	Insuffisance cardiaque par hyperdébit
	Infarctus du ventricule droit
	Cardiopathie de surcharge (hémochromatose et amylose)
Cardiopathie congénitale non corrigée	Valvulopathie droite
Myocardite (virale le plus souvent, maladie de Chagas)	
Sarcoïdose, collagénose, myopathie	
Pathologies valvulaires (rétrécissement aortique, insuffisance aortique, rétrécissement mitrale, insuffisance mitrale)	
Hyperdébit (anémie, hyperthyroïdie, maladie de Paget...)	

Tableau 2 : Signes fonctionnels et cliniques en fonction de l'insuffisance cardiaque gauche ou droite. (1-3)

	IC gauche	IC droite
Signes fonctionnels	Dyspnée (symptôme majeur, classification NYHA), la dyspnée d'effort s'aggrave au cours de l'évolution	Hépatalgie d'effort
	Orthopnée	
	Pseudo-asthme cardiaque	
	Œdème aigu du poumon (urgence)	
	Subœdème pulmonaire	
	Toux à l'effort ou la nuit	
	Hémoptysie	
	Asthénie, altération de l'état général	
	Troubles des fonctions cognitives (bas débit cardiaque)	
	Oligurie	
Signes cliniques	Déviations du choc de pointe vers la gauche et en bas perçus à la palpation	Signe de Harzer à la palpation (dilatation du ventricule droit)
	Tachycardie, pouls alternant (formes évoluées)	Tachycardie
	Lors de l'auscultation cardiaque : - bruit du galop gauche (bruit surajouté) - souffle systolique d'insuffisance mitrale - éclat de B2 (bruit lié à la fermeture des valves pulmonaire et aortique) au foyer pulmonaire (hypertension artérielle pulmonaire)	Lors de l'auscultation cardiaque : - bruit du galop droit (bruit surajouté) - souffle systolique d'insuffisance tricuspide - éclat de B2 au foyer pulmonaire (hypertension artérielle pulmonaire)
	- tension artérielle basse si diminution importante du volume d'éjection systolique, ou pincée	Œdèmes des membres inférieurs : bilatéraux, prenant le godet.
	Lors de l'auscultation pulmonaire : - râles crépitantes aux bases ou étendus aux deux champs pulmonaires (œdème aigu du poumon)	Turgescence jugulaire
- sibilants (pseudo-asthme cardiaque)	Reflux hépatojugulaire	
	Hépatomégalie (souvent pulsatile et douloureuse)	
	Dans les formes avancées : épanchements pleuraux, ascite, parfois état d'anasarque, ictère, troubles digestifs	

L'IC présente une prévalence plus importante dans les pays industrialisés en raison du vieillissement de la population et d'une meilleure prise en charge des cardiopathies ischémiques. Cette prévalence augmente avec l'âge (10% de la

population présente une altération de la fonction cardiaque après 65 ans) (2). La prévalence globale de l'IC était de 1 à 2% dans la population adulte mondiale en 2016 (1,2). Elle est actuellement de 2,3% en France (4). A l'échelle mondiale, l'IC est présente chez au moins 10% de la population âgée de plus de 70 ans (2).

L'examen clé permettant le diagnostic de l'insuffisance cardiaque est l'échographie-Doppler. Il permet de poser le diagnostic étiologique et présente aussi un intérêt pronostique (5). Il permet de mesurer des dimensions ventriculaires, et de mesurer le débit cardiaque. La fraction d'éjection (FE) du ventricule gauche d'un individu sain est de 50%. Cette FE correspond au ratio entre le volume d'éjection systolique (VES) et le volume télédiastolique, soit plus simplement le ratio entre le volume de sang éjecté par le ventricule et le volume de sang présent avant contraction. Lorsque la FE est inférieure à 40%, on parle d'IC associée à une dysfonction systolique (altération de la contraction ventriculaire). La dysfonction systolique du ventricule gauche constitue une forme fréquente d'IC (3). Il existe aussi une forme où la fonction systolique est préservée ($FE \geq 50\%$), on parle alors d'IC diastolique (altération du remplissage ventriculaire). Cette dernière est favorisée par l'hypertension artérielle engendrant une hypertrophie ventriculaire gauche, et touche surtout les sujets âgés et les femmes.

1.2. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque

L'IC peut être aiguë ou chronique, et peut toucher le « cœur droit » qui achemine un sang pauvre en oxygène vers les poumons, le « cœur gauche » qui pompe le sang oxygéné par les poumons vers les organes périphériques, ou les deux simultanément. Ainsi on parle d'insuffisance cardiaque droite, gauche, ou globale selon les symptômes observés.

Bien que d'étiologies diverses et les conséquences différentes selon l'atteinte cardiaque, il est possible d'utiliser une approche générale afin d'expliquer l'installation de l'insuffisance cardiaque (1). Le débit cardiaque (DC) dépend de la

fréquence cardiaque (FC) et du volume d'éjection systolique (VES), comme indiqué par l'équation (I). Le VES correspond à la différence entre les volumes télédiastolique et télésystolique, soit plus simplement le volume de sang expulsé par le cœur par battement.

$$DC (mL.min^{-1}) = FC (battements.min^{-1}) \times VES (mL.battement^{-1}) \quad (I)$$

La FC est contrôlée par le nœud sinusal. Le nœud sinusal est localisé au niveau de l'oreillette droite et est composé de cellules à l'origine du rythme cardiaque qui ont la capacité de se dépolariser de manière régulière. Ce nœud sinusal est régulé par :

- Le système parasympathique via le nerf vague, qui diminue de la FC ;
- Le système sympathique, via l'adrénaline et la noradrénaline sécrétées dans le sang par les glandes surrénales, qui stimule une augmentation de la FC.

Le VES quant à lui dépend de 3 paramètres (1), qui sont :

- La précharge, soit le volume de sang qui entre dans le ventricule avant sa contraction, appelé aussi volume télédiastolique. Sa diminution entraîne une diminution du VES ;
- La postcharge, correspondant à la force d'opposition à l'éjection du sang du ventricule. Son augmentation entraîne une diminution du VES ;
- La contractilité, qui est la capacité du ventricule à se contracter, est indépendante de la précharge et de la postcharge. Sa diminution entraîne une diminution du VES.

Ainsi, une diminution de la précharge, une augmentation de la postcharge, ou une diminution de la contractilité entraînent une diminution du VES, et donc du débit cardiaque d'après l'équation (I). Afin d'illustrer les différents cas de figure pour lesquels la VES diminue, différentes conditions pathologiques à l'origine d'une IC vont être décrits succinctement.

Dans le cas d'une ischémie coronaire, le myocarde ne peut plus assurer sa fonction par manque d'oxygène/nutriments, entraînant ainsi une diminution de la contractilité. Dans le cas de l'hypertension artérielle, la pression aortique, augmentée, s'oppose à la pression générée par le ventricule gauche pour éjecter le sang. On observe par conséquent une augmentation de la postcharge. Une hypovolémie pourrait être à l'origine d'une diminution de la précharge, car moins de sang serait pompé par le ventricule. Le dernier exemple porte sur les valves cardiaques. Ces valves se situent entre les oreillettes et les ventricules (valve tricuspide et valve mitrale) et entre les ventricules et les artères (valve pulmonaire et valve aortique). Elles ont une fonction anti-reflux, empêchant le sang de revenir dans le compartiment précédent lors des contractions. Ainsi, leur altération empêche soit le bon remplissage du ventricule (précharge), soit la bonne éjection ventriculaire (postcharge).

1.3. Mécanismes d'adaptation délétères à long terme

Afin de maintenir un débit cardiaque suffisant, l'équation (I) permet de comprendre que des mécanismes compensateurs peuvent se mettre en place lors d'une diminution du VES. Le système sympathique (6) et le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) (7) ont un rôle prépondérant dans la compensation d'une diminution du VES. Cependant leur stimulation chronique devient cependant délétère dans l'IC (1).

L'adaptation du système sympathique via la libération de catécholamines engendre des effets cardiaques inotrope et chronotrope positifs (6,8) ainsi qu'une vasoconstriction périphérique en faveur du cerveau ainsi que du cœur (9,10). En effet, la libération de catécholamines en réponse à une augmentation de la postcharge va entraîner des modifications au niveau du myocarde pour assurer un débit suffisant pour les besoins de l'organisme. Ces modifications, via l'activation chronique des récepteurs β -1 cardiaques, provoquent sur le long terme une

augmentation de la taille des cardiomyocytes, une modification de l'expression de gènes (réactivation des gènes foëtaux) et donc une modification de l'expression de protéines avec une accumulation des myofibrilles, ceci ayant pour conséquence un déclin progressif de la fonction cardiaque (8,11–14).

L'activation du SRAA entraîne une rétention hydrosodée, provoquant une augmentation de la précharge, de la volémie, avec possible apparition de signes congestifs (1,15,16). Sur le long terme, l'angiotensine II est impliquée dans le développement d'une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une fibrose via les récepteurs à l'angiotensine AT1 (15,17,18), en plus de stimuler la libération de catécholamines (19). L'aldostérone est aussi impliquée dans le développement d'une fibrose cardiaque (20). Ainsi, le SRAA est impliqué à différents niveaux (angiotensine II, aldostérone) dans les modifications tissulaires cardiaques.

Ces adaptations sont des mécanismes compensateurs qui seront dépassés dans le temps et deviendront délétères. Il est à noter qu'il existe des modifications cardiaques lors de la grossesse ou chez le sportif afin de répondre aux besoins de l'organisme (21), mais que celles-ci sont physiologiques, réversibles et non liées à la mise en place d'un cercle vicieux pathologique comme observé lors de l'IC. De plus, d'autres mécanismes peuvent provoquer une altération dans la contraction du myocarde, comme une nécrose des myocytes (ischémie), une atteinte primitive (cardiomyopathie dilatée idiopathique), ou même une exposition à des substances cardiotoxiques (p. ex. anthracyclines, alcool, cocaïne) (3) comme indiqué dans le Tableau 1.

1.4. Prise en charge de l'insuffisance cardiaque chronique

1.4.1. Evaluation de la qualité de vie

Les conséquences de l'IC se font ressentir sur la qualité de vie des patients, notamment en ce qui concerne la mobilité et la résistance à l'effort. La dyspnée est le symptôme fréquent de l'IC, et son importance est centrale selon une cotation par la

NYHA (*New York Heart Association*) dont la dernière mise à jour a été publiée en 1994 (Tableau 3). Elle est donc utilisée depuis longtemps, et a servi de référence pour le suivi de la dyspnée dans l'IC (22). Cependant cette classification présente des limites, en raison de la subjectivité de l'effort pour le patient (habitudes de vie, notion d'exercice de la vie courante, âge...) mais aussi pour le praticien (interprétation de la qualité de l'exercice) pouvant être à l'origine d'un problème de reproductibilité. Goldman *et al.* ont observé que l'avis entre deux médecins indépendants n'est concordant que dans 56% des cas. Ainsi il peut y avoir une mauvaise corrélation avec la capacité d'effort, avec un désaccord fréquent pour classer les patients selon les stades II et III, et donc la valeur pronostique ne serait applicable que pour la classe IV (23). C'est pourquoi d'autres classifications ont été mis en en place en complément afin de pallier ces lacunes, à savoir celles de l'AHA (*American Health Association*) et de l'ACC (*American College of Cardiology*), qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit (3).

Tableau 3 : Cotation de la dyspnée par la classification NYHA.

Stade I	Dyspnée pour des efforts importants inhabituels, sans gêne ressentie dans la vie courante.
Stade II	Dyspnée pour des efforts importants habituels, comme la marche rapide ou en côte, ou lors de la montée d'escaliers (>2 étages)
Stade III	Dyspnée pour des efforts peu intenses de la vie courante, tels que la marche sur terrain plat ou la montée d'escaliers (>2 étages)
Stade IV	Dyspnée permanente au repos

1.4.2. Objectifs de la prise en charge

Pour la prise en charge de l'insuffisance cardiaque chronique, les objectifs sont surtout préventifs (24) :

- Traitement des pathologies pouvant évoluer vers l'IC (HTA, cardiopathies ischémiques, etc) ;
- Limiter la progression de la dysfonction systolique du ventricule gauche vers l'IC, qui est initialement asymptomatique ;

- Maintenir/améliorer la qualité de vie et limiter les réhospitalisations ;
- Augmenter la survie ;
- Traiter la cause de l'IC si possible et les facteurs favorisant une décompensation.

Les différentes possibilités de prise en charge seront détaillées dans les paragraphes suivants, et dépendent notamment de la fraction d'éjection du ventricule gauche (5). Il est à noter qu'il peut y avoir une aggravation (aiguë ou subaiguë) des signes cliniques et des symptômes, c'est ce qu'on appelle communément la décompensation cardiaque. L'attitude du patient par rapport à sa prise charge est centrale et fait partie des facteurs à contrôler pour limiter tout risque de décompensation cardiaque (Tableau 4). Concernant les autres facteurs de risques, la diminution du risque consiste à traiter ou suivre les patients spécifiquement pour ces facteurs.

Tableau 4 : Facteurs pouvant provoquer une décompensation cardiaque.

Lié à la prise en charge du patient	<ul style="list-style-type: none"> - Non-observance du traitement - Ecart de régime - Introduction récente d'un traitement inotrope négatif ou d'un anti-inflammatoire stéroïdien
Au niveau cardiovasculaire	<ul style="list-style-type: none"> - Poussée hypertensive - Ischémie myocardique - Troubles du rythme ou de la conduction
Au niveau pulmonaire	<ul style="list-style-type: none"> - Embolie pulmonaire - Exacerbation d'une insuffisance respiratoire - Infection pulmonaire
Autre :	<ul style="list-style-type: none"> - Aggravation d'une insuffisance rénale - Anémie - Grossesse

1.4.3. Les mesures hygiéno-diététiques

Ces mesures sont centrales dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque, et permettent de réduire les risques d'hospitalisation, de décompensation, et de décès par une prise en charge des facteurs de risques :

- Régime hyposodé (<6 g de sel/jour) ;

- Exercice physique n'entraînant pas de dyspnée ;
- Arrêt du tabac et de la consommation d'alcool ;
- Traitement surpoids/dénutrition ;
- Vaccination antigrippale ;
- Connaissances des traitements à éviter (ou précautions d'emploi) : AINS, coxibs, antiarythmiques de classe I, inhibiteurs calciques bradycardisants (vérapamil, diltiazem), antidépresseurs tricycliques, lithium, corticoïdes ;
- Education thérapeutique.

1.4.4. Les traitements

Ces traitements interviennent généralement lorsque la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) est inférieure à 40%. Le traitement central consiste à associer un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) avec un bêtabloquant en première intention (2,24,25). Si les symptômes persistent ou que la FEVG diminue (<35%), malgré le respect règles hygiéno-diététiques et un traitement aux doses maximales tolérées, d'autres molécules peuvent être ajoutées pour améliorer la fonction cardiaque, à savoir les antialdostérones, les diurétiques de l'anse de Henlé ou thiazidiques, les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II, et les digitaliques. Il est important de souligner que les IEC, bêtabloquants et antialdostérones permettent d'inhiber le remodelage cardiaque précédemment mentionné dans la partie 1.3 et présentent ainsi un intérêt majeur dans la prise en charge de l'IC chronique (26).

1.4.4.1. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion et antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II AT1

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont le traitement de première intention dans la dysfonction systolique du ventricule gauche (diminution de la FEVG). Cette enzyme permet la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II qui

est un octapeptide vasoconstricteur. L'enzyme intervient aussi dans la dégradation de la bradykinine qui est un nonapeptide vasodilatateur.

La diminution de l'angiotensine II diminue la stimulation de ses récepteurs (AT1 et AT2). Ceci a pour conséquence de réduire le tonus vasculaire, et de diminuer la libération d'aldostérone par la corticosurrénale. La diminution de l'aldostérone permet de limiter la réabsorption active en ion sodium Na^+ et passive en eau, augmentant ainsi la diurèse. De plus, l'angiotensine II a une action mitogène sur les fibroblastes myocytes au niveau cardiaque, pouvant favoriser le remodelage cardiaque à la suite d'un stress cardiaque (infarctus) (15,17,18). Les IEC induisent une diminution de la précharge, de la postcharge et du remodelage délétère du ventricule gauche grâce à l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Les IEC permettent une amélioration de la survie, des symptômes, de la capacité fonctionnelle et permettent la réduction du nombre d'hospitalisations (2).

Des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II (ARAI) peuvent aussi être soit utilisés en alternative aux IEC dans le cas d'une mauvaise tolérance à ces derniers, soit associés aux IEC si le patient reste symptomatique (2).

1.4.4.2. Bêtabloquants

Les bêtabloquants sont utilisés par des patients ayant une dysfonction systolique du ventricule gauche, d'origine ischémique ou non, en association avec un IEC. Ils ne sont préconisés que dans l'insuffisance cardiaque stable sans surcharge volémique, et sont contre-indiqués en cas de décompensation cardiaque.

Ils inhibent la stimulation du système sympathique avec une amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche (action chronotrope négative), diminuent les résistances périphériques pour les bêtabloquants non-cardiosélectifs (vasodilatation), et freinent le remodelage cardiaque. Des bêtabloquants cardiosélectifs peuvent être préférés pour limiter les effets périphériques en raison de leur sélectivité pour les récepteurs β -1 très présents au niveau cardiaque. Ils permettent une amélioration de

la survie, des symptômes, de la capacité fonctionnelle et réduction du nombre d'hospitalisations (2).

1.4.4.3. Antialdostérones

Les diurétiques antagonistes des récepteurs de l'aldostérone, représentés principalement par la spironolactone, permettent l'inhibition de la réabsorption d'ions sodium et d'eau comme mentionné précédemment avec les IEC. Cependant ils ont aussi un rôle important dans la prise en charge au long cours car il a été observé, chez des patients traités de par les IEC, une concentration plasmatique augmentée en aldostérone sur le long terme (27,28). Ainsi les IEC ne permettent pas à long-terme d'inhiber efficacement la libération d'aldostérone et donc de favoriser la diurèse, justifiant l'intérêt des antialdostérones pour la prise en charge de l'insuffisance cardiaque chronique (29) en plus de limiter la fibrose cardiaque (20).

1.4.4.4. Diurétiques, sauf antialdostérones

Les diurétiques présentent un intérêt dans le cas de symptômes congestifs, et sont ajoutés à l'association IEC/bêtabloquant dans la prise en charge de l'IC. Il y a les diurétiques de l'anse de Henlé et les thiazidiques qui inhibent la rétention hydrosodée (augmentation de l'excrétion urinaire). Les diurétiques de l'anse inhibent le cotransporteur NKCC permettant la réabsorption de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ au niveau de l'anse de Henlé (branche ascendante), inhibant ainsi la réabsorption passive d'eau. Les diurétiques thiazidiques inhibent le cotransporteur Na^+/Cl^- localisé au niveau de la partie initiale du tube contourné distal, empêchant aussi la réabsorption passive d'eau.

1.4.4.5. Autres médicaments associés

D'autres traitements peuvent être utilisés, comme les digitaliques en cas de persistance des symptômes malgré les associations entre les médicaments précédemment mentionnés (IEC, bêtabloquant, et antialdostérones) ou une fraction FEVG <35%. Ces digitaliques sont utilisés pour leurs effets inotropes positifs et

chronotropes négatifs, pour la prise en charge de patients ayant une fibrillation auriculaire (en association aux bêtabloquants). Dans le cas d'arythmie emboligène, des anticoagulants sont à envisager sur le long terme.

D'autres traitements médicamenteux existent, mais interviennent lors des prises en charge des insuffisances cardiaques réfractaires (usage hospitalier), et donc n'interviennent pas dans la prise en charge de l'IC chronique (lévosimendan, inhibiteurs de la phosphodiesterase, amines sympathicomimétiques).

1.4.5. Traitements non-médicamenteux

Ces traitements interviennent lorsque les prises en charge précédemment mentionnées ne sont pas ou plus suffisantes. Des dispositifs d'assistance ventriculaire (implantation d'une pompe), la pose d'un stimulateur cardiaque (*pacemaker*), ou la transplantation cardiaque peuvent être envisagés.

1.5. Conclusions sur l'insuffisance cardiaque

Malgré une prise en charge améliorée grâce à un arsenal thérapeutique important à disposition, permettant d'agir sur différentes voies délétères pour la fonction cardiaque, l'insuffisance cardiaque reste de mauvais pronostic et la proportion de décès reste importante (3). Actuellement, la prévention reste le meilleur moyen pour éviter l'évolution de certaines pathologies vers une insuffisance cardiaque chronique, et pour retarder l'évolution délétère d'une insuffisance cardiaque chronique déjà présente (3).

Ainsi, le développement de nouvelles molécules ayant des mécanismes d'action différents de ce qui déjà utilisé en clinique est crucial en vue d'améliorer la prise en charge des patients. Ce développement ayant pour objectif final de diminuer la mortalité, et d'améliorer la qualité de vie des patients. C'est pourquoi nous sommes intéressés au développement de nouveaux traitements pour augmenter l'arsenal thérapeutique, décrit ci-après, pour la prévention ou le traitement de l'IC chronique, qui présente une aggravation permanente malgré les traitements actuels.

2. Stratégie de développement d'un nouveau traitement de l'insuffisance cardiaque

2.1. Le CE3F4, nouvelle molécule d'intérêt

2.1.1. Généralités sur la famille de protéines Epac

Face à l'absence de traitements curatifs de l'IC et au manque de traitements médicamenteux efficaces pour limiter la détérioration de la fonction cardiaque à long terme, de nouvelles cibles thérapeutiques ont été recherchées. Parmi celles-ci une famille de protéines, Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*), a été mise en évidence et présente une implication dans de nombreux mécanismes physiologiques. Epac intervient dans le mécanisme de transduction du signal lié à l'AMPc (*adénosine monophosphate cyclique*). La conversion d'un signal de stimulation par une molécule exogène (p. ex. hormones, cytokines, neurotransmetteurs) en réponse cellulaire (p. ex. migration, contraction, sécrétion d'hormones, de matrice extracellulaire ou d'enzyme) nécessite un messenger secondaire pour transmettre le signal entre récepteur et effecteur. Cette étape correspond à la transduction du signal, et dans notre cas, le messenger secondaire est l'AMPc.

Bien que l'implication de l'AMPc comme second messenger dans la transduction du signal cellulaire soit connue depuis plus de soixante ans (30,31), ce n'est qu'en 1998 que la famille Epac a été découverte par deux équipes de recherche indépendantes qui ont pu identifier des gènes codant pour cette famille de protéines, à savoir cAMP-GEFI et cAMP-GEFII (32), ainsi que le gène RAPGEF3 (*rap guanine nucleotide exchange factor 3*) (33). Il s'avère que la famille Epac est représentée par les sous-groupes de protéines Epac1 et Epac2, qui sont codées respectivement par les gènes RAPGEF3 et RAPGEF4 (34). La famille Epac est ubiquitaire (exprimée dans tous les tissus) et intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques. La revue de Robichaux et Cheng (35) traitant d'Epac est très exhaustive, et fait notamment la

distinction entre les différentes fonctions physiologiques selon qu'elles impliquent Epac1 ou Epac2 (35). Pour illustrer globalement l'ubiquité de la famille Epac et la diversité des fonctions pour lesquelles son implication a été prouvée via différents modèles murins, quelques exemples sont listés dans le Tableau 5. La Figure 1 synthétise les pathologies impliquant la famille Epac pour chaque système physiologique. On peut observer qu'Epac intervient dans de nombreux mécanismes physiologiques au niveau de divers organes (p. ex. la mémorisation, la sécrétion d'insuline ainsi que la coagulation), et du fait de cette ubiquité, Epac est impliquée dans des pathologies variées telle que le cancer (p. ex. sein, prostate, pancréas), l'ostéoporose, le diabète, l'obésité, les douleurs chroniques, et l'insuffisance cardiaque. Ainsi, cibler Epac apparaît comme une stratégie prometteuse pour traiter différentes pathologies.

Tableau 5 : Liste non-exhaustive de mécanismes physiologiques impliquant Epac.

Système nerveux central	<ul style="list-style-type: none"> - Processus de mémorisation et mémoire à long terme (36–39) - Addiction (limitation du comportement de rechute à la cocaïne) (40) - Dépression synaptique à long terme (41) - Déficit cognitif lié au vieillissement ou aux maladies liées à l'âge (Alzheimer, Parkinson) (42)
Système cardiovasculaire	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de la néointima (43–45) - Homéostasie calcique & tachycardie ventriculaire liées à l'insuffisance cardiaque, ou d'origine génétique (tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique) (46) - Homéostasie calcique & arythmie (47) - Contractilité cardiaque, myopathies et arythmies induites par un stress (48) - Hypertrophie des cardiomyocytes/signal hypertrophique (11,13,49,50)
Système endocrine	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité à la leptine, régulation de la masse adipeuse, implication dans l'obésité & la balance énergétique (51) - Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (52–54)
Inflammation pulmonaire	<ul style="list-style-type: none"> - Rétablissement de la barrière vasculaire endothéliale (55) - Sécrétion matricielle et remodelage (56)
Infectieux	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion et invasion des rickettsies (bactéries intracellulaires obligatoires) (57)
Douleur	<ul style="list-style-type: none"> - Hyperalgésie (58) - Hyperalgésie inflammatoire (59,60) - Douleur chronique post-opératoire (61) - Douleur chronique inflammatoire (62,63)
Cancer	<ul style="list-style-type: none"> - Prolifération et apoptose (64) - Migration et invasion (64) (p. ex. cancer du pancréas (65)) - Métabolisme des cellules cancéreuses (64) - Modulation de l'activité des cellules T_{reg} (64)
Hémostase	Implication dans la cascade de coagulation (régulation des facteurs IX, V, XIIIa, prothrombine, fibrinogène, fibronectine, plasminogène), et influence la taille des plaquettes (66)

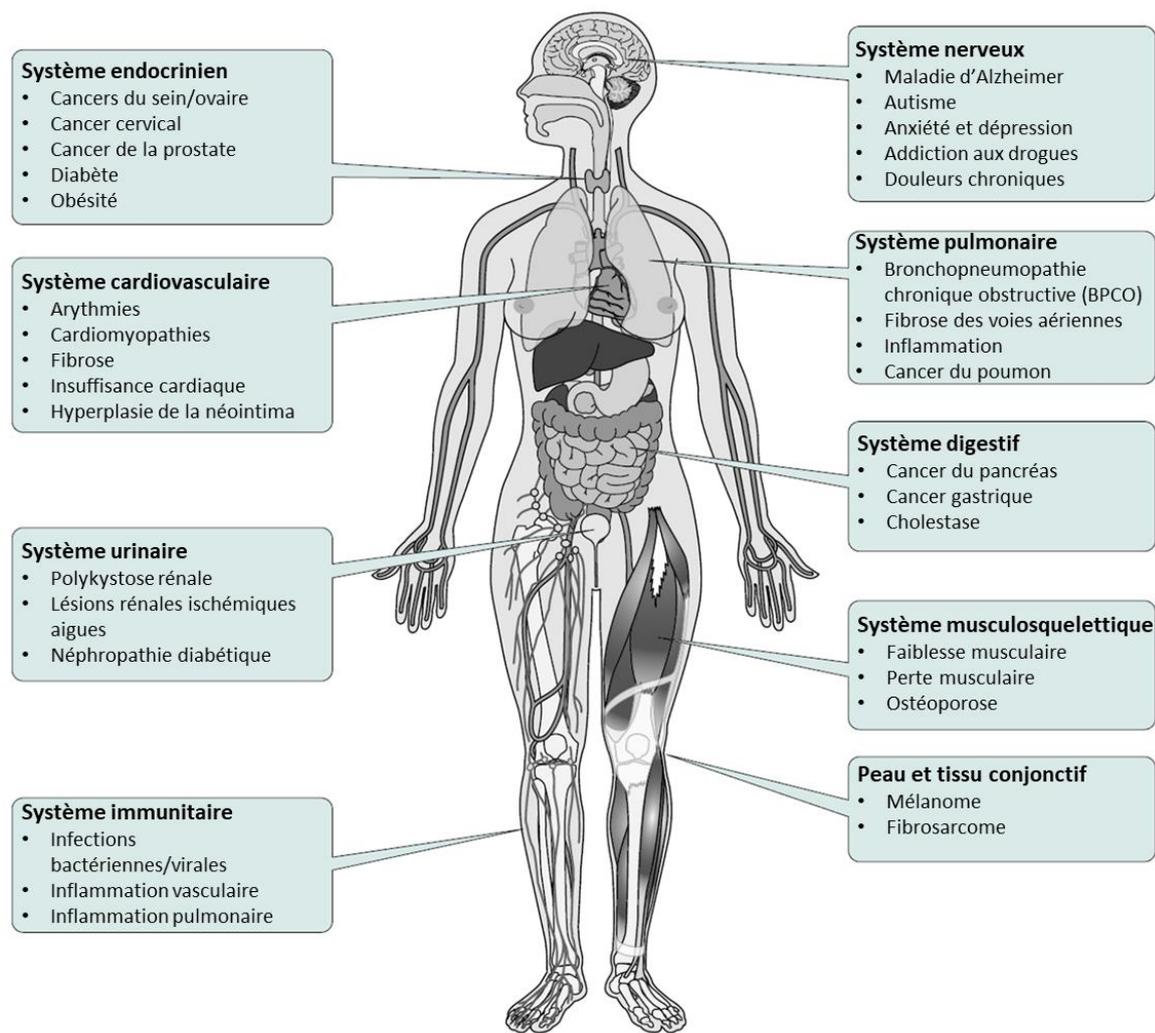


Figure 1 : Aperçu des principales pathologies impliquant Epac (35).

La découverte d'Epac et de son ubiquité a bousculé l'idée bien établie selon laquelle la protéine kinase A (PKA), qui a été découverte en 1968 (67), était la seule protéine effectrice activée par l'AMPC exprimée dans l'ensemble des tissus. D'autres effecteurs étaient connus avant la découverte d'Epac, ou ont été découverts par la suite, mais leur expression est spécifique de certains tissus. On distingue par exemple les canaux cationiques contrôlés par les nucléotides cycliques canaux, qui incluent les protéines canal-HCN (*hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide modulated cation non-selective channel*) localisée au niveau du système nerveux central (68) et au niveau cardiaque (69,70), ainsi que les protéines CNG (*cyclic nucleotide-gated ion*

channels) retrouvée au niveau du système nerveux central (71). D'autres effecteurs non-ubiquitaires utilisant l'AMPc ont été identifiés tel que la protéine CRIS (*cyclic nucleotide receptor involved in sperm function*) impliquée dans la spermatogénèse (72). Pour toutes ces protéines, (Epac, PKA, HCN, CNG, POPDC et CRIS), il existe un site commun qui est le site de liaison des nucléotides CNB (*cyclic nucleotide binding*) permettant de lier l'AMPc notamment (73).

La famille de protéines Epac possède dans son architecture quatre domaines communs :

- un domaine permettant la liaison des nucléotides cycliques (le CNB-B, commun avec la PKA) permettant l'interaction avec l'AMPc et l'activation d'Epac (74,75) ;
- un domaine REM (*Ras exchange motif*), permettant l'activation, en catalysant l'échange du GDP par le GTP, des petites protéines G pour les familles Ras, Rap1 (*Ras-associated protein-1*) et Rap2 (32,33). Ces protéines interviennent dans la transduction du signal ;
- un domaine RA (*Ras-association domain*), permettant l'interaction avec les petites protéines G mentionnées (76) ;
- et le domaine CDC25HD (*CDC25 homologous domain*) qui a une fonction d'échange de nucléotides pour les petites protéines G mentionnées, et ce domaine est stabilisé par le domaine REM (77).

Ces domaines sont répartis en deux régions : la région catalytique composée de REM, RA et CDC25HD, et la région régulatrice variable selon les protéines Epac1 et Epac2 (elle-même représentée trois isoformes identifiés : Epac2A, Epac2B et Epac2C), mais toutes possèdent un domaine CNB-B. L'ensemble de ces informations sont représentées graphiquement dans la Figure 2. Actuellement, les rôles et interactions des différents domaines présentés ne sont pas encore élucidés.

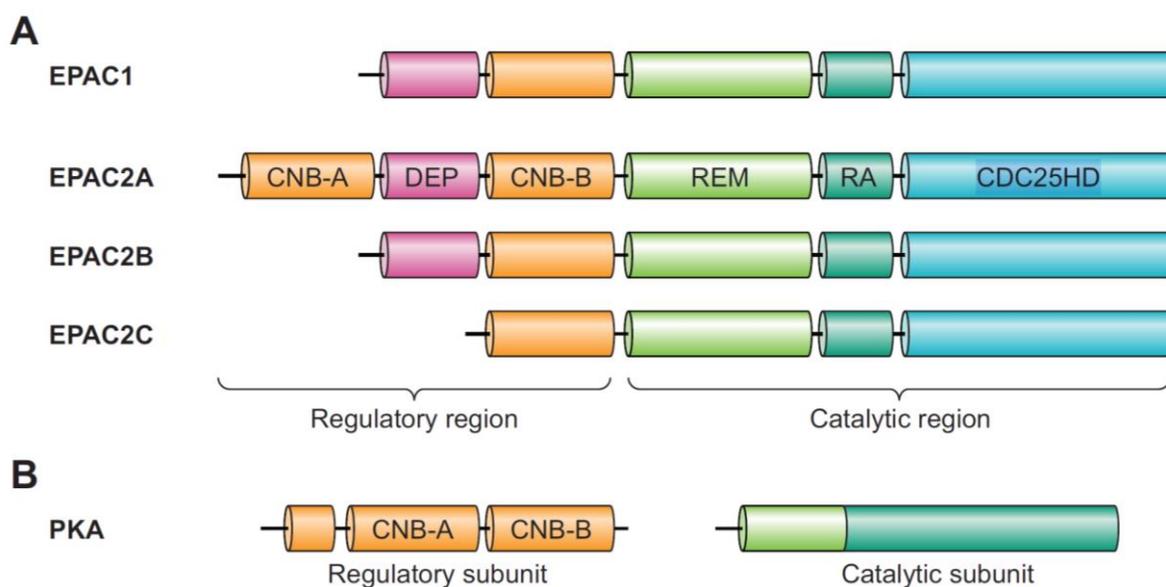


Figure 2 : Représentation des différents domaines composant les protéines Epac (A) et de la PKA (B) ainsi que l'organisation en région régulatrice et catalytique. Le domaine N-terminal se situant à gauche, le domaine C-terminal se situant à droite. CNB, *cyclic nucleotide binding*; DEP, domaine d'homologie *Discheveled, Egl-10 et Pleckstrin*; REM, *Ras exchange motif*; RA, *Ras-association*; CDC25HD, *CDC25 homologous domain*. (35)

2.1.2. Différences entre Epac1 et Epac2

Comme évoqué précédemment, deux gènes codent pour l'ensemble des protéines Epac : RAPGEF3 pour Epac1 et RAPGEF4 pour Epac2, dont les différentes isoformes mentionnées sont liées à des différences de promoteurs et d'épissage, elles-mêmes régulées épigénétiquement (66). Sur la figure 2, nous pouvons remarquer quelques différences entre Epac1 et Epac2 portant sur la présence ou non des domaines suivants :

- DEP (*Discheveled, Egl-10 et Pleckstrin*) qui interviendrait dans l'interaction d'Epac avec les acides phosphatidiques présents dans la membrane plasmique. Le rôle de ce domaine n'est cependant pas encore totalement élucidé en raison de l'absence d'études cristallographiques prouvant cette interaction entre DEP et les membranes plasmiques, mitochondriales, nucléaires et dépendante du cycle cellulaire (78–80) ;

- CNB-A, qui présente une plus faible affinité pour l'AMPc que le CNB-B, aurait un rôle dans la localisation subcellulaire et la sécrétion d'insuline (81).

Même si Epac1 et Epac2 sont relativement similaires d'un point de vue biochimique et des fonctions des domaines évoqués précédemment (interaction avec l'AMPc, protéines Ras/Rap et activation de celles-ci), leurs différences porteraient plus sur leur distribution tissulaire, les fonctions physiologiques qu'elles occupent (nous ne nous intéresserons ici qu'au cœur), et leur place au sein de l'organisation intracellulaire.

2.1.2.1. Distributions tissulaires d'Epac1 et Epac2

Selon la base de données *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) répertoriant les distributions des acides ribonucléiques messagers (ARNm) et des protéines dans les tissus, Epac1 est ubiquitaire (Figure 3). Elle est exclusivement absente au niveau des ovaires sur 45 tissus testés. Epac1 est présente dans les tissus : nerveux (jaune), endocrines (violet), pulmonaires (bleu-vert), oropharyngés (rose pâle), tractus digestifs (bleu), foie et vésicule biliaire (violet pâle), pancréas (vert), urinaires (orange), reproduction (bleu clair pour tissus exclusivement masculins et rose les tissus exclusivement féminins), muscles (rouge), tissus mous et adipeux (vert pâle), cutané (beige) et organes en lien avec l'immunité (gris).

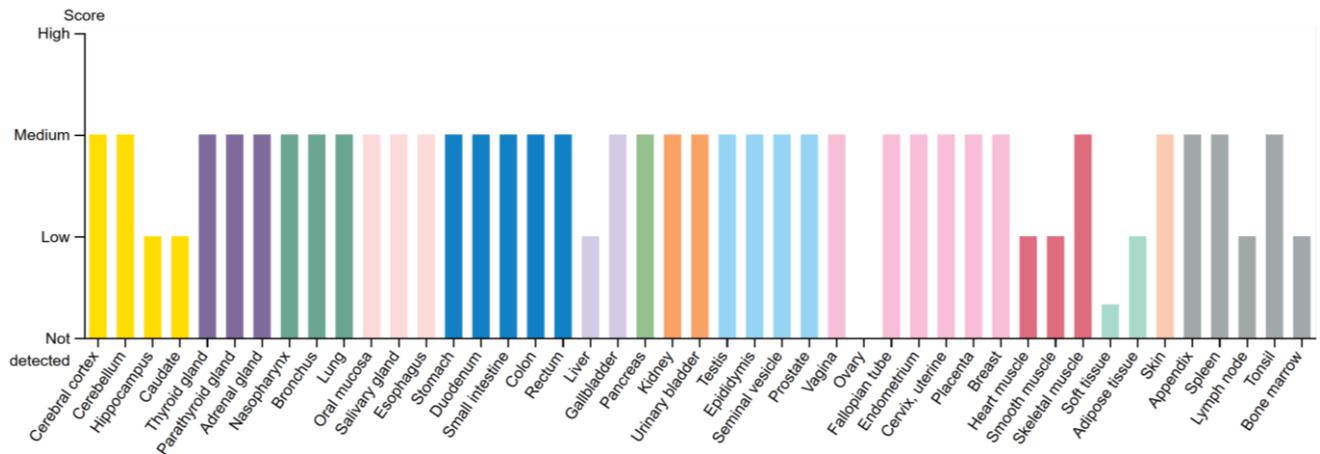


Figure 3 : Distribution tissulaire chez l'humain de la protéine Epac1.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG0000079337-RAPGEF3/tissue>

Concernant Epac2 (Figure 4), on observe aussi l'ubiquité (45 tissus testés) de son expression, avec une expression absente dans la muqueuse orale, mais une forte expression au niveau du système nerveux central et des glandes surrénales, déjà décrite dans la littérature avant la création de cette base de données (32,34).

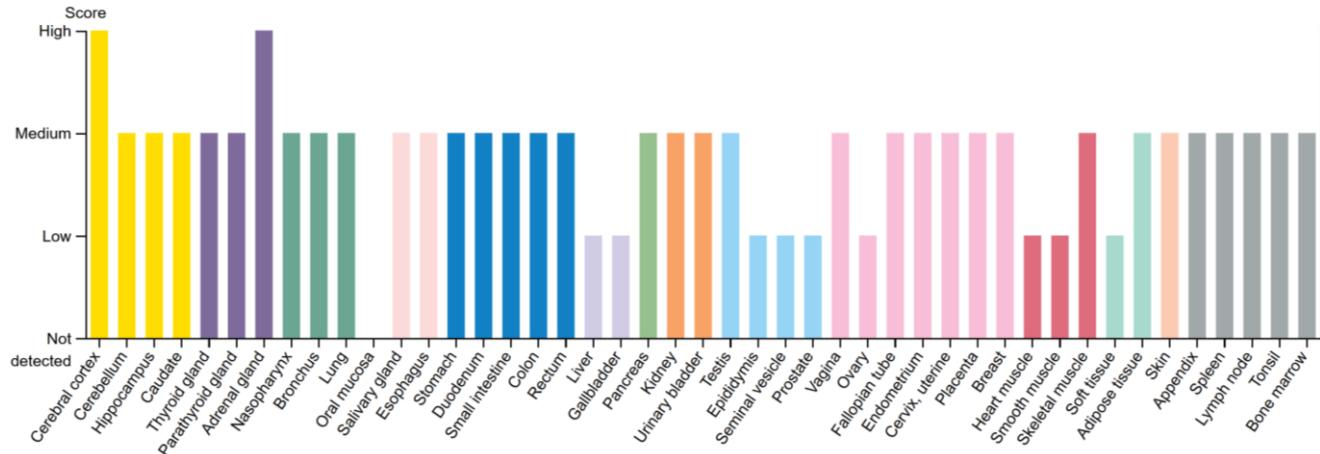


Figure 4 : Distribution tissulaire chez l'humain de la protéine Epac2.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG0000091428-RAPGEF4/tissue>

En plus de cette distribution spatiale des protéines, il est important de garder à l'esprit la composante temporelle, et donc le contexte dans lequel la protéine est exprimée (âge, contexte pathologique ou non...), ce qui n'est pas représenté dans les

Figure 3 et Figure 4. En effet, une étude de la variation de la transcription des gènes codant pour Epac1 (RAPGEF3) et Epac2 (RAPGEF4) a été effectuée sur des souris C57BL/6 (49) à différents stades du développement (foetus, nouveau-né, âgé de 3 semaines et 12 semaines). Concernant la transcription du gène RAPGEF3, l'équipe a observé des variations des concentrations en ARNm dans les tissus testés avec une augmentation de l'ARNm à 3 et 12 semaines dans le cerveau, le cœur, et les reins, et une augmentation transitoire dans les poumons à 3 semaines avec diminution à 12 semaines. Concernant l'ARNm lié à RAPGEF4, une augmentation progressive est observée dans le cœur ainsi que dans le cerveau à 3 et à 12 semaines. Au niveau des reins une disparition quasi-totale de l'ARNm à 3 et 12 semaines par rapport au niveau basal est observé aux stades foetus et nouveau-né ; et pour les poumons une augmentation progressive entre le stade foetus et 3 semaines survient, suivie d'une diminution à 12 semaines.

2.1.2.2. Localisations intracellulaires d'Epac1 et d'Epac2

L'analyse plus fine des domaines des protéines Epac1 et Epac2 a permis de révéler plusieurs zones d'interactions avec une multitude de composants intracellulaires. Toutes ces possibilités d'interactions permettent, à partir d'une même protéine Epac activée, d'obtenir une multitude de réponses cellulaires selon la localisation subcellulaire d'Epac. Les différences des domaines composant la région régulatrice d'Epac1 et d'Epac2A, 2B et 2C (Figure 2) semblent jouer un rôle dans la compartimentation intracellulaire de ces protéines, par exemple le domaine DEP pour l'interaction avec les membranes via les acides phosphatidiques, avec des localisations qui dépendent du cycle cellulaire (78–80). La Figure 5 décrit les différentes « zones » d'interaction sur Epac1 et Epac2, et les constituants avec lesquels elles interagissent. La séquence Epac2A est représentée ici sous le nom d'Epac2, car c'est la forme qui possède l'ensemble des domaines. D'après la Figure 5, dix zones d'interaction pour Epac1 ont été identifiées (A) et six zones pour Epac2 (B). Concernant les séquences détaillées d'Epac1 (A) :

- MTS est la séquence d'adressage mitochondriale ;
- la séquence PA-B permet l'interaction avec les acides phosphatidiques ;
- NPLS permet l'interaction avec les pores nucléaires.

A

MTS: ¹MVLRMRHRPRSCSYQLLLEHQRPSCIQGLRWTPLTNS³⁷

PA-B: ⁷⁵RDRKYHLRLYRQCCSGR⁹¹

NPLS: ⁷⁶⁴KLSPVPVIFMPLLLKDMTFIHEGNHTLVENLINF EKMRMMARAARMLHHC RSHNPVPLSPLRSRVSHLHEDSQVA⁸³⁸

B

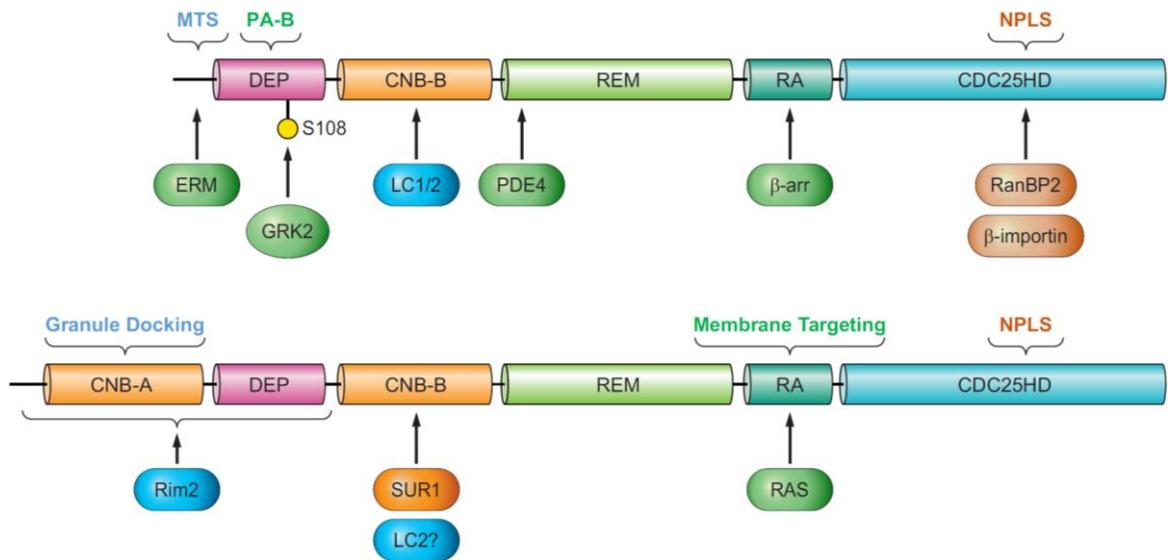


Figure 5 : Zones d'interactions avec les constituants intracellulaires pour les protéines Epac1 (A) et Epac2 (B). Les détails des séquences d'adressage MTS, PA-B et NPLS sont décrite en (A). Les flèches symbolisent les zones d'interaction. Le domaine N-terminal se situant à gauche, le domaine C-terminal se situant à droite. (35)

Des résumés graphiques des interactions et des localisations cytoplasmiques d'Epac sont également disponibles (35). Dans ce manuscrit ils auront pour unique but de mettre en valeur la diversité des mécanismes cellulaires utilisant Epac1 et Epac2 car seule la voie concernant l'implication d'Epac au niveau cardiaque et de l'insuffisance sera détaillée dans la partie suivante. Pour Epac1, les interactions se font avec les membranes plasmique, nucléaire, et mitochondriale, ainsi qu'avec le cytosquelette, et le réticulum endoplasmique (Figure 6). Concernant Epac2, il y a une interaction avec le cytosquelette, avec les composants impliqués dans l'exocytose des granules d'insuline, et aussi l'exocytose des vésicules synaptiques (Figure 7).

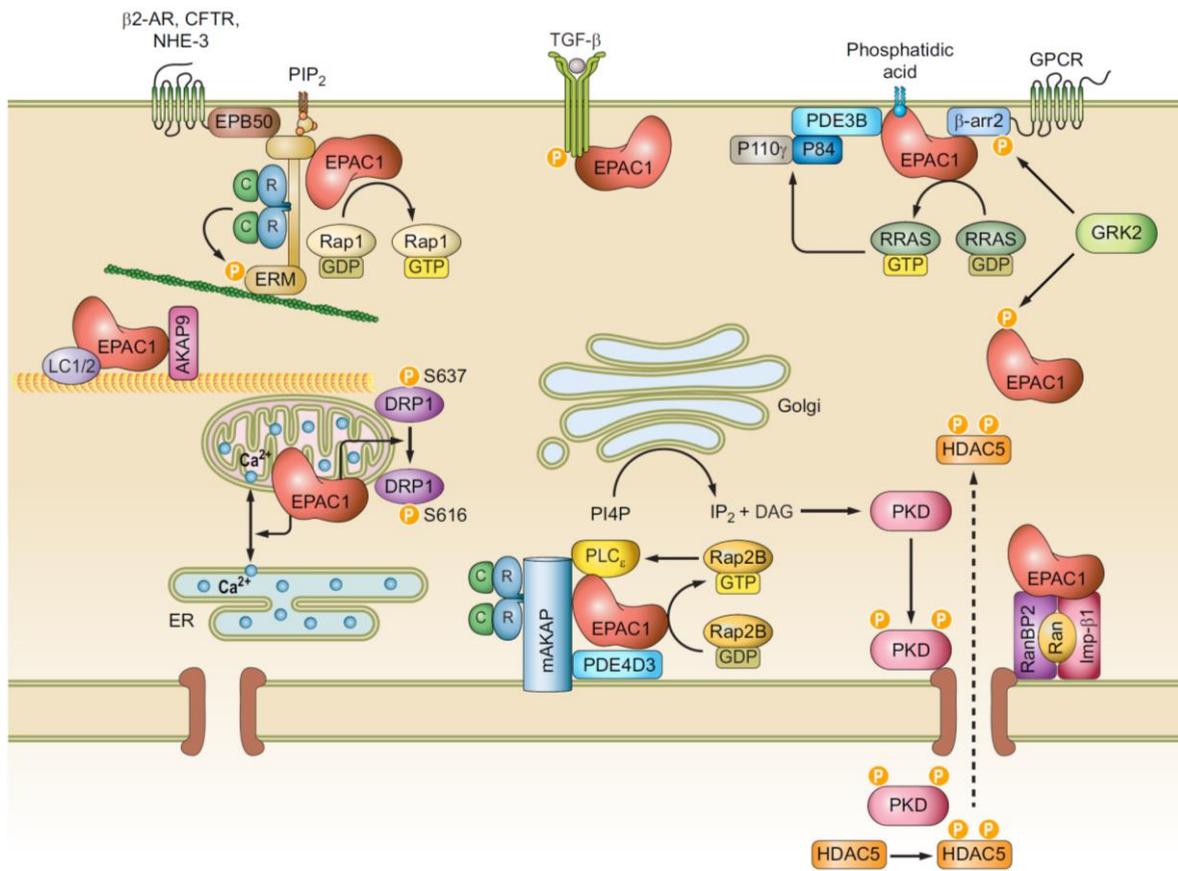


Figure 6 : Localisations subcellulaires d'Epac1 et interactions (35).

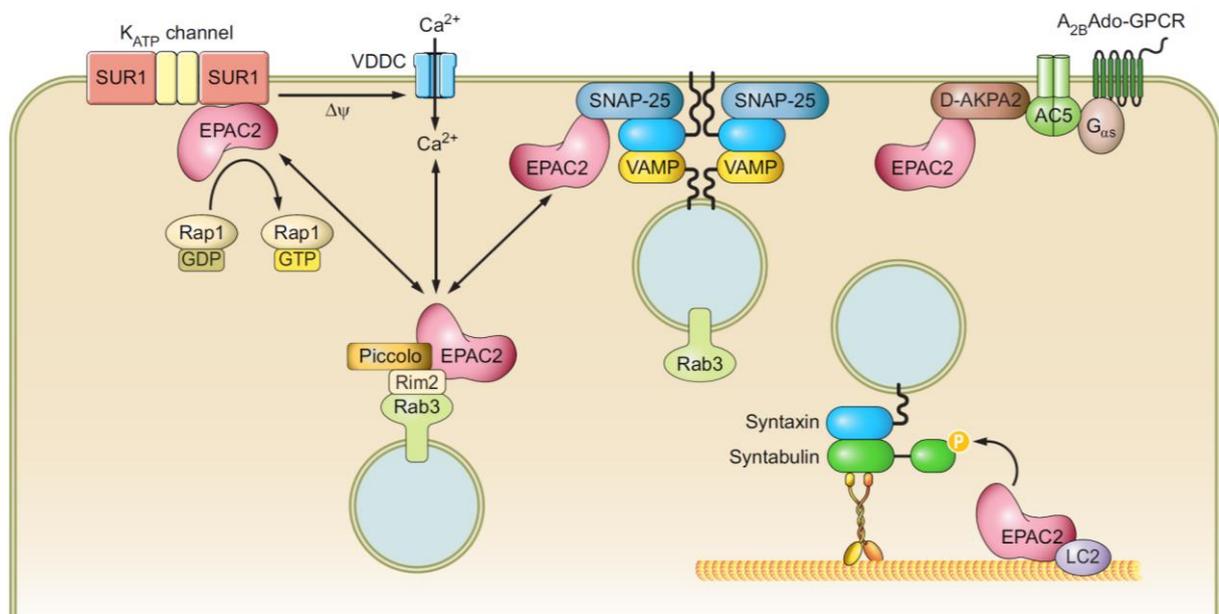


Figure 7 : Localisations subcellulaires d'Epac2 et interactions (35).

2.1.3. Implication d'Epac dans l'insuffisance cardiaque

Selon *The Human Protein Atlas*, Epac1 et Epac2 sont toutes les deux exprimées au niveau cardiaque, avec un score d'expression bas par rapport aux autres tissus. Cependant, une étude publiée en 2014 par Okumura *et al.* a permis de comprendre que d'Epac1 ou Epac2 semble être impliquée au niveau cardiaque. Des études menées sur des souris Epac1 KO (*knock-out*), Epac2 KO, et double KO, ont permis de suggérer une implication d'Epac dans le maintien de la contractilité cardiaque, une non-implication dans la régulation aiguë de la contractilité en réponse à une stimulation par les catécholamines, et démontré que ces fonctions étaient principalement liées à Epac1 plutôt qu'à Epac2 (48).

Concernant la contractilité cardiaque, qui est liée au transfert d'ions Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol via le récepteur à ryanodine RyR2 (*Ryanodine Receptor 2*), l'implication d'Epac1 dans ces déplacements calciques intracellulaires des cardiomyocytes a déjà été étudiée (47,82–85). Epac1 joue un rôle de régulateur de l'activité de la PLC ϵ (phospholipase C epsilon), mais aussi dans la libération transitoire de calcium, et dans la sensibilisation des myofilaments. La PLC ϵ va cliver le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) localisé au niveau de la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne une augmentation en diacylglycérol (DAG) qui reste ancré à la membrane et en inositol triphosphate (IP3) soluble dans le cytoplasme, ces deux molécules sont des messagers secondaires de la transduction du signal.

De plus, il a été observé qu'Epac1 joue un rôle dans l'activation de protéines sarcomériques clés : la Troponine 1 cardiaque (cTnI) et cMyBP-C (*cardiac Myosin Binding Protein-C*) (84). Ces protéines sont impliquées dans l'interaction entre la myosine et l'actine, et donc dans la contraction cardiaque. Epac1 permet la phosphorylation de ces protéines, permettant ainsi l'interaction actine/myosine (84).

Une autre étude a mis en lumière l'implication d'Epac dans l'augmentation de l'expression de la calmoduline (CaM, qui permet l'activation de la protéine CaMKII, protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante), en lien avec l'augmentation en Ca^{2+} au niveau nucléaire, suggérant l'implication d'Epac dans des processus nucléaires de régulation de la transcription (86). Il est important de souligner l'implication de CaMKII et de CaM dans ce mécanisme. En effet, ces deux derniers éléments sont impliqués dans des réponses sur le « long terme » dans le cadre d'une stimulation chronique d'Epac par les agonistes des récepteurs β -adrénergiques, ou des récepteurs mécaniques sensibles à l'étirement cellulaire. D'une part, CaMKII au niveau nucléaire est activée par l'augmentation intranucléaire en Ca^{2+} et la présence de CaM, et peut ainsi activer les histones désacétylases 4 et 5 (HDAC4, HDAC5), aboutissant à une levée de l'inhibition du facteur de transcription MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*). MEF2 peut ensuite activer la transcription de gènes incriminés dans l'hypertrophie cardiaque, regroupés sous l'appellation de programme pro-hypertrophique (87–90). D'autre part, au niveau cytosolique, la présence de Ca^{2+} et de CaM entraîne l'activation de la calcineurine (Cn), qui peut ensuite former un complexe avec NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), complexe qui peut être importé au niveau nucléaire, activant la transcription (91). Le couple Cn/NFAT est incriminé dans l'hypertrophie cardiaque pathologique (92). Différentes études ont pu établir la causalité entre l'activation d'Epac1 et l'hypertrophie des cardiomyocytes et une restructuration cardiaque (13), à l'échelle cellulaire (cardiomyocytes de rats nouveau-nés et adultes), ou à celle d'un organisme entier (modèle murin exposé à un stress chronique par infusion d'isoprénaline), et que l'inhibition d'Epac1 permet de bloquer le développement hypertrophique délétère observé dans l'insuffisance cardiaque (11,49,93). De plus, la famille Epac est aussi impliquée dans la régulation d'autres fonctions cellulaires au niveau cardiaque, non développées dans ce travail, telles que le métabolisme énergétique (94) ou le développement d'arythmies (46,95,96). Ainsi,

l'inhibition d'Epac1 permettrait de limiter le remodelage cardiaque sur long terme lors d'IC chronique.

2.1.4. Le CE3F4

En 2012, un criblage haut-débit a permis de mettre en évidence le CE3F4, molécule chirale ayant un noyau tétrahydroquinoline [la Figure 8 représente le (*R*)-CE3F4], comme inhibiteur d'Epac (97). Cette étude a permis d'établir que le CE3F4 est un antagoniste non-compétitif d'Epac1, mais la spécificité vis-à-vis d'Epac2 n'a pas été démontrée. Une seconde publication, en 2013, a permis de mettre en évidence plusieurs informations cruciales sur le CE3F4 et Epac (98). Il s'agit d'une part de l'importance de la conformation du carbone asymétrique : la concentration efficace médiane (EC_{50}) de l'énantiomère (*R*) du CE3F4 ($EC_{50} = 4,2 \mu M$) est 10 fois plus faible par rapport au (*S*). D'autre part, il a été mis en évidence une sélectivité 10 fois plus importante pour Epac1 par rapport à Epac2. Ainsi, il apparaît clairement que le (*R*)-CE3F4 devrait permettre d'obtenir l'inhibition d'Epac1 dans le tissu cardiaque.

Cependant, rappelons qu'Epac est ubiquitaire et qu'aucune donnée de distribution tissulaire du (*R*)-CE3F4 n'existe. Ainsi, dans le cadre du développement d'un médicament, le risque que le (*R*)-CE3F4 atteigne d'autres tissus que le myocarde est plus que probable, de même concernant le risque que le (*R*)-CE3F4 active Epac2 dans certains tissus où Epac1 est peu présente est tout à fait possible. L'aspect ubiquitaire en termes de répartition tissulaire peut donc être à l'origine d'effets indésirables, ou d'une absence d'efficacité cardiaque si le (*R*)-CE3F4 ne possède pas de tropisme cardiaque.

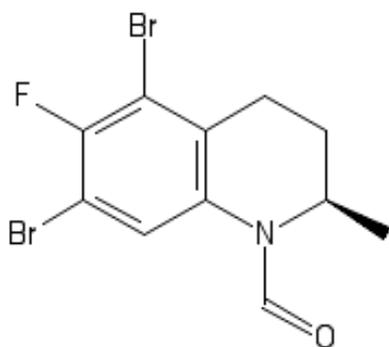


Figure 8 : Formule topologique du (*R*)-CE3F4.

De plus, dans le cadre du projet Lermite, la plateforme SMARt-MS (responsable Alain Pruvost, Service de Pharmacologie et Immunoanalyse, CEA Saclay), a étudié la stabilité métabolique du (*R*)-CE3F4 *in vitro* sur microsomes hépatiques de rats, et une instabilité métabolique a été observée. Enfin, la stabilité métabolique du (*R*)-CE3F4 dans le plasma de rat a été évaluée par la même équipe, et une dégradation *ex vivo* très importante a été observée (demi-vie plasmatique apparente inférieure à 1 heure).

Par conséquent, deux points critiques concernant le (*R*)-CE3F4 doivent être abordés avant de pouvoir l'envisager comme candidat médicament : il faut d'une part limiter son instabilité en milieu biologique, d'autre part permettre au (*R*)-CE3F4 d'avoir un tropisme cardiaque pour que la cible soit atteinte limitant ainsi le risque d'effets indésirables liés à l'atteinte de tissus non désirés. L'utilisation d'un vecteur permettant d'encapsuler le (*R*)-CE3F4 ($\log P = 3,6$) et ayant un tropisme cardiaque permettrait de compenser les limitations de la molécule d'intérêt.

2.2. Intérêt des peptides de ciblage pour la distribution de nanoparticules au cœur

L'identification de protéines membranaires spécifiques d'une cellule donnée permet de sélectionner des ligands qui interagissent spécifiquement avec cette cellule. Lorsque ces ligands sont associés à des nanoparticules (NP), la distribution de ces NP peut être modifiée et devenir préférentielle pour un type cellulaire, ou un

tissu. On parle dans ce cas de ciblage actif, en opposition au ciblage passif qui n'utilise pas de ligand et se fonde sur des modifications physiologiques locales favorisant la distribution des NP. Le ciblage passif est une approche importante dans les traitements anticancéreux. La modification vasculaire à proximité d'une tumeur permet le passage des NP du compartiment sanguin vers cette tumeur qui aura tendance à les séquestrer en raison de l'absence de drainage lymphatique, aboutissant à une accumulation dans la tumeur. Ce phénomène est l'effet EPR (*enhanced permeability and retention effect*), et se fonde sur une différence de perméabilité entre les vaisseaux sanguins sains et les vaisseaux tumoraux, qui présente une fenestration plus importante (99,100).

L'interaction de protéines avec des cibles est le mécanisme d'action fondamental des anticorps. Ainsi, le ciblage actif de NP fonctionnalisées par différents anticorps monoclonaux (mAB) a été étudié au cours des trente dernières années pour cibler le cœur en condition pathologique d'ischémie aiguë du myocarde. L'augmentation de l'adressage de NP au cœur via le ciblage de protéines surexprimées dans des conditions d'infarctus a été réalisé avec succès grâce à l'utilisation de mAB anti-myosine associés à des liposomes (101–104), de mAB anti-sélectine-P associés à des liposomes (105,106), de mAB anti-ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) associés à microsphères d'hexafluorure de soufre (Sonovue®, Bracco Imaging) (107), de mAB anti-troponine I cardiaque aussi associés à des liposomes (108). Actuellement, aucun mAB n'a fait l'objet d'une étude de ciblage en conditions d'insuffisance cardiaque chronique.

Cependant, malgré leurs avantages, les mAB sont des biomolécules de grande taille, de structure complexes et de composition variée, tant sur le plan de la composition en acides aminées que sur la glycosylation associée à la synthèse des protéines. Ainsi, les moyens de production à mettre en œuvre sont importants pour la fabrication et le contrôle de ces biomolécules en vue d'une administration humaine.

De plus, les protéines exogènes peuvent entraîner une immunogénicité lorsqu'elles sont administrées, notamment dans un contexte chronique. C'est pourquoi l'utilisation de peptides de ciblage présente de nombreux intérêts en comparaison de ces protéines. En effet, l'identification de motifs peptidiques présentant une activité de ciblage permet de simplifier au maximum la composition du ligand de ciblage, et de diminuer l'immunogénicité en raison de la taille plus faible de ce type de ligand. De plus, la simplification de la composition permet d'envisager une synthèse chimique (109), impossible à envisager pour des protéines (110).

Le criblage rapide de peptides de ciblage a été rendu possible par la technologie de *phage display* (111). Plusieurs de ces peptides permettent de cibler le système cardiovasculaire et différents types ont été identifiés, notamment les peptides ayant pour séquences DDTRHWG (112), CRPPR (113), APWHLSSQYSRT appelé communément CTP (*cardiac targeting peptide*) (114), et WLSEAGPVVTVRALRGTGSW connus sous le nom de PCM (*primary cardiomyocyte binding peptide*) (115). Ces trois derniers ont fait l'objet d'associations à des NP ou à des exosomes, dont les études sont détaillées plus bas. Parmi ces études, il en est une qui a permis la sélection d'un peptide spécifique du cœur en condition d'infarctus afin d'acheminer des liposomes contenant une molécule d'intérêt, cependant la séquence n'a pas été fournie par les auteurs (116). D'après les séquences de ces différents peptides, aucune homologie ne semble se dégager, ne permettant pas d'identifier de motif commun conférant les propriétés de ciblage. Afin d'identifier un tel motif, l'étude des structures tridimensionnelles de ces peptides serait à effectuer.

Ainsi, la distribution cardiaque de nanoparticules dépourvues de ligand de ciblage sera abordée dans un premier temps chez l'animal sain et en condition d'insuffisance cardiaque aiguë d'origine ischémique. Ensuite, nous ferons un état de l'art des différents peptides de ciblage étudiés chez l'animal sain, sur des modèles d'insuffisance cardiaque aiguë ischémique et d'insuffisance cardiaque chronique.

2.2.1. Stratégie de ciblage passif des nanoparticules au niveau cardiaque

2.2.1.1. Distribution chez l'animal sain

Plusieurs équipes se sont intéressées à la biodistribution de nanoparticules (NP) d'or (117–119) ou de NP d'or PEGylées (120) chez le rongeur sain sans s'intéresser particulièrement à une distribution cardiaque spécifique. Globalement, il apparaît que l'accumulation cardiaque de NP d'or est possible pour des petites tailles de l'ordre de la dizaine de nanomètres, tandis qu'à partir de 100 nm, les dosages par ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) révèlent une absence d'or au niveau du cœur. Il est à noter que la proportion de la dose retrouvée est généralement faible au niveau cardiaque en comparaison des distributions au niveau du foie et de la rate. De Jong et al. ont observé chez le rat sain à 24h des proportions cardiaques d'or de 0,2% et 0,1% de la dose injectée par voie intraveineuse (IV), pour des NP de 10 et 50 nm respectivement, et une absence de distribution cardiaque pour des NP de 100 et 250 nm (117). Cette étude a mis en évidence l'importance de la taille des NP d'or pour le contrôle de la biodistribution chez l'animal sain, cependant les études sur ces NP non-PEGylées n'ont été effectuées que sur 24h. Concernant les NP d'or PEGylées, Cho et al. ont étudié chez la souris saine leur biodistribution durant 6 mois après administration intraveineuse (120). Ils ont observé que les particules ayant atteint le cœur en sont éliminées lentement, avec une quantification cardiaque toujours possible à 6 mois pour des NP d'or PEGylées de 4 et 13 nm alors que la présence cardiaque est très faible dès les premiers temps de l'étude (30 min) pour des NP de 100 nm (120). Au regard de ces différentes études, il est donc clair que d'une part le ciblage cardiaque est un défi en raison des très faibles proportions de NP atteignant le cœur en conditions normales, et que d'autre part, la taille ces NP joue un rôle prépondérant dans la distribution cardiaque.

2.2.1.2. Mécanisme passif de ciblage dans un contexte d'insuffisance cardiaque aiguë d'origine ischémique

D'autres auteurs ont étudié la distribution passive de nanoparticules (lipidiques, polymériques, silices) dans un contexte d'insuffisance cardiaque aiguë grâce à des modèles d'ischémie-reperfusion sur différents rongeurs. Takahama et al. ont réussi à mettre en évidence la présence de liposomes PEGylés marqués par une sonde fluorescente au niveau des zones nécrotiques sur un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat (121). Ils ont ainsi pu observer une accumulation préférentielle dans les zones nécrotiques, puis les bordures, et une absence d'accumulation dans les zones non-ischémiques. Les auteurs suggèrent que cette distribution est probablement liée à une perméabilité endothéliale augmentée par le contexte ischémique (122,123), mais que d'autres investigations doivent être menées afin d'élucider le mécanisme précis. Ce type d'accumulation au niveau des zones lésées a aussi été observé par une autre équipe, avec des NP de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) marquées par une sonde fluorescente (124).

La biodistribution de NP composées de silice poreuse a aussi été étudiée sur un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat (125). Les résultats de ces études démontrent l'impact important du phénomène d'ischémie-reperfusion sur la captation passive des NP, avec une concentration cardiaque en silice multipliée par 3 par rapport aux témoins qui n'ont pas subi d'ischémie-reperfusion (injection intraveineuse 10 min après l'opération).

Wang et al. ont étudié la distribution cardiaque d'un polysaccharide aux effets anti-ischémiques après injection IV, sous forme libre, lié à des PEG de différentes tailles (20 ou 40 kDa) ou encapsulé dans le cœur aqueux de liposomes PEGylés dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat (126). Le polysaccharide a été marqué au préalable par le FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Les auteurs ont observé que le couplage du polysaccharide à une chaîne PEG, ou son encapsulation dans des liposomes possédant du PEG en surface, permet d'augmenter l'efficacité de la distribution cardiaque au niveau des zones infarctées du cœur par rapport au zones

épargnées. De plus, la fluorescence au niveau des zones infarctées à 3 heures après l'injection est plus importante avec les liposomes que lorsque le polysaccharide est couplé respectivement au PEG 20k ou PEG 40k (facteur 2,5 et 4 respectivement, en faveur des liposomes). A 12 heures, ce facteur est d'environ 6 et toujours en faveur des liposomes. Ainsi, les auteurs ont pu montrer l'intérêt des liposome PEGylés pour cibler les zones infarctées du cœur, et que cette distribution est largement favorisée par l'inflammation et la nécrose.

La distribution passive au niveau cardiaque de micelles et de liposomes marqués avec du gadolinium (Gd) ainsi qu'une sonde fluorescente a aussi été considérée sur un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris (127). Le Gd a permis de suivre la présence des vecteurs au niveau cardiaque par imagerie par résonance magnétique (IRM), et la sonde fluorescente d'observer leur présence par microscopie confocale de coupes cardiaques. Dans cette étude, une accumulation passive supérieure des micelles et liposomes a été observée au niveau des zones lésées par rapport au groupe contrôle, pour lequel du Gd (chélaté par le diéthylène triamine penta acétique) a été administré. Par ailleurs, les micelles ont présenté une accumulation plus importante comparativement aux liposomes, notamment au niveau des cellules de l'inflammation, probablement en raison de leur taille plus faible comme suggéré par les auteurs (diamètres hydrodynamiques de 15,6 nm et 100 nm respectivement pour les micelles et les liposomes). Ce dernier résultat corrobore les observations précédemment décrites sur la distribution cardiaque taille-dépendante des NP d'or. Ces mêmes auteurs ont aussi mis en évidence que la distribution cardiaque était moindre lorsque l'injection des NP se faisait à distance de la chirurgie, et donc à distance de l'accident ischémique.

Enfin, l'étude de la distribution cardiaque de NP à base de polystyrène présentant en surface des groupements carboxylates a été réalisée dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris (128). Les NP étaient PEGylées ou non, avec des

diamètres hydrodynamiques de l'ordre de 30 nm à 2,5 µm. Ces NP de différentes tailles sont marquées par une sonde fluorescente, et sont issues du commerce (FluoSpheres® non PEGylées, Life Technologies, Thermo Fisher). La biodistribution des nanoparticules a été étudiée au niveau du cerveau, du cœur, des poumons, des reins, du foie et de la rate. Les auteurs ont pu observer d'une part l'importance de la chirurgie d'ischémie-reperfusion sur la distribution cardiaque des NP, d'autre part que la taille de ces NP a aussi un rôle important dans la distribution. En effet, il apparaît sur la Figure 9, qui représente la présence cardiaque de NP, une différence significative entre les groupes ayant subi ou non la procédure chirurgicale pour des NP de dimensions inférieures ou égales à 500 nm. Ainsi, le terrain pathologique d'ischémie-reperfusion favorise la présence cardiaque de ces NP. L'impact de la taille de ces NP sur la biodistribution est illustré par la Figure 10. La captation des NP par la rate, le foie, les poumons et les reins est liée à la taille de ces NP, avec une captation plus importante par ces organes lorsque la taille augmente. Il est intéressant de noter que la proportion de NP retrouvée au niveau cardiaque reste relativement constante (aux environs de 0,2 à 0,3% de la dose injectée). Cependant les auteurs précisent que seules les particules de tailles inférieures ou égales à 100 nm sont retrouvées dans le cœur, en dehors des vaisseaux, suggérant la diffusion dans le tissu cardiaque. Ces observations rejoignant celles portant sur les NP d'or, tant sur la proportion faible de NP retrouvées au niveau cardiaque que sur l'impact de la taille sur la distribution.

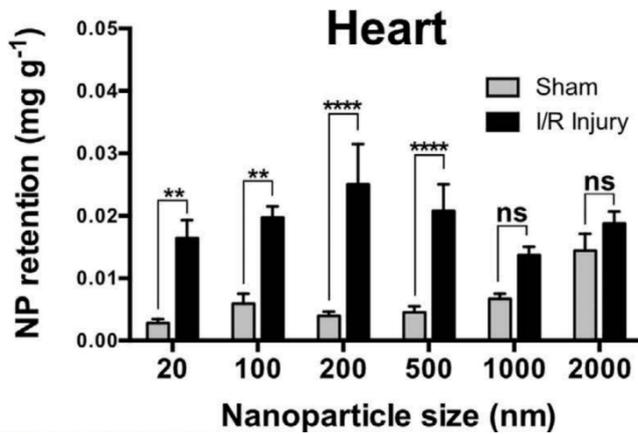


Figure 9 : Impact de la chirurgie d'ischémie-reperfusion sur la rétention cardiaque de nanoparticules selon leurs tailles. (128)

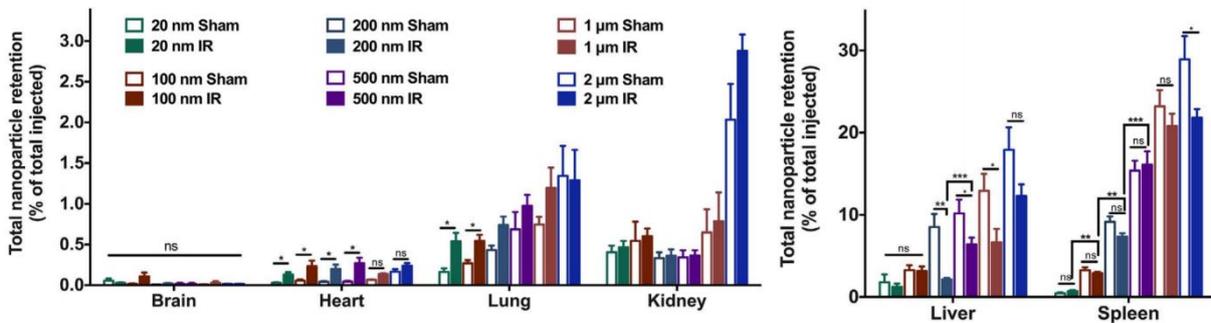


Figure 10 : Biodistribution de nanoparticules en fonction de leurs tailles, sans ou avec chirurgie d'ischémie-reperfusion. A gauche : biodistribution au niveau du cerveau, du cœur, des poumons et des reins. A droite : biodistribution au niveau du foie et de la rate. (128)

L'ensemble des études menées sur le ciblage passif du cœur en condition d'ischémie ont permis de mettre en évidence l'impact du modèle d'ischémie-reperfusion et de la chirurgie associée sur la captation passive cardiaque. Ce type de modèle correspond à un cas d'insuffisance cardiaque aiguë, et n'est pas adapté pour l'étude de NP à tropisme cardiaque dans un contexte d'insuffisance cardiaque chronique. En effet, l'ischémie cardiaque provoque des modifications tissulaires telles que la nécrose ou l'infiltration de cellules immunitaires (129,130), ainsi que des modifications hémodynamiques liées au dysfonctionnement brutal du cœur, ceci

pouvant donc impacter la biodistribution et le temps de séjour de molécules ou de nanoparticules.

2.2.2. Stratégies de ciblage actif utilisant les peptides à tropisme cardiaque

2.2.2.1. Le CRPPR

Seuls les travaux du groupe de Ferrara (131,132) ont permis de démontrer la capacité du CRPPR associé à la surface de liposomes furtifs (c'est-à-dire conçu pour éviter la capture par le système des phagocytes mononucléés) à cibler le cœur chez la souris. Dans un but d'imagerie, ces liposomes ont été marqués par un lipide radiomarqué (¹⁸F) ou une sonde fluorescente.

Au cours d'une première étude, les auteurs ont étudié la biodistribution cardiaque de liposomes chez la souris saine (131). Les liposomes étaient constitués de différentes proportions de DPPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine), DSPE-PEG2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyéthylène glycol)-2000]) et d'un lipide PEGylé lié de manière covalente à différents peptides de ciblage. Concernant ce lipide PEGylé lié à un peptide de ciblage (LPP), plusieurs longueurs du PEG (1200, 2400 et 3600 Da) et différents motifs peptidiques (différents enchainements de proline et d'arginine : CPPRR, CRRPP, CRRRR) ont été étudiés. Ce LPP a été incorporé selon trois proportions molaires (3, 6 et 10%) de la composition globale des liposomes. Au cours d'une étude menée sur 90 minutes après l'injection, un tropisme cardiaque important a été observé pour des liposomes couplés au peptide CRPPR, et optimal lorsqu'il est associé à un PEG de 3600 Da. La proportion molaire du LPP permettant d'obtenir la meilleure distribution cardiaque est de 6%, ce qui correspond à une densité peptidique de l'ordre de 6000 LPP/liposome (répartis de part et d'autre de la bicouche lipidique), soit des formulations contenant 6% (mol/mol) de LPP, 6% de DSPE-PEG2000 et 88% de DPPC. De plus les auteurs affirment une meilleure captation lorsque le LPP est sous forme dimérisée, sans pour autant présenter de résultats probants allant dans ce sens. Bien que l'étude décrive

une utilisation de LPP sous forme de monomère, la captation cardiaque est importante (Figure 11), et ce dès 100 secondes après injection. La Figure 11 montre qu'à 90 minutes après l'injection des liposomes, une modification importante de la biodistribution est possible grâce au CRPPR. En effet, la distribution cardiaque est multipliée par 10 grâce au LPP optimisé en comparaison des liposomes n'ayant de pas de ligand de ciblage.

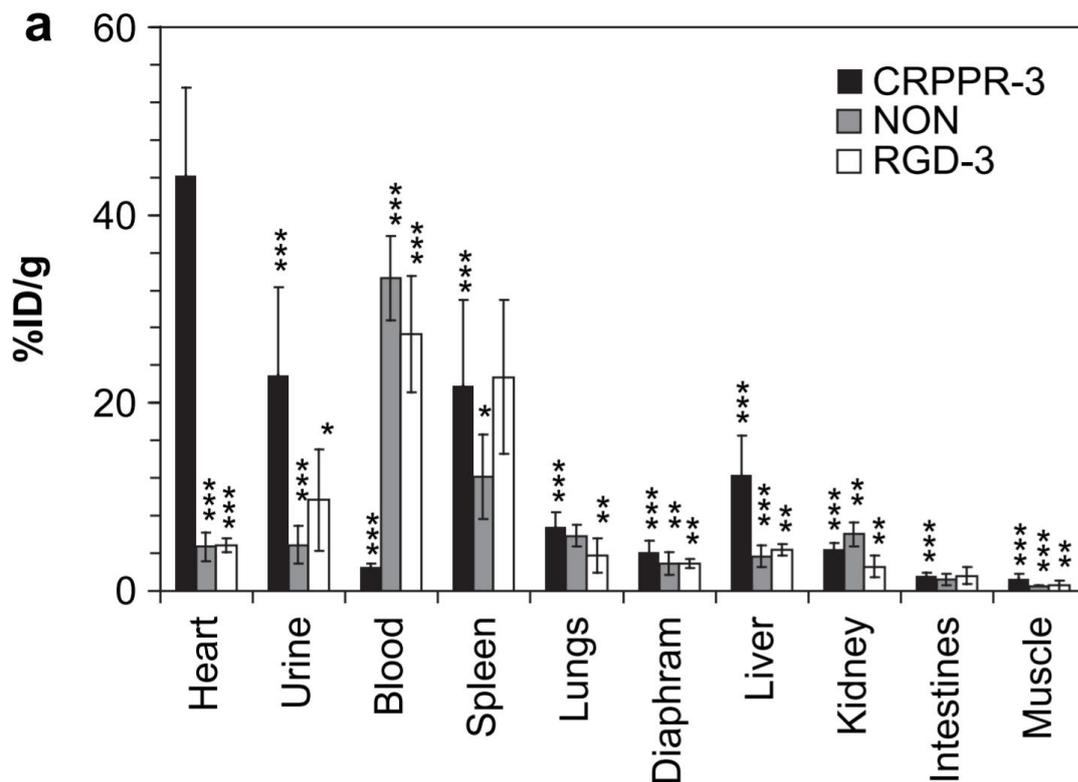


Figure 11 : Biodistribution de liposomes couplés au peptide CRPPR et marqués par un lipide radiomarqué (^{18}F). Radioactivité mesurée à 90 minutes après injection dans différents organes (exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe), sans lipo-PEG-peptide (NON), avec un peptide cyclique (RGD-3), avec le CRPPR couplé à un PEG 3600 à la proportion molaire de 6% (CRPPR-3). (131)

La suite des travaux cités précédemment a consisté à réaliser une étude plus fine de la distribution cardiaque en sélectionnant les différents types cellulaires (cellules endothéliales, cardiomyocytes, fibroblastes) dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion (132). Il a été observé que la captation des liposomes via le

CRPPR se faisait par les cellules endothéliales, et qu'elle était négligeable pour les cardiomyocytes.

Ainsi, le CRPPR présente un intérêt pour cibler le cœur via l'interaction avec les cellules endothéliales. Bien que ces cellules soient aussi présentes dans tout le système vasculaire, la biodistribution cardiaque observée par imagerie est malgré tout très importante sur des temps courts après injection. Le mécanisme lié à cette biodistribution reste cependant à élucider.

2.2.2.2. Le CTP

Grâce à différentes études menées sur le peptide *cardiac targeting peptide* (CTP), de séquence APWHLSSQYSRT, il s'est avéré qu'il permet l'adressage de différents systèmes au cœur.

La première étude porte sur l'utilisation d'un PEG en étoile possédant 8 bras, et aux extrémités de ces bras ont été couplé le CTP, une sonde fluorescente, ainsi qu'une molécule permettant de pratiquer une photoablation (133). Dans un premier temps, à l'aide de cultures *in vitro* de cardiomyocytes et de fibroblastes de rats, les auteurs ont observé une captation très importante et sélective par les cardiomyocytes comparativement aux fibroblastes. Il est à noter que ces résultats correspondent à l'inverse de ceux décrits pour le peptide CRPPR (132). De plus, les auteurs ont confirmé ces observations sur des cellules cardiaques humaines. Dans un second temps, des essais ont été réalisés chez le rat sain. Une distribution importante du PEG modifié par le CTP a été observée au niveau des cardiomyocytes et de manière identique aux études *in vitro*. La captation par les fibroblastes était très faible et elle était négligeable pour les cellules endothéliales, tandis que le PEG non fonctionnalisé par le CTP a été captée par tous les types cellulaires (133).

D'autres travaux concernant le CTP se sont intéressés à la biodistribution chez la souris saine du peptide couplé à deux sondes différentes (134). Le CTP a été chimiquement associé à une sonde fluorescente, puis la distribution cardiaque a été

évaluée sur des coupes histologiques du cœur et comparée à la distribution d'un peptide non spécifique couplé à la même sonde. Il s'est avéré que la présence cardiaque de la sonde était plus importante dans le cas du CTP (134). De plus, le CTP a été couplé à un chélateur fixant le ^{99m}Tc (isomère nucléaire métastable du technétium 99, émetteur γ), ce qui a permis de suivre en temps réel la biodistribution. Avec le CTP, il a été observé une captation cardiaque rapide et importante dès 5 minutes après injection en comparaison du peptide contrôle, ainsi qu'une distribution rénale et vésicale (134).

Une dernière étude s'est intéressée à l'adressage cardiaque d'exosomes grâce au CTP (135). 24 heures après injection intraveineuse chez la souris saine, les auteurs ont pu observer une augmentation de la localisation des exosomes au niveau cardiaque, et une distribution identique avec ou sans CTP au niveau du foie et de la rate.

Ainsi, ces études convergent vers l'intérêt du CTP pour augmenter spécifiquement l'adressage de différents systèmes (polymère, exosomes, ou éléments radioactifs chélatés) au le tissu cardiaque, plus spécifiquement les cardiomyocytes, et ce indépendamment d'un contexte ischémique.

2.2.2.3. Le PCM

Le peptide de ciblage PCM, pour *primary cardiomyocyte binding peptide* (séquence WLSEAGPVVTVRALRGTGS), a fait l'objet du plus grand nombre de travaux. Ce peptide a été utilisé pour adresser des nanoparticules au cœur, seul ou en association avec le peptide TAT de pénétration cellulaire que nous détaillerons plus loin.

Les premiers travaux ont mis en évidence *in vitro* une capture spécifique de NP polymériques (poly(cystamine bisacrylamide-diaminohexane)) exposant le PCM en surface par des cardiomyocytes, comparativement aux fibroblastes (136). D'autres travaux ont associé le PCM à des NP composées de carboxyméthyl-chitosan modifié

par l'acide stéarique, via une liaison amide entre l'azote du chitosan et le carbonyle de l'acide stéarique. A l'aide de ces NP, une étude menée sur un modèle d'hypertrophie cardiaque chez le rat (i.e. étude menée sur l'animal deux semaines après ligature d'une artère rénale) a permis de démontrer le potentiel du PCM pour acheminer au tissu cardiaque des NP véhiculant soit une molécule d'intérêt comme le carvedilol ou la curcumine (137,138), soit un plasmide d'intérêt (139).

Une autre équipe s'est intéressée à la fonctionnalisation par le PCM de nanocapsules de PLGA encapsulant du perfluorocarbone afin d'administrer une molécule d'intérêt (œstrogène) dans un modèle d'hypertrophie cardiaque chez le rat tout en suivant le devenir des nanocapsules par échographie dans un but théranostique (140). Les résultats rejoignent ceux évoqués précédemment sur une meilleure capacité de ciblage cardiaque liée à la présence du PCM. En outre, les propriétés des nanocapsules chargées en perfluorocarbone permettent, grâce ce composé, d'induire une libération localisée sous l'effet d'ultrasons, augmentant l'exposition cardiaque à une molécule d'intérêt.

Une dernière étude a porté sur la fonctionnalisation d'exosomes par le PCM. Dans un premier temps, les auteurs ont observé *in vitro* une capture spécifique des exosomes-PCM par les cardiomyocytes comparativement aux fibroblastes ou aux cellules endothéliales. Dans un deuxième temps, deux voies d'administration ont été étudiées chez la souris saine, à savoir les voies intraveineuse et intramyocardique, pour l'administration d'exosomes fonctionnalisés ou non par le PCM (141). Il ressort des résultats que l'exposition cardiaque dans les deux cas de figure est augmentée avec la fonctionnalisation par le PCM, mais que malheureusement la rétention au niveau du tissu cardiaque est plus importante à la suite de l'injection intramyocardique, plus à risque.

Ainsi, lorsque le PCM a été associé à différents systèmes nanoparticulaires polymériques ou exosomes, ce peptide a montré des propriétés intéressantes de

ciblage cardiaque spécifique vis-à-vis des cardiomyocytes. De plus, il pourra être apprécié qu'une partie de ces études a été menée chez le rongeur présentant une hypertrophie cardiaque, modèle largement sous-représenté dans la littérature pour des études de ciblage.

2.2.2.4. Autres peptides pour le ciblage cardiaque

D'autres peptides ont été utilisés pour le ciblage cardiaque. Ainsi, le peptide natriurétique atrial (ANP) a été greffé à des nanoparticules de silice poreuses et administré par voie intraveineuse dans un modèle d'infarctus du myocarde induit par injection d'isoprénaline 24 heures avant le traitement (142,143). Ces nanoparticules ont montré un tropisme cardiaque important, et plus précisément au niveau de l'endocarde du ventricule gauche des cœurs ischémiés.

D'autres auteurs ont recouvert la surface de liposomes par de l'angiotensine II modifiée avec un espaceur constitué de quatre acides aminés glycine (séquence GGGGDRVYIHPF) dans le but de cibler ses récepteurs (AT1R) présents au niveau cardiaque surexprimés suite à un infarctus du myocarde (modèle d'ischémie chez la souris) (144). Grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente pour marquer les liposomes, les auteurs ont pu observer une captation cardiaque plus importante avec ce peptide en comparaison d'un peptide de composition identique mais de séquence mélangée. Dans ce contexte aigu, ils ont pu observer captation augmentée d'un facteur 1,5. Cependant, dans l'insuffisance cardiaque chronique, on cherchera plutôt à inhiber le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) comme cela a été évoqué précédemment. Ainsi, selon leur application, ce type de NP fonctionnalisées devra être évalué en raison de l'impact physiologique que pourrait avoir l'éventuelle stimulation du SRAA.

Un pentapeptide, CREKA, associé à des NP polymériques de poly(acide lactique)-polyéthylène glycol a fait l'objet d'étude d'adressage dans un modèle murin d'infarctus par ischémie-reperfusion (145). Le nombre de peptides greffées en

surface, environ 600 peptides/NP est à titre de comparaison 10 fois moindre que la densité du CRPPR à la surface de liposomes décrits précédemment (131). L'utilisation de CREKA a permis de cibler la fibrine, présente plus abondamment au niveau des sites impactés par l'ischémie, permettant ainsi de cibler le cœur en post-infarctus.

Une étude de *phage display* a permis l'identification d'un peptide d'intérêt spécifique des cardiomyocytes, appelé I-1, constitué de 7 acides aminés mais dont la séquence n'a pas été fournie par les auteurs (116). C'est un peptide présentant une affinité pour le myocarde altéré à la suite d'un infarctus. Ainsi, les auteurs ont associé ce peptide à des liposomes marqués par une sonde fluorescente, et ont étudié leur biodistribution (cœur, poumons, rate, reins, moelle osseuse, foie) sur la souris, dans un modèle d'infarctus du myocarde. Les formulations ont été injectées par voie intraveineuse 4 jours après induction de l'infarctus. 24 heures après injection, les auteurs ont observé une fluorescence cardiaque correspondant à 15% de la dose injectée lorsque I-1 décorait les liposomes, ce qui est deux fois supérieure au groupe auquel des liposomes non fonctionnalisés ont été administrés. Ces proportions paraissent élevées surtout en ce qui concerne le groupe contrôle ayant reçu des liposomes non fonctionnalisés, compte tenu des résultats décrits dans la partie 2.2.1.2 portant sur la distribution passive dans un contexte d'ischémie cardiaque. Ceci pourrait être lié au recrutement de monocytes circulants au niveau des tissus lésés (129,130), favorisant localement la capacité du tissu à capturer des liposomes.

Une dernière approche s'est intéressée à l'utilisation de peptides sensibles aux métalloprotéases matricielles (MMP), dont l'expression augmente au niveau des tissus myocardiques lésés. Une première étude a été réalisée sur un modèle d'ischémie-reperfusion pour évaluer la distribution de micelles de DSPE-PEG injectées par voie intraveineuse et sensibilisées à la MMP-2 (connue aussi sous le nom de gélatinase A), afin d'obtenir une accumulation spécifiquement cardiaque au niveau des zones ischémiques (146). La seconde étude a porté sur un peptide sensible à la MMP-9 (ou

gélatinase B) couplé à un polymère (polynorbornène) et testé sur modèle d'infarctus chez le rat (147). Comme illustré par la Figure 12, une agrégation localisée des particules a été observée au niveau des zones infarctées, avec un temps remarquable de présence cardiaque jusqu'à 28 jours après injection intraveineuse, ainsi qu'une spécificité pour le tissu cardiaque ischémié. Bien que ces approches permettraient une présence durable de NP dans le temps, elle reste cependant dépendante d'un terrain d'insuffisance cardiaque ischémique en lien avec une modification locale de l'expression de protéines liées à l'inflammation. Ainsi, on pourrait s'attendre à un problème de spécificité vis-à-vis d'autres tissus inflammés.

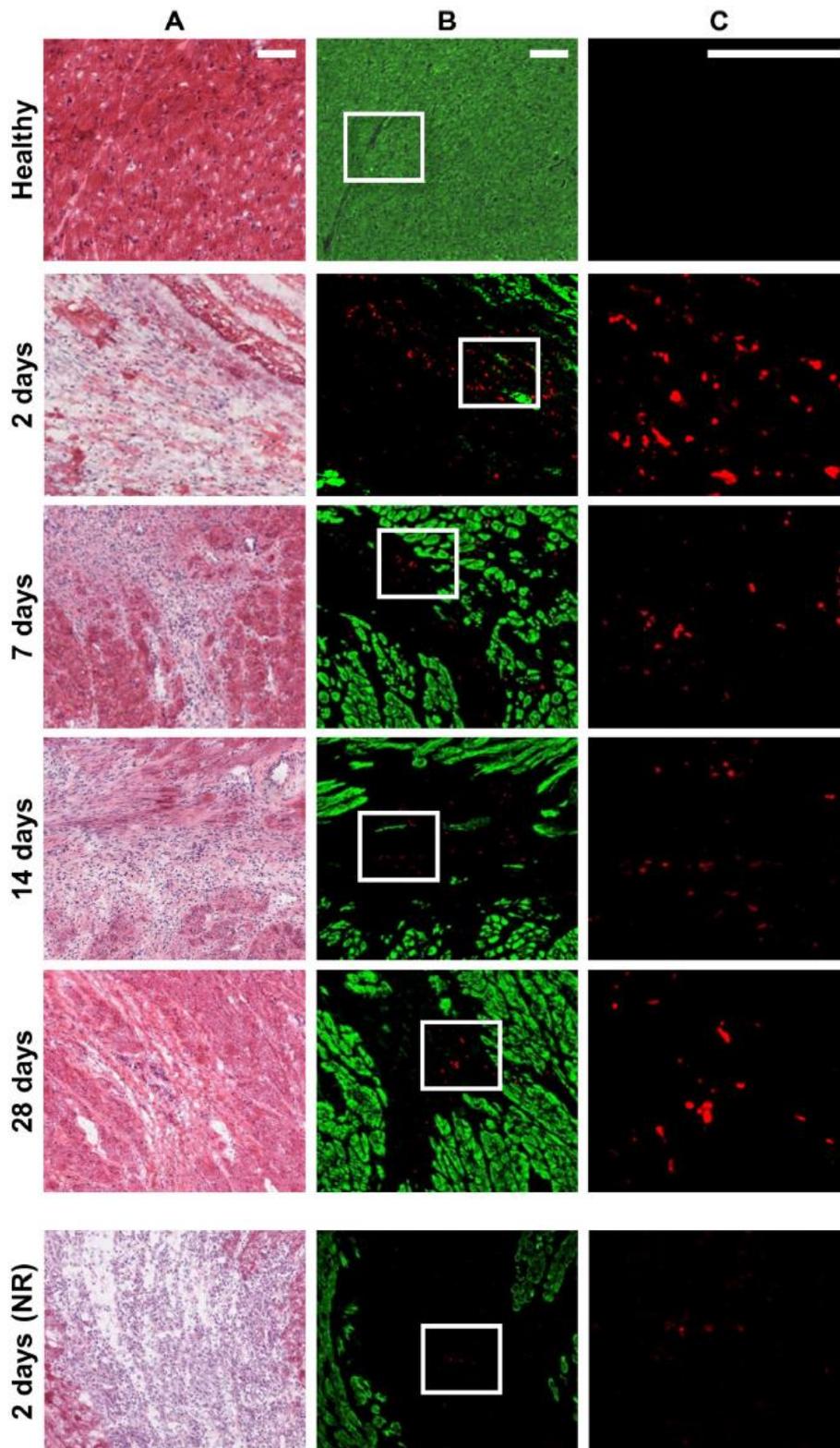


Figure 12 : Rétention cardiaque de nanoparticules sensibles aux métalloprotéases matricielles. A : coupe tissulaire. B : observation des coupes en fluorescence (en vert : un anticorps anti- α -actinine marqué, en rouge les nanoparticules). C : magnification de l'encadré blanc en B avec sélection de la fluorescence révélant les nanoparticules. (NR) : Particules non sensibles aux métalloprotéases. (147)

2.2.2.5. Associations au peptide de pénétration TAT

Un autre peptide, appelé couramment TAT, de séquence YGRKKRRQRRR (148), a été utilisé en association avec des peptides de ciblage cardiaque. C'est en réalité un fragment de 11 acides aminés de la protéine TAT qui appartient à la famille des protéines intervenant dans la pathogénicité du virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1). Cette protéine a démontré des propriétés favorisant l'internalisation cellulaire (149,150). Il a aussi été prouvé que la séquence peptidique choisie a la capacité de pénétrer au niveau cellulaire (151), et a été utilisé pour favoriser la pénétration cellulaire de protéines *in vitro* ou *in vivo* (152,153) ainsi que de liposomes (154–158).

L'utilisation de ce peptide en combinaison avec d'autres molécules de ciblage semble être une approche prometteuse, car dans un premier temps le ligand de ciblage permettrait à des nanoparticules d'être spécifiques et de s'associer à un type cellulaire/tissu, et dans un deuxième temps TAT favoriserait la pénétration des nanoparticules dans les cellules. Cette stratégie a été envisagée en combinant TAT soit à un anticorps monoclonal anti-myosine, soit au peptide de ciblage PCM abordé précédemment.

La combinaison de TAT avec un mAB anti-myosine T a été étudiée par le groupe de Torchilin pour permettre, à l'aide de lipoplexes, la transfection de cardiomyocytes chez le rat modèle d'ischémie cardiaque (158). Ces systèmes ont permis une accumulation cardiaque spécifiquement liée à l'utilisation du mAB anti-myosine, au niveau des zones hypoxiques *in vivo*. Des études complémentaires seraient cependant à envisager afin de vérifier si la transfection est possible grâce à l'utilisation simultanée de TAT et du mAB anti-myosine. La combinaison de TAT au PCM a été étudiée par d'autres équipes sur modèles murins sains, l'une ayant travaillé sur l'adressage cardiaque de polyplexes (159,160), l'autre sur l'adressage de liposomes (161), et ont permis dans les deux cas l'adressage de NP au cœur. *In vivo*, il

apparaît une distribution cardiaque plus importante pour la combinaison PCM/TAT par rapport aux peptides seuls (endocytose des liposomes nus < TAT < PCM < PCM+TAT) (161).

Ces observations mettent en lumière l'intérêt du peptide TAT pour l'endocytose de NP par les cardiomyocytes. Il est à noter que TAT n'est pas spécifique du tissu cardiaque, et par conséquent, peut potentiellement participer à une pénétration tissulaire et cellulaire dans d'autres sites environnants, d'où l'intérêt de l'association à un ligand de ciblage le plus spécifique possible.

2.2.3. Conclusions

Nous avons pu voir au cours de cette introduction l'application de différents peptides le plus souvent associés à des liposomes ou d'autres nanoparticules pour cibler le tissu cardiaque. De plus, il est apparu que les liposomes sont les systèmes qui ont été les étudiés en association avec les ligands de ciblage cardiaques (peptides et mAB). Les expériences menées *in vivo* ont été réalisées sur l'animal sain, l'animal en condition d'insuffisance cardiaque aiguë d'origine ischémique, et dans des conditions d'hypertrophie cardiaque modélisant dans ce dernier cas l'insuffisance cardiaque chronique.

Il s'avère que l'ischémie du myocarde elle-même augmente la distribution cardiaque des nanoparticules en raison de modifications tissulaires locales liées à l'inflammation et au recrutement de cellules immunitaires à forte capacité phagocytaire. Ainsi, ces conditions ne reflètent pas la problématique de ciblage dans un cadre chronique. En effet, dans l'insuffisance cardiaque chronique, les modifications portent notamment sur le développement d'une hypertrophie des cardiomyocytes et d'une fibrose tissulaire (162), et ne sont pas aussi brutales que dans l'ischémie du myocarde où l'on observe une nécrose et une altération de la composition en cellules avec augmentation de la proportion leucocytaire (129,130). La plupart des peptides associés aux liposomes/nanoparticules ont été étudiés dans

des conditions d'ischémie, à savoir l'ANP, l'angiotensine II, CREKA, I-1 et les deux peptides sensibles aux métalloprotéases matricielles MMP-2 et MMP-9. Ces différentes approches exploitent les modifications tissulaires locales causées par l'ischémie telles que l'augmentation de l'expression de des récepteurs à l'angiotensine II, la sécrétion de métalloprotéases, ou la présence de fibrine.

Seul le PCM a fait l'objet d'une étude dans l'hypertrophie cardiaque. Ce peptide, qui a fait l'objet de plus d'études que tous les autres, a permis avec succès d'acheminer différents systèmes nanoparticulaires polymériques au cœur en ciblant les cardiomyocytes. Deux derniers peptides, le CRPPR et le CTP, ont été étudiés chez l'animal sain. Ils ont présenté des propriétés intéressantes pour l'administration de liposomes dans le cas du CRPPR, ou de molécules et exosomes pour le CTP. Ils ont tous les deux permis d'augmenter la distribution cardiaque en l'absence de modification tissulaire aiguë ou chronique, avec un tropisme cardiaque remarquablement important a été observé pour le CRPPR par rapport aux autres organes (131).

Pour conclure, il apparait que la découverte de ligands de ciblage dans un contexte d'insuffisance cardiaque chronique est très limitée. Il semble donc important d'étudier la capacité du CRPPR et du CTP à cibler le cœur dans cette pathologie chronique. Dans le cas de résultat satisfaisants, d'autres études de fonctionnalisation pourraient être envisagées, comme une association avec le PCM pour vérifier une éventuelle synergie dans le ciblage cardiaque, ou avec le peptide de pénétration TAT qui favorise l'internalisation cellulaire des nanoparticules.

Dans ce contexte, la formulation de vecteurs furtifs, biocompatibles et à tropisme cardiaque grâce à un peptide de ciblage semble être une approche prometteuse pour l'administration du (R)-CE3F4 comme traitement de l'insuffisance cardiaque chronique. C'est pourquoi des NP lipidiques fonctionnalisées par le CRPPR

ont été envisagées afin d'une part protéger le (R)-CE3F4 de la dégradation enzymatique, d'autre part adresser spécifiquement ces nanoparticules au cœur.

Références bibliographiques

1. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol*. 15 déc 2015;6(1):187-214.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 14 juill 2016;37(27):2129-200.
3. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 1 sept 2007;93(9):1137-46.
4. Insuffisance cardiaque [Internet]. Santé Publique France. 2020 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-cardiovasculaires-et-accident-vasculaire-cerebral/insuffisance-cardiaque>
5. Guide du parcours de soins - Insuffisance cardiaque - Haute Autorité de Santé [Internet]. 2014 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2012-04/guide_parcours_de_soins_ic_web.pdf
6. Lefkowitz Robert J., Rockman Howard A., Koch Walter J. Catecholamines, Cardiac β -Adrenergic Receptors, and Heart Failure. *Circulation*. 11 avr 2000;101(14):1634-7.
7. Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. 2004;5:6.
8. Madamanchi A. β -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill J Med MJM*. juill 2007;10(2):99-104.
9. Jensen BC, O'Connell TD, Simpson PC. Alpha-1-Adrenergic Receptors in Heart Failure: The Adaptive Arm of the Cardiac Response to Chronic Catecholamine Stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. avr 2014;63(4):291-301.

10. O'Connell TD, Jensen BC, Baker AJ, Simpson PC. Cardiac Alpha1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance. *Pharmacol Rev.* janv 2014;66(1):308-33.
11. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, et al. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 9 déc 2005;97(12):1296-304.
12. Metrich M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomez AM, Lezoualc'h F. Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflüg Arch Eur J Physiol.* mars 2010;459(4):535-46.
13. Laurent A-C, Bissierier M, Lucas A, Tortosa F, Roumieux M, De Régibus A, et al. Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1 janv 2015;105(1):55-64.
14. Li L, Cai H, Liu H, Guo T. β -Adrenergic stimulation activates protein kinase C ϵ and induces extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Med Rep.* juin 2015;11(6):4373-80.
15. Díez J. Role of Angiotensin II in Cardiac Remodeling. In: Unger T, Schölkens BA, éditeurs. *Angiotensin Vol II* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004 [cité 20 janv 2021]. p. 193-208. (Handbook of Experimental Pharmacology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-18497-0_10
16. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. *Blood Press.* 1 janv 2003;12(2):70-88.
17. McEwan Pauline E., Gray Gillian A., Sherry Lorcan, Webb David J., Kenyon Christopher J. Differential Effects of Angiotensin II on Cardiac Cell Proliferation and Intramyocardial Perivascular Fibrosis In Vivo. *Circulation.* 15 déc 1998;98(24):2765-73.
18. Liu Yu, Leri Annarosa, Li Baosheng, Wang Xiaowei, Cheng Wei, Kajstura Jan, et al. Angiotensin II Stimulation In Vitro Induces Hypertrophy of Normal and Postinfarcted Ventricular Myocytes. *Circ Res.* 15 juin 1998;82(11):1145-59.
19. Dendorfer A, Thornagel A, Raasch W, Grisk O, Tempel K, Dominiak P. Angiotensin II Induces Catecholamine Release by Direct Ganglionic Excitation. *Hypertension.* sept 2002;40(3):348-54.
20. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. juill 1994;24(1):30-6.

21. Rigamonti F, Monnard S. Cœur d'athlète: frontière entre physiologie et pathologie. *Rev Médicale Suisse*. 2012;5.
22. Dolgin M, Committee NYHAC. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 9th ed. / editor, Martin Dolgin. Boston : Little, Brown; 1994.
23. Goldman L, Hashimoto B, Cook EF, Loscalzo A. Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation*. déc 1981;64(6):1227-34.
24. Isnard R, Hammoudi N, Legrand L, Pousset F. Que retenir des dernières recommandations européennes sur l'insuffisance cardiaque chronique et aiguë ? *Presse Médicale*. 1 sept 2017;Vol.46(7-8P1):758-65.
25. Traitement de l'insuffisance cardiaque [Internet]. ameli.fr. 2021 [cité 20 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/insuffisance-cardiaque/traitement>
26. Mann Douglas L, Bristow Michael R. Mechanisms and Models in Heart Failure. *Circulation*. 31 mai 2005;111(21):2837-49.
27. Staessen J, Lijnen P, Fagard R, Verschueren LJ, Amery A. Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *J Endocrinol*. déc 1981;91(3):457-65.
28. Sato A, Saruta T. Aldosterone breakthrough during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy: *Am J Hypertens*. 1 sept 2003;16(9):781-8.
29. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. *N Engl J Med*. 2 sept 1999;341(10):709-17.
30. Rall TW, Sutherland EW. Formation of a Cyclic Adenine Ribonucleotide by Tissue Particles. *J Biol Chem*. 6 janv 1958;232(2):1065-76.
31. Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and Characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles. *J Biol Chem*. 6 janv 1958;232(2):1077-92.
32. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science*. 18 déc 1998;282(5397):2275-9.

33. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 3 déc 1998;396(6710):474-7.
34. Ueno H, Shibasaki T, Iwanaga T, Takahashi K, Yokoyama Y, Liu L-M, et al. Characterization of the Gene EPAC2: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Expression, and Identification of the Liver-Specific Isoform. *Genomics*. 1 nov 2001;78(1):91-8.
35. Robichaux WG, Cheng X. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiol Rev*. avr 2018;98(2):919-1053.
36. Kelly MP, Stein JM, Vecsey CG, Favilla C, Yang X, Bizily SF, et al. Developmental etiology for neuroanatomical and cognitive deficits in mice overexpressing $G\alpha_s$, a G-protein subunit genetically linked to schizophrenia. *Mol Psychiatry*. avr 2009;14(4):398-415.
37. Ma N, Abel T, Hernandez PJ. Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A. *Learn Mem*. 6 janv 2009;16(6):367-70.
38. Ostroveanu A, Zee EA van der, Eisel ULM, Schmidt M, Nijholt IM. Exchange protein activated by cyclic AMP 2 (Epac2) plays a specific and time-limited role in memory retrieval. *Hippocampus*. 2010;20(9):1018-26.
39. Grimes MT, Powell M, Gutierrez SM, Darby-King A, Harley CW, McLean JH. Epac activation initiates associative odor preference memories in the rat pup. *Learn Mem*. 2 janv 2015;22(2):74-82.
40. Wan X, Torregrossa MM, Sanchez H, Nairn AC, Taylor JR. Activation of Exchange Protein Activated by cAMP in the Rat Basolateral Amygdala Impairs Reconsolidation of a Memory Associated with Self-Administered Cocaine. *PLoS ONE*. 26 sept 2014;9(9).
41. Lee K, Kobayashi Y, Seo H, Kwak J-H, Masuda A, Lim C-S, et al. Involvement of cAMP-guanine nucleotide exchange factor II in hippocampal long-term depression and behavioral flexibility. *Mol Brain*. 24 juin 2015;8(1):38.
42. Kelly MP. Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. *Cell Signal*. janv 2018;42:281-91.

43. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Jin M, Otsu K, et al. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1 oct 2008;295(4):H1547-55.
44. Kato Yuko, Yokoyama Utako, Yanai Chiharu, Ishige Rina, Kurotaki Daisuke, Umemura Masanari, et al. Epac1 Deficiency Attenuated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 déc 2015;35(12):2617-25.
45. Wang H, Robichaux WG, Wang Z, Mei FC, Cai M, Du G, et al. Inhibition of Epac1 suppresses mitochondrial fission and reduces neointima formation induced by vascular injury. *Sci Rep*. 10 nov 2016;6(1):1-11.
46. Hothi SS, Gurung IS, Heathcote JC, Zhang Y, Booth SW, Skepper JN, et al. Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. nov 2008;457(2):253-70.
47. Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, et al. The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 1 sept 2007;583(Pt 2):685-94.
48. Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, et al. *Epac1*-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest*. 2 juin 2014;124(6):2785-801.
49. Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y, Okumura S, Sato M, et al. Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1 sept 2007;293(3):H1662-72.
50. Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Saulière A, Sin YY, Laurent A-C, Galés C, et al. Specific interactions between Epac1, β -arrestin2 and PDE4D5 regulate β -adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal*. 1 avr 2013;25(4):970-80.
51. Yan J, Mei FC, Cheng H, Lao DH, Hu Y, Wei J, et al. Enhanced Leptin Sensitivity, Reduced Adiposity, and Improved Glucose Homeostasis in Mice Lacking Exchange Protein Directly Activated by Cyclic AMP Isoform 1. *Mol Cell Biol*. 1 mars 2013;33(5):918-26.
52. Chepurny OG, Kelley GG, Dzhura I, Leech CA, Roe MW, Dzhura E, et al. PKA-dependent potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM in human islets of Langerhans. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 15 déc 2009;298(3):E622-33.

53. Kelley GG, Chepurny OG, Schwede F, Genieser H-G, Leech CA, Roe MW, et al. Glucose-dependent potentiation of mouse islet insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *Islets*. 1 nov 2009;1(3):260-5.
54. Schwede F, Chepurny OG, Kaufholz M, Bertinetti D, Leech CA, Cabrera O, et al. Rp-cAMPS Prodrugs Reveal the cAMP Dependence of First-Phase Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Mol Endocrinol*. 1 juill 2015;29(7):988-1005.
55. Birukova AA, Meng F, Tian Y, Meliton A, Sarich N, Quilliam LA, et al. Prostacyclin post-treatment improves LPS-induced acute lung injury and endothelial barrier recovery via Rap1. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1 mai 2015;1852(5):778-91.
56. Oldenburger A, Timens W, Bos S, Smit M, Smrcka AV, Laurent A-C, et al. Epac1 and Epac2 are differentially involved in inflammatory and remodeling processes induced by cigarette smoke. *FASEB J*. 2014;28(11):4617-28.
57. Gong B, Shelite T, Mei FC, Ha T, Hu Y, Xu G, et al. Exchange protein directly activated by cAMP plays a critical role in bacterial invasion during fatal rickettsioses. *Proc Natl Acad Sci*. 26 nov 2013;110(48):19615-20.
58. Eijkelkamp N, Wang H, Garza-Carbajal A, Willemsen HLD, Zwartkruis FJ, Wood JN, et al. Low Nociceptor GRK2 Prolongs Prostaglandin E2 Hyperalgesia via Biased cAMP Signaling to Epac/Rap1, Protein Kinase C ϵ , and MEK/ERK. *J Neurosci*. 22 sept 2010;30(38):12806-15.
59. Hucho TB, Dina OA, Levine JD. Epac Mediates a cAMP-to-PKC Signaling in Inflammatory Pain: An Isolectin B4(+) Neuron-Specific Mechanism. *J Neurosci*. 29 juin 2005;25(26):6119-26.
60. Gu Y, Li G, Chen Y, Huang L-Y. Epac-protein kinase C alpha signaling in purinergic P2X3R-mediated hyperalgesia after inflammation. *Pain*. juill 2016;157(7):1541-50.
61. Cao S, Bian Z, Zhu X, Shen S-R. Effect of Epac1 on pERK and VEGF Activation in Postoperative Persistent Pain in Rats. *J Mol Neurosci*. 1 août 2016;59(4):554-64.
62. Ferrari LF, Bogen O, Alessandri-Haber N, Levine E, Gear RW, Levine JD. Transient decrease in nociceptor GRK2 expression produces long-term enhancement in inflammatory pain. *Neuroscience*. 11 oct 2012;222:392-403.
63. Wang H, Heijnen CJ, Velthoven CTJ van, Willemsen HLD, Ishikawa Y, Zhang X, et al. Balancing GRK2 and EPAC1 levels prevents and relieves chronic pain. *J Clin Invest*. 2 déc 2013;123(12):5023-34.

64. Almahariq M, Mei FC, Cheng X. The pleiotropic role of exchange protein directly activated by cAMP 1 (EPAC1) in cancer: implications for therapeutic intervention. *Acta Biochim Biophys Sin.* janv 2016;48(1):75-81.
65. Wang X, Luo C, Cheng X, Lu M. Lithium and an EPAC-specific inhibitor ESI-09 synergistically suppress pancreatic cancer cell proliferation and survival. *Acta Biochim Biophys Sin.* 1 juill 2017;49(7):573-80.
66. Nygaard G, Herfindal L, Asrud KS, Bjørnstad R, Kopperud RK, Oveland E, et al. Epac1-deficient mice have bleeding phenotype and thrombocytes with decreased GPIIb/IIIa expression. *Sci Rep.* 18 août 2017;7.
67. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J Biol Chem.* 7 oct 1968;243(13):3763-5.
68. Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol.* 5 avr 2004;471(3):241-76.
69. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 9 mai 1991;351(6322):145-7.
70. Larsson HP. How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle. *J Gen Physiol.* 1 sept 2010;136(3):237-41.
71. Zufall F, Shepherd GM, Barnstable CJ. Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 1 juin 1997;7(3):404-12.
72. Krähling AM, Alvarez L, Debowski K, Van Q, Gunkel M, Irsen S, et al. CRIS-a novel cAMP-binding protein controlling spermiogenesis and the development of flagellar bending. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003960.
73. Shabb JB, Corbin JD. Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J Biol Chem.* 25 mars 1992;267(9):5723-6.
74. Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:355-75.
75. Rehmann H, Das J, Knipscheer P, Wittinghofer A, Bos JL. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature.* févr 2006;439(7076):625-8.

76. Liu C, Takahashi M, Li Y, Song S, Dillon TJ, Shinde U, et al. Ras Is Required for the Cyclic AMP-Dependent Activation of Rap1 via Epac2. *Mol Cell Biol.* déc 2008;28(23):7109-25.
77. Rehmann H, Arias-Palomo E, Hadders MA, Schwede F, Llorca O, Bos JL. Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature.* sept 2008;455(7209):124-7.
78. Qiao J, Mei FC, Popov VL, Vergara LA, Cheng X. Cell Cycle-dependent Subcellular Localization of Exchange Factor Directly Activated by cAMP. *J Biol Chem.* 19 juill 2002;277(29):26581-6.
79. Ponsioen B, Zhao J, Riedl J, Zwartkuis F, van der Krogt G, Zaccolo M, et al. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* 1 déc 2004;5(12):1176-80.
80. Consonni SV, Gloerich M, Spanjaard E, Bos JL. cAMP regulates DEP domain-mediated binding of the guanine nucleotide exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci.* 6 mars 2012;109(10):3814-9.
81. Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, Seino S. Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol.* 2009;219(3):652-8.
82. Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, et al. Epac-mediated Activation of Phospholipase C ϵ Plays a Critical Role in β -Adrenergic Receptor-dependent Enhancement of Ca $^{2+}$ Mobilization in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem.* 23 févr 2007;282(8):5488-95.
83. Oestreich EA, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, et al. Epac and Phospholipase C ϵ Regulate Ca $^{2+}$ Release in the Heart by Activation of Protein Kinase C ϵ and Calcium-Calmodulin Kinase II. *J Biol Chem.* 16 janv 2009;284(3):1514-22.
84. Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci.* 18 août 2009;106(33):14144-9.
85. Fujita T, Umemura M, Yokoyama U, Okumura S, Ishikawa Y. The role of Epac in the heart. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017;74(4):591-606.

86. Ruiz-Hurtado G, Morel E, Domínguez-Rodríguez A, Llach A, Lezoualc'h F, Benitah J-P, et al. Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol.* mai 2013;58:162-71.
87. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* juill 2006;116(7):1853-64.
88. Backs J, Backs T, Bezprozvannaya S, McKinsey TA, Olson EN. Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4. *Mol Cell Biol.* mai 2008;28(10):3437-45.
89. Métrich M, Laurent A-C, Breckler M, Duquesnes N, Hmitou I, Courillau D, et al. Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway. *Cell Signal.* oct 2010;22(10):1459-68.
90. Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent A-C, Métrich M, Domínguez-Rodríguez A, et al. Epac enhances excitation–transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1 janv 2012;52(1):283-91.
91. Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature.* 25 juill 1996;382(6589):370-3.
92. Wilkins BJ, Dai Y-S, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 9 janv 2004;94(1):110-8.
93. Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E, et al. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 25 avr 2008;102(8):959-65.
94. Park S-J, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 3 févr 2012;148(3):421-33.
95. Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Pereira L, Fernández-Velasco M, Cassan C, Lezoualc'h F, et al. Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* nov 2012;53(5):617-25.
96. Pereira Laëtitia, Cheng Hongqiang, Lao Dieu Hung, Na Li, van Oort Ralph J., Brown Joan Heller, et al. Epac2 Mediates Cardiac β 1-Adrenergic–Dependent

- Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak and Arrhythmia. *Circulation*. 26 févr 2013;127(8):913-22.
97. Courilleau D, Bisselier M, Jullian J-C, Lucas A, Bouyssou P, Fischmeister R, et al. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J Biol Chem*. 28 déc 2012;287(53):44192-202.
 98. Courilleau D, Bouyssou P, Fischmeister R, Lezoualc'h F, Blondeau J-P. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochem Biophys Res Commun*. 25 oct 2013;440(3):443-8.
 99. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Controlled Release*. 1 mars 2000;65(1):271-84.
 100. Nichols JW, Bae YH. EPR: Evidence and fallacy. *J Controlled Release*. 28 sept 2014;190:451-64.
 101. Torchilin VP, Klivanov AL, Huang L, O'Donnell S, Nossiff ND, Khaw BA. Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. juin 1992;6(9):2716-9.
 102. Torchilin VP, Narula J, Halpern E, Khaw BA. Poly(ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes: factors influencing targeted accumulation in the infarcted myocardium. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 21 févr 1996;1279(1):75-83.
 103. Verma DD, Levchenko TS, Bernstein EA, Mongayt D, Torchilin VP. ATP-loaded immunoliposomes specific for cardiac myosin provide improved protection of the mechanical functions of myocardium from global ischemia in an isolated rat heart model. *J Drug Target*. 1 janv 2006;14(5):273-80.
 104. Khaw BAn, Torchilin VP. 10 Targeting in Myocardial Infarction. In: Francis GE, Delgado C, éditeurs. *Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2000 [cité 10 avr 2020]. p. 159-91. (Methods in Molecular Medicine™). Disponible sur: <https://doi.org/10.1385/1-59259-075-6:159>
 105. Scott RC, Wang B, Nallamothe R, Pattillo CB, Perez-Liz G, Issekutz A, et al. Targeted delivery of antibody conjugated liposomal drug carriers to rat myocardial infarction. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96(4):795-802.

106. Scott RC, Rosano JM, Ivanov Z, Wang B, Chong PL-G, Issekutz AC, et al. Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function. *FASEB J.* 17 juin 2009;23(10):3361-7.
107. Deng Q, Hu B, Cao S, Song H-N, Chen J-L, Zhou Q. Improving the efficacy of therapeutic angiogenesis by UTMD-mediated Ang-1 gene delivery to the infarcted myocardium. *Int J Mol Med.* 1 août 2015;36(2):335-44.
108. Liu M, Li M, Sun S, Li B, Du D, Sun J, et al. The use of antibody modified liposomes loaded with AMO-1 to deliver oligonucleotides to ischemic myocardium for arrhythmia therapy. *Biomaterials.* 1 avr 2014;35(11):3697-707.
109. Stawikowski M, Fields GB. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* Editor Board John E Coligan Al. févr 2002;CHAPTER:Unit-18.1.
110. Dumas J, Robert B. Bioproduction de protéines thérapeutiques - Revue et perspectives. *médecine/sciences.* 1 févr 2009;25:18-26.
111. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chem Rev.* 1 avr 1997;97(2):391-410.
112. Nicol CG, Denby L, Lopez-Franco O, Masson R, Halliday CA, Nicklin SA, et al. Use of in vivo phage display to engineer novel adenoviruses for targeted delivery to the cardiac vasculature. *FEBS Lett.* 18 juin 2009;583(12):2100-7.
113. Zhang Lianglin, Hoffman Jason A., Ruoslahti Erkki. Molecular Profiling of Heart Endothelial Cells. *Circulation.* 13 sept 2005;112(11):1601-11.
114. Zahid M, Phillips BE, Albers SM, Giannoukakis N, Watkins SC, Robbins PD. Identification of a cardiac specific protein transduction domain by in vivo biopanning using a M13 phage peptide display library in mice. *PloS One.* 17 août 2010;5(8):e12252.
115. McGuire MJ, Samli KN, Johnston SA, Brown KC. In vitro Selection of a Peptide with High Selectivity for Cardiomyocytes In vivo. *J Mol Biol.* 3 sept 2004;342(1):171-82.
116. Dasa SSK, Suzuki R, Gutknecht M, Brinton LT, Tian Y, Michaelsson E, et al. Development of target-specific liposomes for delivering small molecule drugs after reperfused myocardial infarction. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 28 déc 2015;220(Pt A):556-67.
117. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials.* 1 avr 2008;29(12):1912-9.

118. Schleh C, Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schäffler M, et al. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology*. févr 2012;6(1):36-46.
119. Takeuchi I, Onaka H, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous injection: Effects of PEGylation at the same particle size. *Biomed Mater Eng*. 1 janv 2018;29(2):205-15.
120. Cho W-S, Cho M, Jeong J, Choi M, Han BS, Shin H-S, et al. Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 mai 2010;245(1):116-23.
121. Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, et al. Prolonged Targeting of Ischemic/Reperfused Myocardium by Liposomal Adenosine Augments Cardioprotection in Rats. *J Am Coll Cardiol*. 24 févr 2009;53(8):709-17.
122. Dauber I M, VanBenthuyzen K M, McMurtry I F, Wheeler G S, Lesnefsky E J, Horwitz L D, et al. Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. *Circ Res*. 1 avr 1990;66(4):986-98.
123. Kim Y D, Fomsgaard J S, Heim K F, Ramwell P W, Thomas G, Kagan E, et al. Brief ischemia-reperfusion induces stunning of endothelium in canine coronary artery. *Circulation*. 1 avr 1992;85(4):1473-82.
124. Nagaoka K, Matoba T, Mao Y, Nakano Y, Ikeda G, Egusa S, et al. A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Induces Cardioprotection from Ischemia-Reperfusion Injury via Activation of PI3K/Akt Pathway and Anti-Inflammation in a Rat Model. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132451.
125. Galagudza M, Korolev D, Postnov V, Naumisheva E, Grigorova Y, Uskov I, et al. Passive targeting of ischemic-reperfused myocardium with adenosine-loaded silica nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1671-8.
126. Wang L, Yao C, Wu F, Lin X, Shen L, Feng Y. Targeting delivery of Radix Ophiopogonis polysaccharide to ischemic/reperfused rat myocardium by long-circulating macromolecular and liposomal carriers. *Int J Nanomedicine*. 10 sept 2015;10:5729-37.

127. Geelen T, Paulis LE, Coolen BF, Nicolay K, Strijkers GJ. Passive targeting of lipid-based nanoparticles to mouse cardiac ischemia-reperfusion injury. *Contrast Media Mol Imaging*. avr 2013;8(2):117-26.
128. Lundy DJ, Chen K-H, Toh EK-W, Hsieh PC-H. Distribution of Systemically Administered Nanoparticles Reveals a Size-Dependent Effect Immediately following Cardiac Ischaemia-Reperfusion Injury. *Sci Rep*. 10 mai 2016;6.
129. Heidt Timo, Courties Gabriel, Dutta Partha, Sager Hendrik B., Sebas Matt, Iwamoto Yoshiko, et al. Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 7 juill 2014;115(2):284-95.
130. Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2014;102(2):240-8.
131. Zhang H, Kusunose J, Kheirrolomoom A, Seo JW, Qi J, Watson KD, et al. Dynamic imaging of arginine-rich heart-targeted vehicles in a mouse model. *Biomaterials*. avr 2008;29(12):1976-88.
132. Zhang H, Li N, Sirish P, Mahakian L, Ingham E, Curry F-R, et al. The cargo of CRPPR-conjugated liposomes crosses the intact murine cardiac endothelium. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 oct 2012;163(1):10-7.
133. Avula UMR, Yoon HK, Lee CH, Kaur K, Ramirez RJ, Takemoto Y, et al. Cell-selective arrhythmia ablation for photomodulation of heart rhythm. *Sci Transl Med*. 28 oct 2015;7(311):311ra172.
134. Zahid M, Feldman KS, Garcia-Borrero G, Feinstein TN, Pogodzinski N, Xu X, et al. Cardiac Targeting Peptide, a Novel Cardiac Vector: Studies in Bio-Distribution, Imaging Application, and Mechanism of Transduction. *Biomolecules*. déc 2018;8(4):147.
135. Kim H, Yun N, Mun D, Kang J-Y, Lee S-H, Park H, et al. Cardiac-specific delivery by cardiac tissue-targeting peptide-expressing exosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 mai 2018;499(4):803-8.
136. Nam HY, McGinn A, Kim P-H, Kim SW, Bull DA. Primary Cardiomyocyte Targeted Bioreducible Polymer for Efficient Gene Delivery to the Myocardium. *Biomaterials*. nov 2010;31(31):8081-7.
137. Rana S, Datta K, Reddy TL, Chatterjee E, Sen P, Pal-Bhadra M, et al. A spatio-temporal cardiomyocyte targeted vector system for efficient delivery of

- therapeutic payloads to regress cardiac hypertrophy abating bystander effect. *J Controlled Release*. 28 févr 2015;200:167-78.
138. Ray A, Rana S, Banerjee D, Mitra A, Datta R, Naskar S, et al. Improved bioavailability of targeted Curcumin delivery efficiently regressed cardiac hypertrophy by modulating apoptotic load within cardiac microenvironment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 janv 2016;290:54-65.
 139. Rana S, Datta R, Chaudhuri RD, Chatterjee E, Chawla-Sarkar M, Sarkar S. Nanotized PPAR α Overexpression Targeted to Hypertrophied Myocardium Improves Cardiac Function by Attenuating the p53-GSK3 β -Mediated Mitochondrial Death Pathway. *Antioxid Redox Signal*. 10 avr 2018;30(5):713-32.
 140. Zhao X, Luo W, Hu J, Zuo L, Wang J, Hu R, et al. Cardiomyocyte-targeted and 17 β -estradiol-loaded acoustic nanoprobe as a theranostic platform for cardiac hypertrophy. *J Nanobiotechnology*. 30 mars 2018;16(1):36.
 141. Mentkowski KI, Lang JK. Exosomes Engineered to Express a Cardiomyocyte Binding Peptide Demonstrate Improved Cardiac Retention in Vivo. *Sci Rep*. 11 juill 2019;9(1):1-13.
 142. Ferreira MPA, Ranjan S, Correia AMR, Mäkilä EM, Kinnunen SM, Zhang H, et al. In vitro and in vivo assessment of heart-homing porous silicon nanoparticles. *Biomaterials*. 1 juill 2016;94:93-104.
 143. Ferreira MPA, Ranjan S, Kinnunen S, Correia A, Talman V, Mäkilä E, et al. Drug-Loaded Multifunctional Nanoparticles Targeted to the Endocardial Layer of the Injured Heart Modulate Hypertrophic Signaling. *Small*. 2017;13(33):1701276.
 144. Dvir T, Bauer M, Schroeder A, Tsui JH, Anderson DG, Langer R, et al. Nanoparticles for targeting the infarcted heart. *Nano Lett*. 12 oct 2011;11(10):4411-4.
 145. Huang Z, Song Y, Pang Z, Zhang B, Yang H, Shi H, et al. Targeted delivery of thymosin beta 4 to the injured myocardium using CREKA-conjugated nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 12 avr 2017;12:3023-36.
 146. Nguyen J, Sievers R, Motion JPM, Kivimäe S, Fang Q, Lee RJ. Delivery of Lipid Micelles into Infarcted Myocardium Using a Lipid-Linked Matrix Metalloproteinase Targeting Peptide. *Mol Pharm*. 6 avr 2015;12(4):1150-7.
 147. Nguyen MM, Carlini AS, Chien M-P, Sonnenberg S, Luo C, Braden RL, et al. Enzyme-Responsive Nanoparticles for Targeted Accumulation and Prolonged

- Retention in Heart Tissue after Myocardial Infarction. *Adv Mater.* 2015;27(37):5547-52.
148. Schwartz JJ, Zhang S. Peptide-mediated cellular delivery. *Curr Opin Mol Ther.* avr 2000;2(2):162-7.
 149. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 23 déc 1988;55(6):1189-93.
 150. Mann DA, Frankel AD. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* juill 1991;10(7):1733-9.
 151. Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* 20 juin 1997;272(25):16010-7.
 152. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 janv 1994;91(2):664-8.
 153. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science.* 3 sept 1999;285(5433):1569-72.
 154. Tseng Y-L, Liu J-J, Hong R-L. Translocation of Liposomes into Cancer Cells by Cell-Penetrating Peptides Penetratin and Tat: A Kinetic and Efficacy Study. *Mol Pharmacol.* 1 oct 2002;62(4):864-72.
 155. Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 17 juill 2001;98(15):8786-91.
 156. Torchilin V, Levchenko T. TAT-Liposomes: A Novel Intracellular Drug Carrier. *Curr Protein Pept Sci.* 1 avr 2003;4(2):133-40.
 157. Torchilin VP, Levchenko TS, Rammohan R, Volodina N, Papahadjopoulos-Sternberg B, D'Souza GGM. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci.* 18 févr 2003;100(4):1972-7.
 158. Ko YT, Hartner WC, Kale A, Torchilin VP. Gene delivery into ischemic myocardium by double-targeted lipoplexes with anti-myosin antibody and TAT peptide. *Gene Ther.* janv 2009;16(1):52-9.

159. Nam HY, Kim J, Kim S, Yockman JW, Kim SW, Bull DA. Cell penetrating peptide conjugated bioreducible polymer for siRNA delivery. *Biomaterials*. 1 août 2011;32(22):5213-22.
160. Nam HY, Kim J, Kim SW, Bull DA. Cell Targeting Peptide Conjugation to siRNA Polyplexes for Effective Gene Silencing in Cardiomyocytes. *Mol Pharm*. 7 mai 2012;9(5):1302-9.
161. Wang X, Huang H, Zhang L, Bai Y, Chen H. PCM and TAT co-modified liposome with improved myocardium delivery: in vitro and in vivo evaluations. *Drug Deliv*. 1 janv 2017;24(1):339-45.
162. Sainte-Marie Y, Bisselier M, Tortosa F, Lezoualc'h F. Les acteurs moléculaires du remodelage cardiaque pathologique: Exemple des protéines Epac et carabin. *médecine/sciences*. oct 2015;31(10):881-8.

Partie expérimentale - Chapitre 1.

Comparaison interespèces du métabolisme plasmatique et stabilisation d'échantillons en bioanalyse : application au (*R*)-CE3F4 en développement préclinique, et identification d'un métabolite par spectrométrie de masse à haute résolution

Résumé :

Le (*R*)-CE3F4 est un inhibiteur d'EPAC1 (*exchange protein directly activated by cAMP type 1*), qui est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Son inhibition a montré des résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo* dans différentes pathologies cardiaques, comme l'hypertrophie qui contribue à l'installation d'une insuffisance cardiaque, et l'arythmie.

Une méthode utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée un détecteur UV-visible (HPLC-UV), avec un traitement d'échantillons rapide et simple, a permis la quantification du (*R*)-CE3F4. Pour un échantillon de 50 µL de plasma, la précipitation des protéines plasmatiques se faisait par l'ajout de 50 µL d'éthanol et 150 µL d'acétonitrile. Deux longueurs d'onde ont été utilisées en fonction de l'origine des plasma (220 ou 250 nm pour des échantillons humains, 250 nm uniquement pour des échantillons murins). L'approche se fondant sur le profil d'exactitude a été utilisée pour les deux longueurs d'onde utilisées, et la méthode a été validée selon des critères compatibles avec la ligne directrice fournie par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour la validation des méthodes en bioanalyse. Le temps d'analyse était de 12 minutes, permettant la détection du (*R*)-CE3F4 et d'un métabolite. De plus, cette étude a permis d'une part de comprendre le devenir du (*R*)-CE3F4 dans le plasma, et de mettre en évidence une différence importante sur les capacités métaboliques des plasmas humains et murins. Ce dernier point pourrait influencer les études à venir du CE3F4 dans des modèles

pathologiques précliniques. L'utilisation du paraoxon comme inhibiteur enzymatique a été crucial pour stabiliser le (R)-CE3F4 dans les échantillons murins. Des études menées en HPLC-UV et HPLC-MS/MS (spectrométrie de masse en tandem) ont permis de confirmer la structure du métabolite, et par conséquent la principale voie de dégradation du CE3F4 dans le plasma murin.

La suite de ce chapitre est rédigée en anglais, et correspond au document soumis au *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*.

Interspecies comparison of plasma metabolism and sample stabilization for quantitative bioanalyses: application to (*R*)-CE3F4 in preclinical development, including metabolite identification by high-resolution mass spectrometry.

Balthazar Toussaint^{1,2}, Hervé Hillaireau¹, Emmanuel Jaccoulet^{1,3}, Catherine Cailleau¹, Pauline Legrand^{2,4}, Yves Ambroise⁵, Elias Fattal¹

¹ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296, Châtenay-Malabry, France.

² Département de Recherche et Développement Pharmaceutique, Agence Générale des Équipements et Produits de Santé (AGEPS), Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.

³ Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP), Service Pharmacie (AP-HP), Paris, France.

⁴ Université de Paris, Faculté de sciences pharmaceutiques et biologiques, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), CNRS UMR8258, Inserm U1022, Paris, France.

⁵ Université Paris-Saclay, CEA, Institut des Sciences du Vivant Frederic Joliot, 91191, Gif-sur-Yvette, France.

*Corresponding Author:

Elias Fattal, Ph.D

Université Paris-Saclay

Institut Galien Paris-Sud

UMR CNRS 8612

5 Rue Jean-Baptiste Clément

92290 Châtenay-Malabry

France

Abstract

The CE3F4 is an inhibitor of the type 1 exchange protein directly activated by cAMP (EPAC1), which is involved in numerous signaling pathways. The inhibition of EPAC1 shows promising results *in vitro* and *in vivo* in different cardiac pathological situations like hypertrophic signaling, contributing to heart failure, or arrhythmia. An HPLC-UV method with a simple and fast sample treatment allowed the quantification of (*R*)-CE3F4. Sample treatment consisted of simple protein precipitation with 50 μ L of ethanol and 150 μ L of acetonitrile for a 50 μ L biological sample. Two wavelengths were used according to the origin of plasma (220 or 250 nm for human samples and 250 nm for murine samples). Accuracy profile was evaluated for both wavelengths, and the method was in agreement with the criteria given by the EMA in the guideline for bioanalytical method validation for human plasma samples. The run time was 12 min allowing the detection of the (*R*)-CE3F4 and a metabolite. This study further permitted understanding the behavior of CE3F4 in plasma by highlighting an important difference between humans and rodents on plasma metabolism and may impact future *in vivo* studies related to this molecule and translation of results between animal models and humans. Using paraoxon as a metabolism inhibitor was crucial for the stabilization of (*R*)-CE3F4 in murine samples. HPLC-UV and HPLC-MS/MS studies were conducted to confirm metabolite structure and consequently, the main metabolic pathway in murine plasma.

Keywords: EPAC1, High-performance liquid chromatography, Species metabolism, Validation method, Plasma stability study

1. Introduction

Heart disease is one of the major issues of the last century which burden remains significant with high morbidity and mortality that has not been improved by any treatment modality [1]. Many efforts are performed to find new efficient drugs in the cardiology field. Very recently, one *in vivo* study described the potential of a new drug, CE3F4, on C57BL/6 mouse models for atrial/ventricular arrhythmias [2]. CE3F4 is a tetrahydroquinoline analog identified as a specific and uncompetitive inhibitor of EPAC1 (exchange protein directly activated by cAMP 1) [3,4]. The downregulation of EPAC1 activity can restore or protect physiological functions, which could be exploited for new treatments of heart failure [5] and arrhythmia [2,6]. CE3F4 has demonstrated *in vitro* efficient inhibition of cellular mechanisms involving EPAC1 in pathological cardiac conditions [7–9]. Moreover, other diseases such as breast, gastric, and pancreatic cancers [10–12], Alzheimer's disease [13], and depression [14] may benefit from CE3F4. Altogether, these results were promising for further pharmaceutical development of this drug.

Extensive and comprehensive preclinical studies are required to yield toxicological, pharmacokinetic, and pharmacological information before clinical trials of a new drug [15]. Typically, pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) study involves *in vitro* analysis from animals (e.g. rodents) and human plasma [16]. Quantitative analysis is of utmost importance for this purpose [16,17]. However, particular care should be taken in analytical strategies due to metabolism differences between species. To facilitate the preclinical results to clinical study transposition, drug metabolism should be performed *in vitro* with murine and human plasma at an early stage of development. This raises the challenge of the analysis in a complex medium such as plasma, containing various degrading enzymes that differ from species. Indeed, it is noteworthy that differences in the type of enzyme existing between mammalian species may impact drug analysis and subsequently lead to

considerable challenges in interpreting the data. Interspecies differences in drug metabolism were reported between rodents and humans [18–20]. For example, carboxylesterases, which are known to degrade drugs containing amides, carbamate, esters, or thioesters bonds [21,22], are present in rodent plasma but not in human plasma [23]. Therefore, plasma metabolism can lead to drug degradation during sample collection, preparation, or storage [24], inducing a false estimate of the drug level in plasma which is detrimental for monitoring purposes [25]. To overcome these issues, several procedures are currently used for *ex vivo* drug stabilization before analysis. To achieve drug stabilization in plasma samples, specific enzyme inhibitors, involved in the degradation, have been described such as irreversible non-competitive inhibitors like pesticides inhibiting esterases to stabilize diformyl dapsones [19], oseltamivir [25], and zeylenone [26]. Other inhibitors like tetrahydrouridine demonstrated an interest in gemcitabine stabilization (competitive inhibitor) before quantification [27], or EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) which can be used to inhibit metal-dependent enzymes [28,29]. Less-specific methods can be used such as cold temperature to slow-down enzymatic reaction kinetic, pH setting outside optimal range for enzyme activity [30], or protein precipitation by organic solvent [31,32], this latest method presenting the advantage to deproteinize the plasma sample making it suitable for analysis. Very recently, different methods were combined to stabilize molecules of interest in plasma before analysis, as EDTA with sample acidification and refrigerated conditions for osimertinib stabilization [33], or sodium fluoride (esterase inhibitor) associated to sample acidification, EDTA, derivatization, and refrigerated conditions for the simultaneous quantification of vicagrel and its two metabolites [34].

Nevertheless, when it comes to a new drug, the enzymes likely to affect the clearance of the drug are not always identified. Di *et al.* [35] emphasized the importance of plasma stability experiments on hydrolyzable drugs during drug discovery, as this type of study is very informative about compound screening, drug

liability, and the potential need to use hydrolase inhibitors during PK studies [35]. In the case of (*R*)-CE3F4, to the best of our knowledge, no degrading enzyme in plasma has yet been reported. To conduct PK/PD studies, the behavior of (*R*)-CE3F4 in blood or plasma medium (e.g. differences in pharmacokinetics, metabolism) should be conducted [36,37]. CE3F4 shows a N-formamide function (**Fig. 1**), and thus, has the potential to be inactivated by hydrolases, including esterases or N-formamidase [18–20]. Due to the known differences between humans and rodents in the expression of the wide class of hydrolases [23,38,39], a specific approach must be considered.

The present paper describes the first method for (*R*)-CE3F4 quantification in both human and mouse plasma using LC-UV system. The method included enzyme inhibition, extraction, and assay steps. The method was validated through the European Medicine Agency guideline for bioanalytical analysis, on two wavelengths (220 and 250 nm) to overcome a lack of specificity depending on the origin of the plasma matrices analyzed (i.e. human or mouse). It was then applied to plasma samples, and an essential difference in plasma metabolism has been highlighted *ex vivo* between murine and human plasma.

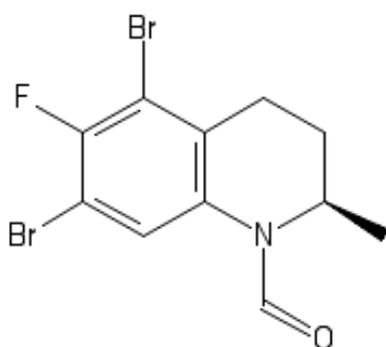


Fig. 1. Structure of (*R*)-CE3F4.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

A racemic mixture of CE3F4 and the deformedylated-CE3F4 were synthesized using published procedures [40]. The active enantiomer (*R*)-CE3F4 was isolated with a purity >99% and enantiomeric excess (ee) >98% by applying the racemic mixture to a 250 × 30 mm Chiralpak® IB column (Daicel Corporation, Japan) equilibrated with *n*-hexane/propan-2-ol (95/5) at 42 mL/min. Paraoxon-ethyl (paraoxon) with the standard analytical grade, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) with purity >99%, benzil with purity >98%, and bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) with purity >99% were acquired from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Zoletil® 50 (tiletamine, zolazepam), Rompun® 2% (Xylazine), Iso-Vet (isoflurane) were respectively purchased from Virbac (Carros, France), Bayer (Leverkusen, NRW, Germany), and Piramal Critical Care (Voorschoten, Netherlands). Ethanol (EtOH), as well as dimethyl sulfoxide (DMSO), were bought from VWR (Radnor, PA, USA), acetonitrile (ACN) with HPLC grade was purchased from Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Deionized water (H₂O) was produced by a Milli-Q water purifying system (Millipore, Milford, MA, USA). For the LC-MS experiment, water, acetonitrile, and formic acid were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

2.2. Biological samples

Human blank plasmas were obtained from blood donations from healthy volunteers who signed written informed consent (French Blood Establishment, La Plaine Saint-Denis, France). A sampling of murine plasmas was carried out according to the ethical committee (agreement number APAFIS#5584-20 16050312271349 v4). Blood samples were collected in heparinized tubes. After centrifugation at 500 g for 10 minutes in polypropylene tubes, plasmas were separated from the pellets and stored at -20°C.

2.3. Preparation of (*R*)-CE3F4 stock solutions, calibration standards, and quality controls

All liquids were handled with MICROMAN E positive displacement pipettes (Middleton, WI, USA) due to the viscosity of plasma samples and the use of organic solvents. Two stock solutions of (*R*)-CE3F4 were prepared in ethanol at a concentration of 1000 µg/mL, for calibration, and quality controls (QC). They were stored at +5°C. For the preparation of calibration standards, serial dilution (dilution factor = 2.43) in ethanol was performed from the stock solution to obtain an eight levels calibration curve with concentrations ranging from 0.40 to 200 µg/mL (**Table 1**). For the preparation of QC, appropriate volumes of stock solutions were evaporated to dryness at 40°C under a stream of nitrogen in 10 mL calibrated flasks for human QC or in 5 mL calibrated flasks for murine QC. For human QC, the dry residue was taken up with 10 mL of blank human plasma and mixed under magnetic stirring for two hours to obtain appropriate solubilization of the residue in the plasma at the six concentrations levels from 0.40 to 150 µg/mL (**Table 1**). For murine QC, 5 mL of mouse plasma loaded with paraoxon (final concentration of 10⁻⁴M) were used to obtain three concentration levels of (*R*)-C3F4 (0.40, 8.00, and 150 µg/mL) (**Table 1**). These QC were defined as working solutions and were stored at -20°C.

Table 1. Concentrations (µg/mL) for the eight calibration standards, the six quality controls in human plasma, and the three quality controls in mouse plasma.

Sample type	Number of levels	[CE3F4] for each level (µg/mL)							
		0.40	0.97	2.36	5.74	13.9	13.9	82.3	200
Calibration	8	0.40	0.97	2.36	5.74	13.9	13.9	82.3	200
Human quality controls	6	0.40	1.50	5.00	25.0	60.0	150		
Murine quality controls	3	0.40	8.00	150					

2.4. Sample treatment

Using 2 mL polypropylene microcentrifuge tubes, 50 µL of calibration standards were added to 50 µL of (*R*)-CE3F4-free human plasma for the calibration samples and followed by a vortex-mixing step (10 seconds). For plasma samples spiked with (*R*)-CE3F4 (human plasma as QC for validation, human and murine

plasmas for metabolism experiments), 50 μL of plasma was supplied with 50 μL of ethanol and followed by a vortex-mixing step (10 seconds). The proportions for each component (plasma, ethanol) were identical between calibration samples and QC (**Table 2**). Protein precipitation was performed by the addition of 150 μL of acetonitrile followed by a vortex-mixing for 10 seconds. After precipitation, tubes were centrifuged at 13,000 g for 10 minutes at room temperature, then 100 μL of the supernatant was collected into autosampler vials. 15 μL of the supernatant was injected into the chromatographic system.

Table 2. Detail of volumes (μL) used for the sample preparation, for each working solution (calibration standard, CS; and human or murine quality control, QC), plasma (human or murine), and solvents.

Sample type	CS	QC	Plasma with unknown [(<i>R</i>)-CE3F4]	Blank plasma	EtOH	ACN for extraction
Calibration	50	-	-	50	-	150
QC	-	50	-	-	50	150
Plasma samples (human or murine)	-	-	50	-	50	150

2.5. Stock solutions of enzyme inhibitors

Several stock solutions of paraoxon, BNPP, and benzil were separately prepared at the concentration of 10^{-2} M, 10^{-3} M, and 10^{-4} M in DMSO. EDTA was solubilized in water to obtain a concentration of 200 mM.

2.6. Instruments

2.6.1. UV/Visible spectrophotometer

The UV absorbance spectra of (*R*)-CE3F4 were acquired using a Lambda 25 UV/VIS spectrometer from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). The acquisition was performed with the software (UV WinLab from PerkinElmer) in scan mode from 195 to 400 nm with an acquisition rate of 480 nm/min, a slit width of 1 nm, and a data

interval of 1 nm. Samples were analysed in a quartz cuvette (Hellma Analytics, Paris, France), and the optical pathlength was 10 mm. Appropriate dilutions of (*R*)-CE3F4 in ACN were performed to obtain 4.0, 8.0, and 16.0 µg/mL. After subtraction of the blank (ACN), absorbances at each wavelength have been divided by the corresponding concentration of the analysed sample to obtain the molar extinction coefficient.

Second derivate UV spectra were calculated using the Savitzky-Golay (SG) algorithm to identify UV maxima. Such a procedure highlights the potential wavelengths of interest for setting up chromatographic analysis. The convolution coefficients used were those to perform the SG second derivative with a quadratic/cubic polynomial fitting and a window size of nine points.

2.6.2. Liquid chromatography with UV detection

LC was performed on a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) equipped with a diode array detector (Waters 2996 PDA), an injector (Waters 717 plus Autosampler), and a quaternary pump (Waters 600 HPLC pump). An external heater/chiller for the column was used (GRACE Model 7956R, Columbia, MD, USA). The separation was performed on XBridge C18 3.5 µm, 4.6 × 100 mm column (Waters). The oven temperature was set at 35°C. The mobile phase consisted of a mixture of water and acetonitrile (40:60, v/v) under isocratic mode at a flow rate of 1 ml/min. The acquisition was carried out from 194 to 400 nm with a resolution of 1.2 nm. Chromatograms were registered at 220 and 250 nm.

2.6.3. Liquid chromatography with MS/MS detection

Analysis was performed on RP-HPLC (ACQUITY, Waters, Manchester, UK) hyphenated to LTQ-orbitrap XL mass spectrometer (Thermo-Fischer Scientific, Les Ulis, France) specifically for identification purpose. The chromatographic conditions were very similar to the HPLC-UV method. Differences stood in the addition of formic acid 0.1% (v/v) into the mobile phase (water and ACN, 40:60, v/v) and in the flow rate

which was set at 0.5 mL/min. The column remaining the same (XBridge C18 3.5 μ m, 4.6 \times 100 mm) was kept at the same temperature (35°C). Mass spectrometry analyses were conducted with a heated electrospray ionization (ESI) interface (HESI-II) operating on positive mode with the following parameters: ESI voltage of +4.0 kV, sheath gas flow rate value of 80, and an auxiliary gas flow rate value of 12. Source heating temperature was set to 300°C, capillary and tube lens voltage to a value of 35 V and 90 V respectively. Mass/charge (m/z) range was 50-500. Full MS scans were recorded in profile mode using the high-resolution FTMS analyzer (R = 60,000). MS/MS fragmentation was performed by collision-induced dissociation (CID) using a normalized CID energy of 35. Data acquisition was controlled by Xcalibur software (Thermo-Fischer Scientific, Les Ulis, France).

2.7. Analytical method validation for (R)-CE3F4 plasma stability studies

The validation procedure was adapted from the European Medicine Agency (EMA) guideline for bioanalytical method validation which defines the acceptance criteria [41]. This procedure was carried out with plasma samples on three separate days, following the methodology from the *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (SFSTP) previously reported [42–44]. LC-UV system has been used, and the signal was the chromatographic peak area at 220 nm and 250 nm.

2.7.1. Specificity

The specificity of this method was demonstrated by injecting the extracts blank plasma (human or murine), the extracts of plasma spiked with other compounds like enzyme inhibitors (i.e. paraoxon, BNPP, benzil), or molecules which can be used for *in vivo* experiment as isoflurane, or the association Zoletil® (tiletamine, zolazepam) plus Rompun® (xylazine) at lethal dose. No peak with a surface area equal to at least 20 % of the LLOQ should appear on the chromatogram under or near the (R)-CE3F4 (resolution $R_s < 1.5$).

2.7.2. Quantitative validation

In our experiments, we assumed that a calibration curve and its corresponding QCs were accepted if 6 out of 8 CS concentration levels and, at least 4 out of 5 QC samples for each QC level (= 80% of the QCs samples, corresponding to the β -expectation tolerance interval described by the SFSTP [42–44]) satisfied the validation criteria. This approach is a derivation of EMA guidelines, which recommend that 67% of QC samples for 50% QC level must fulfill the bias acceptance criteria.

For the validation of the quantitative method, the calibration curve was fitted by least square regression using 8 CS concentration levels, ranging from 0.40 $\mu\text{g/mL}$ to 200 $\mu\text{g/mL}$, and different weighting factors were evaluated (1, 1/concentration, 1/concentration²). Linearity was assessed from the slope of the linear regression and the y-intercept and the coefficient of determination (R^2). For the validation of the method, accuracy, precision, and recovery were tested with the same QC sample. Accuracy, repeatability, and intermediate precision were assessed using five determinations with independent extractions of the same batch, on three separate days ($n = 15$) for each of the six QC levels using human plasma, and each of the three QC levels using murine plasma loaded with paraoxon. Both precision and accuracy were given as the recovery profile. The lower limit of quantification (LLOQ) and the upper limit of quantification (ULOQ) of the method were both set to the lowest and the highest QC value (0.40 $\mu\text{g/mL}$ and 150 $\mu\text{g/mL}$), which is another adaptation of EMA guidelines. Mean relative errors (%) from the expected concentrations were calculated and the accepted ranges were $\pm 20\%$ and $\pm 15\%$ for the lowest QC concentration (i.e. 0.40 $\mu\text{g/mL}$), and the other QC, respectively. Acceptance criteria limits for the β -expectation tolerance interval were $100 \pm 20\%$ for the first QC level (LLOQ), and $100 \pm 15\%$ for other QC levels. The carryover was also investigated with the injection of the highest calibration standard (200 $\mu\text{g/mL}$), followed by five injections of blank plasma extract. Carryover was considered negligible if the signal obtained with the 1st blank following the highest standard was less than 20% of the LLOQ.

2.7.3. Extraction recovery and stability

Two calibration curves were carried out, the difference was in the moment of the (*R*)-CE3F4 addition. The first calibration curve corresponded to addition into plasma before the extraction process (calibration "A"), and the second calibration curve consisted in the addition of the (*R*)-CE3F4 after the extraction process on blank plasma with ACN, and it corresponds to a theoretical recovery of 100 % (calibration "B") [45]. Samples were injected into the chromatographic system. The recovery was calculated each day of the validation process with the ratio between the slopes of these 2 calibration curves (A/B).

The stability of the extracts in the autosampler (set at 20° C) was investigated over a 15 h period by comparing the concentration obtained with extracts divided into two batches. One was injected immediately after extraction then reinjected after 15 h in the autosampler, and the other batch was just injected once after 15 h in the autosampler. The stability over one year was investigated for stock solutions for their usual storage conditions (5° C), one month for human QCs or one week for mouse QCs stored at -20° C, after 3 cycles of freeze-thaw (-20° C to ambient temperature), and short-term stability for two hours at room temperature. If a decrease of 15 % or more was observed for QC or 5 % for stock solutions, the analyte was considered unstable for the corresponding tested condition.

2.8. Applications for the evaluation of (*R*)-CE3F4 ex vivo stability in human or murine plasma

2.8.1. (*R*)-CE3F4 behaviour in plasma at 37°C

The stability of (*R*)-CE3F4 in human and murine plasmas was investigated ex vivo for 24 hours at 37°C. Due to the poor solubility in water media, (*R*)-CE3F4 was first solubilized into DMSO to obtain a stock solution at 10 mg/mL. 3.6 µL of the (*R*)-CE3F4 solution was mixed to 600 µL plasma in microcentrifuge tubes to obtain a concentration near 60 µg/mL. Microcentrifuge tubes were put in a rotary agitator at

37°C. Sampling was achieved at the following times ($t = 5', 15', 30', 45', 60', 90', 120', 180', 20 \text{ h}$ and 24 h). To follow the stability of the (*R*)-CE3F4 over time, a normalization of the data was made by the ratio between the concentration measured at each sampling time and the concentration measured at 5 minutes ($[\text{CE3F4}]_t/[\text{CE3F4}]_{5\text{min}} = \text{relative concentration (\%)} \text{ at time } t$). Experiments were repeated four times with human plasma, and six times with murine plasma.

2.8.2. Stabilization studies of (*R*)-CE3F4 in murine plasma at 37°C with EDTA, paraoxon, BNPP, or benzil

Paraoxon, BNPP, benzil, and EDTA were separately tested as metabolism inhibitors in murine plasma to stop the degradation of (*R*)-CE3F4 that may occur during the processing of samples *in vivo* studies. EDTA was tested at the concentration of 10 mM in murine plasma sample (i.e. 15 μL of the EDTA stock solution were added to 284 μL of plasma) spiked with (*R*)-CE3F4 (i.e. 1.8 μL of (*R*)-CE3F4 at 10 mg/mL for 300 μL of plasma) and the sample was put in a rotary agitator at 37°C after one-minute vortex step. Paraoxon, BNPP, and benzil were studied separately at 10^{-4} M , 10^{-5} M , 10^{-6} M in plasma. Briefly, for these three inhibitors, 3.0 μL of each stock solution (at 10^{-2} M , 10^{-3} M , 10^{-4} M) were added in 296 μL of murine plasma, followed by a one-minute vortex step and five minutes in a rotary agitator at 37°C. Then, (*R*)-CE3F4 was added in plasma already loaded with inhibitor (paraoxon or BNPP or benzil) in the same proportions described in the paragraph above (i.e. 1.8 μL of (*R*)-CE3F4 at 10 mg/mL for 300 μL of plasma). For the four compounds, five sampling times were analysed for up to 1 hour to estimate the stabilization of the (*R*)-CE3F4 in samples. Similarly, in a second experiment (*R*)-CE3F4 and paraoxon (stock solution at 10^{-2} M) were simultaneously added in murine plasma at the same proportion and conditions of the previous experiment to evaluate whether (*R*)-CE3F4 degradation occurred during homogenization of the sample.

2.8.3. Storage conditions suitable for (*R*)-CE3F4 in murine plasma

The stability of loaded murine plasma samples with paraoxon (10^{-4} M in plasma sample) and (*R*)-CE3F4 (60 $\mu\text{g/mL}$) was investigated at 5°C for 3 days, after 3 days and one week at -20°C , and after 3 cycles of freeze-thaw. If a decrease of 15% or more was observed, samples were considered unstable.

2.8.4. HPLC-MS/MS for metabolite identification

The identification of (*R*)-CE3F4 metabolite was performed by HPLC-MS/MS analysis. To proceed with the identification, a control sample of (*R*)-CE3F4 (5 $\mu\text{g/mL}$), a control sample of deformedylated-CE3F4 (5 $\mu\text{g/mL}$), and plasma extract (as described in 2.8.1) were analyzed.

3. Results and discussion

3.1. Spectral analysis of (*R*)-CE3F4 & method validation

3.1.1. Spectral analysis

Due to the lack of information on (*R*)-CE3F4, a preliminary study of the UV absorption spectra was performed in the range of 200 nm to 400 nm. This enables us to determine precisely the suitable wavelengths for HPLC-UV analysis. From the mean UV spectrum of (*R*)-CE3F4, two narrow bands, showing maxima at 202 nm and 220 nm, and two broad bands were observed (**Fig. S1**). The second derivative spectrum was calculated from the mean UV spectrum to exalt the spectrum signal and the two expected wavelengths from the broad bands were highlighted at 250 and 299 nm. Based on the variability of the measured absorbances (RSD %) at 202 nm, 220 nm, 250 nm, and 299 nm, which were 6.1 %, 2.12 %, 3.0 %, and 10.4% respectively, we selected the wavelengths 220 nm and 250 nm for the quantification of (*R*)-CE3F4. Then both wavelengths were further investigated to improve the UV detection for the quantitative method depending on the specificity of the chromatographic assay on human and murine plasma.

3.1.2. Validation of the (*R*)-CE3F4 method quantification in human plasma

The next step for conducting the CE3F4 bioanalysis was to set up a quantitative method using liquid chromatography. The relative hydrophobicity of CE3F4 (LogP= 3.6) allowed us to use a reversed stationary phase with a long alkyl chain (C18) and relative elutropic strength (ACN/Water: 60/40 (v/v)). Accordingly, the method was validated in terms of specificity, linearity, LOQ, accuracy profile, and precision. Carryover, sample stability, and extraction recovery were also determined.

Under these analytical conditions, the (*R*)-CE3F4 had an elution time of 4.2 min and was well-separated from visible compounds from the human plasma matrix which were overwhelmingly eluted up to 3 min. Indeed, concerning the specificity, no signal was detectable at 220 or 250 nm on blank human plasma samples close to CE3F4 retention time (4.2 min) as displayed in **Fig. .** Similar results were obtained with enzyme inhibitors, or commonly used compounds for *in vivo* studies as isoflurane, Rompun® (xylazine), or the association of Zoletil® (tiletamine, zolazepam) at a lethal dose. At this stage, it is worth noting that two calibration curves corresponding to each selected wavelength (i.e. 220 and 250 nm) were performed. This strategy was applied to overcome the difference between species, with the possible interferences generated by matrix elements extracted from human or mouse plasma.

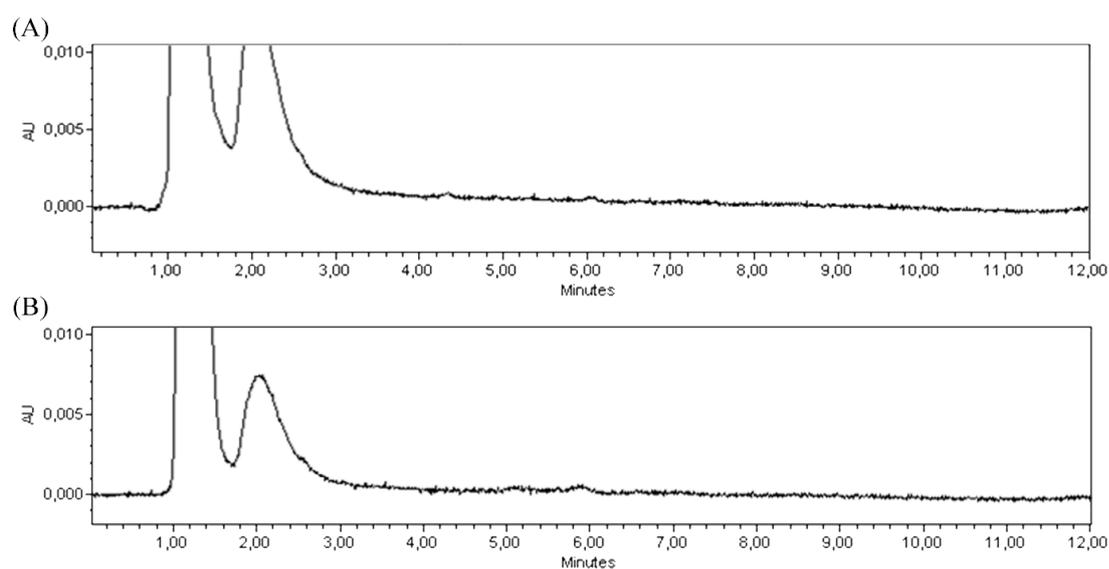


Fig. 2. Chromatograms of blank human plasma extract at 220 nm (A) and 250 nm (B).

For the validation of the (*R*)-CE3F4 method quantification in human plasma, the β -expectation proportion of 80% for all QC level, using tolerance interval calculation, was more appropriate than that recommended by bioanalytical methods (67% of validated QC for at least 50% of QC levels fulfilling acceptance criteria). For QC, the validation domain ranged from 0.40 to 150 $\mu\text{g/mL}$ to cover the concentration range observed in the only *in vivo* study on CE3F4 [2]. However, these authors did not measure the concentration of CE3F4 in blood or plasma. An amount of 3 mg/kg was injected into C57BL/6 mice for an average total blood volume estimated to 72 mL/kg [46]. Therefore, the maximum blood concentration of CE3F4 that could be observed should be 42 $\mu\text{g/mL}$ assuming a one-compartment model for blood (plasma + cells). However, if CE3F4 is only located in plasma (where the plasma volume is around 36-43 mL/kg for a usual hematocrit ranging from 40 to 50% [47]), the expected maximum concentration should reach at least 83 $\mu\text{g/mL}$ for a dosage of 3 mg/kg. Consequently, a calibration curve covering concentrations from 0.40 to 150 $\mu\text{g/mL}$ was considered appropriate to evaluate the maximal concentration to 1% of the maximal expected concentration for the dosage of 3 mg/kg. In addition, such a calibration curve allows plasma quantification in plasma with the same sample treatment procedure for variable dosage regimens (i.e. no dilution step). These extended ranges led us to assess calibration curves from 0.40 to 200 $\mu\text{g/mL}$ with various weighted regressions including no weighing, 1/concentration, and 1/concentration². The calibration curves were obtained without using internal standard since no appropriate CE3F4 analog was commercially available. Although each calibration curve provided an acceptable coefficient of determination R^2 (> 0.99), only 1/concentration² weighting fulfilled the relative error acceptance range for all levels (i.e. within $\pm 20\%$ for the lowest concentration, $\pm 15\%$ for other levels). The parameters of the calibration curves at 220 and 250 nm were determined (**Table 3**) and they satisfied the validation criteria, including their corresponding QCs (**Table 4**).

Table 3. Average parameters of the linear regression obtained from three calibration curves of the analytes with a 1/concentration² weighting at 220 or 250 nm.

Wavelength	n	Linear range	R ² (±SD)	Slope (±SD)	y-Intercept (±SD)
220 nm	3	0.40-200 µg/mL	0.9967 (±0.0008)	14585.5 (±773.1)	713.1 (±987.6)
250 nm	3	0.40-200 µg/mL	0.9972 (±0.0025)	4136.7 (±113.7)	-174.1 (±143.6)

Table 4. Between-day precision and accuracy on six quality control for quantification at 220 and 250 nm.

Wavelength	QC level (µg/mL)	0.40	1.50	5.00	25.0	60.0	150
220 nm	Mean bias (%)	4.77	-2.28	-5.03	-8.96	-1.14	1.63
	RSD interday (%)	8.27	4.35	3.37	2.96	3.28	3.25
	RSD intraday (%)	7.94	3.20	3.02	2.26	2.54	2.43
250 nm	Mean bias (%)	6.73	-1.47	-4.76	-8.30	0.02	2.88
	RSD interday (%)	9.04	5.36	3.32	2.51	2.81	2.26
	RSD intraday (%)	8.80	3.71	3.06	2.18	2.41	2.26

Accuracy profiles were built from data combining precision and trueness (**Fig. S2**). At 220 nm, biases were shown into the interval of ± 10 %, and RSD < 10 % for LLOQ and < 5 % for other QCs. These values satisfied EMA criteria for the validation of bioanalytical methods. Based on these evaluated parameters, the corresponding accuracy profile at 220 nm has been built (**Fig. S2A**). The tolerance interval was between the limits given by the EMA (100 ± 20% for LLOQ, and 100 ± 15% for another QC level) for a β-expectation tolerance interval set at 80%. These results allowed concluding that the method fulfilled the required reliability in terms of trueness and precision for the quantification of (*R*)-CE3F4 in the plasma matrix. The LLOQ and ULOQ were very satisfactory with values of 0.40 µg/mL and 150 µg/mL, respectively. For the calibration curve at 250 nm, very similar results about biases and RSD were obtained (biases are into the interval of ± 10%, and RSD <10%). The

corresponding accuracy profile is reported in **Fig. S2B**, where it appears that the tolerance interval for LLOQ was near the upper acceptance limit but was still conforming (119.8%). Finally, the calibration curves for human plasma at the two wavelengths satisfied the EMA criteria. Also, the method demonstrated a strong ability to accurately quantify (*R*)-CE3F4, even considering the tolerance interval for each QC level. For the carryover, the signal was less than 20% of the LLOQ on the first injection of blank plasma at the retention time of the analyte (no peak detectable) after the injection of the highest concentration used for calibration (200 µg/mL).

Besides, the extraction of CE3F4 was assessed from calibration curve "A" (i.e. CE3F4 addition into plasma before the extraction process) and calibration curve "B" as reference (i.e. CE3F4 addition after extraction process on blank plasma). The simple extraction procedure, which consisted to precipitate proteins with 150 µL of ACN, followed by a centrifugation step, allowed a mean extraction recovery on three days of 100.4% with an RSD of 6.4%. Consequently, the use of an internal standard was unnecessary due to a total extraction, a low RSD, and UV detection, contrarily to mass spectrometry, which involves an ionization yield in the case of a coelution with molecules from the complex matrix, justifying the use of an internal standard to reduce variability and correct bias (i.e. isotope-labeled CE3F4).

3.1.3. Human plasma samples stability

The stability of the extracted samples was investigated from the validated calibration curve. After 15 h in an autosampler, the bias between the first and second analysis session was superior to 15 % for samples that were first injected due to solvent evaporation, but the stability was correct for non-immediately injected samples (less than 15% loss). Concerning stock solutions stored at 5°C for one year, QCs stored at -20°C for one month, or exposed to 3 cycles of freeze-thaw, or after two hours at room temperature, degradation was not significant (< 5% for stock solutions, < 15% for all conditions using plasma). It can be concluded that such

results make it possible to obtain sufficient stability to organize analyses by a campaign, at a still experimental stage of pharmaceutical development. More long-term stability could be explored if the (*R*)-CE3F4 exhibits a clinical interest to be tested in humans.

3.2. Application of the LC-UV method to the evaluation of (*R*)-CE3F4 ex vivo stability in human or murine plasma

Various risk points were verified to check the transposability of the HPLC-UV method, in particular concerning the specificity of the signal, and the extraction efficiency of CE3F4.

3.2.1. Chromatograph difference in specificity between human and murine plasma

As previously mentioned, the results on specificity showed no detectable signal near CE3F4 at 220 or 250 nm on blank human plasma samples, but differences resulted with blank murine plasma samples. Indeed, visible peaks at the CE3F4 retention time (4.2 min) were observed in these matrices at 220 nm (**Fig. A**). When switching to 250 nm, detection specificity was enhanced and thus satisfactory, without any visible coelution impacting CE3F4 quantification (**Fig. B**). Different gradient conditions were studied (results not shown), but none of them adequately improved the resolution at 220 nm in addition to extending the time analysis (until one hour). These results are in agreement with our previous hypothesis on the interest to validate several detection conditions when UV detection is used (i.e. 220 and 250 nm) because of the possible interferences on chromatograms depending on the origin of the plasma (i.e. mouse or human). Therefore, the wavelength of 250 nm should be used for quantification in mouse plasma, and both 220 and 250 nm are suitable for human plasma analysis.

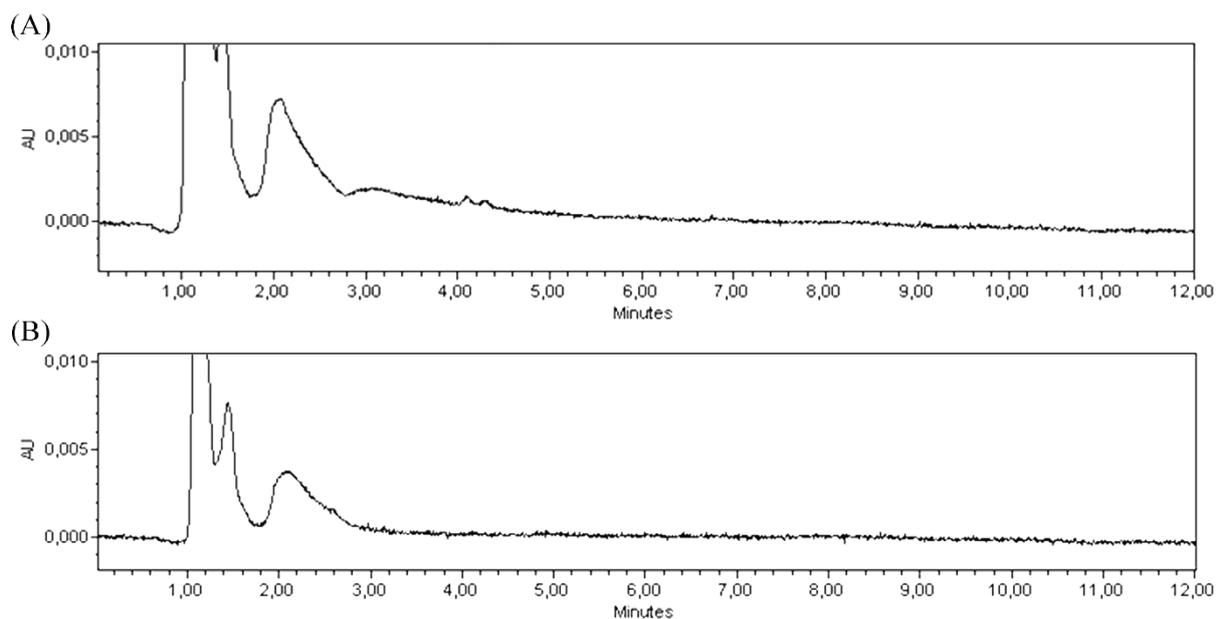


Fig. 3. Chromatograms of blank mouse plasma extract at 220 nm (A) and 250 nm (B)

3.2.2. (R)-CE3F4 and ex vivo plasmatic metabolism at 37°C

We first investigated *ex vivo* the (R)-CE3F4 behavior in the plasmas from two species as a function of the time to evaluate a potential plasma metabolism at 37°C. To be suitable for HPLC analysis, samples were treated as described previously, and chromatograms were collected using wavelengths 220 and 250 nm for human and mouse plasma, respectively. The chromatographic analysis of the murine and human plasma samples showed a peak at 8.6 min (TRR = 2.05) at 220 nm and 250 nm (**Fig. .**) in addition to CE3F4 (4.2 min). Also, a lack of specificity was observed at 220 nm at 4.2 min in murine plasma (**Fig. A**), by using the appropriate wavelength detection at 250 nm, the peak was recovered, confirming the usefulness of this wavelength for preclinical studies in mice.

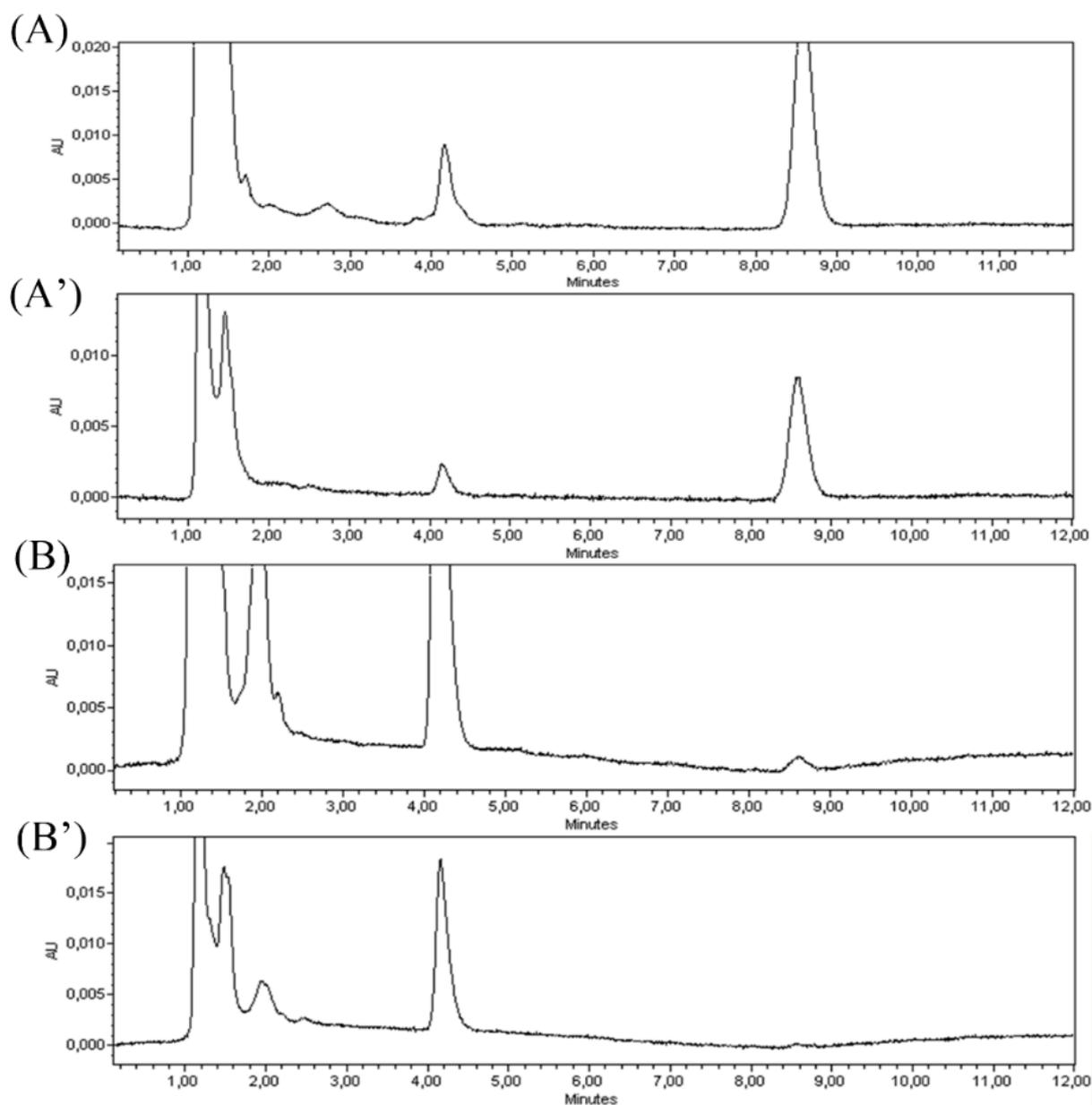


Fig. 4. Chromatograms at 220 nm (A) and 250 nm (A') of (*R*)-CE3F4 (TR = 4.2 min) and its principal metabolite (TR = 8.6 min) in murine plasma, after 3h at 37°C. Chromatograms at 220 nm (B) and 250 nm (B') in human plasma, after 24h at 37°C.

A significant difference in the kinetics of the disappearance of the main peak was observed between the two plasma samples. Indeed, a decrease of 23 % of the peak area was observed in human plasma after 24 h (**Fig. A**). In contrast, a decrease of 95 % was found in murine plasma after only 3 h, and no peak at the expected time was detected after six hours confirming the total degradation of CE3F4 (**Fig. A**). These results suggest that (*R*)-CE3F4 undergoes distinct kinetic degradation. The observed

half-life in murine plasma was 39.9 min (confidence interval 95%: from 36.9 to 43.4 min) against a half-life superior to 24 h in human plasma. As depicted in **Fig. B**, the CE3F4 related metabolite showed two phases in murine plasma, an acute ascending phase, and a slow decreasing phase suggesting the instability of the metabolite in murine plasma (e.g. due to the formation of secondary metabolites, or non-enzymatic degradation such as oxidation reaction). For human plasma, this metabolite appeared very slowly.

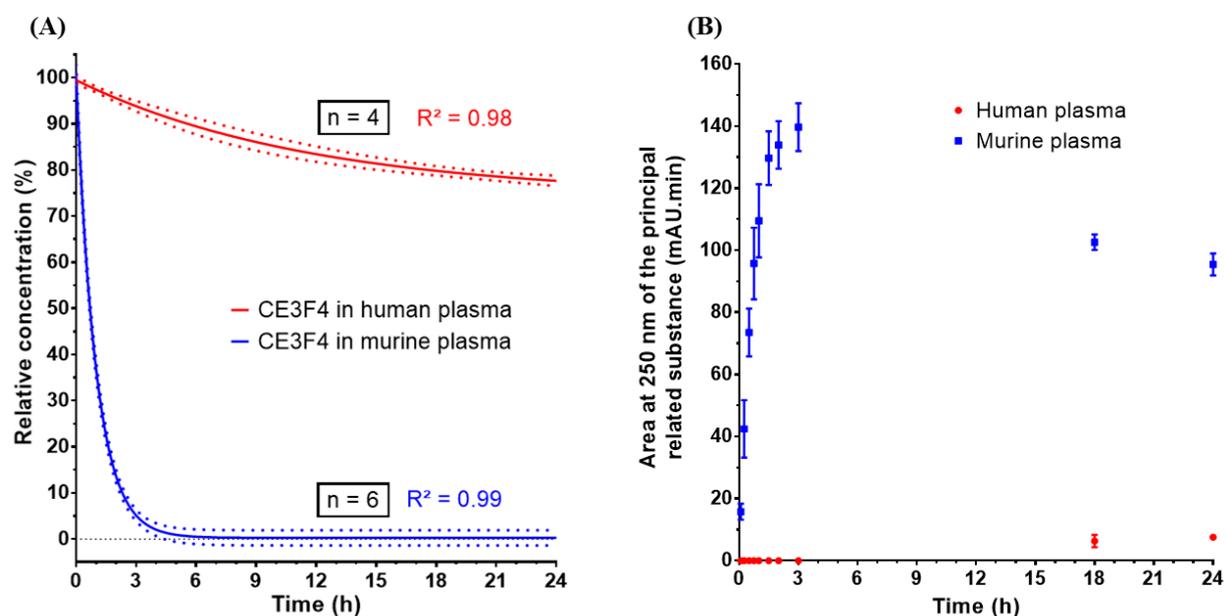


Fig. 5. (A) Kinetics of the disappearance of the (*R*)-CE3F4 based on signal variation in human (at 220 nm) or murine (at 250 nm) plasma. Continuous lines represent the mean regression and the dotted lines represent the confidence interval on the regression (95%). **(B)** Kinetics of the principal metabolite of the (*R*)-CE3F4 ($T_R = 8.6$ min) observed at 250 nm in murine and human plasma at 37°C.

We therefore hypothesized that enzyme-dependent hydrolysis promoted metabolism on the (*R*)-CE3F4 N-formyl group (**Fig. S3**) resulting in a more apolar compound than (*R*)-CE3F4 which is coherent with the HPLC analysis exhibiting a longer elution time than (*R*)-CE3F4 on the reverse-phase column. The spectral analysis of this degraded CE3F4 showed similar features with the original CE3F4 spectrum depicting three maxima (218 nm, 250 nm, and 325 nm), indicating a structural similarity with the CE3F4 (**Fig. S4**). Among the known CE3F4 derivatives,

deformylated-CE3F4 may be a candidate. To confirm this structural hypothesis, LC-UV and LC-MS/MS analyses were performed on synthesized deformylated-CE3F4 as described in a specific part below (3.3). It is worth mentioning that the deformylated-CE3F4 was inactive on EPAC1 [3]. On this metabolism through N-deformylation, Gleason et al. reported an inter-species variability on the plasmatic metabolism of diformyldapsone. Different kinetics of metabolism have been described in plasmas, in the following order: mouse > rat > guinea pig > rabbit, while no N-deformylation in the dog or human plasma was observed [19]. Some authors observed differences in plasma metabolism between rodents, dogs, and humans for an N-formylated indolocarbazole topoisomerase I inhibitor [20], with no N-deformylation in dogs or humans plasma. Other studies also reported similar differences between species in the type of plasmatic esterases [23,38,39,48]. They noticed the absence of carboxylesterases in human plasma in contrast to rodent plasmas. However, liver metabolism showed an inversed tendency for humans and rodents. Another study on diformyldapsone with liver homogenates changed the rank order of metabolism rates: guinea pig \geq human > mouse = rabbit = rat > dog [18]. Based on these results, it appears evident to consider enzyme inhibitors to stabilize samples following plasma collection, for *in vivo* kinetic experiments, especially in mice.

3.2.3. Stabilization studies of (R)-CE3F4 in murine plasma at 37°C with paraoxon

To proceed to the (R)-CE3F4 quantification in murine plasma, different strategies were explored using either EDTA, paraoxon, BNPP, or benzil. EDTA can inhibit metal-dependent enzymes, such as hydrolases including e.g. amidohydrolase [49] or paraoxonase [23,50,51] in addition to being of interest as an anticoagulant for sample collection. Paraoxon is known as a well-known powerful esterase inhibitor (organophosphate oxon), as described by Gleason and al. [19] for diformyldapsone stabilization in plasma samples. BNPP and benzil are more specific inhibitors than paraoxon. BNPP is a specific inhibitor of carboxylesterases [52,53], phosphodiesterase [54]. Benzil is a specific reversible inhibitor of mammalian carboxylesterases [55].

EDTA did not exhibit any stabilizing effect against CE3F4 degradation in murine plasma samples. Thus, the enzyme involved in CE3F4 degradation is not metal-dependent. Nevertheless, it could be interesting to note that EDTA can inhibit the paraoxonase at 5 mM [23] and be used in this study at 10 mM. The enzyme is involved in the metabolism of organophosphate like paraoxon.

Paraoxon was tested at different concentrations to stop the degradation of CE3F4. It has been shown that plasmatic N-deformylation was inhibited with paraoxon. Firstly, paraoxon was added in the plasma 5 min before the (*R*)-CE3F4 for homogenization of the sample to allow at least a 1-hour blockade. This 1-hour delay was chosen to mimic conditions of sample treatment (i.e. blood sampling, centrifugation step for plasma/serum separation, until protein precipitation by solvents). The inhibition of CE3F4 degradation was null, partial, and total for paraoxon at 10^{-6} M, 10^{-5} M, and 10^{-4} M, respectively (**Fig**). These results confirmed the relevance of paraoxon to inhibit plasmatic deformylation of CE3F4 and subsequently, the stabilization of plasma samples. Moreover, the paraoxon experiments suggest the involvement of a hydrolase in CE3F4 metabolism. Secondly, when 10^{-4} M paraoxon was added simultaneously with (*R*)-CE3F4 to mimic real sample treatment (i.e. addition of paraoxon as first pre-treatment step after blood sampling), no CE3F4 degradation was observed and no metabolite was detected on the chromatograms (data not shown).

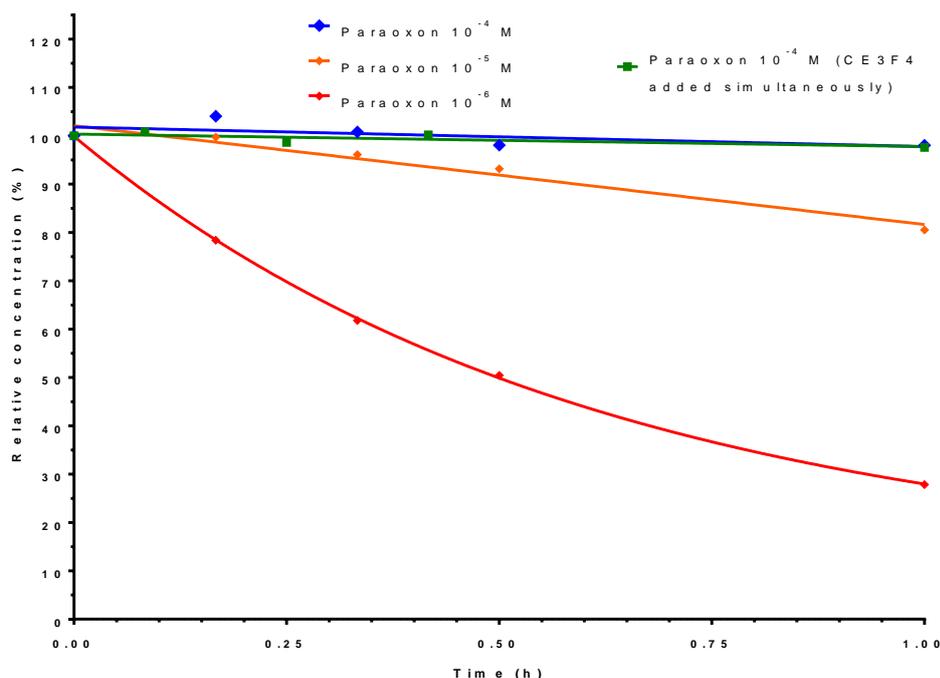


Fig. 6. Effect of paraoxon on (R)-CE3F4 metabolism in murine plasma at 37°C. Paraoxon was at different concentrations added 10 minutes before the addition of (R)-CE3F4 (blue, orange, and red lines), or simultaneously (green line).

BNPP and benzil were assayed, but they did not stabilize the CE3F4 against degradation on a 1-hour duration (**Table 5**). A slight concentration-dependent inhibition was observed with BNPP, but it appears that higher concentrations should be considered to obtain sufficient inhibition, which is of no interest in practice. These results exhibit that carboxylesterases are not involved in CE3F4 degradation. Consequently, the paraoxon at the inhibiting concentration of 10⁻⁴ M was retained to allow mouse sample pre-treatment.

Table 5. Stability of (R)-CE3F4 in mouse plasma sample in presence of enzyme inhibitors BNPP or benzil.

Time (h)	[BNPP] (M)			[Benzil] (M)		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
0	100%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
0,5	68,2%	67,7%	56,1%	56,8%	60,4%	59,4%
1	56,6%	41,8%	37,6%	33,7%	35,2%	36,4%

3.2.4. Validation of the (R)-CE3F4 method quantification in murine plasma loaded with paraoxon

Based on the validation procedure in human plasma, and the stabilization of CE3F4 in murine plasma thanks to paraoxon, the validation of the (R)-CE3F4 quantification method at 250 nm in murine plasma loaded with paraoxon has been carried out. As for validation in human plasma, only $1/\text{concentration}^2$ weighting fulfilled the relative error acceptance range for all levels (i.e. within $\pm 20\%$ for the lowest concentration, $\pm 15\%$ for other levels). The parameters of the calibration curves at 250 nm were determined (**Table 6**) and shown to satisfy the validation criteria.

Table 6. Average parameters of the linear regression obtained from three calibration curves of the analytes with a $1/\text{concentration}^2$ weighting at 220 or 250 nm.

Wavelength	n	Linear range	R ² (\pm SD)	Slope (\pm SD)	y-Intercept (\pm SD)
250 nm	3	0.40-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.9964 (\pm 0.0015)	5339.8 (\pm 90.0)	-93.0 (\pm 184.1)

As observed in human plasma, no carryover was observed on the first injection of blank murine plasma at the retention time of the CE3F4 (no peak detectable) after the injection of the highest concentration used for calibration (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the mean extraction recovery on three days was 100.5% with an RSD of 2.3%. Then paraoxon did not influence the CE3F4 extraction in murine plasma. Because of similarities of results between human plasma and murine plasma loaded with paraoxon, three QC levels were used to rationalize the use of animals for the transposition of the already fully validated method in human plasma. The results on QCs were satisfactory (**Table 7**) because all biases were shown in the interval of $\pm 5\%$, and RSD < 5%. The corresponding accuracy profile is reported in Fig. S7.

Table 7. Between-day precision and accuracy on three quality control for quantification at 250 nm.

QC level ($\mu\text{g/mL}$)	0.40	8.00	150
Mean bias (%)	-1.76	4.36	-1.26
RSD interday (%)	4.74	5.04	1.54
RSD intraday (%)	4.30	4.37	1.08

Thus, the validated method using human plasma allowed to manage murine samples, and then the method was validated on three days in murine plasma loaded with paraoxon allowing the quantification of CE3F4 at 250 nm from 0.40 to 150 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.5. Murine sample storage

For the stability of murine plasma spiked with paraoxon 10^{-4} M, a critical degradation of the (*R*)-CE3F4 was observed after three days at 5°C (-79.6%). However, no significant variations (< 15%) were observed at -20°C after 1 week, after 3 cycles of freeze-thaw, after two hours at room temperature, or in the plasma extracts after 15h in the autosampler. This could be explained by the presence of paraoxonase in murine plasma, which degrades paraoxon and then allows the hydrolysis of CE3F4. This hypothesis could be surprising because paraoxon is known as an irreversible inhibitor. However, a spontaneous reactivation of mouse butyrylcholinesterase after paraoxon inhibition has been described by Li et al. [23], and pieces of evidence of other inhibition mechanisms such as the allosteric modification or steric hindrance which can be reversible were reported [56–58].

Thus, storage at -20°C facilitates the practical aspect of handling biological samples, allowing flexibility in analysis schedules. Storage at -80°C should be considered and evaluated for the long-term storage of biological samples.

3.3. Identity of the main metabolite

3.3.1. HPLC-UV analysis

In addition to the efficacy of paraoxon in inhibiting the degradation of CE3F4 in murine plasma, similarities were observed between unknown metabolites and deformedylated-CE3F4. Samples were prepared to obtain relatively close concentration (i.e. deformedylated-CE3F4 and (*R*)-CE3F4 at 50 µg/mL in ACN versus 100 µg/mL of (*R*)-CE3F4 in murine plasma analysed after a little more than a half-life). The RP-LC analysis resulted in similar relative retention times: 2.05 and 2.08 for deformedylated-CE3F4 and observed metabolite, respectively (**Fig. S5A**). A small peak corresponding to a synthesis impurity of (*R*)-CE3F4 was detected at 5.2 min. When analysing the UV spectra of deformedylated-CE3F4 and metabolite, the high similarity was obtained with three identical maxima at 218 nm, 250 nm, and 322 nm (**Fig. S5B**). These results supported the hypothesis that the metabolite observed in murine plasma was the deformedylated-CE3F4.

3.3.2. HPLC-MS/MS analysis

To undoubtedly confirm the structure of CE3F4 metabolite as deformedylated-CE3F4 and so the mechanism involved in CE3F4 degradation, mass spectrometry (MS) experiments were performed. Deformedylated-CE3F4 presents a molar mass of 322.9 g/mol which corresponds to a parent ion of m/z of 323.9 in positive mode $[MH^+]$. Total ion chromatograms (TIC) and extracted chromatograms (m/z 323.9, m/z 351.9) of plasma sample, deformedylated-CE3F4 and (*R*)-CE3F4 controls are presented in **Fig**. It should be noted that because the flow rate of the mobile phase is 0.5 mL/min instead of 1.0 mL/min in previous experiments, the time of retention of analytes was doubled. Indeed, (*R*)-CE3F4 is eluted at 8.4 minutes, whereas the unknown metabolite is eluted at 18.3 minutes. The unknown metabolite and deformedylated-CE3F4 are eluted with the same retention time. Regarding MS experiments, the hypothesized metabolite and deformedylated-CE3F4 exhibited the same parent ion of m/z 323.9 as observed on the chromatogram of the extracted ion m/z 323.9 (**FigA & C**) and the comparison of the MS spectrum extracted at 18.3 min of plasma sample (**Fig.A**) and deformedylated-

CE3F4 (**Fig.B**). Also, the isotopic distribution is similar and is coherent with the presence of two bromine (**Fig.C & D**). Finally, both the unknown metabolite and deformedylated-CE3F4 showed the same MS fragmentation pattern of the parent ion (**Fig.E & F**). Altogether, these results confirmed that the metabolite observed in murine plasma was the deformedylated-CE3F4. MS and MS/MS spectrum of CE3F4 were also recorded and are presented in supplemental data (**Fig. S6**).

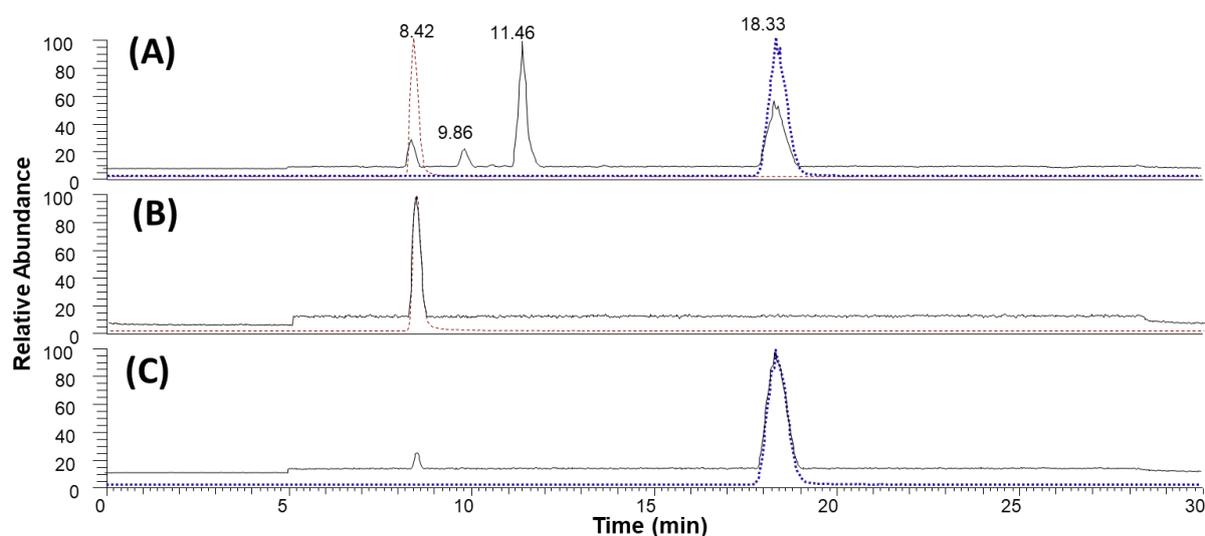


Fig. 7. Chromatograms of (A) murine plasma sample containing (*R*)-CE3F4 and metabolite, (B) (*R*)-CE3F4 at 5 µg/mL, and (C) deformedylated-CE3F4 at 5 µg/mL. Total ion chromatogram is presented as a continuous black line, extracted ion chromatogram of *m/z* 351.9 is presented as a dotted red line, and extracted ion chromatogram of *m/z* 323.9 is presented as a dotted blue line.

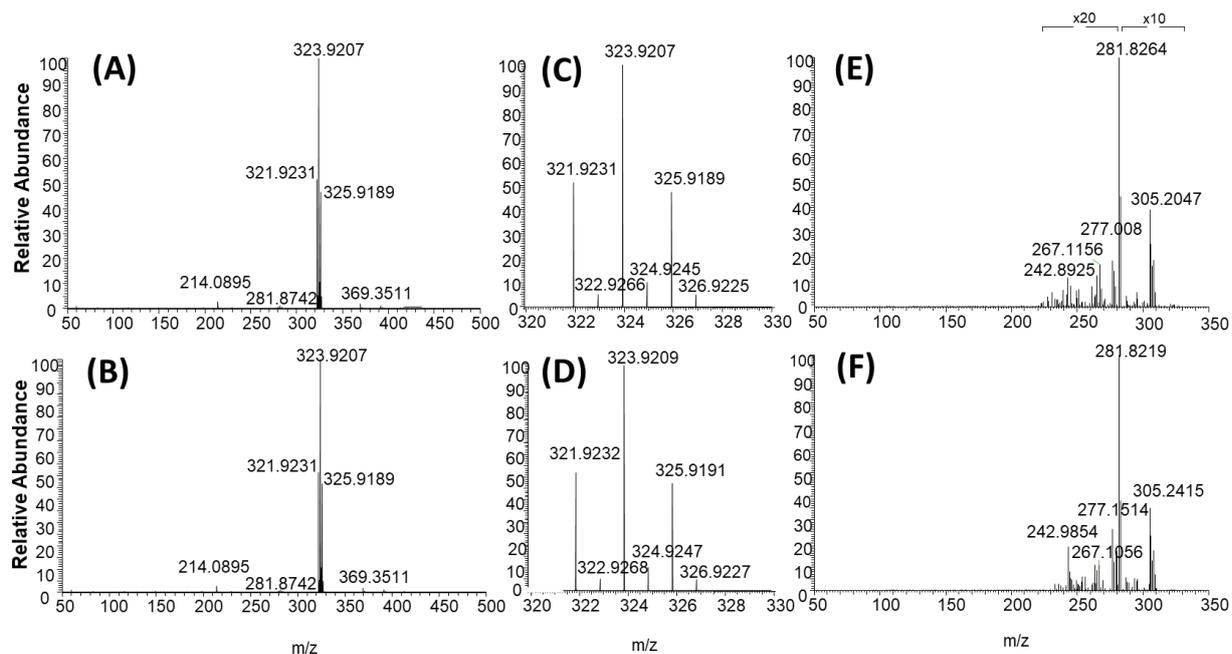


Fig. 8. MS spectrum extracted at 18.3 min, isotopic distribution of m/z 323.9 and MS/MS spectrum of the parent ion m/z 323.9, in plasma sample (A, C and E respectively) and a control sample of deformylated-CE3F4 (B, D, and F respectively)

4. Conclusion

The quantification method including a simple extraction protocol showed to be well suitable for the quantification of the (*R*)-CE3F4 in plasma for preclinical studies as well as clinical studies. This method allows drug quantification in complex matrices from different origins providing that appropriate wavelength selection is performed. Because of the impact of the matrix observed at 220 nm in murine plasma that is still unresolved despite the application of different gradient conditions, an adaptation of the wavelength in agreement to the studied species was necessary (220 nm or 250 nm for human samples, only 250 nm for mouse samples) highlighting the importance of the wavelength selection for the (*R*)-CE3F4 quantification.

The validated method allows the processing of the samples and the rendering of the results within the same working day. Moreover, it permits to follow the main metabolite of (*R*)-CE3F4 observed in mouse plasma within the same analysis. The

metabolite was identified as the N-deformylated-CE3F4 and the involvement of a hydrolase was revealed by paraoxon use and further by HPLC-UV and HPLC-MS/MS studies.

We also show the interest of paraoxon in preclinical studies to stop metabolic degradation during sample pretreatment in mouse models. Future studies are needed to identify the enzyme responsible for the observed degradation, for the possible development of knock-out mice models lacking this enzyme [59] for pharmacokinetic and efficacy studies.

Furthermore, non-plasma-based metabolic pathways should be considered, like metabolic stability assay on microsomes or hepatocytes knowing that hepatic metabolism is central in humans, to elucidate the (*R*)-CE3F4's metabolic profile and then identify any novel metabolites and metabolic pathways in humans and mice. To conclude in an objective of pharmaceutical development, it appears essential to provide for the protection of the (*R*)-CE3F4 against all potential enzymatic degradations (i.e. also in the liver for humans), and to develop an appropriate formulation accordingly.

Acknowledgment

The "Institut Galien Paris-Sud" and the "Service de Chimie Bioorganique et de Marquage" belong to the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (ANR-10-LABX-0033-LERMIT).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest regarding this publication.

References

- [1] B. Ziaeiian, G.C. Fonarow, Epidemiology and aetiology of heart failure, *Nat Rev Cardiol.* 13 (2016) 368–378. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>.

- [2] R. Prajapati, T. Fujita, K. Suita, T. Nakamura, W. Cai, Y. Hidaka, M. Umemura, U. Yokoyama, B.C. Knollmann, S. Okumura, Y. Ishikawa, Usefulness of Exchanged Protein Directly Activated by cAMP (Epac)1-Inhibiting Therapy for Prevention of Atrial and Ventricular Arrhythmias in Mice, *Circulation Journal*. 83 (2019) 295–303. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-18-0743>.
- [3] D. Courilleau, M. Bissierier, J.-C. Jullian, A. Lucas, P. Bouyssou, R. Fischmeister, J.-P. Blondeau, F. Lezoualc'h, Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 44192–44202.
- [4] D. Courilleau, P. Bouyssou, R. Fischmeister, F. Lezoualc'h, J.-P. Blondeau, The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440 (2013) 443–448.
- [5] M. Metrich, M. Berthouze, E. Morel, B. Crozatier, A.M. Gomez, F. Lezoualc'h, Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology, *Pflugers Arch.* 459 (2010) 535–546.
- [6] S.S. Hothi, I.S. Gurung, J.C. Heathcote, Y. Zhang, S.W. Booth, J.N. Skepper, A.A. Grace, C.L.-H. Huang, Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart, *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 457 (2008) 253–270. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0508-3>.
- [7] A.-C. Laurent, M. Bissierier, A. Lucas, F. Tortosa, M. Roumieux, A. De Régibus, A. Swiader, Y. Sainte-Marie, C. Heymes, C. Vindis, F. Lezoualc'h, Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy, *Cardiovasc. Res.* 105 (2015) 55–64.
- [8] M. Bissierier, J.-P. Blondeau, F. Lezoualc'h, Epac proteins: specific ligands and role in cardiac remodelling, *Biochemical Society Transactions.* 42 (2014) 257–264. <https://doi.org/10.1042/BST20140033>.
- [9] M. Zhang, J. Zheng, W. Wang, F. Kong, X. Wu, J. Jiang, J. Pan, Exchange-protein activated by cAMP (EPAC) regulates L-type calcium channel in atrial fibrillation of heart failure model, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 23 (2019) 2200–2207.
- [10] R. Lorenz, T. Aleksic, M. Wagner, G. Adler, C. Weber, The cAMP/Epac1/Rap1 Pathway in Pancreatic Carcinoma, *Pancreas.* 37 (2008) 102–103. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318160748f>.
- [11] N. Kumar, S. Gupta, S. Dabral, S. Singh, S. Sehrawat, Role of exchange protein directly activated by cAMP (EPAC1) in breast cancer cell migration and apoptosis,

Mol Cell Biochem. 430 (2017) 115–125. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-2959-3>.

- [12] D.-P. Sun, C.-L. Fang, H.-K. Chen, K.-S. Wen, Y.-C. Hseu, S.-T. Hung, Y.-H. Uen, K.-Y. Lin, EPAC1 overexpression is a prognostic marker and its inhibition shows promising therapeutic potential for gastric cancer, *Oncology Reports*. 37 (2017) 1953–1960. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5442>.
- [13] I. McPhee, L.C.D. Gibson, J. Kewney, C. Darroch, P.A. Stevens, D. Spinks, A. Cooreman, S.J. MacKenzie, Cyclic nucleotide signalling: a molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease, *Biochemical Society Transactions*. 33 (2005) 3.
- [14] C.M. Middeldorp, J.M. Vink, J.M. Hetteema, E.J.C. de Geus, K.S. Kendler, G. Willemsen, M.C. Neale, D.I. Boomsma, X. Chen, An association between Epac-1 gene variants and anxiety and depression in two independent samples, *Am. J. Med. Genet.* 153B (2010) 214–219. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30976>.
- [15] M4S Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use - Safety, Committee for Human Medicinal Products. (2003) 113.
- [16] M4E(R2) - Common technical document for the registration of pharmaceuticals for human use - Efficacy, Committee for Human Medicinal Products. (2016) 53.
- [17] T. Tuntland, B. Ethell, T. Kosaka, F. Blasco, R.X. Zang, M. Jain, T. Gould, K. Hoffmaster, Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research, *Frontiers in Pharmacology*. 5 (2014).
- [18] C.Y. Chiou, Deformylation of 4,4'-diformamidodiphenyl sulfone (DFD) by mammalian liver homogenates, *Biochemical Pharmacology*. 20 (1971) 2401–2408. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90240-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90240-1).
- [19] L.N. Gleason, B.P. Vogh, Deformylation of 4,4'-diformamidodiphenyl sulfone (DFD) by plasma of certain mammals, *Biochemical Pharmacology*. 20 (1971) 2409–2416. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90241-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90241-3).
- [20] N. Takenaga, T. Hasegawa, M. Ishii, H. Ishizaki, S. Hata, T. Kamei, In vitro metabolism of a new anticancer agent, 6-N-formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-(β -D-glucopyranosil)5H-indolo [2,3-A]pyrrolo [3,4-C]carbazole-5,7(6H)-dione (NB-506), in mice, rats, dogs, and humans, *Drug Metabolism and Disposition*. 27 (1998) 213–220.

- [21] L. Di, The Impact of Carboxylesterases in Drug Metabolism and Pharmacokinetics, *Curr Drug Metab.* 20 (2019) 91–102. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180821094502>.
- [22] M. Hosokawa, Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs, *Molecules.* 13 (2008) 412–431. <https://doi.org/10.3390/molecules13020412>.
- [23] B. Li, M. Sedlacek, I. Manoharan, R. Boopathy, E.G. Duysen, P. Masson, O. Lockridge, Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma, *Biochemical Pharmacology.* 70 (2005) 1673–1684. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.09.002>.
- [24] C. Ohnmacht, M. Cooley, R. Darling, S. Lei, V. Patel, Sample stabilization strategies: a case study review of unique sample collection and handling procedures, *Bioanalysis.* 11 (2019) 1867–1880. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0238>.
- [25] N. Lindegardh, G.R. Davies, T.T. Hien, J. Farrar, P. Singhasivanon, N.P.J. Day, N.J. White, Rapid Degradation of Oseltamivir Phosphate in Clinical Samples by Plasma Esterases, *Antimicrob Agents Chemother.* 50 (2006) 3197–3199. <https://doi.org/10.1128/AAC.00500-06>.
- [26] X.-L. Wei, R. Han, X. Hu, L.-H. Quan, C.-Y. Liu, Q. Chang, Y.-H. Liao, Stabilization of zeylenone in rat plasma by the presence of esterase inhibitors and its LC-MS/MS assay for pharmacokinetic study, *Biomedical Chromatography.* 27 (2013) 636–640. <https://doi.org/10.1002/bmc.2838>.
- [27] S.K. Dp, P. C, S.R. Jvln, DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A DRIED BLOOD SPOT LC-MS/MS ASSAY TO QUANTIFY GEMCITABINE IN HUMAN WHOLE BLOOD: A COMPARISION WITH AND WITHOUT CYTIDINE DEAMINASE INHIBITOR, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* (2015) 75–81.
- [28] W.F. Lavallee, H. Rosenkrantz, Evidence for pilocarpine transformation by serum, *Biochemical Pharmacology.* 15 (1966) 206–210. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(66\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(66)90064-5).
- [29] J. Li, S. Xu, Y. Peng, N. Feng, L. Wang, X. Wang, Conversion and pharmacokinetics profiles of a novel pro-drug of 3- n -butylphthalide, potassium 2-(1-hydroxypentyl)-benzoate, in rats and dogs, *Acta Pharmacologica Sinica.* 39 (2018) 275–285. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.90>.

- [30] F. Gil, M.C. Gonzalvo, A.F. Hernandez, E. Villanueva, A. Pla, Differences in the kinetic properties, effect of calcium and sensitivity to inhibitors of paraoxon hydrolase activity in rat plasma and microsomal fraction from rat liver, *Biochemical Pharmacology*. 48 (1994) 1559–1568. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90200-3).
- [31] F.A. de Jong, R.H.J. Mathijssen, P. de Bruijn, W.J. Loos, J. Verweij, A. Sparreboom, Determination of irinotecan (CPT-11) and SN-38 in human whole blood and red blood cells by liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*. 795 (2003) 383–388. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00574-9](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00574-9).
- [32] E. Tsakalozou, J. Horn, M. Leggas, An HPLC Assay for the Lipophilic Camptothecin Analog AR-67 Carboxylate and Lactone in Human Whole Blood, *Biomed Chromatogr*. 24 (2010) 1045–1051. <https://doi.org/10.1002/bmc.1404>.
- [33] A. van Veelen, R. van Geel, Y. de Beer, A.-M. Dingemans, L. Stolk, R. ter Heine, F. de Vries, S. Croes, Validation of an analytical method using HPLC–MS/MS to quantify osimertinib in human plasma and supplementary stability results, *Biomedical Chromatography*. 34 (2020) e4771. <https://doi.org/10.1002/bmc.4771>.
- [34] T. Tai, H. Zhou, T. Zhu, Y.-M. Jia, J.-Z. Ji, Y.-F. Li, Q.-Y. Mi, H.-G. Xie, Development and validation of a UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of vicagrel and its major metabolites in rat or human plasma: An optimized novel strategy for the stabilization of vicagrel, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 179 (2020) 112955. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112955>.
- [35] L. Di, E.H. Kerns, Y. Hong, H. Chen, Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery, *International Journal of Pharmaceutics*. 297 (2005) 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.022>.
- [36] R.L. Lalonde, K.G. Kowalski, M.M. Hutmacher, W. Ewy, D.J. Nichols, P.A. Milligan, B.W. Corrigan, P.A. Lockwood, S.A. Marshall, L.J. Benincosa, T.G. Tensfeldt, K. Parivar, M. Amantea, P. Glue, H. Koide, R. Miller, Model-based Drug Development, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 82 (2007) 21–32. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100235>.
- [37] A.Z. Zhu, Quantitative translational modeling to facilitate preclinical to clinical efficacy & toxicity translation in oncology, *Future Science OA*. 4 (2018) FSO306. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0152>.

- [38] P. Ratnatilaka Na Bhuket, P. Jithavech, B. Ongpipattanakul, P. Rojsitthisak, Interspecies differences in stability kinetics and plasma esterases involved in hydrolytic activation of curcumin diethyl disuccinate, a prodrug of curcumin, *RSC Advances*. 9 (2019) 4626–4634. <https://doi.org/10.1039/C8RA08594C>.
- [39] L. Berry, L. Wollenberg, Z. Zhao, Esterase Activities in the Blood, Liver and Intestine of Several Preclinical Species and Humans, *Drug Metabolism Letters*. 3 (2009) 70–77. <https://doi.org/10.2174/187231209788654081>.
- [40] P. Bouyssou, C.L. Goff, J. Chenault, Synthesis of 7- and 5,7-substituted-6-fluoro-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: Convenient precursors of quinolone antibacterial agents, *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 29 (1992) 895–898. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570290436>.
- [41] Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency. (2011). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
- [42] P. Hubert, J. Nguyenhuu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part I, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 36 (2004) 579–586. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(04\)00329-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(04)00329-2).
- [43] Ph. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part II, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45 (2007) 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013>.
- [44] Ph. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part III, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45 (2007) 82–96. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.032>.
- [45] B. Toussaint, F. Lanternier, C. Woloch, D. Fournier, M. Launay, E. Billaud, E. Dannaoui, O. Lortholary, V. Jullien, An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the therapeutic drug monitoring of isavuconazole and seven other antifungal compounds in plasma samples, *Journal of Chromatography B*. 1046 (2017) 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.036>.

- [46] K.-H. Diehl, R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J.-M. Vidal, C.V.D. Vorstenbosch, A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology*. 21 (2001) 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>.
- [47] A.P. Bolliger, N. Everds, Haematology of the Mouse, in: *The Laboratory Mouse*, Elsevier, 2012: pp. 331–347. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382008-2.00014-3>.
- [48] F.G. Bahar, K. Ohura, T. Ogiyama, T. Imai, Species Difference of Esterase Expression and Hydrolase Activity in Plasma, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 101 (2012) 3979–3988. <https://doi.org/10.1002/jps.23258>.
- [49] C.M. Seibert, F.M. Raushel, Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily, *Biochemistry*. 44 (2005) 6383–6391. <https://doi.org/10.1021/bi047326v>.
- [50] M.I. Mackness, Human Serum Paraoxonase Is Inhibited in EDTA Plasma, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 242 (1998) 249. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7872>.
- [51] A. Tvarijonaviciute, F. Tecles, M. Caldin, S. Tasca, J. Cerón, Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs, 73 (2012) 8.
- [52] T. Minagawa, Y. Kohno, T. Suwa, A. Tsuji, Species differences in hydrolysis of isocarbacyclin methyl ester (TEI-9090) by blood esterases, *Biochemical Pharmacology*. 49 (1995) 1361–1365. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00071-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00071-7).
- [53] S. Yamaori, N. Fujiyama, M. Kushihara, T. Funahashi, T. Kimura, I. Yamamoto, T. Sone, M. Isobe, T. Ohshima, K. Matsumura, M. Oda, K. Watanabe, Involvement of Human Blood Arylesterases and Liver Microsomal Carboxylesterases in Nafamostat Hydrolysis, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 21 (2006) 147–155. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.147>.
- [54] S.J. Kelly, D.E. Dardinger, L.G. Butler, Hydrolysis of phosphonate esters catalyzed by 5'-nucleotide phosphodiesterase, *Biochemistry*. 14 (1975) 4983–4988. <https://doi.org/10.1021/bi00693a030>.
- [55] R.M. Wadkins, J.L. Hyatt, X. Wei, K.J.P. Yoon, M. Wierdl, C.C. Edwards, C.L. Morton, J.C. Obenauer, K. Damodaran, P. Beroza, M.K. Danks, P.M. Potter, Identification and Characterization of Novel Benzil (Diphenylethane-1,2-dione) Analogues as

Inhibitors of Mammalian Carboxylesterases, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 2906–2915. <https://doi.org/10.1021/jm049011j>.

- [56] S.A. Kardos, Interactions of the Organophosphates Paraoxon and Methyl Paraoxon with Mouse Brain Acetylcholinesterase, *Toxicological Sciences*. 58 (2000) 118–126. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.1.118>.
- [57] A.A. Kousba, Comparison of Chlorpyrifos-Oxon and Paraoxon Acetylcholinesterase Inhibition Dynamics: Potential Role of a Peripheral Binding Site, *Toxicological Sciences*. 80 (2004) 239–248. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh163>.
- [58] C.A. Rosenfeld, L.G. Sultatos, Concentration-Dependent Kinetics of Acetylcholinesterase Inhibition by the Organophosphate Paraoxon, *Toxicological Sciences*. 90 (2006) 460–469. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj094>.
- [59] W. Xie, P.J. Wilder, J. Stribley, A. Chatonnet, A. Rizzino, P. Taylor, S.H. Hinrichs, O. Lockridge, Knockout of one acetylcholinesterase allele in the mouse, *Chemico-Biological Interactions*. 119–120 (1999) 289–299. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00039-3).

Supplementary for Toussaint et al. "Interspecies comparison of plasma metabolism and sample stabilization for quantitative bioanalyses: application to (R)-CE3F4 in preclinical development, including metabolite identification by high-resolution mass spectrometry"

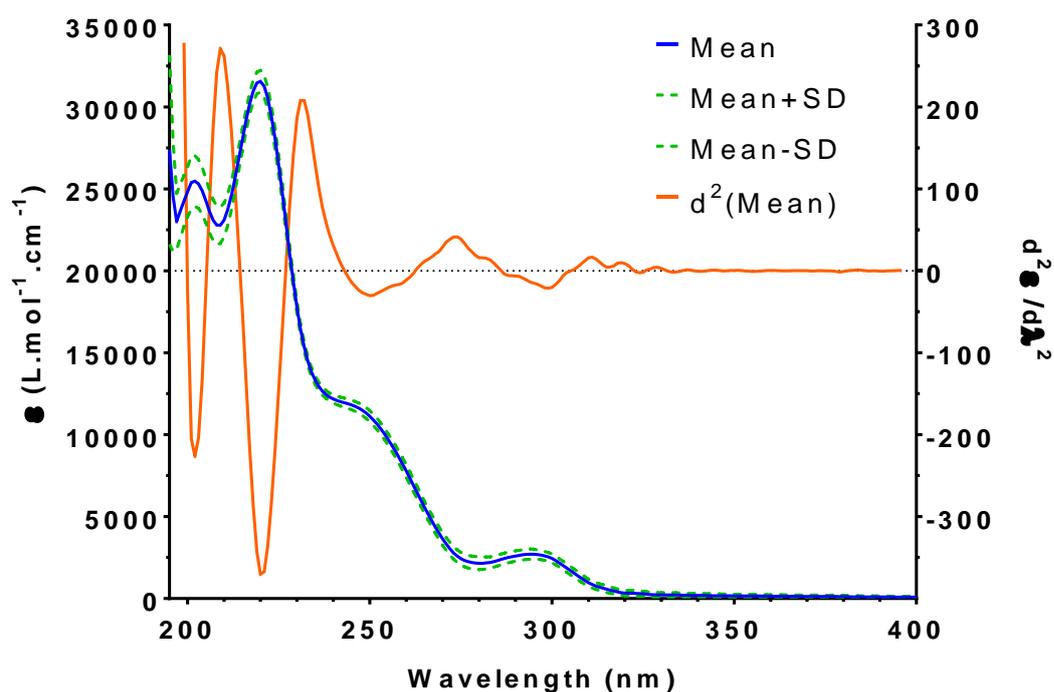


Fig. S1. The UV absorption spectrum and second derivative spectrum of (R)-CE3F4 in acetonitrile. The continuous blue line represents the mean spectrum; the dotted green lines represent the standard deviation (SD); the second derivative spectrum on the mean is represented in orange.

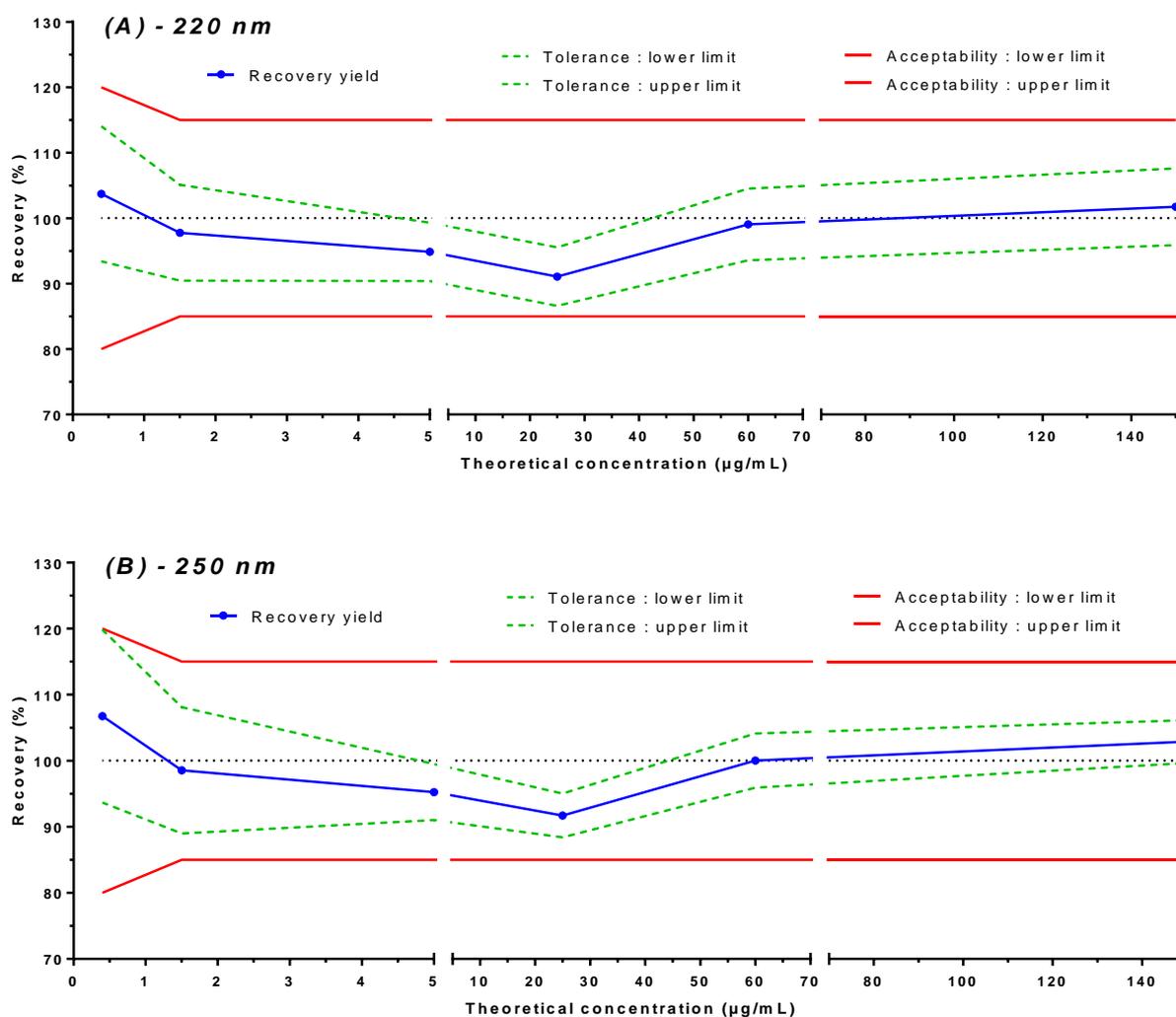


Fig. S2. Accuracy profiles for the validation of (*R*)-CE3F4 from 0.40 to 150 µg/mL in human plasma for measurement at 220 nm (A) and 250 nm (B). Accuracy is illustrated as a continuous blue line; levels of concentration as blue dot; limits of the tolerance interval as dotted green lines for a β -proportion of 80%; and the acceptability limits as continuous red lines.

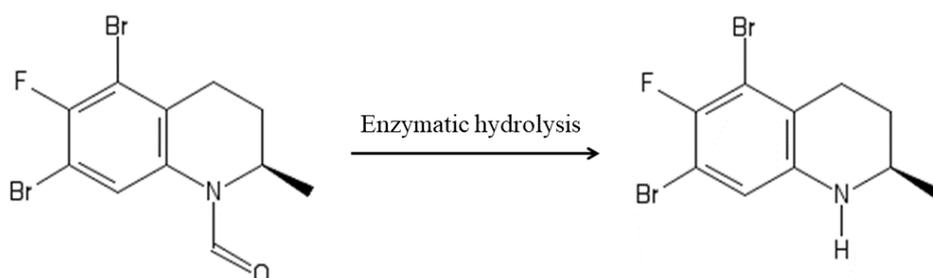


Fig. S3. The hypothesized reaction for the formation of the observed metabolite of (*R*)-CE3F4 in murine plasma.

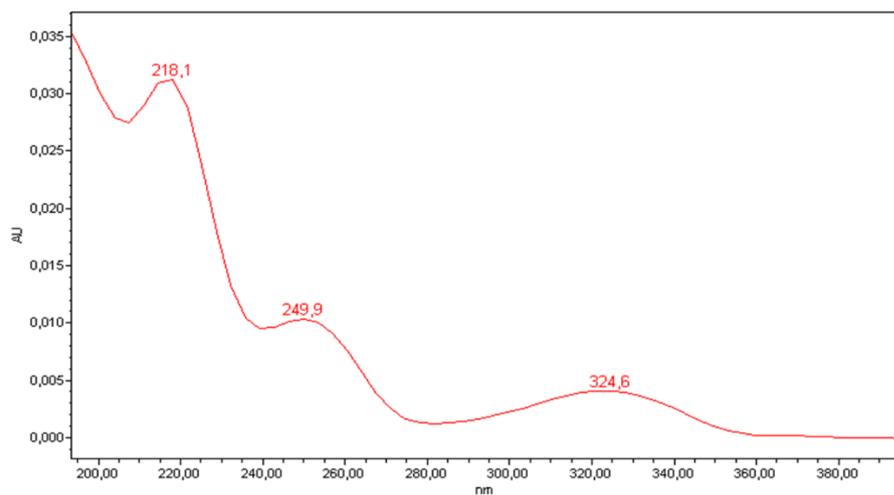


Fig. S4. Observed UV spectrum of the metabolite (TR = 8.6 min).

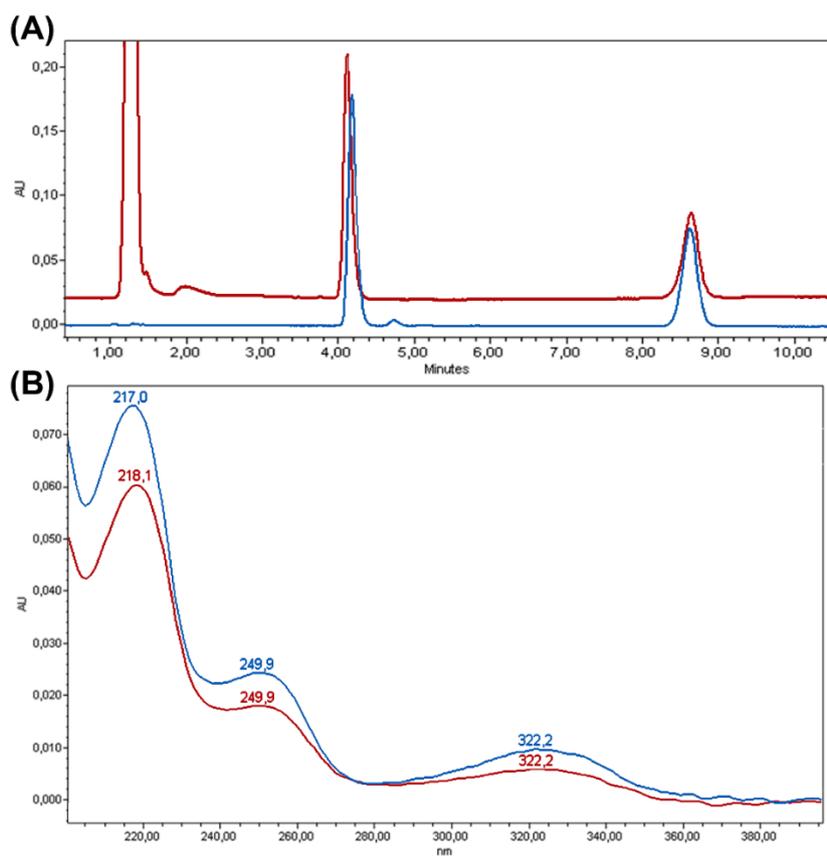


Fig. S5. (A) Chromatograms at 220 nm for (*R*)-CE3F4 (TR = 4.2 min) and deformylated-CE3F4 (TR = 8.6 min) in acetonitrile (blue), and (*R*)-CE3F4 and metabolite (TR = 8.6 min) in murine plasma (red). (B) UV spectra of the deformylated-CE3F4 in blue (TRR = 2.15) and metabolite observed in murine plasma in red (TRR = 2.16).

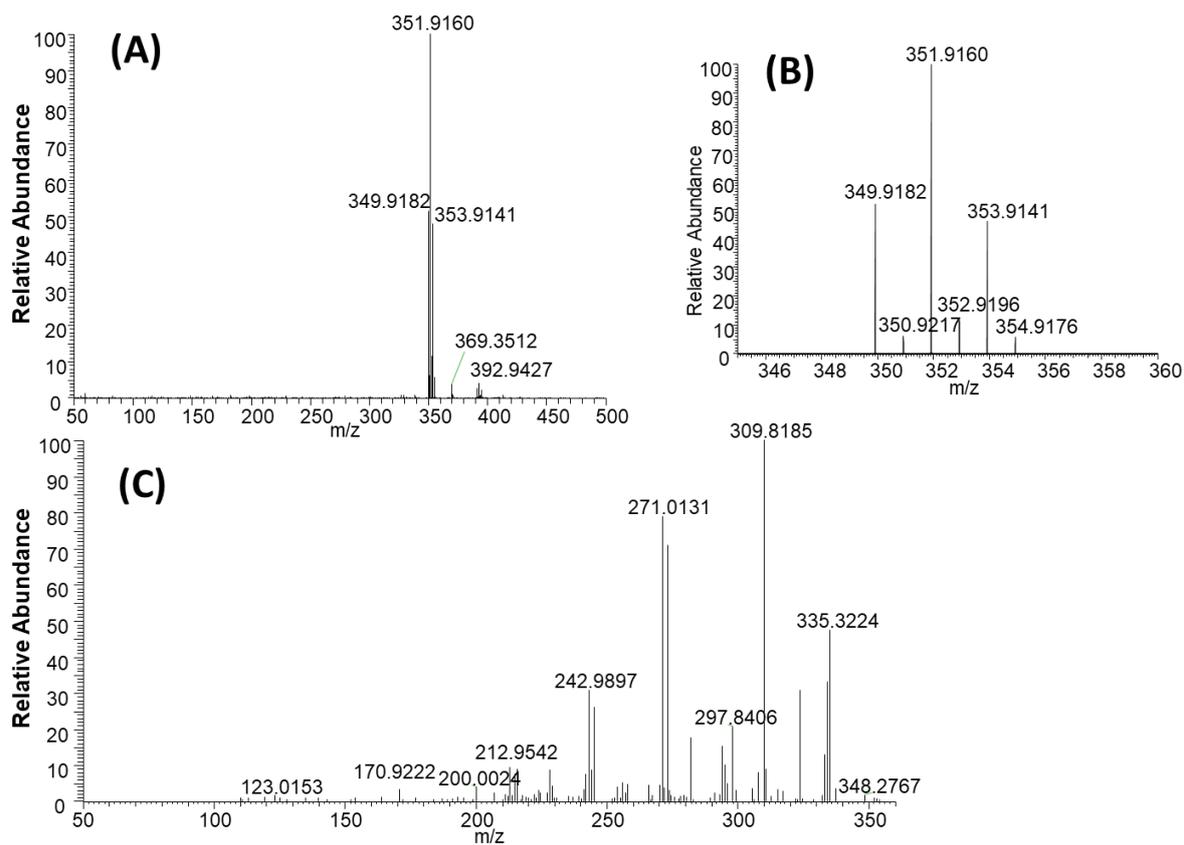


Fig. S6. (A) MS spectrum of CE3F4; (B) Isotopic distribution of the parent ion of CE3F4; (C) MS/MS spectrum of m/z 351.9.

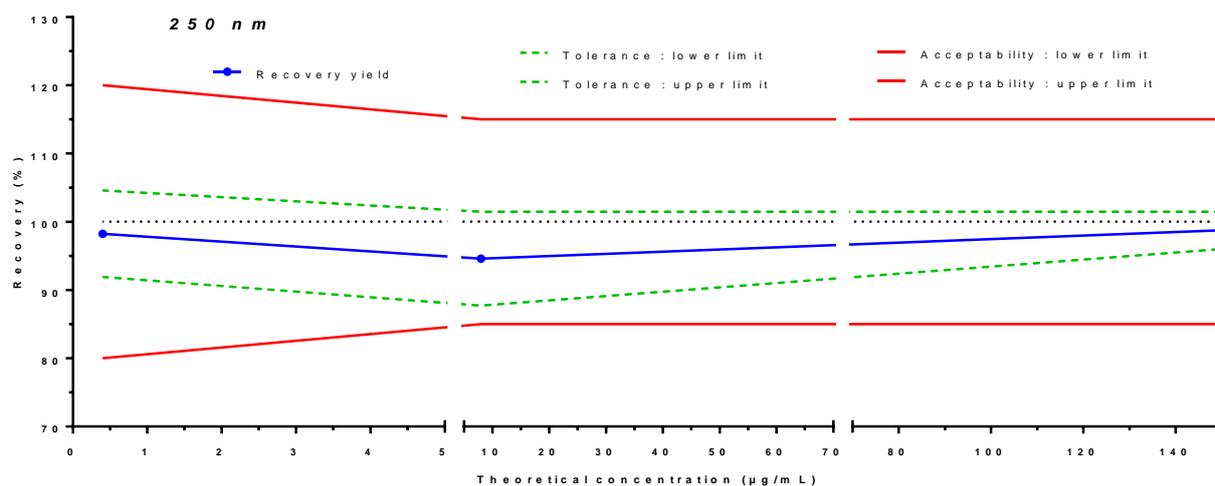


Fig. S7. Accuracy profile for the validation of (*R*)-CE3F4 from 0.40 to 150 $\mu\text{g/mL}$ in murine plasma loaded with paraoxon, at the wavelength 250 nm. Accuracy is illustrated as a continuous blue line; levels of concentration as blue dot; limits of the tolerance interval as dotted green lines for a β -proportion of 80%; and the acceptability limits as continuous red lines.

Partie expérimentale - Chapitre 2.

Stabilité, pharmacocinétique et biodistribution chez la souris du (*R*)-CE3F4, un inhibiteur d'EPAC1, libre ou encapsulé dans des liposomes ou des nanocapsules lipidiques.

Résumé :

Le (*R*)-CE3F4, un inhibiteur d'EPAC1 (*exchange protein directly activated by cAMP type 1*), a démontré *in vitro* et *in vivo* sa capacité à contrôler les arythmies, et à réduire le signal hypertrophique qui contribue à l'installation d'une insuffisance cardiaque. Cependant, le (*R*)-CE3F4 présente une solubilité faible dans les milieux aqueux et est très sensible à l'hydrolyse enzymatique dans le plasma. Afin de contrecarrer ces difficultés, l'encapsulation de la molécule dans des liposomes et des nanocapsules lipidiques a été étudiée. Ces deux systèmes ont permis d'augmenter considérablement la solubilité apparente de la molécule dans un milieu aqueux. Parmi ces nanovecteurs, les nanocapsules lipidiques ont permis *in vitro* une protection significative du (*R*)-CE3F4 contre la dégradation enzymatique, permettant d'augmenter la demi-vie apparente d'initialement environ 40 minutes à 6 heures. Des études de pharmacocinétique et de biodistribution du (*R*)-CE3F4 libre ou formulé à l'aide de nanocapsules lipidiques ont été menées chez la souris C57BL/6 saine. Le ³H-CE3F4 libre a présenté une distribution très rapide en dehors du compartiment sanguin. Des résultats similaires ont été observés lors pour la molécule formulée à l'aide de nanocapsules lipidiques. Dans ce dernier cas, le marquage radioactif simultané ³H-CE3F4/¹⁴C-nanocapsules a montré une dissociation rapide des deux signaux. Ainsi, des informations précliniques essentielles ont pu être obtenues sur le devenir du (*R*)-CE3F4, ainsi que pour sa formulation dans des nanovecteurs lipidiques.

La suite de ce chapitre est rédigée en anglais, et correspond au document soumis à *International Journal of Pharmaceutics*.

Stability, pharmacokinetics, and biodistribution in mice of the EPAC1 inhibitor (R)-CE3F4 entrapped in liposomes and lipid nanocapsules.

Balthazar Toussaint^{1,2}, Hervé Hillaireau¹, Catherine Cailleau¹, Yves Ambroise³, Elias Fattal^{1,*}.

¹ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

² Département de Recherche et Développement Pharmaceutique, Agence Générale des Équipements et Produits de Santé (AGEPS), Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.

³ Université Paris-Saclay, CEA, Institut des Sciences du Vivant Frederic-Joliot, 91191, Gif-sur-Yvette, France.

* Corresponding Author:

Elias Fattal, Ph.D

Université Paris-Saclay

Institut Galien Paris-Saclay

UMR CNRS 8612

5 Rue Jean-Baptiste Clément

92290 Châtenay-Malabry

France

Abstract

(*R*)-CE3F4, a specific inhibitor of EPAC1 (exchange protein directly activated by cAMP type 1), has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* to reduce hypertrophic signaling contributing to heart failure or to control arrhythmia. However, (*R*)-CE3F4 exhibits poor solubility in aqueous media and has shown sensitivity to enzyme hydrolysis in plasma. To overcome these issues, the drug was entrapped in liposomes and lipid nanocapsules. Both systems considerably increased the drug apparent solubility in aqueous media. Among these nanocarriers, lipid nanocapsules offered significant protection *in vitro* against enzymatic degradation by increasing the (*R*)-CE3F4 apparent half-life from around 40 min to 6 hours. Pharmacokinetics and biodistribution of (*R*)-CE3F4 radiolabeled or not were studied in healthy C57BL/6 mice. The non-encapsulated ³H-CE3F4 showed a very rapid distribution outside the blood compartment. Similar results were observed when using nanocarriers together with a fast dissociation of ³H-CE3F4 from nanocapsules simultaneously labeled with ¹⁴C. Thus, essential preclinical information on CE3F4 fate has been obtained, as well as the impact of its formulation using lipid-based nanocarriers.

Keywords: EPAC1 inhibitors, liposomes, nanocapsules, stability, pharmacokinetics, biodistribution

1. Introduction

Cardiovascular diseases are still the first causes of death according to World Health Organization and the number of deaths increased during the two last decades (World Health Organization, 2020) despite the improvement in the care and therapeutic armamentarium. This leads to the research of new interesting pharmacological targets and drug candidates to treat cardiac diseases.

Over the past two decades, the exchange protein directly activated by cAMP 1 (EPAC1) has been increasingly documented as a pharmacological target of various diseases. This protein is ubiquitously expressed and involved in numerous signaling pathways (Robichaux and Cheng, 2018). Its downregulation has shown promises to treat Alzheimer's disease (McPhee et al., 2005), breast, gastric, and pancreatic cancers (Kumar et al., 2017; Lorenz et al., 2008; Sun et al., 2017), heart failure (Metrich et al., 2010), arrhythmia (Hothi et al., 2008) and depression (Middeldorp et al., 2010).

(*R*)-CE3F4 (**Figure 1**) has been identified as a drug candidate to treat cardiac diseases because it is a specific and uncompetitive inhibitor of EPAC1 (Courilleau et al., 2013, 2012). Indeed, this tetrahydroquinoline analog has demonstrated efficient *in vitro* inhibition of cellular mechanisms involving EPAC1 in pathological cardiac conditions (Bisserier et al., 2014; Laurent et al., 2015; Zhang et al., 2019). In particular, it has recently shown promising *in vivo* activity on C57BL/6 mouse models of atrial/ventricular arrhythmias (Prajapati et al., 2019). However, we have previously shown that this molecule is prone to metabolization, especially enzymatic hydrolysis in mice plasma (submitted). The generated metabolite from hydrolysis (=N-deformylated-CE3F4) was shown to be inactive on EPAC1 (Courilleau et al., 2012). Only paraoxon, a pesticide known as a hydrolase inhibitor, has been identified to prevent (*R*)-CE3F4's degradation, but due to its toxicity it cannot be co-administrated to stabilize (*R*)-CE3F4 *in vivo*. Thus, the CE3F4 requires a specific drug delivery strategy to protect it against enzymatic degradation to investigate its full potential *in vivo*.

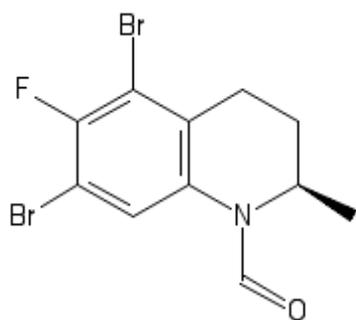


Figure 1. Structure of (*R*)-CE3F4.

Lipid-based nanosystems such as liposomes or lipid nanocapsules are relevant candidates for this purpose. They have been used for the encapsulation of a wide range of active molecules and have been proven safe due to their biocompatibility. Both can be tailored for multiple functions including by ligands for site-specific targeting (Uster et al., 1996; Hoarau et al., 2004; Perrier et al., 2010; Cosco et al., 2017; Alshaer et al., 2018). In this work, we investigated the encapsulation of (*R*)-CE3F4 in liposomes and lipid nanocapsules, their potential for the protection of the molecule against enzymatic degradation in plasma *in vitro*, and the *in vivo* fate of the most promising combination after intravenous administration to mice.

2. Materials & methods

2.1. Chemicals

A racemic mixture of CE3F4 was synthesized using published procedures (Bouyssou et al., 1992). The active enantiomer (*R*)-CE3F4 was isolated with a purity >99% and enantiomeric excess (ee) >98% by applying the racemic mixture to a 250 × 30 mm Chiralpak® IB column (Daicel Corporation, Japan) equilibrated with *n*-hexane/propan-2-ol (95:5, v/v) at 42 mL/min. Paraoxon-ethyl with the analytical standard grade (paraoxon), Solutol® HS 15, D- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS), 4-(dodecyloxy)benzoic acid (DOBA), polyethylene glycol 200 Da (PEG₂₀₀), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) with a purity >99%, phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 (sterile and suitable for cell culture) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). L- α -phosphatidylcholine from egg (EggPC), L- α -phosphatidylcholine from Soy (HSPC), cholesterol (Chol), 1,2-

distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀) were obtained from Avanti. Miglyol® 812 was purchased from Sasol (Johannesburg, South Africa). Zoletil® 50 (tiletamine, zolazepam), Rompun® 2% (xylazine), Iso-Vet (isoflurane) were respectively purchased from Virbac (Carros, France), Bayer (Leverkusen, NRW, Germany), and Piramal Critical Care (Voorschoten, Netherlands). Ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO) were provided from VWR (Radnor, PA, USA). Acetonitrile (ACN) with HPLC grade, propan-2-ol (IPA), and chloroform were acquired from Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). To get deionized water (H₂O), a Milli-Q water purifying system (Millipore, Milford, MA, USA) was used. Concerning radioactive materials, CE3F4 (with ³H on formyl bond) solubilized in acetonitrile was kindly provided by the Institut des Sciences du Vivant Frederic-Joliot (Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France) with a specific activity of 7.14 Ci/mmol, and 1-oleoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [linolenic-1-¹⁴C] (¹⁴C-1-oleoyl-2-linoleoyl-GPC) in ethanol:toluene mixture (1:1) was purchased from Isobio (Fleurus, Belgium) with a specific activity of 50-60 mCi/mmol. Hionic-Fluor and Ultima Gold™ (Packard, Rungis, France) were used as scintillating cocktails for radioactive analyses. Soluene-350® used to dissolve biological samples was obtained from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). Hydrogen peroxide (H₂O₂) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

All liquids other than pure water or PBS were handled with MICROMAN E positive displacement pipettes (Middleton, WI, USA) due to the viscosity of plasma samples and the use of organic solvents.

2.2. (R)-CE3F4 quantification

Quantification was performed with an in-house developed and validated method which is suitable for (R)-CE3F4 quantification in formulations, as well as in biological media (in this case, plasma). This method allowed the quantification of (R)-CE3F4 from 0.40 to 150 µg/mL (using 1/concentration² weighting factor for linear regression, $y = a + bx$), and the separation of (R)-CE3F4 from its main detectable

metabolite, with no interference regardless of the excipients, anesthetics and anticoagulant molecules used.

2.2.1. Chromatographic system

Analyses were performed on a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) equipped with a diode array detector (Waters 2996 PDA), an injector (Waters 717 plus Autosampler), and a quaternary pump (Waters 600 HPLC pump). An external heater/chiller for the column was used (GRACE Model 7956R, Columbia, MD, USA). The separation was performed on a XBridge C18 3.5 μm , 4.6 \times 100 mm column (Waters) at 35°C. The mobile phase consisted of a mixture of water and acetonitrile (40:60, v/v) under isocratic mode at a flow rate of 1.0 mL/min. The wavelength of 250 nm was used to trace the chromatograms, and the quantitative signal was the chromatographic peak area.

2.2.2. Sample treatment

An extraction procedure was carried out using EtOH and ACN to solubilize (*R*)-CE3F4 from different samples (formulation assay, biological sample). In polypropylene microcentrifuge tubes, 50 μL of a sample containing (*R*)-CE3F4 was added to 50 μL EtOH, followed by a vortex-mixing step (10 seconds). Then 150 μL of acetonitrile was added, followed by a vortex-mixing step for 30 seconds. To finish, microcentrifuge tubes were centrifuged at 13,000 g for 10 minutes at room temperature to eliminate non-solubilized compounds (i.e. excipients, salts, proteins), and 100 μL of the supernatant was collected in autosampler vials. 15 μL of the supernatant was injected into the chromatographic system.

In the case of (*R*)-CE3F4 quantification in formulations, an observation under an optical microscope was carried out to verify the absence of crystals in suspension within the various preparations before sample treatment. When crystals were present, they were eliminated by low-speed centrifugation (10 min; 10,000 g) to only evaluate the solubilized (*R*)-CE3F4 fraction. The formulations were then diluted to the tenth before undergoing the sample treatment mentioned above.

2.3. (*R*)-CE3F4 encapsulation

2.3.1. Liposomes

2.3.1.1. Liposome preparation

Liposomes were prepared by the thin-film hydration method. (*R*)-CE3F4 was incorporated simultaneously with lipids in the chloroform solution, with a constant total concentration of lipids (total = 25.0 mM) but various lipids proportions (**Table 1, Suppl. Tables 1 and 2**). The mixture was dried at ambient temperature for 60 min using a rotary evaporator R-215 (Büchi, Switzerland). The obtained film was hydrated with PBS at room temperature, except when HSPC was used, in which case the hydration was performed at 60°C. Then multilamellar liposomes were extruded (Lipex™, Northern Lipids, Canada) 8 times through two polycarbonate membranes with 0.1 µm pore diameters (Nuclepore, Whatman plc, United Kingdom) at ambient temperature or 60°C for HSPC formulations. The membrane was able to retain crystallized, non-encapsulated (*R*)-CE3F4. After the extrusion step, Amicon® filters with a cut-off of 100 kDa (Millipore, Milford, MA, USA) were used to eliminate the non-encapsulated fraction of (*R*)-CE3F4 from the liposome suspension.

2.3.1.2. Evaluation of drug encapsulation

The lipid recovery was evaluated by assaying the phosphatidylcholine content using an enzymatic colorimetric kit (Phospholipids, BIOLABO SA, Maizy, France) according to the manufacturer's instructions. Then the total lipid concentration was calculated by the assumption that proportions of all lipids remained constant during the formulation process. The drug encapsulation efficiency (EE%), the lipids recovery (LR%), and the drug loading (DL%) were calculated as follows:

$$EE (\%) = 100 \times [CE3F4]_{final} / [CE3F4]_{initial} \quad (1)$$

$$LR (\%) = 100 \times [Lipids]_{final} / [Lipids]_{initial} \quad (2)$$

$$DL (\%) = 100 \times [CE3F4]_{final} / [Lipids]_{final} \quad (3)$$

Table 1. Proportions of (R)-CE3F4 and lipids used for CE3F4 encapsulation in liposomes.

Liposome formulation		EggPC	EggPC-Chol	HSPC	HSPC-Chol _{medium}	HSPC-Chol
[(R)-CE3F4] (mM)		2.85	2.85	2.85	2.85	2.85
[Lipids] (mM)		25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
(R)-CE3F4/lipid ratio (mol/mol)		11.4%	11.4%	11.4%	11.4%	11.4%
Lipid molar composition (n/n _{total lipids})	EggPC	94.7%	56.6%	-	-	-
	HSPC	-	-	94.7%	74.7%	56.6%
	Cholesterol	-	38.2%	-	20.0%	38.2%
	DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%

Table 2. Proportions of (R)-CE3F4, lipids, and aqueous media for nanocapsules formulations. Differences compared to the LNC1 formulation are highlighted in italics.

LNC formulations	LNC1	LNC2	LNC3	LNC1-CE3F4 _{High}	LNC2-CE3F4 _{High}	LNC3-CE3F4 _{High}
Miglyol (w/w _{Total lipids})	41.6%	41.6%	41.6%	41.6%	41.6%	41.6%
Solutol HS 15 (w/w _{Total lipids})	51.9%	<i>39.0%</i>	51.9%	51.9%	<i>39.0%</i>	51.9%
EggPC (w/w _{Total lipids})	6.5%	<i>19.4%</i>	6.5%	6.5%	<i>19.4%</i>	6.5%
m _{PBS} :m _{Total lipids} before dilution	1.1:1	1.1:1	<i>2.1:1</i>	1.1:1	1.1:1	<i>2.1:1</i>
m _{total lipids} (mg)	770	770	770	770	770	770
m _{(R)-CE3F4} (mg)	5.0	5.0	5.0	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>10</i>
(R)-CE3F4/lipid ratio (w/w)	0.65%	0.65%	0.65%	<i>1.30%</i>	<i>1.30%</i>	<i>1.30%</i>
Final volume (mL)	5.5	5.5	5.5	<i>5.5</i>	<i>5.5</i>	<i>5.5</i>
[CE3F4] concentration expected (µg/mL)	909	909	909	<i>1818</i>	<i>1818</i>	<i>1818</i>

2.3.2. Encapsulation in lipid nanocapsules

The method used for the preparation of lipid nanocapsules (LNC) consisted of a phase inversion process (Heurtault et al., 2002). PBS was used as an aqueous phase, and a mixture of Solutol®, EggPC, and Miglyol® as lipid phase. Both phases were mixed into a vial containing a magnet. The vial was put into a water bath, and three temperature cycles of heating/cooling between 55°C and 85 °C were applied. After reaching 85°C for the third time, the vial was cooled to 65°C and a dilution with cold PBS (5°C) was performed under magnetic stirring, leading to the spontaneous formation of lipid nanocapsules. For (*R*)-CE3F4 encapsulation, the molecule was dissolved into Miglyol® before the process. All formulation conditions are summarized in **Table 2**. After the cold dilution step, the (*R*)-CE3F4 concentration was measured, and appropriate dilutions were performed for all formulas to obtain the final concentration of 625 µg/mL. The formula used for *in vivo* studies was filtered on a 0.22 µm PVDF filter (Millipore, Milford, MA, USA).

2.3.3. Size and zeta potential measurements

The particle average hydrodynamic diameter (D_H) was determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Corp., Worcestershire, UK). Samples were diluted in PBS before the measurements in a disposable cuvette and analyzed at a backscatter angle of 173°. Polydispersity index (PDI) was used as an indicator of size distribution. Zeta potential (ζ) was measured in the same apparatus in a folded capillary cell after 30-fold dilution with pure water (ionic strength corresponding to 1/30 PBS).

2.3.4. Calculation of (*R*)-CE3F4 surface density and content per particle

The number of (*R*)-CE3F4 molecules per nanoparticle was estimated (**Eq. 4**) as well as the potential surface density of (*R*)-CE3F4 (Eq. 5) for EggPC-liposomes, HSPC-liposomes, LNC₁, and LNC₁-CE3F4_{High}. The number of particles was estimated (**Eq. 6**) by dividing the virtual surface made of all surfactants " S_{virtual} " (**Eq. 7**) by the surface of one particle " S_{particle} " (**Suppl. Figure 1**), the latter being calculated from the

hydrodynamic diameter (D_H). For $S_{particle}$, one surface must be considered for LNC, but the two surfaces of the bilayer must be estimated for liposomes (inner and outer surfaces). The properties of the surfactants used for the calculation of $S_{virtual}$ are displayed in **Suppl. Table 3**. All calculations were made for 1 mL of formulation, considering the molar content of each surfactant and the lipids recovery (as measured in the case of liposomes; assumed to be 100% in the case of LNCs due to the one-pot process). Assumptions were made for particles surfaces calculations based on measured D_H . For liposomes, the obtention of unilamellar structures was assumed, the impact of acyl chains lengths of DSPE-PEG₂₀₀₀ on bilayer thickness was neglected due to its small molar proportion (near 5%). For LNCs, the polymer thickness related to PEG-HS was not taken into account due to the lack of conformational information on PEG 660 at high surface concentration.

$$\text{Number of CE3F4 per particle} = n_{CE3F4} \times N_A / \text{Number of particles} \quad (4)$$

with N_A : Avogadro number

$$\text{Surface density of CE3F4} = n_{CE3F4} \times N_A / S_{virtual} \quad (5)$$

$$\text{Number of particles} = S_{virtual} / S_{particle} \quad (6)$$

with $S_{particle}$ detailed in **Suppl. Fig. 1**

$$S_{virtual} = (n_{tensioactive\ 1} \times a_{tensioactive\ 1} + n_{tensioactive\ 2} \times a_{tensioactive\ 2} + \dots + n_{tensioactive\ n} \times a_{tensioactive\ n}) \times N_A \quad (7)$$

with a : area of the tensioactive's polar headgroup

2.4. Vehicle for in vivo administration of free (*R*)-CE3F4

The combination of Solutol HS 15, PEG₂₀₀, and PBS (4.5:1:15, $m_{PEG200}/m_{Solutol\ HS\ 15}/V_{PBS}$) was evaluated to solubilize (*R*)-CE3F4 at the targeted concentration of 625 $\mu\text{g/mL}$. Namely, for 1.0 mL of preparation, 0.625 mg of (*R*)-CE3F4 was dissolved in 225 mg of PEG₂₀₀ at 40°C, then 50 mg of Solutol HS 15 was added (4.5:1:15, $m_{PEG200}/m_{Solutol\ HS\ 15}/V_{PBS}$), and the mixture was gently homogenized for 30 min at 40°C. After this step, 750 μL of PBS at 40°C was added and the formula was gently mixed 10 min at 40°C then 1h at room temperature. To evaluate the solubilization or recrystallization of (*R*)-CE3F4, the formulation was observed under an optical

microscope after preparation and until 24 h at room temperature. The solution was filtered on a 0.22 µm PVDF filter (Millipore, Milford, MA, USA) before injection for *in vivo* studies.

2.5. (R)-CE3F4 stability study in murine plasma, evaluation of the impact of formulations

Formulations were first diluted in PBS if necessary to obtain an (R)-CE3F4 concentration of 625 µg/mL, then a dilution in murine plasma was performed to obtain a concentration of 60 µg/mL. Samples were put into a rotary agitator at 37°C, and after 5 min to 26 h, they were treated as described in section 2.2.2 to quantify total (R)-CE3F4 (released and encapsulated) and its metabolite resulting from hydrolysis. For data representation and comparison between all formulations, a normalization of the data was made by the ratio between the measured (R)-CE3F4 concentration at each sampling time and the measured concentration at 5 minutes (Eq. 8).

$$\text{Relative concentration (\% at time } t) = 100 \times [\text{CE3F4}]_t / [\text{CE3F4}]_{5\text{min}} \quad (8)$$

2.6. *In vivo* studies

(R)-CE3F4 studies in healthy C57BL/6N mice were carried out according to the local ethical committee guidelines (agreement number APAFIS#5584-2016050312271349 v4). 7-week-old C57BL/6N male mice were purchased from Envigo (France) and let for 1 week after shipping for adaptation before starting experiments. Mice were kept in a separate animal room under climate-controlled conditions with a 12 h light/dark cycle, housed in polystyrene cages containing wood shavings, and fed standard rodent chow and water *ad libitum*. In both studies, the (R)-CE3F4 concentration was adjusted to 625 µg/mL with PBS for each formulation. The administrated dose was 5 mg/kg, corresponding to an administration of 200 µL for a 25 g mouse. Formulations were slowly intravenously injected via a retro-orbital sinus.

2.6.1. Pharmacokinetic study

The study was designed with two groups, treated with free (*R*)-CE3F4 or (*R*)-CE3F4 encapsulated in LNC, and followed on 24 h (sampling times: 5', 15', 30', 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, and 24 h). For each sampling time, three mice were used. In microcentrifuge tubes containing 30 μ L of paraoxon solution (10^{-3} M, in DMSO), 300 μ L of blood were collected by cardiac puncture with EDTA-coated needles. After gently mixing the sample, centrifugation was performed for 5 min at 10,000 g. 50 μ L of the supernatant was processed as detailed in section 2.2.2, and then analyzed.

2.6.2. Biodistribution study

2.6.2.1. Design of the study

Two groups were treated with free ^3H -CE3F4 or ^3H -CE3F4 in ^{14}C -LNC, and studied on 24 h with sampling times at 10', 15', 30', 1 h, 4 h, and 24 h. Before the experiment, all mice were weighed. For each sampling time, heart, liver (including gallbladder), spleen, kidneys, and blood were collected and analyzed. Organ sampling occurred after a cardiac puncture with EDTA-coated needles allowing blood sampling. Blood and the totality of these organs were analyzed after sample treatment using a liquid scintillation counter (Model LS 6000 TA, Beckman, France), allowing the simultaneous quantification of ^3H and ^{14}C .

2.6.2.2. Free ^3H -CE3F4

Radiolabeled ^3H -CE3F4 in ACN was evaporated to dryness at room temperature under a stream of nitrogen in a 20 mL glass vial, then non-radioactive CE3F4 was added. ^3H -CE3F4 and CE3F4 were solubilized as described above for free CE3F4 to obtain a total concentration of 625 g/mL and a tritium concentration of 4.0 $\mu\text{Ci/mL}$. Then the formulation was filtered through a 0.22 μm filter. For each mouse, 0.80 μCi of ^3H were injected.

2.6.2.3. ^3H -CE3F4 in ^{14}C -LNC

Radiolabeled ^3H -CE3F4 in ACN and ^{14}C -1-oleoyl-2-linoleoyl-GPC in EtOH:toluene were evaporated to dryness at room temperature under a stream of

nitrogen in a 20 mL glass vial, and non-radioactive (*R*)-CE3F4 was added. The dry residue was reconstituted with Miglyol at first, then encapsulation according to the LNC₁ formulation was performed to obtain a total CE3F4 concentration of 625 g/mL, a ³H and a ¹⁴C radioactive concentrations of 4.0 and 0.4 μCi/mL respectively. The preparation was then filtered through a 0.22 μm filter. For each mouse, 1 μCi of ³H and 0.1 μCi of ¹⁴C were injected.

2.6.2.4. Sample treatment

100 μL of blood were added to 400 μL of a mixture of Soluene-350®:IPA (1:1) and incubated for 30 min at 50°C, then a decolorization step of the sample with H₂O₂ (drop-to-drop addition) was done, and 4 mL of Hionic-Fluor was finally added as a scintillating liquid. The sample was vortexed before the analysis.

The totality of the organs (heart, kidneys, spleen, liver) was analyzed. After weighing, each organ was cut into small pieces, which were mixed with 2 mL Soluene-350® and incubated at 50°C overnight for tissue digestion. H₂O₂ was added (drop-to-drop) until decolorization, 16 mL of Ultima Gold™ scintillating liquid was added before vortex mixing, and then treated samples were analyzed.

2.6.2.5. Data analysis

Radioactivity for each organ was expressed in percentage of the injected dose, by dividing the number of disintegrations per minute (DPM) measured on the whole organ after digestion by the injected DPM. In the case of blood, the total blood volume of the mouse was approximated as a function of its weight ($K = 0.072$ mL/g) (Diehl et al., 2001), and the total activity corresponding to the whole blood was obtained according to Eq. 9.

$$\text{Activity}_{\text{whole blood}} = (\text{Activity}_{\text{blood sample}} / \text{Volume}_{\text{blood sample}}) \times K \times \text{mouse weight} \quad (9)$$

The total radioactivity measured in all investigated tissues was calculated as the sum of each organ and total blood activities per mouse. Additionally, the ponderation

of the activity by the mass of tissue analyzed was used to highlight differences in biodistribution between groups.

2.7. Statistical analysis

All data were processed in GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Values are expressed as their mean \pm standard deviation ($\mu \pm$ S.D.). When comparing multiple groups, two-way ANOVA was applied with Bonferroni's multiple comparisons test. The statistical data were considered significant at $p < 0.05$ (*), 0.01 (**), 0.001 (***)).

3. Results & Discussion

3.1. (R)-CE3F4 encapsulation

3.1.1. Liposomes

The encapsulation of (R)-CE3F4 was investigated in liposomes prepared from HSPC or EggPC as main phospholipids, using various proportions of cholesterol. The type of phospholipid and the presence or not of cholesterol induced a significant effect on the amount of (R)-CE3F4 encapsulated (**Figure 2**), whereas the hydrodynamic diameter and the zeta potential remained relatively unchanged among formulations (**Table 3**). Maximal (R)-CE3F4 encapsulation (EE > 80%) and lipid recovery (LR > 80%) were obtained for EggPC liposomes without cholesterol, resulting in a drug loading (DL) of 11 % (mol/mol). In detail, **Figure 2** and a two-way ANOVA analysis show a moderate impact of the phospholipid on EE (with HSPC being less favorable than EggPC), as well as a negative impact of cholesterol on EE. A significant interaction was found between both parameters, resulting in a drop of (R)-CE3F4 encapsulation in liposomes prepared from HSPC and cholesterol. In this case, the measured (R)-CE3F4 concentration in the formulation was by far the lowest and close to the observed (R)-CE3F4 solubility in PBS (~ 40 μ M). The investigation of an intermediate cholesterol proportion in HSPC liposomes confirmed the negative correlation between cholesterol and EE when this lipid is used (**Suppl. Figure 2**).

Other liposomal formulations containing DOBA or TPGS in their lipid composition also showed a negative impact of cholesterol on EE (**Suppl. Tables 4 and 5**). Altogether, these results suggest a competition in their insertion within the liposome bilayer between cholesterol and (*R*)-CE3F4, combined with an influence of the membrane fluidity related to differences between phase transition temperature of EggPC and HSPC which are respectively near -10°C (Amselem et al., 1995) and 52°C (Horowitz et al., 1992), and the influence of cholesterol (Ohvo-Rekilä et al., 2002; Halling et al., 2008). The interaction between CE3F4 and micelles of Triton X-100 has been recently reported, with the exposure of the CE3F4's formyl moiety at the surface of the micelles while the hydrophobic part interacts with the aromatic ring and the hydrocarbon chain of Triton X-100 (Boulton et al., 2019). Regarding cholesterol location in bilayers, it is known that its hydroxyl group is exposed at the surface of the bilayer (in interaction with polar heads of phospholipids) while its hydrophobic parts (steroid core and hydrocarbon chain) interact with the hydrophobic tail of phospholipids (Ohvo-Rekilä et al., 2002). The competition between cholesterol and another apolar molecule (celecoxib) which also interacts with polar heads of phospholipids in liposome bilayer has already been described (Deniz et al., 2010). Indeed, the authors reported a lower celecoxib EE when cholesterol was added in large molar proportion (33%) in liposomes. Thus, according to our results and the literature, a competition between cholesterol and the CE3F4 in their location in bilayer membrane seems the most probable hypothesis. Despite this, (*R*)-CE3F4 was successfully encapsulated with satisfactory EE in at least three different liposomal formulations (EggPC, HSPC, and EggPC-Chol), which were further evaluated for their ability to protect (*R*)-CE3F4 from degradation in murine plasma.

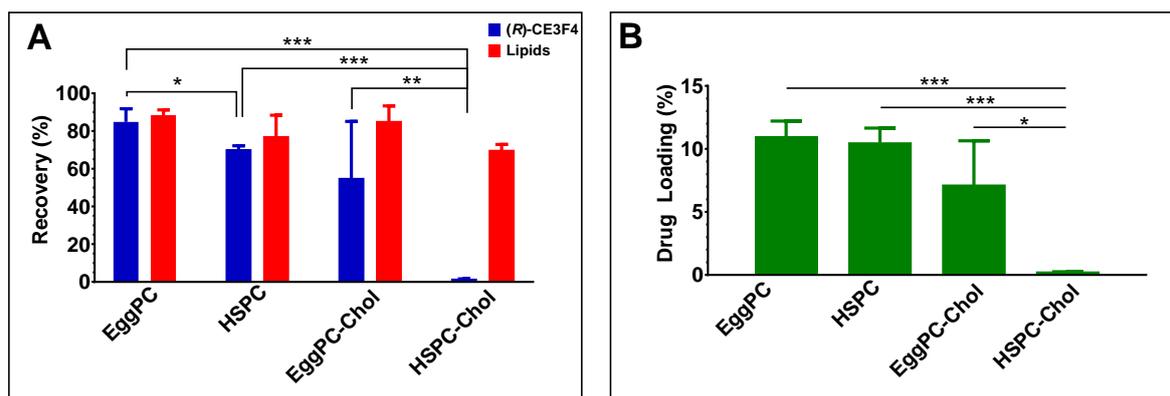


Figure 2. (A) (*R*)-CE3F4 encapsulation efficiency (EE, blue) and lipid recovery (LR, red) for liposomes prepared from EggPC or HSPC, with or without cholesterol. (B) Drug loading (mol/mol) achieved with liposomes. n = 3 per formulation group; p-value < 0.05 (*), 0.01 (), 0.001 (***)**.

Table 3. Colloidal properties of liposomes investigated for (*R*)-CE3F4 encapsulation (mean \pm S.D., n = 3).

Formulation	EggPC	EggPC-Chol	HSPC	HSPC-Chol
Hydrodynamic diameter (nm)	90 \pm 11	97 \pm 11	106 \pm 4	98 \pm 6
Polydispersity index	0.067 \pm 0.036	0.045 \pm 0.023	0.082 \pm 0.12	0.056 \pm 0.003
ζ potential (mV)	-19.1 \pm 3.0	-19.8 \pm 4.4	-17.2 \pm 3.7	-14.1 \pm 0.9

3.1.2. Lipid nanocapsules

Lipid nanocapsules (LNC) suspensions were obtained by mixing the Miglyol oil, containing dissolved (*R*)-CE3F4, with EggPC and Solutol HS15 in an aqueous medium. Unlike liposomes, this process consists of a one-pot mixing (no transfer, extrusion, or purification steps involved), alleviating the risk of drug or excipient loss. Excipients proportions were based on a reference LNC formulation (Heurtault et al., 2002), named LNC₁ in the following. Other proportions within the domain of LNC formation were explored by altering the EggPC/Solutol ratio and the aqueous phase initial fraction (LNC₂, LNC₃). Two initial amounts of (*R*)-CE3F4 (5 mg for LNC₁₋₃; 10 mg for

LNC₁₋₃-CE3F4_{High}) were studied for a constant amount of lipids (770 mg) to evaluate the impact of the CE3F4:lipids ratio (w/w). The theoretical drug loading was therefore 0.65% (w/w) for LNC₁₋₃ and 1.30% for LNC₁₋₃-CE3F4_{High}.

Homogeneous colloidal suspensions were obtained in all cases, with hydrodynamic diameters around 30 nm and polydispersity indexes below 0.2 (**Table 4**). Notably, despite using (*R*)-CE3F4 concentrations more than a hundred-times above its solubility in PBS for all LNC formulations, optical microscopy observations indicated an absence of crystals in suspension, which was confirmed by the assessment of (*R*)-CE3F4 concentration after low-speed centrifugation as well as after filtration through a 0.2 µm filter (for example, (*R*)-CE3F4 recovery after the whole process was 101.8% ± 4.6% (n = 3) for LNC₁), indicating a correct encapsulation of the (*R*)-CE3F4 in LNCs. When the initial (*R*)-CE3F4 amount was doubled (LNC₁₋₃-CE3F4_{High}), this modification did not alter the formulation process, allowing high drug concentrations in the final LNC suspensions, up to 2 orders of magnitude higher than its PBS solubility and twice as much as in liposomes (**Table 4**). Compared to liposomes, the diameter is small enough to allow a 0.2 µm filtration as an easy sterilization process before *in vivo* studies.

Table 4. Colloidal properties of LNC suspensions prepared in presence of (*R*)-CE3F4, and drug concentrations achieved in the preparation (n=1-3).

LNC formulations	LNC ₁	LNC ₂	LNC ₃	LNC ₁ - CE3F4 _{High}	LNC ₂ - CE3F4 _{High}	LNC ₃ - CE3F4 _{High}
Hydrodynamic diameter (nm)	29.3 ± 0.6	28.4	30.6	29.6	27.8	30.9
Polydispersity index	0.04 ± 0.01	0.16	0.03	0.09	0.16	0.09
[CE3F4] (µg/mL)	913.3	910.1	917.7	1737	1766	1772
CE3F4 recovery	100%	100%	101%	96%	97%	97%
Drug loading (w/w)	0.65%	0.65%	0.66%	1.24%	1.26%	1.27%

3.2. (*R*)-CE3F4 degradation in plasma

A plasmatic half-life of 39.9 min was previously reported for (*R*)-CE3F4 (confidence interval 95%: from 36.9 to 43.4 min) (Submitted). The disappearance of (*R*)-CE3F4 in C57BL/6N mice plasma *in vitro* can be represented by a one-phase exponential decay for all formulation as shown in **Figure 3**. Results show unambiguously that liposomes do not confer any protection to (*R*)-CE3F4 from plasmatic degradation *in vitro*, with degradation kinetics similar to free (*R*)-CE3F4, suggesting a rapid release from the liposomes, or at least an insufficient protection from accessibility to enzymes. Other liposome formulations using TPGS or DOBA did not show any improvement either (**Suppl. Tables 4 and 5**). In contrast, LNC formulations increased (*R*)-CE3F4 apparent half-life by at least 2.7-fold (LNC₂-CE3F4_{High}) and up to 5.9-fold (LNC₁). The protection effect was higher for LNC₁₋₃ compared to LNC₁₋₃-CE3F4_{High}, showing the importance of the initial CE3F4-to-lipids ratio. A higher or faster drug release in the case of LNCs loaded with higher amounts of (*R*)-CE3F4 could explain this difference.

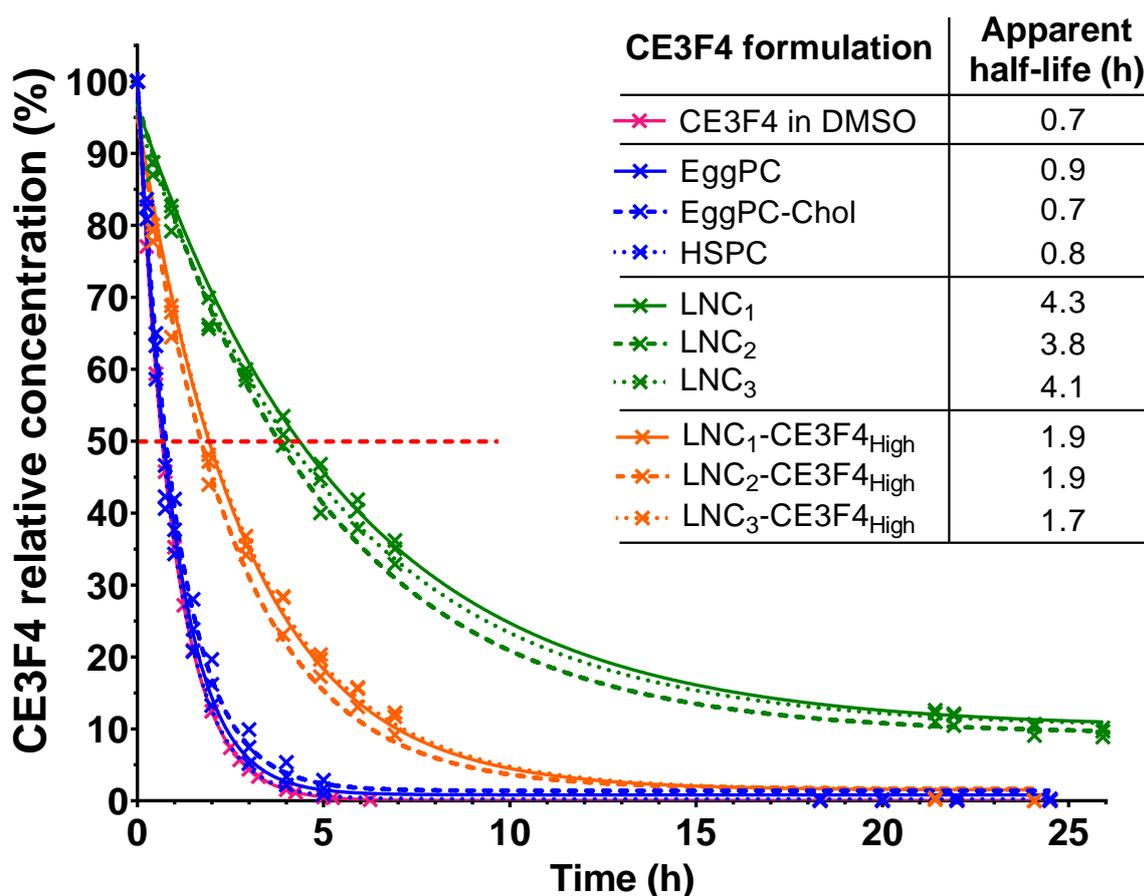


Figure 3. *In vitro* degradation kinetics of (*R*)-CE3F4 encapsulated in liposomes (EggPC, EggPC-Chol, HSPC), in lipid nanocapsules (LNC₁ to LNC₃, and LNC₁-CE3F4_{High} to LNC₃-CE3F4_{High}), compared to free CE3F4 solubilized in DMSO, in C57BL/6N mice plasma. 50% of degradation is shown by a red dotted line. Detailed apparent half-lives are reported in the associated table. In all cases, the determination coefficient was higher than 0.99.

A possible hypothesis accounting for these discrepancies of drug protection towards degradation could be a different accessibility of the drug molecules at the surface of the nanocarriers. Because liposomes and LNCs have notable differences in terms of particle size and drug loading, the number of (*R*)-CE3F4 molecules per nanoparticle surface was estimated (**Suppl. Table 6**). The differences in the values calculated for liposomes (0.18-0.23 molecules/nm²) and LNCs (0.09-0.16 molecules/nm²) might not be enough to account for the protection effect observed experimentally. A more pronounced gap was found in terms of number of (*R*)-CE3F4 molecules per nanoparticle (0.7-1.3×10⁴ molecules/particle for liposomes, 2-4×10²

for LNCs), suggesting a higher or faster drug release in the case of liposomes driven by a higher drug concentration gradient than in the case of LNCs. Based on these observations, the LNC₁ formulation was selected for further *in vivo* evaluation of (*R*)-CE3F4 delivery.

3.3. (*R*)-CE3F4 fate in vivo

3.3.1. Vehicle choice for the administration of free (*R*)-CE3F4

Prajapati et al. already use DMSO 30% (in water) to solubilize (*R*)-CE3F4 for *in vivo* studies (Prajapati et al., 2019). However, in these conditions, we observed the recrystallization of (*R*)-CE3F4 at ambient temperature in less than 18 h, which does not allow the use of 30% DMSO for studies in animals over 24 h (data not shown). Because the use of DMSO with a proportion larger than 30% (v/v) is not recommended (Thackaberry et al., 2014), we explored the interest of Solutol HS 15 and PEG₂₀₀ to solubilize (*R*)-CE3F4 in PBS at the target concentration of 625 µg/mL. No recrystallization was observed during at least 24 h. The sterilization through a 0.22 µm filter confirmed the solubilization of the drug, and allowed the use of the selected formulation for pharmacokinetic and biodistribution studies as the control group.

3.3.2. Pharmacokinetic study

In this study, paraoxon was used as metabolism inhibitor in murine plasma to stop the enzymatic degradation of (*R*)-CE3F4 that may occur between blood sampling and protein precipitation before HPLC analysis. A very fast disappearance of (*R*)-CE3F4 was observed for the two groups (free CE3F4 and LNC). Indeed, the (*R*)-CE3F4 concentration measured was less than 2.0% of the maximal expected concentration in the bloodstream (~ 62.5 µg/mL) at 5 min. After 15 min, the (*R*)-CE3F4 signal was below the limit of quantification (i.e. 0.40 µg/mL, corresponding to 0.6% of the maximal expected concentration) despite the LNC use (**Table 5**).

Table 5. Measured plasma concentration of (*R*)-CE3F4 during pharmacokinetic study on C57BL/6N mice injected with free (*R*)-CE3F4 or (*R*)-CE3F4 encapsulated in lipid nanocapsules (LNC). < LOQ: signal below lower limit of calibration curve (0.40 µg/mL).

Group	Sampling times		
	5 min	15 min	from 30 min to 24 h
Free CE3F4 (µg/mL)	0.43	< LOQ	< LOQ
CE3F4 in LNC (µg/mL)	1.30 ± 0.70	0.43 ± 0.07	< LOQ

This rapid clearance of free (*R*)-CE3F4 from the plasma is consistent with the rapid metabolization shown *in vitro* in murine plasma, mostly by hydrolysis of (*R*)-CE3F4 by enzymes in plasma as previously reported by our team (Submitted). However, the main metabolite identified *in vitro* was not observed here *in vivo* using a similar HPLC-UV analysis, questioning hydrolysis as the main metabolism pathway, even though secondary products cannot be excluded. Other factors could explain the rapid clearance of free (*R*)-CE3F4, such as a fast distribution outside the plasma compartment, into tissues or blood cells (which are eliminated during sample treatment), a fast elimination, or a combination of these different possibilities.

Despite promising results reported *in vitro* (section 3.2), it appeared that the formulation of (*R*)-CE3F4 with LNCs did not improve its pharmacokinetic profile. This could be explained by a faster drug release *in vivo* driven by conditions not encountered *in vitro*, such as sequestration in tissues or blood constituents. Another possibility is a stable entrapment in LNCs, which are rapidly cleared from the plasma.

3.3.3. Biodistribution studies

To go deeper in the understanding of the fate of (*R*)-CE3F4 *in vivo*, the biodistribution was investigated using ³H-CE3F4 as a tracer. A ¹⁴C-lipid was also added in the LNC formulation to monitor the fate of the nanocarrier simultaneously. The impact of sterilizing by filtration was first investigated. The activities of ³H and ¹⁴C measured after filtration were respectively 98.5% and 97.7% of the initial values, and

the observed ratio $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ in the formulation remained stable (8.95 before vs. 9.02 after filtration). These results confirm the easy sterilization of CE3F4 formulated as LNCs.

The biodistribution of free ^3H -CE3F4 (**Figure 4A**) and ^3H -CE3F4 delivered with LNCs (**Figure 4B**) showed similar trends with slight differences. Ten minutes after injection of free CE3F4, less than 5 % of the injected tritium was found in the blood, with some distribution to liver and kidneys, then plateauing or decreasing. This is consistent with the rapid clearance from the plasma compartment described above and supports a rapid elimination rather than any accumulation in the investigated tissues. In the case of CE3F4 delivered with LNCs, no significant differences in the fractions of injected doses were measured, suggesting a rapid release of CE3F4 from LNCs and a similar distribution compared to free CE3F4. A slight increase in drug amount can still be noticed in the liver in the first hour. This last observation is confirmed when correcting the measured ^3H activities by the organ weight (**Figure 4C**), which shows a higher CE3F4 presence in the liver tissue when delivered with LNCs, probably due to the accumulation of LNCs in the liver.

It can be noted that all organs exhibit a similar activity at 24 h (25-60 DPM/mg of tissue). This could be explained by the hydrolysis of the formamide bond of CE3F4 by plasmatic enzymes in rodents (Gleason and Vogh, 1971; Takenaga et al., 1998) (submitted). This would produce ^3H -formic acid, which is known to react with macromolecules, to be metabolized as $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, or to be directly eliminated in urines (Thompson, 1992), altering a proper evaluation of CE3F4 biodistribution with unwanted signal correlated to formic acid distribution.

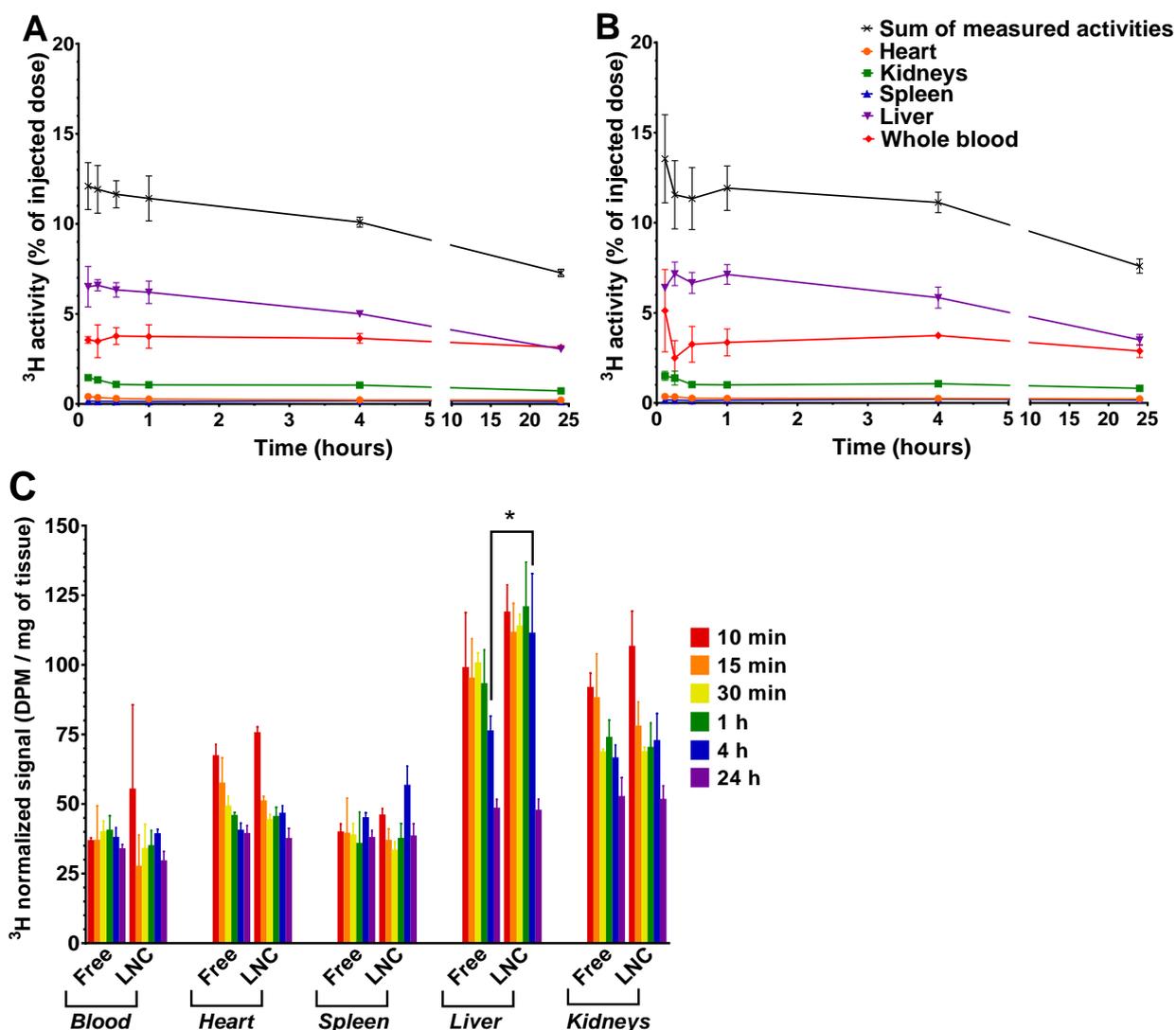


Figure 4. Biodistribution of ^3H in different organs is expressed as a percentage of the injected dose (A, B). (A) Free ^3H -CE3F4 and (B) ^3H -CE3F4 formulated with ^{14}C -LNCs were injected intravenously into C57BL/6N mice. (C) ^3H distribution in organs corrected by the mass of each organ, for free ^3H -CE3F4 and ^3H -CE3F4 delivered with LNCs. P-value < 0.05 (*).

The simultaneous labeling of ^3H -CE3F4 and ^{14}C -LNC (using a ^{14}C -phospholipid as a tracer of LNCs) allowed us to investigate the fate of these nanocarriers and to compare it with the (*R*)-CE3F4's. First, we can observe in **Figure 5** that the ^{14}C biodistribution profile is very different from the tritium biodistribution profile, with still 84% of the injected dose recovered at 10 min, overwhelmingly recovered in the blood compartment (72% of the injected dose), and distribution to the liver which

becomes the main distribution compartment after 3 hours. The mean half-life in blood was 1.4 hours (confidence interval 95%: [0.8 to 5.0]), which is consistent with a previous study using radiolabeled LNC (Lacoeuille et al., 2007). The liver uptake of ^{14}C -LNC could explain the slight increase in liver uptake of ^3H -CE3F4 administered as LNC formulation (**Figure 4C**). Furthermore, as reported in **Table 6**, the ^3H -to- ^{14}C ratio in blood samples dropped from its initial value of 9.02 in the formulation to 0.88 ± 0.49 after 10 min, down to a minimum of 0.37 ± 0.17 after 15 min, showing a fast release of ^3H -CE3F4 from ^{14}C -LNC. Thus, these results on ^3H -CE3F4 and ^{14}C -LNC biodistributions show that a small fraction of CE3F4 administered as LNCs is delivered to the liver with the nanocarriers, while the rest of the drug is rapidly released and follows the same fate as free CE3F4.

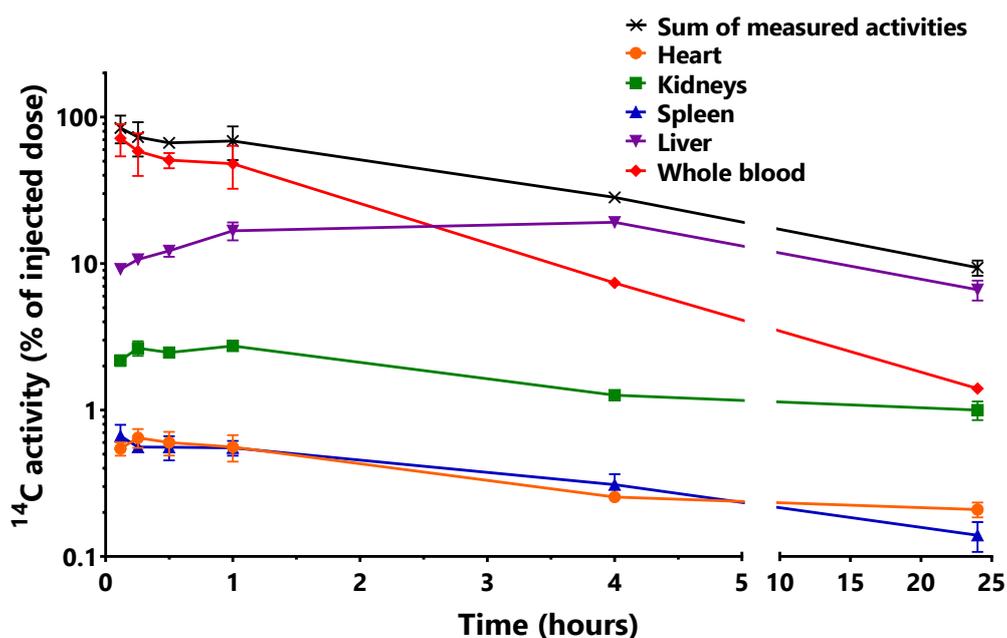


Figure 5. Biodistribution of ^{14}C in different organs is expressed as the percentage of the injected dose. ^3H -CE3F4 in ^{14}C -LNC formulation was injected into C57BL/6N mice.

Table 6. Kinetics of $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio in healthy C57BL/6 mice from the LNC formulation intravenously injected to blood samples analyzed.

Analyzed samples	Time (h)	Ratio $^3\text{H}/^{14}\text{C}$
LNC-formulation	Initial ratio "t=0"	9.02
Blood samples	0.17	0.88 ± 0.49
	0.25	0.37 ± 0.17
	0.5	0.63 ± 0.25
	1.0	0.69 ± 0.09

4. Conclusions

To our knowledge, this is the first study describing the pharmacokinetics and biodistribution of (*R*)-CE3F4, and its formulation with nanocarriers to modulate its stability and delivery. (*R*)-CE3F4 was successfully encapsulated in liposomes and LNCs, and these lipid-based nanocarriers increased its apparent solubility by up to two orders of magnitude compared to its solubility in water. An interaction between the drug and cholesterol within liposomes has been unveiled, and its nature remains to be elucidated. Only LNCs were found to offer significant protection of (*R*)-CE3F4 from degradation, in addition to be compatible with sterilizing filtration, making these nanocarriers the most suitable candidates for *in vivo* administration. While the described LNC formulations did not significantly improve the drug pharmacokinetic profile after intravenous administration to mice, this study provides new fundamental data on the (*R*)-CE3F4 behavior *in vivo*. Thus, essential foundations have been laid for the development of future formulations aiming at improving (*R*)-CE3F4 delivery.

Acknowledgment

The "Institut Galien Paris-Sud" and the "Service de Chimie Bioorganique et de Marquage" belong to the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (ANR-10-LABX-0033-LERMIT). We thank Mrs Assia Hessani for technical assistance in the radioactivity assay.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest regarding this publication.

References

- Alshaer, W., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Mura, S., Deloménie, C., Sauvage, F., Ismail, S., Fattal, E., 2018. Aptamer-guided siRNA-loaded nanomedicines for systemic gene silencing in CD-44 expressing murine triple-negative breast cancer model. *J. Controlled Release* 271, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.022>
- Amselem, S., Zawoznik, E., Yogev, A., Friedman, D., 1995. Emulsomes, a new type of lipid assembly., in: Barenholz, Y., Lasic, D.D. (Eds.), *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes: From Design to Microreactors*. CRC Press, pp. 209–223. <https://doi.org/10.1201/9781351072724>
- Bisserier, M., Blondeau, J.-P., Lezoualc'h, F., 2014. Epac proteins: specific ligands and role in cardiac remodelling. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 257–264. <https://doi.org/10.1042/BST20140033>
- Boulton, S., Selvaratnam, R., Ahmed, R., Van, K., Cheng, X., Melacini, G., 2019. Mechanisms of Specific versus Nonspecific Interactions of Aggregation-Prone Inhibitors and Attenuators. *J. Med. Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00258>
- Bouyssou, P., Goff, C.L., Chenault, J., 1992. Synthesis of 7- and 5,7-substituted-6-fluoro-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: Convenient precursors of quinolone antibacterial agents. *J. Heterocycl. Chem.* 29, 895–898. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570290436>
- Cosco, D., Tsapis, N., Nascimento, T.L., Fresta, M., Chapron, D., Taverna, M., Arpicco, S., Fattal, E., 2017. Polysaccharide-coated liposomes by post-insertion of a hyaluronan-lipid conjugate. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 158, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.029>
- Courilleau, D., Bisserier, M., Jullian, J.-C., Lucas, A., Bouyssou, P., Fischmeister, R., Blondeau, J.-P., Lezoualc'h, F., 2012. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J. Biol. Chem.* 287, 44192–44202.
- Courilleau, D., Bouyssou, P., Fischmeister, R., Lezoualc'h, F., Blondeau, J.-P., 2013. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 443–448.

- Deniz, A., Sade, A., Severcan, F., Keskin, D., Tezcaner, A., Banerjee, S., 2010. Celecoxib-loaded liposomes: effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics. *Biosci. Rep.* 30, 365–373. <https://doi.org/10.1042/BSR20090104>
- Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., Vorstenbosch, C.V.D., 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>
- Drabik, D., Chodaczek, G., Kraszewski, S., Langner, M., 2020. Mechanical Properties Determination of DMPC, DPPC, DSPC, and HSPC Solid-Ordered Bilayers. *Langmuir* 36, 3826–3835. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00475>
- Gleason, L.N., Vogh, B.P., 1971. Deformylation of 4,4'-diformamidodiphenyl sulfone (DFD) by plasma of certain mammals. *Biochem. Pharmacol.* 20, 2409–2416. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90241-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90241-3)
- Halling, K.K., Ramstedt, B., Nyström, J.H., Slotte, J.P., Nyholm, T.K.M., 2008. Cholesterol Interactions with Fluid-Phase Phospholipids: Effect on the Lateral Organization of the Bilayer. *Biophys. J.* 95, 3861–3871. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.133744>
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., Benoit, J.-P., 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19, 875–880.
- Hoarau, D., Delmas, P., David, S., Roux, E., Leroux, J.-C., 2004. Novel Long-Circulating Lipid Nanocapsules. *Pharm. Res.* 21, 1783–1789. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000045229.87844.21>
- Horowitz, A.T., Barenholz, Y., Gabizon, A.A., 1992. In vitro cytotoxicity of liposome-encapsulated doxorubicin: dependence on liposome composition and drug release. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1109, 203–209. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90084-Y](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90084-Y)
- Hothi, S.S., Gurung, I.S., Heathcote, J.C., Zhang, Y., Booth, S.W., Skepper, J.N., Grace, A.A., Huang, C.L.-H., 2008. Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 457, 253–270. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0508-3>
- Kumar, N., Gupta, S., Dabral, S., Singh, S., Sehrawat, S., 2017. Role of exchange protein directly activated by cAMP (EPAC1) in breast cancer cell migration and apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 430, 115–125. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-2959-3>
- Lacoeuille, F., Hindre, F., Moal, F., Roux, J., Passirani, C., Couturier, O., Cales, P., Le Jeune, J.J., Lamprecht, A., Benoit, J.P., 2007. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a

promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int. J. Pharm.* 344, 143–149.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.014>

Laurent, A.-C., Bissierier, M., Lucas, A., Tortosa, F., Roumieux, M., De Régibus, A., Swiader, A., Sainte-Marie, Y., Heymes, C., Vindis, C., Lezoualc'h, F., 2015. Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 105, 55–64.

Lorenz, R., Aleksic, T., Wagner, M., Adler, G., Weber, C., 2008. The cAMP/Epac1/Rap1 Pathway in Pancreatic Carcinoma. *Pancreas* 37, 102–103.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318160748f>

McPhee, I., Gibson, L.C.D., Kewney, J., Darroch, C., Stevens, P.A., Spinks, D., Cooreman, A., MacKenzie, S.J., 2005. Cyclic nucleotide signalling: a molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 3.

Metrich, M., Berthouze, M., Morel, E., Crozatier, B., Gomez, A.M., Lezoualc'h, F., 2010. Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 535–546.

Middeldorp, C.M., Vink, J.M., Hetteema, J.M., de Geus, E.J.C., Kendler, K.S., Willemsen, G., Neale, M.C., Boomsma, D.I., Chen, X., 2010. An association between Epac-1 gene variants and anxiety and depression in two independent samples. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153B, 214–219.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30976>

Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Peter Slotte, J., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41, 66–97.
[https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0)

Perrier, T., Saulnier, P., Fouchet, F., Lautram, N., Benoît, J.-P., 2010. Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms. *Int. J. Pharm.* 396, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.019>

Prajapati, R., Fujita, T., Suita, K., Nakamura, T., Cai, W., Hidaka, Y., Umemura, M., Yokoyama, U., Knollmann, B.C., Okumura, S., Ishikawa, Y., 2019. Usefulness of Exchanged Protein Directly Activated by cAMP (Epac)1-Inhibiting Therapy for Prevention of Atrial and Ventricular Arrhythmias in Mice. *Circ. J.* 83, 295–303.
<https://doi.org/10.1253/circj.CJ-18-0743>

Robichaux, W.G., Cheng, X., 2018. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiol. Rev.* 98, 919–1053.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2017>

- Sun, D.-P., Fang, C.-L., Chen, H.-K., Wen, K.-S., Hseu, Y.-C., Hung, S.-T., Uen, Y.-H., Lin, K.-Y., 2017. EPAC1 overexpression is a prognostic marker and its inhibition shows promising therapeutic potential for gastric cancer. *Oncol. Rep.* 37, 1953–1960. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5442>
- Takenaga, N., Hasegawa, T., Ishii, M., Ishizaki, H., Hata, S., Kamei, T., 1998. In vitro metabolism of a new anticancer agent, 6-N-formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-(β -D-glucopyranosil)5H-indolo [2,3-A]pyrrolo [3,4-C]carbazole-5,7(6H)-dione (NB-506), in mice, rats, dogs, and humans. *Drug Metab. Dispos.* 27, 213–220.
- Thackaberry, E.A., Wang, X., Schweiger, M., Messick, K., Valle, N., Dean, B., Sambrone, A., Bowman, T., Xie, M., 2014. Solvent-based formulations for intravenous mouse pharmacokinetic studies: tolerability and recommended solvent dose limits. *Xenobiotica* 44, 235–241. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845706>
- Thompson, M., 1992. NTP Technical Report on toxicity studies of formic acid (CAS 64-18-6) administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic. Rep. Ser.*
- Uster, P.S., Allen, T.M., Daniel, B.E., Mendez, C.J., Newman, M.S., Zhu, G.Z., 1996. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett.* 386, 243–246. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00452-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00452-8)
- Watkins, E.B., El-khouri, R.J., Miller, C.E., Seaby, B.G., Majewski, J., Marques, C.M., Kuhl, T.L., 2011. Structure and Thermodynamics of Lipid Bilayers on Polyethylene Glycol Cushions: Fact and Fiction of PEG Cushioned Membranes. *Langmuir* 27, 13618–13628. <https://doi.org/10.1021/la200622e>
- World Health Organization, 2020. World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: WHO.
- Zhang, M., Zheng, J., Wang, W., Kong, F., Wu, X., Jiang, J., Pan, J., 2019. Exchange-protein activated by cAMP (EPAC) regulates L-type calcium channel in atrial fibrillation of heart failure model. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23, 2200–2207.

Supplementary for Toussaint et al. "Stability, pharmacokinetics, and biodistribution in mice of the EPAC1 inhibitor (R)-CE3F4 entrapped in liposomes and lipid nanocapsules"

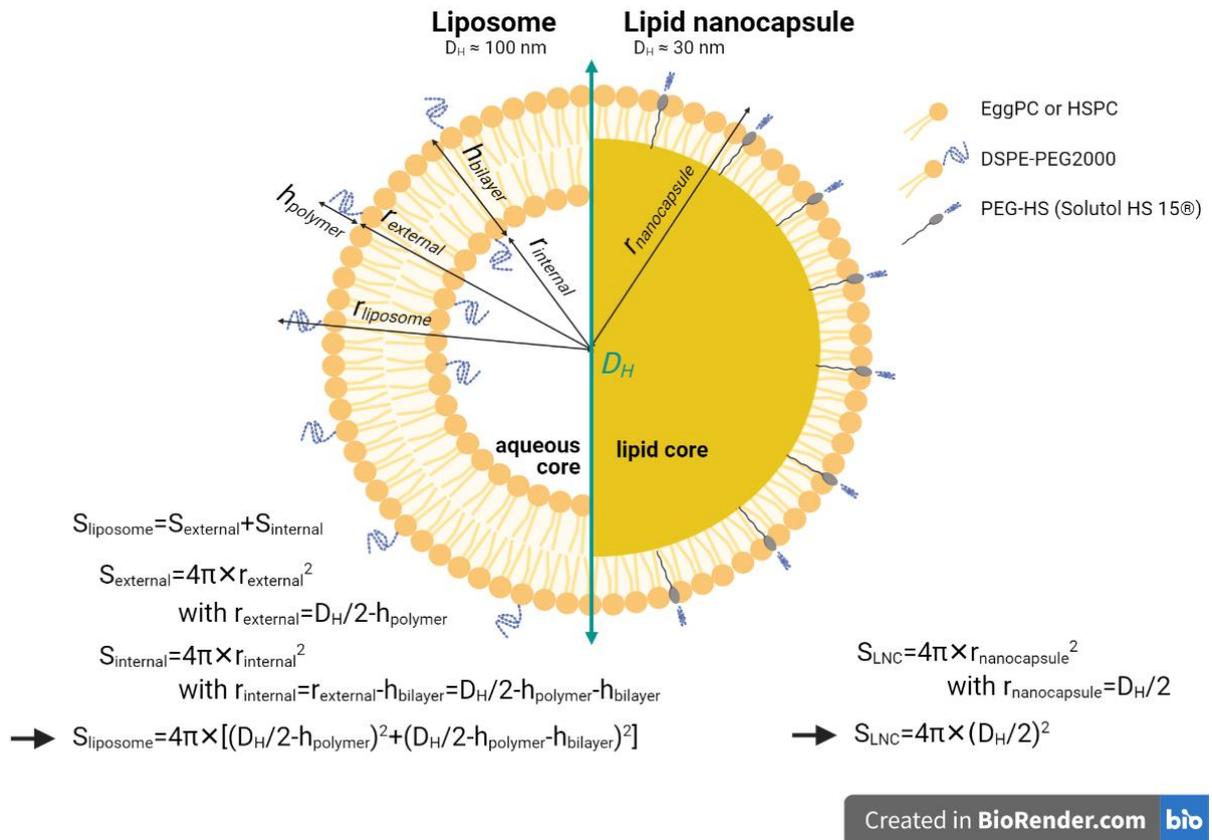
Suppl. Methods

Suppl. Table 1. Proportions of (R)-CE3F4 and lipids used for CE3F4 encapsulation in TPGS-liposomes.

TPGS-liposomes formulations		TPGS _{Low}	TPGS _{Medium}	TPGS _{High}	TPGS _{Medium-Chol_{Low}}	TPGS _{Medium-Chol_{Medium}}	TPGS _{Medium-Chol_{High}}
[(R)-CE3F4] (mM)		2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85
[Lipids] concentration (mM)		25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
(R)-CE3F4/lipid ratio (mol/mol)		11.4%	11.4%	11.4%	11.4%	11.4%	11.4%
Lipid molar proportion (n/n _{total lipids})	EggPC	79.7%	64.7%	49.7%	49.7%	39.7%	29.7%
	Cholesterol	-	-	-	15.0%	25.0%	35.0%
	DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%
	TPGS	15.0%	30.0%	45.0%	30.0%	30.0%	30.0%

Suppl. Table 2. Proportions of (R)-CE3F4 and lipids used for CE3F4 encapsulation in DOBA-liposomes.

DOBA-liposomes formulations		DOBA _{Low}	DOBA _{Medium}	DOBA _{High}	DOBA _{Medium-Chol_{Low}}	DOBA _{Medium-Chol_{Medium}}	DOBA _{Medium-Chol_{High}}
[(R)-CE3F4] (mM)		2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85
[Lipids] concentration (mM)		25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
(R)-CE3F4/lipid ratio (mol/mol)		11.4%	11.4%	11.4%	11.4%	11.4%	11.4%
Lipid molar proportion (n/n _{total lipids})	EggPC	79.7%	64.7%	49.7%	49.7%	39.7%	29.7%
	Cholesterol	-	-	-	15.0%	25.0%	35.0%
	DSPE-PEG ₂₀₀₀	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%	5.3%
	DOBA	15.0%	30.0%	45.0%	30.0%	30.0%	30.0%



Suppl. Figure 1. Structural organization of a liposome (left) and a lipid nanocapsule (right), and related surface's calculations. D_H : hydrodynamic diameter.

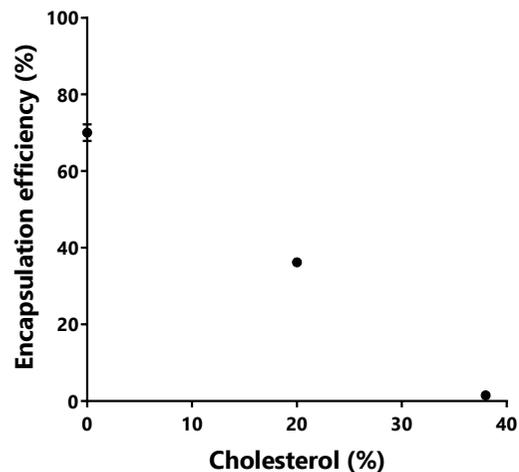
Suppl. Table 3. Properties of surfactants used for liposomes or lipid nanocapsules formulations.

Formulation	Surfactant	EggPC	HSPC	DSPE-PEG ₂₀₀₀	PEG-HS
		Molecular mass (g/mol)	770	784	2805
Liposomes (bilayer)	Mean area per surfactant molecule in bilayer (nm ²)	0.61 (POPC) ⁽¹⁾	0.46 ⁽¹⁾	0.38 ⁽²⁾	-
	Membrane thickness (nm)	3.43 (POPC) ⁽¹⁾	4.29 ⁽¹⁾	4.50 ⁽²⁾	-
	Polymer thickness (nm)	-	-	3.80* ⁽²⁾	Unknown
LNC (monolayer)	Area per surfactant molecule in monolayer (nm ²)	0.65 (POPC) ⁽¹⁾	-	-	0.43 ⁽³⁾

*: Polymer thickness for a DSPE-PEG₂₀₀₀ proportion of 5% (mol/mol)

(1) (Drabik et al., 2020); (2): (Watkins et al., 2011); (3): (Lacoeuille et al., 2007)

Suppl. Results



Suppl. Figure 2. Influence of the cholesterol proportion on (*R*)-CE3F4 encapsulation efficiency for liposomes made with HSPC.

Suppl. Table 4. Results on EE%, and (*R*)-CE3F4's apparent half-life in murine plasma for TPGS-liposomes.

TPGS-liposomes formulations	TPGS _{Low}	TPGS _{Medium}	TPGS _{High}	TPGS _{Medium} -Chol _{Low}	TPGS _{Medium} -Chol _{Medium}	TPGS _{Medium} -Chol _{High}
EE (%)	99.6	97.6	102.4	101.3	92.4	36.6
(<i>R</i>)-CE3F4's apparent $t_{1/2}$ in murine plasma (h)	0.70	0.74	0.77	0.73	0.73	0.85

Suppl. Table 5. Results on EE%, and (*R*)-CE3F4's apparent half-life in murine plasma for DOBA-liposomes.

DOBA-liposomes formulations	DOBA _{Low}	DOBA _{Medium}	DOBA _{High}	DOBA _{Medium} -Chol _{Low}	DOBA _{Medium} -Chol _{Medium}	DOBA _{Medium} -Chol _{High}
EE (%)	86.9	84.5	57.4	88.8	32.3	23.7
(<i>R</i>)-CE3F4's apparent $t_{1/2}$ in murine plasma (h)	0.74	0.71	0.72	0.71	0.75	0.72

Suppl. Table 6. Detailed steps and calculated parameters used to estimate the potential (\mathcal{R})-CE3F4 surface density and the number of (\mathcal{R})-CE3F4 molecules per liposome (EggPC, HSPC) or lipid nanocapsule (LNC₁, LNC₁-CE3F4_{High}).

Step	Parameter	Liposomes		Lipid nanocapsules	
		EggPC	HSPC	LNC ₁	LNC ₁ -CE3F4 _{High}
Calculation of the virtual surfactant surface	EggPC (molecules/mL)	1.26×10^{19}	-	7.12×10^{18}	7.12×10^{18}
	HSPC (molecules/mL)	-	1.10×10^{19}	-	-
	DSPE-PEG ₂₀₀₀ (molecules/mL)	7.05×10^{17}	6.14×10^{17}	-	-
	PEG-HS (molecules/mL)	-	-	3.19×10^{19}	3.19×10^{19}
	Total surface's tensioactives calculated (nm ² /mL)	7.95×10^{18}	5.28×10^{18}	1.83×10^{19}	1.83×10^{19}
Estimation of the total surface of one particle	D _H measured (nm)	90.0	106	29.3	29.6
	Outer surface (nm ² /particle)	21331	30419	2697	2753
	Inner surface (nm ² /particle)	17927	25345	-	-
	Total particle's surfaces (nm ² /particle)	39258	55764	2697	2753
Estimation of the number CE3F4 molecules per	CE3F4 (molecules/mL)	1.46×10^{18}	1.20×10^{18}	1.56×10^{18}	2.99×10^{18}
	Number of particles/mL	2.03×10^{14}	9.47×10^{13}	6.81×10^{15}	6.66×10^{15}
	Surface density of CE3F4 (CE3F4/nm ² of lipids)	0.18	0.23	0.09	0.16
	Number of CE3F4/particle	7187	12680	229	449

References for the Supporting Information

- Drabik, D., Chodaczek, G., Kraszewski, S., Langner, M., 2020. Mechanical Properties Determination of DMPC, DPPC, DSPC, and HSPC Solid-Ordered Bilayers. *Langmuir* 36, 3826–3835. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00475>
- Lacoeuille, F., Hindre, F., Moal, F., Roux, J., Passirani, C., Couturier, O., Cales, P., Le Jeune, J.J., Lamprecht, A., Benoit, J.P., 2007. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* 344, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.014>
- Watkins, E.B., El-khoury, R.J., Miller, C.E., Seaby, B.G., Majewski, J., Marques, C.M., Kuhl, T.L., 2011. Structure and Thermodynamics of Lipid Bilayers on Polyethylene Glycol Cushions: Fact and Fiction of PEG Cushioned Membranes. *Langmuir* 27, 13618–13628. <https://doi.org/10.1021/la200622e>

Discussion Générale

L'intérêt du CE3F4 pour l'inhibition d'EPAC1 a été mis en lumière il y a moins de 10 ans. Cette molécule a d'abord été utilisée comme outil pour la compréhension du rôle d'EPAC1 dans des mécanismes cellulaires (1,2). La première étude *in vivo* utilisant le CE3F4 date de 2019 et s'est intéressée à l'utilisation de cette molécule de façon préventive pour limiter les arythmies sur un modèle murin (3). Les auteurs ont suivi une réponse physiologique cardiaque, mais n'ont pas réalisé d'études du devenir de cette molécule chez la souris. Les travaux décrits dans ce manuscrit sont, par conséquent, les premiers à s'intéresser au devenir du CE3F4 chez l'animal. Des informations fondamentales ont été obtenues tant sur des aspects biologiques (biodistribution chez la souris, différences métaboliques interespèces avec métabolisme plasmatique très important chez la souris) que sur des aspects pharmacotechniques (solubilité, encapsulation du CE3F4 dans différentes nanoparticules lipidiques). En particulier, le CE3F4 a présenté une distribution très rapide en dehors du compartiment sanguin. Cependant, la cible EPAC1 est ubiquitaire. Il est donc indispensable d'adresser spécifiquement le CE3F4 au tissu cardiaque en référence à ce que nous avons décrit dans la partie bibliographique de ce mémoire.

En plus d'avoir développé une méthode permettant la quantification du CE3F4 en milieu plasmatique, un mécanisme de métabolisation plasmatique exclusivement murin a été mis en évidence comparativement au plasma humain. Dans le cadre d'un développement de potentiels médicaments, cette information est cruciale pour la mise au point d'études adaptées au stade préclinique, pour la modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD), ainsi que pour la transposition du stade préclinique au stade clinique, qui rappelons-le est critique et sujette à des problèmes de non reproductibilité ainsi que de non efficacité (4–10).

1. Développement analytique pour le dosage plasmatique du CE3F4

1.1. Validation et recherche d'un inhibiteur enzymatique efficace

La méthode de dosage LC-UV a été validée initialement pour le dosage du CE3F4 dans le plasma humain pour des concentrations comprises entre 0,40 et 150 µg/mL selon des spécifications compatibles avec celles fournies par l'Agence Européenne du Médicament pour la validation des méthodes en bioanalyse. Elle a pu être transposée et validée avec succès pour le dosage du CE3F4 dans le plasma de souris. Il est intéressant de préciser que cette méthode a été validée sur des plasmas d'espèces différentes, sur des chaînes LC-UV différentes, et avec plusieurs années d'écart. Ceci permet de conforter la robustesse du procédé utilisé pour le traitement des échantillons, et être confiant dans l'application de cette méthode par d'autres laboratoires.

Grâce à cette méthode, une différence majeure de métabolisme a été mise en évidence, avec une métabolisation très importante et rapide du CE3F4 dans le plasma de souris. Ainsi, pour les études *in vivo*, il a été indispensable de rechercher un inhibiteur enzymatique permettant de limiter la dégradation du CE3F4 entre le moment où le sang de la souris est prélevé et la précipitation des protéines plasmatiques par les solvants organiques (éthanol et acétonitrile). Comme mentionné dans la première partie expérimentale, l'hydrolyse de la liaison N-formamide du CE3F4 a été suggérée et confirmée par des analyses en LC-MS/MS. Pour obtenir une inhibition enzymatique suffisante, différents inhibiteurs d'hydrolases ont été étudiés à différentes concentrations : le paraoxon, le bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) et le benzile. Seul le paraoxon a permis une inhibition de la dégradation du CE3F4, et sa stabilisation suffisante dans les échantillons sanguins.

Ainsi, en plus d'avoir validé la méthode de quantification du CE3F4 dans le plasma de deux espèces (humain, souris), l'hydrolyse de la liaison N-formamide du

CE3F4 a été identifiée comme voie de dégradation principale dans le plasma murin, cependant l'enzyme concernée n'a pas été identifiée.

1.2. Hypothèses sur l'enzyme impliquée dans la dégradation plasmatique du CE3F4

Concernant l'enzyme responsable de la dégradation du CE3F4, une première hypothèse est l'implication de l'aryl-formylamine amidohydrolase (connue sous le nom de kynurénine formamidase, ou AFMID). Cette enzyme est connue pour hydrolyser les liaisons N-formamide. Elle est impliquée dans le métabolisme du tryptophane (11) et elle est inhibée par le paraoxon (12). Cette enzyme fait partie de la superfamille des α/β hydrolases (13) et présente une triade catalytique de trois acides aminés au niveau de son site actif : un nucléophile, un basique et un acide, avec par exemple la triade sérine-histidine-aspartate présente notamment au niveau du site actif de la chymotrypsine (14,15). La superfamille des α/β hydrolases inclut les cholinestérases telles que l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE), et inclut aussi les carboxylestérases (CE) (16). L'AFMID, l'AChE, la BChE et les CE sont toutes sensibles à l'action inhibitrice du paraoxon, avec des concentrations inhibitrices médianes (IC50) similaires (17,18). D'une part Oesch-Bartlomowicz et Oesch ont reporté dans leurs travaux que les mêmes enzymes peuvent catalyser l'hydrolyse des esters ou des formamides (19), d'autre part Liederer et Borchardt ont souligné le fait que certaines estérases ne sont pas limitées à un seul type de réaction ou à l'hydrolyse d'un seul et unique substrat (20). Ce dernier point a notamment été confirmé *in vivo* par Dobrovolsky et al. sur des souris déficientes en AFMID (11). L'hypothèse formulée suggère aussi l'implication d'estérases telles que les cholinestérases ou les carboxylestérases qui hydrolyseraient la liaison N-formamide du CE3F4. Les estérases peuvent être classées en trois groupes (A, B et C) selon leurs interactions avec les composés organophosphorés (OP) (19). Les A-estérases peuvent métaboliser les OP et peuvent être inhibées par l'EDTA (21), les B-estérases sont fortement inhibées par les OP, alors que les C-estérases n'interagissent pas avec les

OP. Dans le groupe des B-estérases, 3 sous-groupes ont été identifiés : AChE, BChE, et CE. Toutes les B-estérases sont inhibées par le paraoxon (20). De plus, il est intéressant de noter que les CE ne sont pas présentes dans le plasma humain à l'opposé du plasma de souris (22), ce qui pourrait expliquer les résultats observés concernant la différence de métabolisation du CE3F4 entre les plasmas humain et murin. L'organisation des enzymes citées ainsi que leurs propriétés particulières sont résumées dans la **Figure 1**.

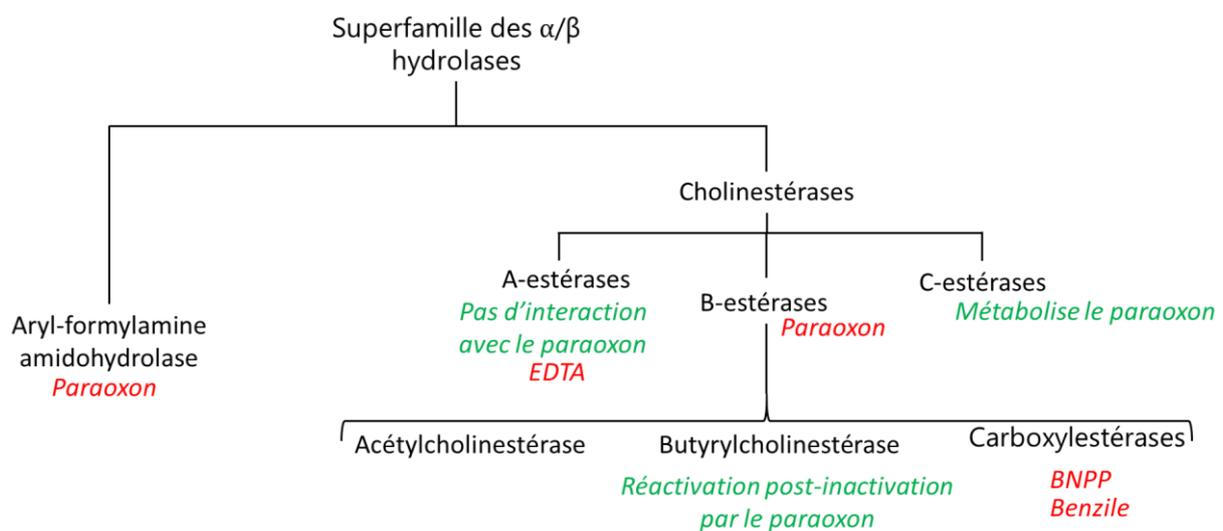


Figure 1 : Résumé de l'organisation des enzymes citées appartenant à la superfamille des α/β hydrolases. En rouge, les inhibiteurs enzymatiques. En vert, les propriétés particulières des enzymes. BNPP : bis(4-nitrophenyl) phosphate ; EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique.

Dans la première partie expérimentale, différents inhibiteurs ont été testés pour le traitement d'échantillons plasmatiques : l'EDTA, le paraoxon, le bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) et le benzile. Le paraoxon inhibe toutes les B-estérases. Le BNPP inhibe spécifiquement et irréversiblement les phosphodiesterases (23), les CE (24,25) au sein du groupe des B-estérases et n'a aucune activité sur la BChE (26). Le benzile quant à lui inhibe spécifiquement les CE et de manière réversible, et n'a aucune action sur l'AChE et la BChE (27–29). D'après les résultats observés *in vitro*, le paraoxon a permis une inhibition enzymatique et les autres

inhibiteurs testés étaient sans effet. L'AFMID, l'AChE et la BChE pourraient donc hydrolyser le CE3F4. Parmi les résultats obtenus, une dégradation importante du CE3F4 a été observée après 3 jours à 5°C dans le plasma de souris en présence de paraoxon, alors que l'inhibition était totale pendant une heure à 37°C et que le paraoxon est connu pour exercer une inhibition irréversible. Il s'avère que la réactivation spontanée de BChE chez la souris après une inhibition par un OP a été décrite par Li et al. (22). Ainsi, d'après l'ensemble des résultats et les spécificités des estérases, la BChE pourrait être à l'origine de l'hydrolyse du CE3F4 (**Figure 1**).

Pour conclure, l'AFMID ou la BChE pourraient être impliquées dans la dégradation plasmatique du CE3F4. Des expériences restent à envisager pour confirmer l'enzyme mise en jeu dans la dégradation du CE3F4. Cela permettrait l'utilisation d'un inhibiteur spécifique et/ou moins toxique que le paraoxon pour la stabilisation du CE3F4 lors du traitement des échantillons biologiques, ou même d'envisager *in vivo* une co-administration avec le CE3F4 si l'inhibiteur ne présente aucune toxicité.

2. Formulation du CE3F4 à l'aide de nanovecteurs lipidiques

2.1. Discussion sur les formulations mises au point

Au cours des études présentées dans la seconde partie expérimentale, deux types de nanoparticules lipidiques ont été utilisées pour l'encapsulation du CE3F4 : des liposomes ou des nanocapsules lipidiques (NCL) (**Tableau 1**). En ce qui concerne les liposomes, seul le ratio molaire de DSPE-PEG2000 n'a pas varié, les proportions des composants ont été modulées pour favoriser l'encapsulation. Pour l'ensemble des formulations étudiées, seule la proportion de cholestérol a influé négativement les taux d'encapsulation du CE3F4. Lorsque le cholestérol était absent, le CE3F4 a pu être encapsulé avec succès dans l'ensemble des cas de figures, avec des concentrations apparentes de l'ordre de 1 mg/mL, alors que la solubilité aqueuse observée était de 14 µg/mL. Il est ainsi ressorti que l'encapsulation du CE3F4 dans ces types de

particules lipidiques était possible et que seule la présence de cholestérol limitait significativement cette encapsulation dans les conditions étudiées.

Tableau 1 : Résumé des lipides utilisés dans la deuxième partie expérimentale en fonction du type de particule lipidique (U : utilisé ; NU : non utilisé)

Lipide	Rôle(s)	Liposomes	Nanocapsules lipidiques
EggPC	Emulsifiant	U	U
HSPC	Emulsifiant	U	NU
DSPE-PEG2000	Tensioactif, furtivité	U	NU
Solutol HS15	Tensioactif, furtivité	NU	U
DOBA	Tensioactif	U	NU
TPGS	Tensioactif, antioxydant	U	NU
Cholestérol	Fluidité membranaire	U	NU
Miglyol	Compartiment huileux	NU	U

L'hypothèse d'une compétition au niveau d'une localisation commune du cholestérol et du CE3F4 au sein des membranes a été avancée. Boulton et al. ont observé des interactions entre le CE3F4 et un tensioactif (Triton X-100) (30). Le CE3F4 se positionne à l'interface des micelles formées par le tensioactif, avec exposition du groupement N-formyl en surface, le reste de la molécule ayant des interactions hydrophobes avec le noyau aromatique et la chaîne carbonée du triton X-100. Or ce positionnement est également observé avec le cholestérol dont le groupement hydroxyle interagit avec les têtes polaires des phospholipides en surface, alors que le noyau stéroïde interagit avec les chaînes carbonées de ces phospholipides (31). Deniz et al. ont observé une compétition entre une substance active (le celecoxib, qui interagit lui aussi avec les têtes polaires des phospholipides) et le cholestérol dans les membranes lipidiques, ce dernier diminuant l'encapsulation de la molécule (32). Ainsi, une compétition entre le CE3F4 et le cholestérol au niveau des membranes semble probable, mais des études complémentaires sont à mener afin de confirmer cette hypothèse (par exemple par calorimétrie différentielle à balayage).

Le **Tableau 2** synthétise les informations qui concernent l'encapsulation du CE3F4 dans les liposomes et les NCL, l'impact des formulations sur la protection du CE3F4 dans le plasma murin (*in vitro*) et les essais *in vivo*. Il est à noter que le CE3F4 est une molécule qui a entraîné plusieurs difficultés au cours du projet. Elle est peu soluble dans l'eau, adsorbée sur les plastiques, et instable dans les milieux biologiques. Ces observations ont aussi été réalisées par l'équipe de la plateforme SMArt-MS (responsable Alain Pruvost, Service de Pharmacologie et Immunoanalyse, CEA Saclay) dans le cadre du projet global au sein du Labex LERMIT. Ces propriétés limitent les possibilités d'évaluation de la libération du CE3F4 en dehors des nanoparticules via l'utilisation de membranes de dialyse, d'unité d'ultrafiltration, ou d'une ultracentrifugation. Ainsi, l'évaluation de la cinétique de libération du CE3F4 en milieu biologique depuis les nanoparticules n'a pas pu se faire de manière directe. Cependant, l'utilisation de la demi-vie apparente a permis d'évaluer leur capacité à protéger le CE3F4 de la dégradation enzymatique en posant l'hypothèse suivante : si le CE3F4 reste encapsulé en milieu biologique, il ne peut pas être dégradé, donc un allongement de la demi-vie apparente serait alors observé. Cette approche a permis de rationaliser la sélection des formulations en vue d'une administration chez l'animal.

Tableau 2 : Résumé des caractéristiques principales des nanovecteurs testés dans la deuxième partie expérimentale

Critère de comparaison	Liposomes	Nanocapsules lipidiques
Densité maximale du CE3F4 à la surface des particules (CE3F4/nm ²)	0,15 à 0,23	0,06 à 0,16
Nombre de CE3F4 par particule	7,2.10 ³ à 1,3.10 ⁴	1,7.10 ² à 5,0.10 ²
Demi-vie apparente <i>in vitro</i>	Pas d'amélioration par rapport à la molécule libre	Augmentation d'un facteur 2,7 à 5,9
Pharmacocinétique du CE3F4 encapsulé	Pas d'amélioration par rapport à la molécule libre	Pas d'amélioration par rapport à la molécule libre
Biodistribution du ³ H-CE3F4	Non étudiée	Similaire à la molécule libre

La différence majeure observée entre les liposomes et les NCL réside dans la protection du CE3F4 *in vitro*, en milieu plasmatique murin. Les liposomes n'ont pas présenté d'impact notable dans la protection du CE3F4 vis-à-vis de la dégradation enzymatique.

Deux différences majeures entre liposomes et NCL sont à souligner :

- la différence structurale : des liposomes d'environ 100 nm ont été obtenus, ils sont formés par une bicouche lipidique dont l'épaisseur dépend des phospholipides utilisés [épaisseur de 3,4 nm pour l'EggPC et de 4,3 nm pour l'HSPC (33)], délimitant un cœur aqueux, et cette bicouche correspond au compartiment dans lequel le CE3F4 est potentiellement encapsulé ; les NCL sont des particules « pleines » (ici d'environ 30 nm) avec un cœur huileux, ainsi le compartiment d'encapsulation correspondrait plutôt à la particule dans sa totalité ;
- le nombre de molécules de CE3F4 par particule : entre $7,2 \cdot 10^3$ et $1,3 \cdot 10^4$ pour les liposomes testés, $1,7 \cdot 10^2$ et $5,0 \cdot 10^2$ pour les NCL.

La stabilité du CE3F4 dans les NCL peut donc être liée :

- au cœur lipidique qui permettrait une distribution particulière du CE3F4 ailleurs qu'à l'interface lipide/eau, sachant qu'une position à l'interface favorise la libération d'une molécule encapsulée vers le milieu de libération (32) ;
- à une quantité de CE3F4 par particule plus faible pouvant influencer la cinétique de diffusion d'une molécule encapsulée dans un milieu « donneur » (liposome/NCL) vers un milieu « receveur », le plasma de souris dans notre cas. D'après la loi de Fick, la vitesse de diffusion d'une molécule depuis un compartiment concentré (liposome/NCL) vers le compartiment moins concentré (plasma) est dépendante de la différence de concentration entre ces deux compartiments. Ainsi si le gradient est plus important, la vitesse de libération le sera aussi.

Concernant ce dernier point, il est intéressant de souligner que le milieu receveur (plasma) permet la solubilisation correcte du CE3F4 (>100 µg/mL), et que les enzymes plasmatiques dégradent le CE3F4 (plasma murin). Ainsi, il est impossible d'atteindre un équilibre entre les milieux donneurs et receveurs, et le CE3F4 est libéré jusqu'à métabolisation totale.

Bien que des différences aient pu être observées *in vitro* entre liposomes et NCL, aucune différence n'a pu être démontrée sur les profils pharmacocinétiques entre la molécule libre et celle encapsulée dans les liposomes ou dans les NCL. La biodistribution du ³H-CE3F4, vectorisé par les nanocapsules ou sous forme libre, témoigne d'une sortie du compartiment sanguin dès les 10 premières minutes de l'étude où moins de 15% de la dose injectée est retrouvée dans l'ensemble des tissus analysés (sang, cœur, foie, rate, reins). Ce comportement témoigne d'un grand volume de distribution du CE3F4, et compte tenu des quantités retrouvées dans les différents organes, cette distribution se ferait vers des tissus non étudiés tels que le tissu adipeux.

2.2. Autres formulations explorées

Au cours de ce travail, d'autres formulations de liposomes ou de NCL encapsulant le CE3F4 ont été étudiées en vue d'améliorer la protection du CE3F4 en limitant sa libération hors des particules. C'est indirectement, en suivant la dégradation du CE3F4 dans le plasma murin, que nous avons réalisé ces études.

2.2.1. Liposomes

Afin d'améliorer la stabilité du CE3F4 dans les liposomes, différentes approches ont été utilisées. Déjà mentionnée dans la partie expérimentale précédente, l'utilisation de TPGS ou de DOBA a été envisagée notamment en vue d'augmenter la stabilité par la mise en place d'interactions entre le noyau aromatique du CE3F4 et celui des deux lipides testés (π - π *stacking*). L'observation d'une cinétique

de dégradation du CE3F4 similaire aux formulations liposomales de référence (EggPC ou HSPC, avec ou sans cholestérol) a montré une absence d'effet bénéfique.

L'influence de la structure des liposomes sur la rétention du CE3F4 encapsulé a également été étudiée. En effet, les liposomes testés devraient présenter une structure unilamellaire à la suite de l'étape d'extrusion sur membrane de polycarbonate ayant un diamètre de pores de 0,1 μm . C'est pourquoi une organisation multilamellaire a été testée afin d'augmenter le nombre de bicouches entourant la phase aqueuse et donc de potentiellement limiter le phénomène de diffusion. Les particules testées furent celles obtenues après l'étape d'hydratation du film lipidique, qui permet la formation spontanée de vésicules multilamellaires de tailles variables. Une dégradation rapide du CE3F4 a été observée avec ces particules, sans gain par rapport aux autres formulations testées.

Une solubilisation du CE3F4 par des cyclodextrines (CD) a aussi été envisagée afin d'augmenter la solubilité apparente du CE3F4 pour une encapsulation dans le cœur aqueux des liposomes, et ainsi favoriser la rétention du CE3F4. Des α -CD, méthyl- β -CD, hydroxypropyl- β -CD, sulfobutylether- β -CD, et γ -CD ont été utilisées pour solubiliser le CE3F4. La solubilité apparente du CE3F4 en présence de ces différentes CD restait trop faible pour permettre une encapsulation dans les liposomes. Même pour des concentrations en CD supérieures à 25 mg/mL, il n'était pas possible d'obtenir une concentration finale en CE3F4 de l'ordre de 625 $\mu\text{g/mL}$, cette valeur ayant été définie par extrapolation des résultats cellulaires obtenues par l'équipe de Rodolphe Fischmeister (INSERM UMR-S 1180, Université Paris-Saclay), et a servi de valeur de référence obtenue pour les autres formulations. De plus, il est à noter que parmi les β -CD testées, la méthyl- β -CD n'aurait pas pu être envisagée pour une application *in vivo* en raison de sa toxicité par voie intraveineuse (34).

2.2.2. Nanocapsules lipidiques

L'impact de la composition des NCL a aussi été étudié de façon préliminaire. La DPPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine) a été utilisée en remplacement de l'EggPC, le DSPE-PEG en remplacement du Solutol HS15 (diminution de la quantité de Solutol présente), et même le cholestérol a pu être ajouté dans une formulation connue (ajout à la formulation « LNC₁ » présentée dans la partie expérimentale précédente). Pour l'ensemble des formulations explorées, la quantité de CE3F4 était constante et similaire aux formulations décrites précédemment. Les résultats observés sur la cinétique de dégradation du CE3F4 dans le plasma murin étaient similaires, quelle que soit la formulation mentionnée. Le facteur prépondérant restait le ratio initial de CE3F4 par rapport aux lipides comme décrit dans le deuxième chapitre expérimental.

2.3. Corrélation entre la stabilité plasmatique du CE3F4 et les paramètres de formulation

En l'absence de données publiées sur l'impact des différents paramètres de formulation sur la stabilité d'encapsulation du CE3F4 au sein des liposome ou des NCL, une étude a posteriori a été effectuée sur l'ensemble des formulations testées *in vitro*, afin de mettre en évidence les paramètres de formulation pouvant améliorer la demi-vie apparente du CE3F4.

2.3.1. Choix des facteurs explicatifs

A partir de nombreux essais de formulation dans des conditions différentes, une matrice de corrélation de Pearson a été utilisée. Cette matrice permet de déterminer des corrélations entre des facteurs explicatifs et/ou des observations pris deux à deux. Ainsi on peut vérifier la redondance de l'information ou mettre en évidence des paramètres particuliers pour expliquer des observations. Au total, 37 formulations de compositions différentes ont été testées dans le plasma de souris (27 liposomes, 10 nanocapsules lipidiques). Différentes variables ont été sélectionnées pour expliquer la capacité des nanoparticules à stabiliser le CE3F4 dans le plasma de

souris (évaluation via la demi-vie apparente observée). Ces variables explicatives sont :

- le type de nanoparticules (liposomes ou nanocapsules lipidiques) ;
- la concentration en CE3F4 dans les formulations ;
- le ratio molaire CE3F4/agent de surface (tensioactif/émulsifiant) ;
- spécifiquement pour les liposomes :
 - o le ratio molaire CE3F4/cholestérol ;
 - o le ratio molaire CE3F4/lipides totaux ;
 - o la concentration molaire en lipides ;
- spécifiquement pour les nanocapsules lipidiques (NCL) :
 - o la proportion molaire CE3F4/phospholipides ;
 - o la proportion molaire CE3F4/Solutol HS15 ;
 - o le ratio massique CE3F4/lipides totaux ;
 - o la proportion massique entre Miglyol 812/milieux aqueux ;
 - o la proportion massique entre phospholipides/milieux aqueux ;
 - o la proportion massique entre Solutol HS15/milieux aqueux.

Ainsi, trois matrices de corrélation ont été générées : sur les liposomes seuls, sur les NCL seules, et sur l'ensemble des formules. Il est important de préciser que pour les calculs des quantités molaires tensioactifs, le Solutol HS15 est composé d'environ 30% en masse de PEG libre. Ainsi le calcul du nombre de moles de tensioactifs incluant ce produit a été fait grâce à la masse molaire du lipide PEGylé (963 g/mol), de sa proportion massique (70%) et de la masse de produit ajoutée.

2.3.2. Corrélations observées pour les liposomes

Concernant les liposomes, il apparaît une corrélation significative entre la concentration en lipides et la demi-vie apparente ($p\text{-value} = 4.10^{-4}$). En effet, le nombre de liposomes unilamellaires en suspension obtenus après extrusion sur membrane de polycarbonate dépend de la concentration en lipides car les liposomes

sont calibrés selon le diamètre des pores de la membrane (35). Ainsi, pour des conditions identiques d'extrusion, lorsque la concentration en lipides augmente, le nombre de particules augmente, et donc le CE3F4 est réparti dans un plus grand nombre de particules. Ainsi la teneur en CE3F4 par liposome diminue lorsque la concentration en lipides augmente. Comme mentionné précédemment, la vitesse de diffusion d'une molécule depuis un compartiment concentré vers le compartiment moins concentré est dépendante de la différence de concentration entre ces deux compartiments. Ainsi la corrélation observée semble cohérente.

2.3.3. Corrélations observées pour les nanocapsules lipidiques

Pour les NCL, il apparaît une corrélation négative entre la proportion de CE3F4 initiale et la demi-vie apparente (p -value = 0,008). Les dimensions des NCL étant relativement homogènes (de l'ordre de 30 nm), le taux de charge en CE3F4 par particules semble influencer la demi-vie apparente, comme évoqué précédemment pour les liposomes.

Une corrélation a pu être observée entre la proportion de Solutol HS15 et la demi-vie apparente (p -value = 0,03), cependant la corrélation la plus forte concerne le ratio CE3F4/agents de surface (p -value = 0,001) qui suggèrent qu'augmenter la proportion de ces agents (tensioactifs/émulsifiants) permet d'augmenter la demi-vie apparente du CE3F4, comme représenté sur la **Figure 2**.

2.3.4. Corrélations sur l'ensemble des formulations

S'il on s'intéresse à l'ensemble des formulations (liposomes & NCL) une corrélation très forte a pu être mise en évidence parmi l'ensemble des paramètres étudiés. La demi-vie apparente du CE3F4 est corrélée au ratio CE3F4/agents de surface (p -value = 9.10^{-12}). Ce ratio apparaît comme le seul paramètre explicatif pertinent pour l'ensemble des formulations de liposomes et de NCL (**Figure 2**). L'absence de ratios équivalents entre liposomes et NCL empêche une comparaison des formulations selon leur nature. Sur la **Figure 2**, si l'on s'intéresse à la formule

« CE3F4 solubilisé » par le PEG200 et le Solutol, la proportion d'agent de surface (ici uniquement le tensioactif et pas de phospholipides) est équivalente avec certaines formulations de NCL. Il apparaît une demi-vie apparente presque trois fois plus importante lorsque les NCL sont utilisées, et la formulation « CE3F4 solubilisé » est en dehors de la tendance formée par l'ensemble des formulations (liposomes + NCL). Ainsi, il semble que l'organisation des lipides en nanoparticules impacte positivement la demi-vie apparente du CE3F4.

Afin de confirmer ou infirmer ces observations, il pourrait être intéressant d'étudier l'impact du ratio CE3F4/agents de surface ainsi que la quantité de CE3F4 par nanoparticule, et ce pour les différents types de nanoparticules lipidiques. Etudier des conditions équivalentes entre les liposomes et les NCL permettrait de vérifier l'impact d'un cœur huileux sur la stabilisation du CE3F4. Cela permettrait d'éventuellement proposer un système plus adapté *in vivo* pour l'administration du CE3F4 encapsulé de manière stable, ou d'écartier complètement ces particules.

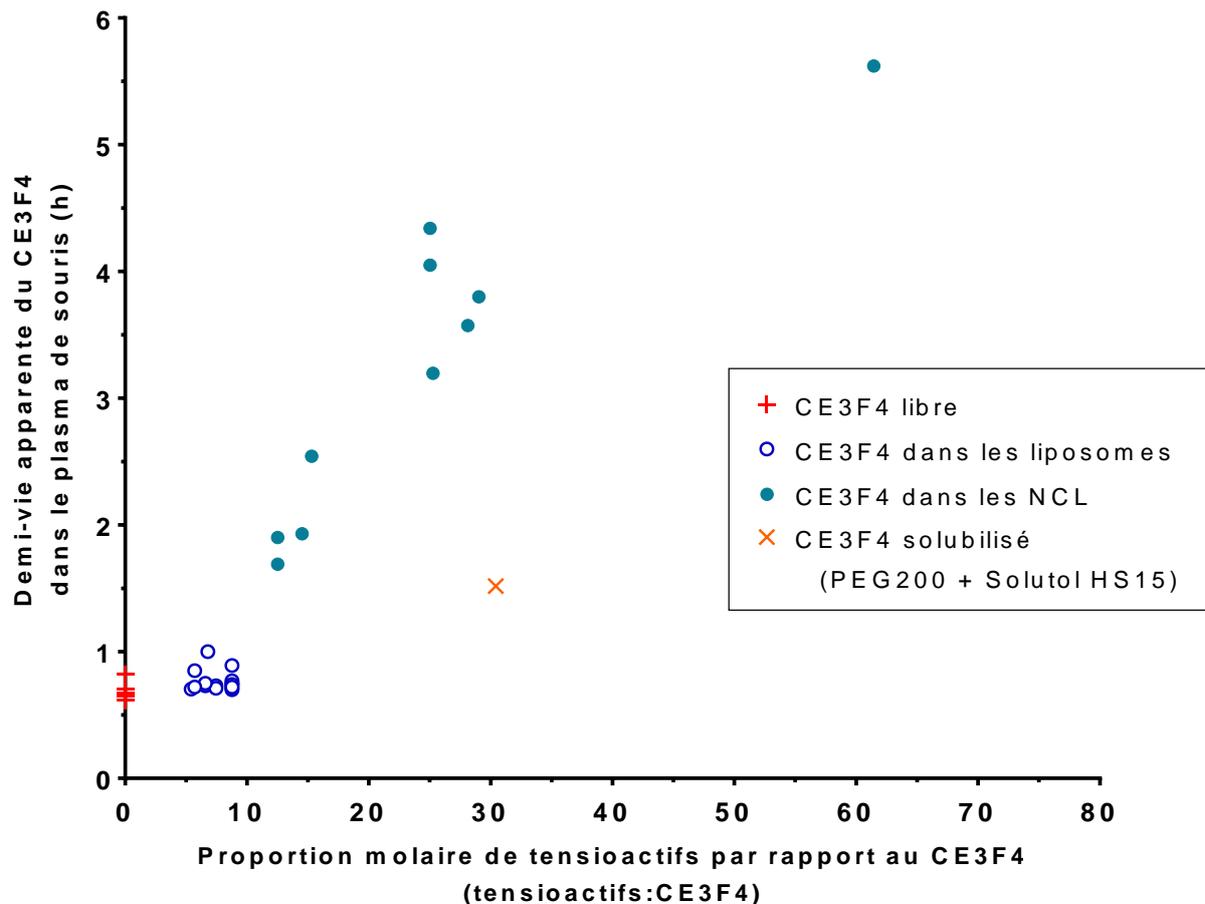


Figure 2 : Demi-vies apparentes du CE3F4 observées lors des différentes expériences de formulations dans les liposomes, les NCL (nanocapsules lipidiques), solubilisé par le PEG200 et le Solutol HS15, ou libre (solubilisé dans le DMSO).

2.4. Nouvelles stratégies pour l'inhibition d'EPAC1

2.4.1. Systèmes encapsulant le CE3F4

L'évolution du ratio $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ lors de l'étude de biodistribution a mis en évidence une instabilité de l'encapsulation du CE3F4 *in vivo*. Globalement, il est apparu que les formulations lipidiques n'ont pas permis une bonne rétention du CE3F4. Rappelons tout de même que le projet était ancré dans un cadre de ciblage cardiaque et que la cible est ubiquitaire. Les particules lipidiques (liposomes et NCL) ont été choisies en premier lieu car elles offraient l'avantage de pouvoir être fonctionnalisées par le même ligand de ciblage (peptide de ciblage greffé sur un lipide PEGylé), en utilisant

le même procédé de post-insertion (35–39). D'autres types de particules pourraient être envisagées. Les nanoparticules lipidiques solides pourraient augmenter la rétention du CE3F4 grâce à un cœur lipidique solide en utilisant des triglycérides ayant des températures de transition de phase supérieures à la température physiologique¹. Les NP polymériques peuvent aussi être envisagées pour encapsuler le CE3F4, comme celle composées d'acide polylactique (PLA) ou d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA). De plus, elles peuvent être fonctionnalisées en surface dans un but de ciblage cardiaque grâce à des polymères PLA-PEG-maléimide ou PLGA-PEG-maléimide, permettant des réactions avec les cystéines de protéines ou peptides de ciblage.

2.4.2. Utilisation d'analogues du CE3F4 pour l'inhibition d'EPAC1

Toujours dans le cadre des collaborations issues du Labex Lermite, l'équipe du laboratoire de chimie bioorganique (Yves Ambroise, CEA Saclay) a pu synthétiser différentes molécules apparentées au CE3F4. Certaines présentèrent une activité plus faible vis-à-vis d'EPAC1, cependant la lipophilie a pu être augmentée. Il pourrait aussi être envisagé le greffage d'un acide gras sur le CE3F4 pour former soit une prodrogue, soit nouvelle molécule active. Cependant, il faudra faire attention à la localisation de la liaison acide gras-CE3F4 car un greffage sur l'azote pourrait engendrer une perte d'activité du produit obtenu après hydrolyse, le CE3F4 N-déformylé étant inactif (1). L'encapsulation d'une molécule plus lipophile mais moins puissante est une option envisageable pour cibler EPAC1. Le CE3F4 se libérant quasi-instantanément d'après les données de biodistribution, un dérivé du CE3F4 permettrait de pallier ce problème grâce à des interactions plus favorables avec les lipides, augmentant la stabilité de l'encapsulation en milieux biologique.

¹ Les NCL formulées dans ce travail présentent un cœur lipidique liquide à température ambiante en raison de l'utilisation de Miglyol 812, qui est un mélange de triglycérides à chaînes moyennes (chaînes d'acides gras C8-C10).

Références bibliographiques

1. Courilleau D, Bissierier M, Jullian J-C, Lucas A, Bouyssou P, Fischmeister R, et al. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J Biol Chem*. 28 déc 2012;287(53):44192-202.
2. Courilleau D, Bouyssou P, Fischmeister R, Lezoualc'h F, Blondeau J-P. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochem Biophys Res Commun*. 25 oct 2013;440(3):443-8.
3. Prajapati R, Fujita T, Suita K, Nakamura T, Cai W, Hidaka Y, et al. Usefulness of Exchanged Protein Directly Activated by cAMP (Epac)1-Inhibiting Therapy for Prevention of Atrial and Ventricular Arrhythmias in Mice. *Circ J*. 25 janv 2019;83(2):295-303.
4. Freedman L, Gibson M. The Impact of Preclinical Irreproducibility on Drug Development. *Clin Pharmacol Ther*. janv 2015;97(1):16-8.
5. Tuntland T, Ethell B, Kosaka T, Blasco F, Zang RX, Jain M, et al. Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research. *Front Pharmacol*. 28 juill 2014;5.
6. Kimmelman J, Mogil JS, Dirnagl U. Distinguishing between Exploratory and Confirmatory Preclinical Research Will Improve Translation. Jones DR, éditeur. *PLoS Biol*. 20 mai 2014;12(5):e1001863.
7. Denayer T, Stöhr T, Roy MV. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *Eur J Mol Clin Med*. 27 août 2014;2(1):5.
8. de Vries RBM, Wever KE, Avey MT, Stephens ML, Sena ES, Leenaars M. The Usefulness of Systematic Reviews of Animal Experiments for the Design of Preclinical and Clinical Studies. *ILAR J*. 20 déc 2014;55(3):427-37.
9. Mager D, Jusko W. Development of Translational Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Models. *Clin Pharmacol Ther*. juin 2008;83(6):909-12.
10. Lalonde RL, Kowalski KG, Hutmacher MM, Ewy W, Nichols DJ, Milligan PA, et al. Model-based Drug Development. *Clin Pharmacol Ther*. juill 2007;82(1):21-32.
11. Dobrovolsky VN, Bowyer JF, Pabarcus MK, Heflich RH, Williams LD, Doerge DR, et al. Effect of arylformamidase (kynurenine formamidase) gene inactivation in mice on enzymatic activity, kynurenine pathway metabolites and phenotype. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 20 juin 2005;1724(1):163-72.

12. Bailey CB, Wagner C. Kynurenine Formamidase. *J Biol Chem.* juill 1974;249(14):4439-44.
13. Han Q, Robinson H, Li J. Biochemical identification and crystal structure of kynurenine formamidase from *Drosophila melanogaster*. *Biochem J.* 1 sept 2012;446(2):253-60.
14. Cai Y, Zhou G-P, Jen C-H, Lin S-L, Chou K-C. Identify catalytic triads of serine hydrolases by support vector machines. *J Theor Biol.* 21 juin 2004;228(4):551-7.
15. Marchot P, Chatonnet A. Enzymatic Activity and Protein Interactions in Alpha/Beta Hydrolase Fold Proteins: Moonlighting Versus Promiscuity. *Protein Pept Lett.* 1 févr 2012;19(2):132-43.
16. Lenfant N, Hotelier T, Velluet E, Bourne Y, Marchot P, Chatonnet A. ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res.* janv 2013;41(Database issue):D423-9.
17. Casida JE, Quistad GB. Organophosphate Toxicology: Safety Aspects of Nonacetylcholinesterase Secondary Targets. *Chem Res Toxicol.* août 2004;17(8):983-98.
18. Crow JA, Bittles V, Herring KL, Borazjani A, Potter PM, Ross MK. Inhibition of Recombinant Human Carboxylesterase 1 and 2 and Monoacylglycerol Lipase by Chlorpyrifos Oxon, Paraoxon and Methyl Paraoxon. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 janv 2012;258(1):145-50.
19. Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F. Mechanisms of Toxication and Detoxification which Challenge Drug Candidates and Drugs. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II* [Internet]. Elsevier; 2007 [cité 11 févr 2021]. p. 193-214. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B008045044X001243>
20. Liederer BM, Borchardt RT. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J Pharm Sci.* juin 2006;95(6):1177-95.
21. Gonzalvo MC, Gil F, Hernández AF, Villanueva E, Pla A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact.* 1 août 1997;105(3):169-79.
22. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol.* nov 2005;70(11):1673-84.

23. Kelly SJ, Dardinger DE, Butler LG. Hydrolysis of phosphonate esters catalyzed by 5'-nucleotide phosphodiesterase. *Biochemistry*. 4 nov 1975;14(22):4983-8.
24. Minagawa T, Kohno Y, Suwa T, Tsuji A. Species differences in hydrolysis of isocarbacyclin methyl ester (TEI-9090) by blood esterases. *Biochem Pharmacol*. 17 mai 1995;49(10):1361-5.
25. Yamaori S, Fujiyama N, Kushihara M, Funahashi T, Kimura T, Yamamoto I, et al. Involvement of Human Blood Arylesterases and Liver Microsomal Carboxylesterases in Nafamostat Hydrolysis. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(2):147-55.
26. Napon G, Dafferner AJ, Saxena A, Lockridge O. Identification of Carboxylesterase, Butyrylcholinesterase, Acetylcholinesterase, Paraoxonase, and Albumin Pseudoesterase in Guinea Pig Plasma through Nondenaturing Gel Electrophoresis. *Comp Med*. oct 2018;68(5):367-74.
27. Wadkins RM, Hyatt JL, Wei X, Yoon KJP, Wierdl M, Edwards CC, et al. Identification and Characterization of Novel Benzil (Diphenylethane-1,2-dione) Analogues as Inhibitors of Mammalian Carboxylesterases. *J Med Chem*. 1 avr 2005;48(8):2906-15.
28. Hyatt JL, Stacy V, Wadkins RM, Yoon KJP, Wierdl M, Edwards CC, et al. Inhibition of Carboxylesterases by Benzil (Diphenylethane-1,2-dione) and Heterocyclic Analogues Is Dependent upon the Aromaticity of the Ring and the Flexibility of the Dione Moiety. *J Med Chem*. août 2005;48(17):5543-50.
29. Tsurkan LG, Hatfield MJ, Edwards CC, Hyatt JL, Potter PM. Inhibition of human carboxylesterases hCE1 and hiCE by cholinesterase inhibitors. *Chem Biol Interact*. 25 mars 2013;203(1):226-30.
30. Boulton S, Selvaratnam R, Ahmed R, Van K, Cheng X, Melacini G. Mechanisms of Specific versus Nonspecific Interactions of Aggregation-Prone Inhibitors and Attenuators. *J Med Chem [Internet]*. 10 mai 2019 [cité 7 mars 2021]; Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jmedchem.9b00258>
31. Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Peter Slotte J. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*. janv 2002;41(1):66-97.
32. Deniz A, Sade A, Severcan F, Keskin D, Tezcaner A, Banerjee S. Celecoxib-loaded liposomes: effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics. *Biosci Rep*. 3 juin 2010;30(5):365-73.

33. Drabik D, Chodaczek G, Kraszewski S, Langner M. Mechanical Properties Determination of DMPC, DPPC, DSPC, and HSPC Solid-Ordered Bilayers. *Langmuir*. 14 avr 2020;36(14):3826-35.
34. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J Pharm Sci*. 1 févr 1997;86(2):147-62.
35. Alshaer W, Hillaireau H, Vergnaud J, Ismail S, Fattal E. Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjug Chem*. 15 juill 2015;26(7):1307-13.
36. Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett*. 1996;386(2-3):243-6.
37. Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux J-C. Novel Long-Circulating Lipid Nanocapsules. *Pharm Res*. 1 oct 2004;21(10):1783-9.
38. Perrier T, Saulnier P, Fouchet F, Lautram N, Benoît J-P. Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms. *Int J Pharm*. 30 août 2010;396(1-2):204-9.
39. Cosco D, Tsapis N, Nascimento TL, Fresta M, Chapron D, Taverna M, et al. Polysaccharide-coated liposomes by post-insertion of a hyaluronan-lipid conjugate. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 oct 2017;158:119-26.

Annexe 1 : Résultats préliminaires sur l'intérêt du diCRPPR pour le ciblage cardiaque de liposomes

Des études de ciblage cardiaque ont été menées en collaboration avec différentes unités de recherche de Sanofi à Chilly-Mazarin travaillant sur des problématiques cardiaques. Les principaux collaborateurs (galénistes, analystes, plate-forme d'imagerie pour les études *in vivo*) furent Frederic Puech, Gihad Dargazanli, Céline Nguyen Van Dau, Olivier Bergis et Denis Boulay. Nous avons profité que dans le contexte du Labex Lermite la société Sanofi menait un certain nombre d'études de ciblage pour proposer nos liposomes. Parmi les différents peptides envisagés pour le ciblage cardiaque, le CRPPR a été retenu (1,2). La sonde DiD (ou DiIC₁₈(5), 1,1'-dioctadécyl-3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine) est une sonde fluorescente émettant vers 680 nm. Elle a été utilisée pour marquer les liposomes afin de permettre leur visualisation par imagerie en 3 dimensions,

1. Formulation de liposomes marquées au DiD, présentant le diCRPPR

Pour les formulations, le CRPPR a été utilisé sous sa forme dimérisée (via les cystéines de deux CRPPR) et couplé à un lipide PEGylé (PEG3600, **Figure 1**), en raison de résultats de ciblage plus prometteurs de l'insertion de ce conjugué selon la littérature (1,2). Ainsi une molécule de ciblage comprend deux blocs « phospholipide-PEG-peptide » (LPP) dimérisés via un pont disulfure (diLPP). Les publications citées mentionnent une densité de surface de 6000 peptides/particule, soit 6000 peptides disposés sur les surfaces interne et externe des liposomes. Ces ligands sont présents de part et d'autre de la bicouche lipidique en raison du procédé utilisé pour la formulation des liposomes, à savoir la méthode d'hydratation d'un film lipidique (3), avec le LPP présent dans ce film. Les peptides étant considérés comme des monomères, il y a approximativement 3000 LPP sur la surface externe d'un liposome. Ainsi dans notre cas, la cible était d'obtenir environ 1500 diLPP sur la surface externe

d'un liposome. Les études préliminaires ont été menées sur des formulations de liposomes encapsulant dans un premier temps la sonde DiD, puis le dimère a été intégré aux liposomes uniquement. Le CE3F4 n'a pas été utilisé dans le cadre de cette étude.

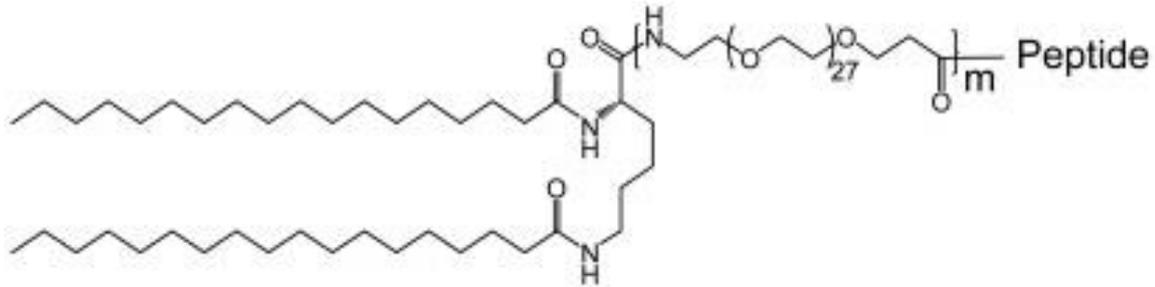


Figure 1 : Lipide PEGylé présentant le peptide (CRPPR). Ici m=3, correspondant à un PEG3600.(1)

La formulation liposomale comprend de l'HSPC, du cholestérol et du DSPE-PEG2000 (proportions molaires respectives 57, 38 et 5%), préparée de la même manière que lors des essais d'encapsulation du CE3F4 (hydratation du film lipidique).

1.1. Marquage des liposomes avec une sonde DiD

Dans un premier temps, la sonde fluorescente a été incluse dans les liposomes afin d'évaluer l'impact de celle-ci sur les paramètres colloïdaux, la concentration finale ciblée en DiD étant de 15 μM dans la préparation. La mesure des paramètres a été effectuée après dilution au 30^e dans le PBS pour la mesure de la taille et de l'indice de polydispersité (PDI), et au 30^e dans l'eau pure pour la mesure du potentiel ζ . Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes de liposomes produits avec ou sans DiD (**Tableau 1**). La quantification de la sonde DiD a été effectuée en spectroscopie UV-Visible afin d'évaluer la concentration en DiD liposomale en fin de procédé, après dilution dans l'éthanol (la sonde étant soluble dans ce solvant). La concentration en DiD mesurée était de $14,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$.

Tableau 1 : Impact de la sonde DiD sur les paramètres colloïdaux des liposomes. n = 3 lots fabriqués ; résultats exprimés sous la forme de moyenne \pm écart-type.

Liposomes	Sans DiD	Avec DiD
Diamètre hydrodynamique (nm)	124 \pm 8	123 \pm 0
Indice de polydispersité	0,090 \pm 0,014	0,081 \pm 0,003
Potentiel ζ (mV)	-21,3 \pm 0,2	-15,8 \pm 2,6

1.2. Formulation de liposomes présentant le diCRPPR

Deux procédés de fonctionnalisation par le diLPP de liposomes contenant la sonde DiD ont été testés : la post-insertion du diLPP à 60°C pendant 2 heures avec mélange toutes les 15 minutes au vortex (4,5), et l'inclusion lors de l'étape de formation du film lipidique grâce à une solubilisation du diLPP dans le chloroforme. En raison de faibles quantités disponibles de diLPP, les expériences n'ont pas pu être répétées.

Concernant le processus de post-insertion, trois proportions de diLPP ont été testées en présence de liposomes déjà formés. Pour une concentration finale en lipides de 2,5 mM, le diLPP a été ajouté en proportions variables pour obtenir des concentrations finales en diLPP de 0,2 μ M, 1,1 μ M et 28 μ M. Dans toutes les conditions, des particules visibles à l'œil nu ont été observées. De plus malgré le temps passé à 60°C, aucune variation notable du potentiel ζ n'a été observée après purification par centrifugation basse vitesse (afin d'éliminer les plus grosses particules) suivie d'une ultrafiltration sur colonne de type Amicon (afin d'éliminer le diLPP resté à l'état dissous dans l'eau et non-inclus dans les liposomes). Ces observations suggèrent une absence d'inclusion du diLPP dans les liposomes car le diLPP est chargé positivement, et donc devrait engendrer une neutralisation du potentiel ζ voire un potentiel positif.

En incluant le diLPP dans le film lipidique, pour une concentration finale après réhydratation de 56 μ M pour 2,5 mM de lipides, il est apparu la formation de

particules visibles à l'œil nu lors de la réhydratation par le PBS à 60°C. Ces amas ont pu être éliminés par un passage au bain à ultrasons à 60°C durant 2 minutes, permettant ensuite de procéder à l'extrusion à 60°C sur membrane en polycarbonate (0,1 µm). La formulation ainsi obtenue a présenté un diamètre hydrodynamique de 137 nm, un PDI de 0,23 (élevé en comparaison des formulations liposomes mentionnées précédemment), et un potentiel ζ positif (8,8 mV). Ces paramètres se sont avérés relativement instables dans le temps, avec un phénomène d'agrégation observé lors du suivi à court terme des paramètres colloïdaux (de l'ordre de l'heure) mais invisible en microscopie optique.

Cette formulation a été analysée pour quantifier ses différents constituants et évaluer un rendement d'inclusion du diLPP, en vue d'une administration *in vivo* chez la souris saine. Les proportions molaires théoriques des différents constituants sont : 55,3% d'HSPC, 36,9% de cholestérol, 4,9% de DSPE-PEG2000, 0,8% de DiD et 2,2% de diLPP.

2. Quantification du diCRPPR inclus dans les liposomes

La quantification des différents constituants a été effectuée par UPLC-DEDL (détecteur : DEDL 2424, Waters), et l'identité des constituants a été vérifiée par UPLC-MS (détecteur : Xevo G2-XS QToF, Waters). Le volume théorique après hydratation du film lipidique était de 4,0 mL. A la fin du procédé (extrusion, centrifugation basse vitesse, ultrafiltration), le volume final a été estimé à 2,0 mL. Cette différence de volume peut être expliquée par l'évaporation de l'eau lors du procédé de fabrication, avec des températures à 60°C lors de la réhydratation, ou de l'étape l'extrusion (volume mort et évaporation). De plus de l'eau peut être perdue lors de l'ultrafiltration (volume mort du filtre).

Les concentrations mesurées par UPLC-DEDL ont permis d'estimer le nombre de moles restantes en fin de procédé, et un rendement a ainsi pu être calculé (**Tableau 2**). Des pertes homogènes ont été observées pour les différents

constituants, excepté le DPSE-PEG2000 dont le rendement est supérieur à 100%. Comme les analyses ont été effectuées 4 jours après la production des liposomes, cette observation peut être expliquée par la dégradation du diLPP en deux lipides PEGylés, et ces derniers seraient élués en même temps que le DSPE-PEG2000. Cette hypothèse d'instabilité a été confirmée par spectrométrie de masse.

Tableau 2 : Quantité et proportions molaires théoriques et observées des différents constituants des liposomes, et rendements.

Molécule		HSPC	Cholestérol	DSPE-PEG2000	DiD	DiLPP
Initial (Théorique)	n (mol)	$5,70 \cdot 10^{-6}$	$3,80 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-7}$	$8,00 \cdot 10^{-8}$	$2,24 \cdot 10^{-7}$
	Proportions (mol/mol)	55,3%	36,9%	4,9%	0,8%	2,2%
Final (Mesuré)	n (mol)	$4,40 \cdot 10^{-6}$	$1,96 \cdot 10^{-6}$	$6,28 \cdot 10^{-7}$	$5,30 \cdot 10^{-8}$	$1,40 \cdot 10^{-7}$
	Proportions (mol/mol)	61,3%	27,4%	8,8%	0,6%	2,0%
Rendement		77,1%	51,7%	125,6%	66,3%	62,5%

Grâce à l'ensemble de ces données, le nombre de diLPP par particule a pu être calculé pour des liposomes de 137 nm, et une épaisseur bicouche de 4,3 nm (6). Pour les calculs, les quantités molaires, les surfaces topologiques des lipides sont répertoriées dans le tableau qui suit, la sonde DiD étant négligée en raison de sa faible proportion, et le DiLPP étant constitué de deux molécules de DSPE-PEG.

Tableau 3 : Paramètres utilisés pour les calculs du nombre de liposomes en suspension, et du nombre de ligands de ciblage par particule.

Molécule	HSPC	Cholestérol	DSPE-PEG2000	DiLPP
n (mol)	$4,40 \cdot 10^{-6}$	$1,96 \cdot 10^{-6}$	$6,28 \cdot 10^{-7}$	$2 \times 1,40 \cdot 10^{-7}$
Surface topologique (nm ²)	0,46 (6)	0,34 (7)	0,38 (8)	0,38
Surface totale des lipides (nm ²)	$1,22 \cdot 10^{18}$	$4,01 \cdot 10^{17}$	$1,44 \cdot 10^{17}$	$6,41 \cdot 10^{16}$

Ainsi, les surfaces externes et internes ont été calculées ainsi que le nombre de diLPP par liposome (**Tableau 4**Tableau). Le nombre de diLPP/liposome estimé est de 4500 diLPP de part et d'autre de la bicouche, avec 2400 diLPP à la surface externe d'un liposome, en faisant l'hypothèse d'une répartition homogène du diLPP de part et d'autre de la bicouche. Ce résultat est cohérent par rapport à l'objectif fixé en densité de lipo-peptide et relatif aux données de la littérature.

Tableau 4 : Surfaces calculées, nombre diLPP par liposome et exposés à la surface externe.

Paramètre	Valeur
Diamètre hydrodynamique (nm)	137
Surface interne (nm ²)	45900
Surface externe (nm ²)	52600
Surface totale (nm ²)	98500
Nombre de liposomes/mL	1,86.10 ¹³
Nombre de diLLP par liposome	4500
Nombre diLLP à la surface externe	2400

3. Biodistribution des liposomes fonctionnalisés par le diLPP

Les analyses de la biodistribution des liposomes fonctionnalisés par le diLPP et encapsulant la sonde DiD ont été effectués chez la souris mâle (n = 5 souris injectées par voie rétro orbitaire, 1 souris contrôle non injectée). La fluorescence a été suivie en 3 dimensions et dans le temps sur l'ensemble des animaux. La fluorescence a été quantifiée avant injection et à 20 minutes, 3 heures et 24 heures après injection dans l'organisme entier, ainsi que dans les différents organes (foie, rate, cœur, reins, vessie et poumons). A la fin de l'expérience, les animaux ont été mis à mort et les organes prélevés afin d'évaluer la fluorescence *ex vivo* par épi-illumination sur les viscères, foie, cerveau, poumons, cœur, rate, reins, estomac et testicules.

Une diffusion de la fluorescence a été observée dans l'ensemble de l'organisme à $t = 20$ min (**Figure 2**). Le suivi de la fluorescence totale a permis de voir qu'à 24 heures, celle-ci était toujours très présente avec une diminution d'un facteur deux par rapport à la mesure à 20 minutes (**Figure 3A**). En revanche, la fluorescence diminue plus rapidement au niveau sanguin (**Figure 3B**), avec diminution de plus d'un facteur 10 de la fluorescence à 24 heures versus 20 minutes après injection, avec retour à un niveau basale presque équivalent au contrôle. Cette différence de cinétique témoigne d'une disparition de la fluorescence du compartiment sanguin au profit des organes.

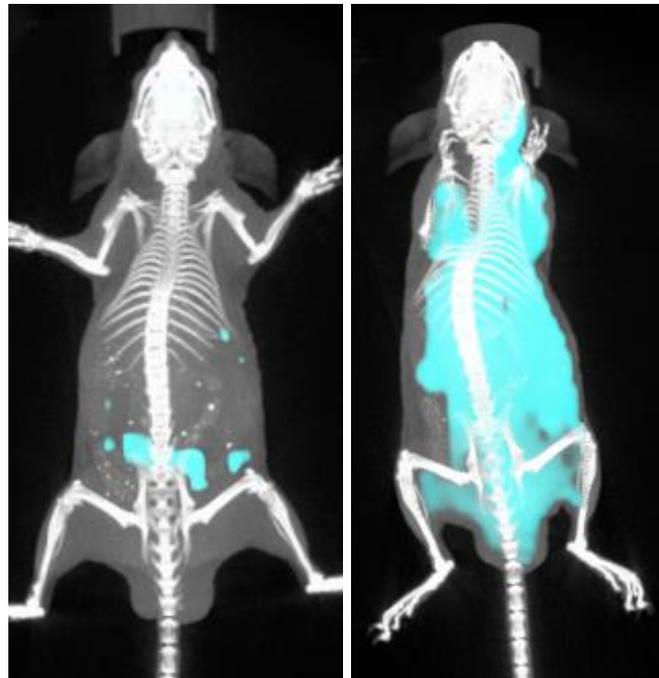


Figure 2 : Biodistribution des liposomes diLPP marqués avec une sonde DiD. Gauche : contrôle avant injection ; Droite : observation 20 minutes après injection.

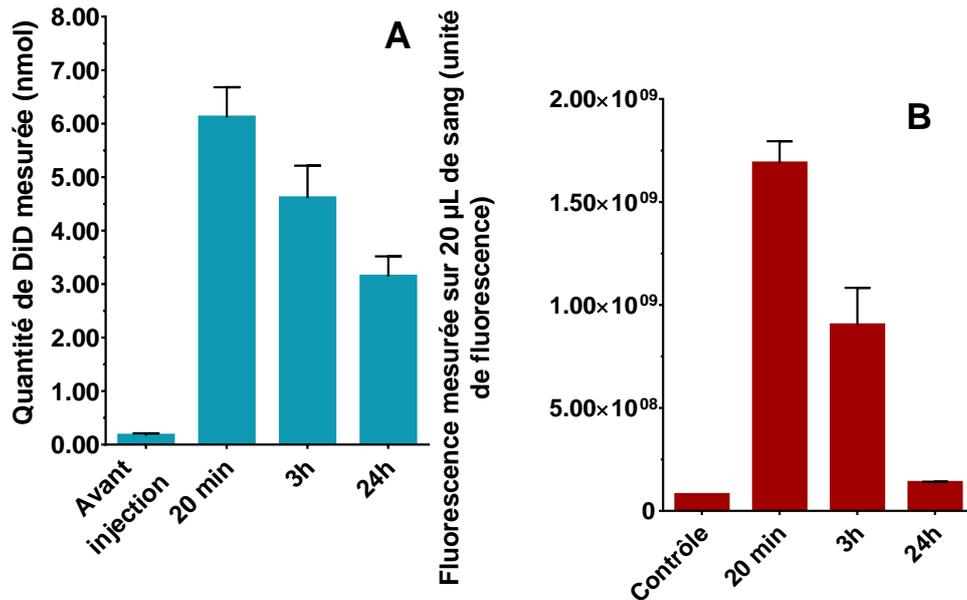


Figure 3 : A, mesure par fluorescence de la quantité de DiD dans tout l'organisme au cours du temps lors de l'expérience de biodistribution des liposomes diLPP marqués avec une sonde DiD (n = 5 souris par temps). B, suivi de la fluorescence dans 20 µL de sang (n = 5 souris, et n = 1 souris contrôle).

Si l'on s'intéresse plus particulièrement à la distribution de la fluorescence aux niveaux des différents organes, une diminution du signal est observée à 3h puis à 24h par rapport à la mesure à 20 min, excepté pour la rate dont le signal augmente au cours du temps (**Figure 4**). Une légère présence cardiaque a été observée, cependant l'absence de traitement contrôle (liposomes marqués, sans diLLP) empêche de conclure à un éventuel tropisme cardiaque. Ici la stabilité de l'inclusion de la sonde DiD au sein des liposomes peut être remise en question. En effet, ces résultats pourraient ne refléter que la biodistribution de la sonde et non celle des nanoparticules. Dans la littérature, il y a peu de données de biodistribution de la sonde libre chez la souris. Cependant, en raison de la lipophile de la sonde, et son utilisation usuelle pour le marquage des membranes cellulaires, il est possible d'émettre l'hypothèse que la sonde est correctement retenue au sein des nanoparticules. Concernant sa quantification dans les différents organes, les résultats

exprimés en pourcentage de la dose injectée et pondéré par le poids de l'organe (%DI/g) permettent d'observer à 20 minutes un signal pondéré équivalent entre le cœur, le foie et les reins, qui ne varie pas de manière significative au cours du temps. La rate et les poumons semblent capter de manière plus favorable les liposomes par rapport aux autres organes, avec une augmentation significative du signal entre 20 min et 3h dans la rate après injection, alors qu'au niveau des poumons une diminution significative au cours du temps est observée. L'observation *ex vivo* des organes à 24h par épi-illumination confirme la présence de DiD au niveau du foie, de la rate et des poumons, ainsi qu'au niveau des viscères, et une absence de signal au niveau du cœur (**Figure 5**Figure).

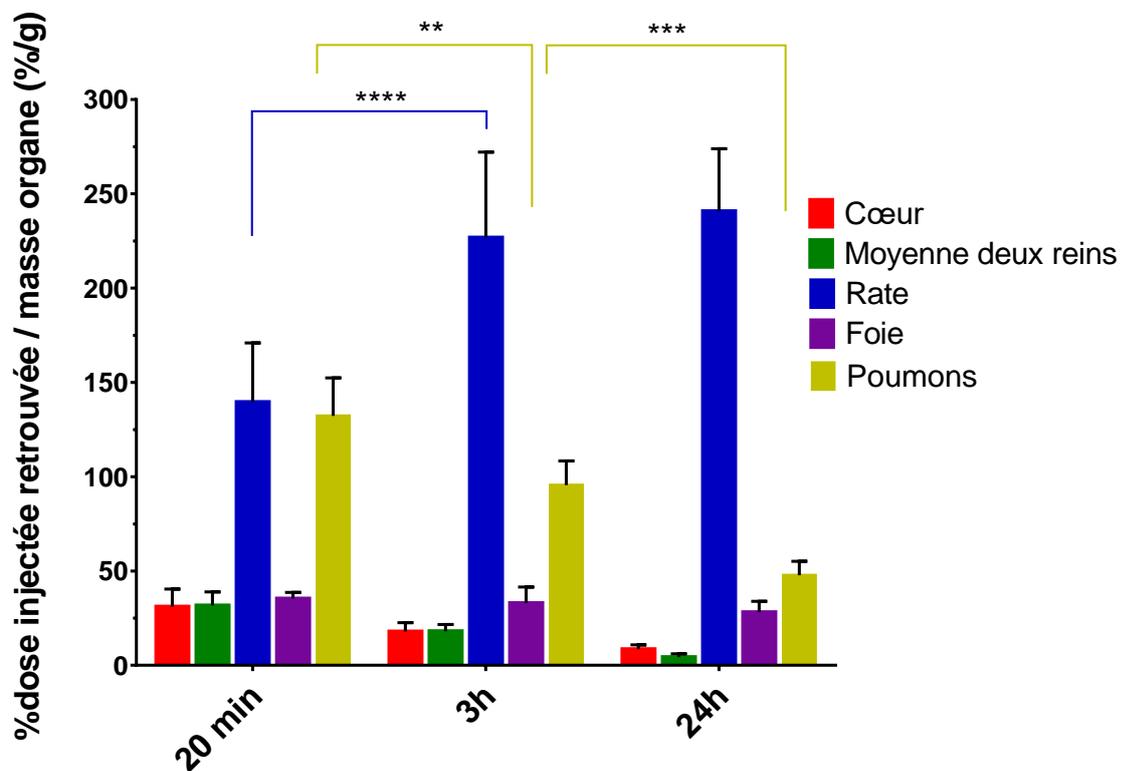


Figure 4 : Quantification de la DiD dans différents organes, exprimé en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe, lors de l'expérience de biodistribution des liposomes diLPP marqués avec une sonde DiD (n = 5 souris par temps). **: p-value < 0,01 ; *** : p-value < 0,001**** : p-value < 0,0001.

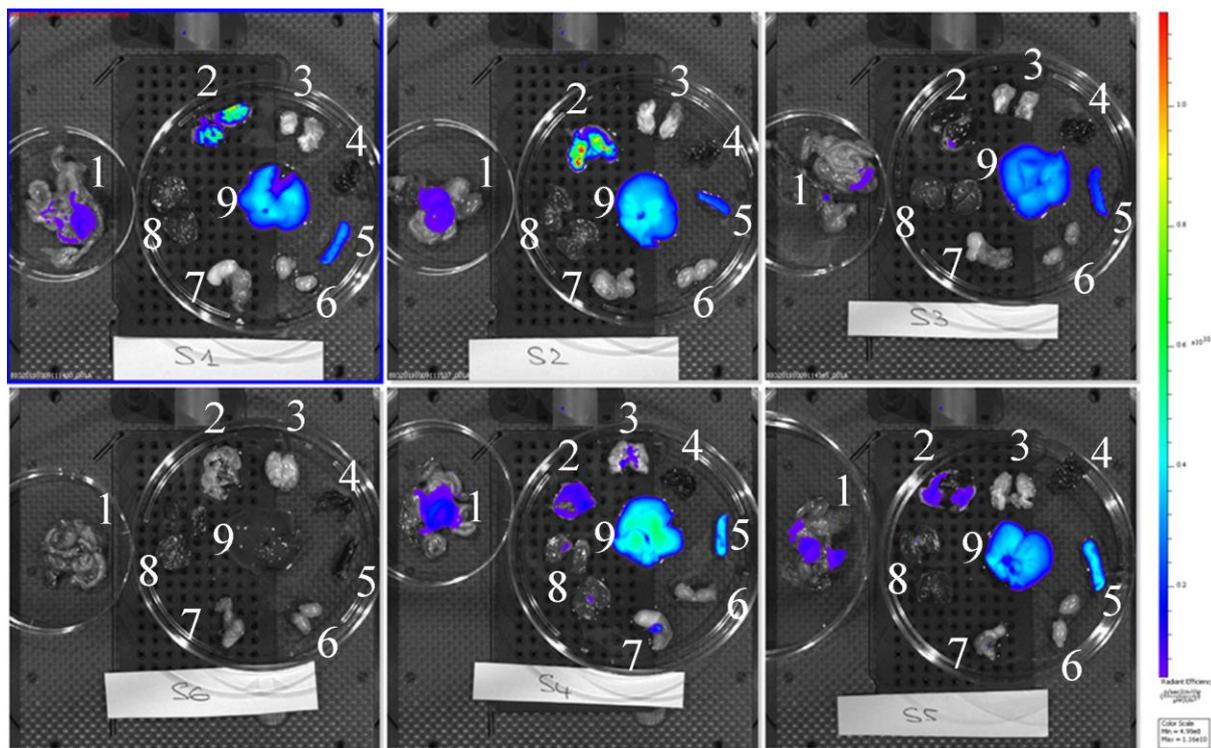


Figure 5 : Epi-illumination des organes 24 heures après injection de liposomes diLPP marquées à la DiD. S1 à S5 : souris injectées avec la formulation contenant les liposomes diLPP ; S6 : contrôle non injecté. 1 : viscères ; 2 : poumons ; 3 : cerveau ; 4 : cœur ; 5 : rate ; 6 : testicules ; 7 : estomac ; 8 : reins ; 9 : foie.

S'il l'on compare ces résultats de biodistribution avec ceux obtenus par l'équipe de Ferrara sur le ciblage cardiaque grâce au CRPPR (1), une distribution au niveau des organes différente a été observée à 20 min et à 3h, bien que l'analyse décrite dans la publication ait été effectuée 1h30 après injection. Les résultats décrits portent sur le « CRPPR-3 » (**Figure 6**), c'est-à-dire que le CRPPR est couplé à un phospholipide greffé par un PEG3600. Dans l'étude publiée, le %DI/g au niveau cardiaque est proche de celui observé à 20 min pour le diCRPPR. Avec 4 animaux, un %DI/g de 44 ± 10 a été observé pour le CRPPR, alors qu'avec le diCRPPR il était de 31 ± 9 pour 5 animaux. Ces valeurs présentent une différence significative ($p = 0,03$; test t bilatéral, égalité des variances vérifiée par test F). Sur l'ensemble des résultats issus de l'étude de biodistribution des liposomes marqués par le diCRPPR, la différence majeure réside dans la différence de distribution entre les organes. En

effet, l'étude de l'équipe de Ferrara présente par ordre décroissant de %DI/g en fonction des organes : cœur > rate > foie > poumons > reins. Dans notre étude, cet ordre est bouleversé : rate > poumons > foie > cœur = reins. Plusieurs hypothèses expliquant ces différences peuvent être posées. La première porte sur le diLPP utilisé, car dans l'étude commentée le ciblage a été effectuée avec la forme non dimérisée du CRPPR, bien que les auteurs mentionnent de meilleurs résultats de ciblage avec le diLPP sans pour autant les présenter. Ensuite la composition lipidique est différente, notamment avec la présence d'une forte proportion de cholestérol dans notre étude menée alors qu'ils n'en utilisent pas, ceci pouvant modifier les interactions entre le diLPP et le liposome. La dernière hypothèse porte sur le procédé de marquage et la bonne rétention de la sonde utilisée dans les liposomes : la sonde DiD a été utilisée dans notre étude alors qu'un phospholipide radiomarqué a été utilisé dans l'étude publiée. Pour cette dernière hypothèse, il est possible que la biodistribution de la sonde puisse correspondre à la sonde hors des liposomes comme mentionné précédemment.

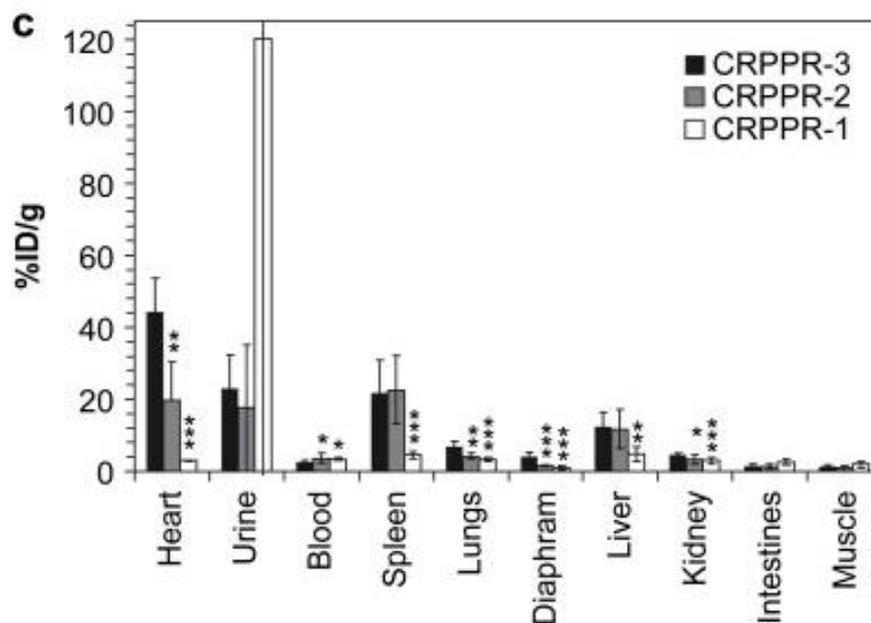


Figure 6 : Quantification du signal radioactif dans les différents organes 90 minutes après injection de liposomes radioactifs présentant des lipides PEGylés modifiés par le CRPPR. Trois tailles de PEG ont été utilisées 1 : PEG1200 ; 2 : PEG2400 ; 3 : PEG3600. Résultats exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe. (1)

Les résultats présentés ont permis de mettre en évidence différents problèmes de formulation du diLPP, dont la formulation n'avait été que mentionnée mais non décrite dans la littérature. La biodistribution des liposomes est différente de ce qui a pu être observé dans la littérature pour le ligand CRPPR non dimérisé. Cependant, les résultats restent cohérents avec les propriétés du ligand qui présente une affinité pour les endothéliums vasculaire et cardiaque (2) car la fluorescence était majoritaire dans les organes très vascularisés (rate, poumons, foie, viscères). Des études complémentaires devront être envisagées afin de confirmer ou non l'intérêt du CRPPR dans le traitement de pathologies cardiaques. Cependant l'utilisation d'autres peptides de ciblage tels que le CTP (*cardiac targeting peptide*) ou le PCM (*primary cardiomyocyte binding peptide*) devront être aussi explorés en raison des différents résultats prometteurs publiés (9–18).

Références bibliographiques

1. Zhang H, Kusunose J, Kheirolomoom A, Seo JW, Qi J, Watson KD, et al. Dynamic imaging of arginine-rich heart-targeted vehicles in a mouse model. *Biomaterials*. avr 2008;29(12):1976-88.
2. Zhang H, Li N, Sirish P, Mahakian L, Ingham E, Curry F-R, et al. The cargo of CRPPR-conjugated liposomes crosses the intact murine cardiac endothelium. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 oct 2012;163(1):10-7.
3. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*. août 1965;13(1):238-52.
4. Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett*. 1996;386(2-3):243-6.
5. Perrier T, Saulnier P, Fouchet F, Lautram N, Benoît J-P. Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms. *Int J Pharm*. 30 août 2010;396(1-2):204-9.

6. Drabik D, Chodaczek G, Kraszewski S, Langner M. Mechanical Properties Determination of DMPC, DPPC, DSPC, and HSPC Solid-Ordered Bilayers. *Langmuir*. 14 avr 2020;36(14):3826-35.
7. Alwarawrah M, Dai J, Huang J. A Molecular View of the Cholesterol Condensing Effect in DOPC Lipid Bilayers. *J Phys Chem B*. 10 juin 2010;114(22):7516-23.
8. Watkins EB, El-khoury RJ, Miller CE, Seaby BG, Majewski J, Marques CM, et al. Structure and Thermodynamics of Lipid Bilayers on Polyethylene Glycol Cushions: Fact and Fiction of PEG Cushioned Membranes. *Langmuir*. 15 nov 2011;27(22):13618-28.
9. Zahid M, Phillips BE, Albers SM, Giannoukakis N, Watkins SC, Robbins PD. Identification of a cardiac specific protein transduction domain by in vivo biopanning using a M13 phage peptide display library in mice. *PloS One*. 17 août 2010;5(8):e12252.
10. Avula UMR, Yoon HK, Lee CH, Kaur K, Ramirez RJ, Takemoto Y, et al. Cell-selective arrhythmia ablation for photomodulation of heart rhythm. *Sci Transl Med*. 28 oct 2015;7(311):311ra172.
11. Zahid M, Feldman KS, Garcia-Borrero G, Feinstein TN, Pogodzinski N, Xu X, et al. Cardiac Targeting Peptide, a Novel Cardiac Vector: Studies in Bio-Distribution, Imaging Application, and Mechanism of Transduction. *Biomolecules*. déc 2018;8(4):147.
12. Kim H, Yun N, Mun D, Kang J-Y, Lee S-H, Park H, et al. Cardiac-specific delivery by cardiac tissue-targeting peptide-expressing exosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 2018;499(4):803-8.
13. Nam HY, McGinn A, Kim P-H, Kim SW, Bull DA. Primary cardiomyocyte-targeted bio-reducible polymer for efficient gene delivery to the myocardium. *Biomaterials*. nov 2010;31(31):8081-7.
14. Rana S, Datta K, Reddy TL, Chatterjee E, Sen P, Pal-Bhadra M, et al. A spatio-temporal cardiomyocyte targeted vector system for efficient delivery of therapeutic payloads to regress cardiac hypertrophy abating bystander effect. *J Controlled Release*. 28 févr 2015;200:167-78.
15. Ray A, Rana S, Banerjee D, Mitra A, Datta R, Naskar S, et al. Improved bioavailability of targeted Curcumin delivery efficiently regressed cardiac hypertrophy by modulating apoptotic load within cardiac microenvironment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 janv 2016;290:54-65.

16. Rana S, Datta R, Chaudhuri RD, Chatterjee E, Chawla-Sarkar M, Sarkar S. Nanotized PPAR α Overexpression Targeted to Hypertrophied Myocardium Improves Cardiac Function by Attenuating the p53-GSK3 β -Mediated Mitochondrial Death Pathway. *Antioxid Redox Signal*. 10 avr 2018;30(5):713-32.
17. Zhao X, Luo W, Hu J, Zuo L, Wang J, Hu R, et al. Cardiomyocyte-targeted and 17 β -estradiol-loaded acoustic nanoprobe as a theranostic platform for cardiac hypertrophy. *J Nanobiotechnology*. 30 mars 2018;16(1):36.
18. Mentkowski KI, Lang JK. Exosomes Engineered to Express a Cardiomyocyte Binding Peptide Demonstrate Improved Cardiac Retention in Vivo. *Sci Rep*. 11 juill 2019;9(1):1-13.

Conclusions et perspectives

L'objectif global de cette thèse était la compréhension du devenir biologique du (*R*)-CE3F4 *in vivo*, et sa modulation par des nanovecteurs dans le but d'optimiser son administration en vue du traitement de l'insuffisance cardiaque. Dans un premier temps, une méthode analytique a été développée afin de quantifier le (*R*)-CE3F4 dans le plasma murin et humain. Ainsi, la biodistribution du (*R*)-CE3F4 et son instabilité biologique ont été décrites pour la première fois. Dans un deuxième temps, la formulation du (*R*)-CE3F4 dans des nanovecteurs lipidiques a permis d'augmenter significativement sa solubilité apparente en milieu aqueux, et de le protéger significativement de la dégradation enzymatique dans le plasma murin. Des expériences complémentaires seront à envisager afin d'optimiser la stabilité d'encapsulation du (*R*)-CE3F4 dans ces nanoparticules lipidiques. Une piste à explorer pour l'amélioration de ces systèmes est le ratio (*R*)-CE3F4/agents de surface en raison de la corrélation existante avec la demi-vie apparente observée *in vitro*. De plus, les méthodes développées au cours de ce travail permettront ultérieurement une évaluation plus rapide d'autres nanoparticules lipidiques, voire polymériques, notamment grâce au test clé de mesure de la demi-vie apparente du (*R*)-CE3F4 en milieux plasmatique murin. Dans la pratique, ce test permet une sélection rapide des formulations et ne nécessite que de faibles volumes d'échantillons, permettant aussi une rationalisation dans l'utilisation d'animaux.

D'autres pistes peuvent être envisagées afin d'améliorer le couple nanoparticule/inhibiteur d'Epac1. Les nanoparticules lipidiques solides ou polymériques pourraient présenter un intérêt dans l'encapsulation du (*R*)-CE3F4. Il est aussi possible de remplacer le par d'autres molécules apparentées développées dans le cadre de la collaboration au sein du LabEx Lermite. En effet certains analogues du (*R*)-CE3F4 conservent une activité vis-à-vis d'Epac1 *in vitro* tout en ayant des propriétés physico-chimiques différentes, comme une plus grande lipophilie, pouvant favoriser la stabilité du couple inhibiteur/nanoparticule.

Concernant le ciblage cardiaque, des expériences préliminaires ont montré une différence dans la biodistribution de liposomes grâce au peptide de ciblage CRPPR dimérisé par rapport à la littérature. Cependant des études complémentaires devront être envisagées afin de conclure sur l'intérêt de ce peptide. D'autres peptides et d'autres stratégies de ciblage peuvent être envisagés, voire combinés afin de favoriser le ciblage cardiaque. Cependant dans le cadre d'un traitement récurrent de l'insuffisance cardiaque chronique, le développement de nanoparticules administrables par des voies n'entraînant pas d'effraction serait aussi à envisager. La voie orale est une voie de choix, et les nanocapsules lipidiques ont présenté un intérêt^{2,3} dans ce cadre. La voie pulmonaire présente aussi un intérêt en raison de la proximité poumon-cœur via la veine pulmonaire. Récemment des nanoparticules de phosphate de calcium ont été utilisées pour cibler le cœur grâce à cette voie d'administration^{4,5}.

Pour conclure, le développement de nouveaux traitements contre l'insuffisance cardiaque est un sujet d'actualité. Les recherches combinées de nouvelles cibles pharmacologiques, molécules, et formulations apportent un espoir d'amélioration de la prise en charge de cette pathologie invalidante et mortelle.

² Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit J-P. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Controlled Release*. 3 déc 2009;140(2):174-81.

³ Roger E, Lagarce F, Benoit J-P. Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 sept 2011;79(1):181-8.

⁴ Di Mauro V, Iafisco M, Salvarani N, Vacchiano M, Carullo P, Ramírez-Rodríguez GB, et al. Bioinspired negatively charged calcium phosphate nanocarriers for cardiac delivery of MicroRNAs. *Nanomed*. 16 mars 2016;11(8):891-906.

⁵ Miragoli M, Ceriotti P, Iafisco M, Vacchiano M, Salvarani N, Alogna A, et al. Inhalation of peptide-loaded nanoparticles improves heart failure. *Sci Transl Med*. 17 janv 2018;10(424).

Titre : Stabilité plasmatique et biodistribution d'un inhibiteur d'EPAC1, le (R)-CE3F4, et modifications apportées par les nanovecteurs lipidiques.

Mots clés : Liposomes, Nanocapsules lipidiques, EPAC1, CE3F4, Insuffisance cardiaque

Résumé : Le projet vise à développer une nouvelle stratégie pour traiter spécifiquement le myocarde dans l'insuffisance cardiaque via la formulation du CE3F4, un inhibiteur de la protéine EPAC1. Cette protéine est ubiquitaire, et est notamment impliquée dans l'hypertrophie des cardiomyocytes et la restructuration cardiaque pathologique. Le CE3F4 a été identifié comme candidat pour inhiber EPAC1 afin de bloquer le développement hypertrophique délétère observé dans l'insuffisance cardiaque. Des études préliminaires sur le CE3F4 ont mis en évidence une faible solubilité aqueuse ainsi qu'une instabilité métabolique sur microsomes hépatiques de rats. De plus, en raison de l'ubiquité de la cible dans les différents tissus, il est nécessaire de contrôler la distribution du CE3F4 en favorisant un tropisme cardiaque. Le développement de nanovecteurs encapsulant le CE3F4 apparaît comme une approche prometteuse. En effet, ces vecteurs peuvent être fonctionnalisés en surface par des ligands spécifiques du cœur, permettant d'obtenir un adressage spécifique du CE3F4 encapsulé

Au cours de cette thèse, des liposomes et des nanocapsules lipidiques ont été formulés. Ceux-ci ont permis d'augmenter significativement la solubilité apparente du CE3F4, et les nanocapsules lipidiques ont permis une protection du CE3F4 contre la dégradation enzymatique observée *in vitro* dans le plasma de souris C57BL/6. En effet, une hydrolyse enzymatique rapide du CE3F4 a été observée dans le plasma murin grâce au développement d'outils analytiques adaptés. De plus, une différence interspèces a été observée sur le métabolisme plasmatique du CE3F4, qui a été négligeable dans le plasma humain. Une étude de biodistribution a été menée chez la souris C57BL/6 avec du ³H-CE3F4 encapsulé ou non dans des nanocapsules radiomarquées au ¹⁴C. Une distribution très rapide en dehors du compartiment sanguin a été observée dans les deux groupes, avec une dissociation quasi-instantanée du couple ³H-CE3F4/¹⁴C-nanocapsules.

Title : Plasma stability and biodistribution of the EPAC1 inhibitor (R)-CE3F4, and its modulation by lipid-based nanocarriers

Keywords : Liposomes, Lipid nanocapsules, EPAC1, CE3F4, Heart failure

Abstract : The project aims to develop a new strategy to specifically treat the myocardium in heart failure with the formulation of CE3F4, an inhibitor of the EPAC1 protein. This protein is ubiquitous and is particularly involved in cardiomyocyte hypertrophy and pathological cardiac restructuring. The CE3F4 has been identified as a candidate to inhibit EPAC1 to block the deleterious hypertrophic development seen in heart failure. Preliminary studies on CE3F4 have shown a low aqueous solubility as well as metabolic instability in rat liver microsomes. In addition, due to the ubiquity of the target in different tissues, it is necessary to control the distribution of the CE3F4 by promoting cardiac tropism. The development of nanovectors encapsulating the CE3F4 appears to be a promising approach. Indeed, these vectors can be functionalized at the surface by specific ligands of the heart, allowing the specific addressing of the encapsulated CE3F4.

During this thesis, liposomes and lipid nanocapsules were formulated. These particles have significantly increased the apparent solubility of the CE3F4, and the lipid nanocapsules provided protection of the CE3F4 against the enzymatic degradation observed *in vitro* in the plasma of C57BL/6 mice. Indeed, a rapid enzymatic hydrolysis of the molecule was observed in murine plasma thanks to the development of suitable analytical methods. In addition, an interspecies difference was observed in the plasma metabolism of the CE3F4, which was negligible in human plasma. A biodistribution study was carried out in C57BL/6 mice with ³H-CE3F4 encapsulated or not in lipid nanocapsules radiolabelled with ¹⁴C. A very rapid distribution outside the blood compartment was observed in both groups, with almost instantaneous dissociation of the ³H-CE3F4 from ¹⁴C-nanocapsules.