



**HAL**  
open science

# Conception, synthèse et évaluations de sondes fluorogènes et solvatofluorochromes pour l'étude des récepteurs couplés aux protéines G : application aux récepteurs de l'ocytocine et de la spexine

Fabien Hanser

► **To cite this version:**

Fabien Hanser. Conception, synthèse et évaluations de sondes fluorogènes et solvatofluorochromes pour l'étude des récepteurs couplés aux protéines G : application aux récepteurs de l'ocytocine et de la spexine. Chimie thérapeutique. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAF059 . tel-04399524

**HAL Id: tel-04399524**

**<https://theses.hal.science/tel-04399524>**

Submitted on 17 Jan 2024

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**UMR 7200**

**THÈSE** présentée par :

**Fabien HANSER**

soutenue le : **04 décembre 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie biologique thérapeutique

**Conception, synthèse et évaluations de  
sondes fluorogènes et  
solvatofluorochromes pour l'étude des  
récepteurs couplés aux protéines G :  
application aux récepteurs de  
l'ocytocine et de la spexine**

**THÈSE dirigée par :**

**M. BONNET Dominique**

Docteur, CNRS/Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme ACHER Francine**

**M. BURGER Alain**

Docteur, CNRS/Université Paris Descartes

Professeur, CNU 32/Université Nice Sophia Antipolis

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme KARPENKO Iuliia**

Docteur, Université de Strasbourg



# Table des matières

---

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction générale : contexte et objectifs</b> .....	<b>8</b>
Contexte.....	9
1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) .....	9
1.1. Structure et classification des RCPG.....	9
1.2. Expression des RCPG.....	10
1.3. Signalisation des RCPG.....	10
1.4. Intérêt thérapeutique des RCPG.....	13
2. Des récepteurs d'intérêt du laboratoire : le récepteur de l'ocytocine (OTR) et les récepteurs de la galanine (GalR) .....	14
2.1. Le récepteur de l'ocytocine (OTR) .....	14
2.2. Les récepteurs de la galanine GalR2 et GalR3 : cibles de la spexine .....	16
3. Introduction à la fluorescence : un outil puissant pour suivre les interactions ligand-RCPG .....	19
3.1. Marquage des RCPG à la fluorescence.....	19
3.2. Les sondes sensibles à l'environnement : fluorogènes et solvatofluorochromes... ..	23
3.2.1. Mécanismes de la sensibilité à l'environnement .....	23
3.2.2. Le Nile Red : fluorophore sensible à l'environnement .....	28
3.2.3. Les sondes sensibles à leur environnement ciblant les RCPG.....	30
Objectifs des travaux de thèse.....	32
<b>Chapitre 1 : Développement de sondes fluorescentes sensibles à l'environnement pour le récepteur de l'ocytocine</b> .....	<b>33</b>
1. Conception et synthèse de sondes fluorescentes dérivées du Nile Red ciblant l'OTR... ..	34
2. Évaluation des propriétés spectrales de sondes de l'OTR dérivées du Nile Red .....	42
3. Évaluation des interactions non spécifiques de sondes de l'OTR dérivées du Nile Red <i>in vitro</i> .....	45
4. Évaluation des interactions non spécifiques de sondes de l'OTR dérivées du Nile Red <i>in cellulo</i> .....	46
5. Évaluation de l'activité fonctionnelle sur l'OTR .....	50
6. Utilisation de la sonde Pf-PEG <sub>20</sub> -NR pour l'étude du microenvironnement de l'OTR....	51
7. Utilisation de la sonde Pf-PEG <sub>20</sub> -NR pour l'imagerie super-résolution de l'OTR .....	58

8.	Utilisation de la sonde Pf-PEG <sub>20</sub> -NR pour le développement d'un test de liaison à l'OTR..	67
9.	Conclusions et perspectives .....	70
<b>Chapitre 2 : Développement de sondes fluorescentes dérivées de la spexine pour l'étude du récepteur GalR2.....</b>		<b>72</b>
1.	Conception et synthèse de spexines fluorescentes.....	73
2.	Évaluation de l'activité fonctionnelle de spexines fluorescentes sur le GalR2 .....	81
3.	Évaluation des propriétés spectrales de spexines fluorescentes.....	82
4.	Imagerie du récepteur GalR2 non modifié sur cellules vivantes en conditions homogènes avec des spexines fluorescentes .....	86
5.	Conception et synthèse de fluorospexines fluorescentes .....	90
6.	Évaluation de l'activité fonctionnelle de fluorospexines fluorescentes sur le GalR2 ..	92
7.	Évaluation des propriétés spectrales de fluorospexines fluorescentes .....	92
8.	Imagerie du récepteur GalR2 non modifié sur cellules vivantes en conditions homogènes avec des fluorospexines fluorescentes .....	95
9.	Conception et synthèse d'acides aminés hydrosolubles dérivés du Nile Red.....	97
10.	Évaluation des propriétés spectrales d'acides aminés solubilisants dérivés du Nile Red.....	100
11.	Conclusions et perspectives .....	106
<b>Conclusion générale.....</b>		<b>108</b>
<b>Experimental part.....</b>		<b>113</b>
1.	General information .....	114
1.1.	Chemical synthesis: starting material .....	114
1.2.	Chemical synthesis: monitoring.....	114
1.3.	Purification of compounds .....	114
1.4.	Physico-chemical characterization .....	114
1.5.	Fluorescence spectroscopy .....	115
1.6.	Fluorescence microscopy .....	115
2.	Chapter 1: Development of environment-sensitive fluorescent probes for the oxytocin receptor .....	116
2.1.	Design and synthesis of fluorescent Nile Red-based derivatives targeting the OTR .....	116
2.2.	Evaluation of the spectral properties of Nile Red-based probes of the OTR .....	135
2.3.	Evaluation of the non-specific interactions of Nile Red-based probes of the OTR <i>in vitro</i> .....	133
2.3.1.	Preparation of 1 mM DOPC/cholesterol (2:1) liposomes .....	135
2.3.2.	Evaluation of non-specific interactions with liposomes .....	135
2.3.3.	Evaluation of non-specific interactions with BSA.....	136

2.4.	Evaluation of the non-specific interactions of Nile Red-based probes of the OTR <i>in cellulo</i> .....	136
2.4.1.	Cell lines and culture conditions.....	136
2.4.2.	Live-cell no-wash imaging of the OTR .....	136
2.5.	Evaluation of the functional activity on the OTR.....	137
2.6.	Use of the probe Pf-PEG <sub>20</sub> -NR for the study of the OTR microenvironment.....	138
2.6.1.	Cell lines and culture conditions.....	138
2.6.2.	Ratiometric fluorescence imaging.....	138
2.7.	Use of the probe Pf-PEG <sub>20</sub> -NR for the super-resolution imaging of the OTR.....	139
2.7.1.	Cell lines and culture conditions.....	139
2.7.2.	Super-resolution imaging of the OTR.....	139
2.7.3.	Evaluation of the photostability of the probes selected for super-resolution imaging of the OTR.....	140
2.7.3.1.	Fluorescence spectroscopy .....	140
2.7.3.2.	Fluorescence microscopy .....	140
2.8.	Use of the probe Pf-PEG <sub>20</sub> -NR for the development of an OTR binding assay ...	141
3.	Chapter 2: Development of environment-sensitive spexin-based fluorescent probes for the GalR2 receptor .....	141
3.1.	Manual solid-phase peptide synthesis .....	141
3.2.	Automated solid-phase peptide synthesis .....	142
3.3.	Solid-phase peptide synthesis: monitoring .....	142
3.4.	Design and synthesis of fluorescent spexins and fluorospexins .....	143
3.5.	Evaluation of the functional activity on the GalR2 .....	165
3.6.	Evaluation of the spectral properties of fluorescent amino acids, spexins and fluorospexins.....	166
3.7.	Imaging of the unmodified GalR2 in homogeneous conditions .....	166
3.7.1.	Cell lines and culture conditions.....	166
3.7.2.	Live-cell no-wash imaging of the GalR2.....	167
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>168</b>



## Remerciements

---

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200) dans l'équipe de Chimie-Biologie Intégrative et Pharmacognosie (CBIP) sous la direction du Dr. Dominique Bonnet et financés par le LabEx MEDALIS et par Pierre Fabre que je remercie grandement pour leur soutien qui a été primordial pour la réussite de ces travaux. J'ai été ravi de pouvoir travailler dans ce laboratoire abordant des thématiques pluridisciplinaires très intéressantes avec un grand potentiel pour faire avancer la science de demain aussi bien au niveau de la compréhension du vivant qu'au niveau thérapeutique. Je dis merci à toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de ce projet.

Avant tout, je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Dr. Dominique Bonnet, qui m'a fait confiance tout au long de ces années depuis mon arrivée dans son équipe en stage de deuxième année de Master. Je le remercie pour ses très bons conseils qui m'ont beaucoup aidé dans ce projet et aussi pour ses valeurs humaines qu'il a su partager.

Un grand merci aussi à Iuliia, qui a beaucoup participé à la réussite de ces travaux, en suivant mon avancée au quotidien avec bienveillance et un esprit scientifique très ouvert. Son aide a été très appréciée et ses conseils ont toujours été très pertinents. Je la remercie aussi de m'avoir permis d'animer des travaux pratiques de chimie organique deux années consécutives. Cette expérience a été très enrichissante et m'a donné l'opportunité de développer de nouvelles compétences en évoluant dans cet autre univers. J'en profite pour remercier Karine et Aurélie qui m'ont aussi formé à l'encadrement et à l'enseignement au cours de ces séances à leurs côtés.

Je suis également très reconnaissant envers les membres du jury, le Dr. Francine Acher (Université Paris Descartes) et le Pr. Alain Burger (Université Nice Sophia Antipolis) qui ont accepté de consacrer un temps précieux à l'évaluation de ce manuscrit.

Je remercie aussi le Pr. Marcel Hibert, qui, avec le Dr. Dominique Bonnet, m'ont vraiment donné envie de travailler dans leur laboratoire, après avoir pu suivre leurs cours très intéressants dispensés pendant mon Master.

J'ai aussi une pensée pour l'ensemble de mon équipe ayant partagé cette expérience de thèse très riche à mes côtés, notamment Claire qui m'a suivi lors de mon stage de deuxième année de Master m'ayant permis de consolider des compétences solides en chimie, Lucie, sa joie de vivre ayant beaucoup égayé le laboratoire au début de ma thèse, Florent son perfectionnisme m'a bien aidé pour la rédaction de mon



rapport de stage de Master, merci à Sri qui a vécu ces trois années de thèse au même moment et qui m'a donné de bons conseils sur la chimie des peptides, un grand merci aussi à Stéphanie qui maîtrise l'ensemble des techniques utilisées dans notre laboratoire et qui est de bon conseil au quotidien, Damla, m'ayant aidé à optimiser plusieurs étapes de synthèse dans le cadre de son stage de Master, merci aussi aux nouveaux doctorants de l'équipe, Timothé et Arthur, qui ont partagé un bout de chemin avec moi.

Sans oublier le Dr. Andrey Klymchenko dont l'expertise en fluorescence m'a apporté beaucoup de nouvelles connaissances au cours de ma thèse, Dmytro Danylchuk qui m'a beaucoup aidé aussi bien pour la microscopie à super-résolution que pour le développement du test de liaison, Nicolas Humbert pour sa gentillesse et sa formation très utile en spectroscopie de fluorescence, Romain pour sa formation en microscopie sur la plateforme PIQ m'ayant permis d'accéder au microscope confocal et d'obtenir de très beaux résultats d'imagerie.

Mes remerciements sont aussi destinés au Dr. Delphine Garnier et au Dr. Estefania Oliva de la plateforme d'analyse PACSI, m'ayant permis de caractériser tous les composés que j'ai pu synthétiser.

Merci au Dr. Pascal Villa, de la plateforme PCBIS, nos efforts ayant permis de faire beaucoup avancer le chapitre de ma thèse portant sur le récepteur de l'ocytocine, au Dr. Frédéric Simonin, étant notre partenaire avec son équipe dans l'étude du couple spexine/GalR2 ayant un très grand potentiel pour le développement de médicaments contre la douleur, à Christel Valencia, à Valérie Utard et à Sophie Gioria, leur travail remarquable ayant permis d'obtenir tous ces résultats positifs sur cellules !

J'ai aussi une pensée pour tous mes autres collègues, Damien, Antoine, Qian, Estefania, Ludovik et Eli, qui ont apporté une très bonne ambiance dans notre travail et avec qui j'ai passé de bons moments.

J'ai aussi une pensée pour tous mes amis, Loïc, Anaïs, ma famille, Priscillia, Léa, y compris pour toi, Mamie, qui a rejoint les anges du ciel depuis maintenant deux ans, qui croyait en moi et pour qui je continue à donner le meilleur de moi-même.

Je remercie sincèrement mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes études et même bien avant. Sans eux, je n'aurai pas réussi à atteindre tous ces objectifs.

Je tiens aussi à remercier du plus profond de mon cœur ma fiancée, Sandy, qui a toujours été à mes côtés et fait mon bonheur au quotidien !

## Liste des abréviations

---

AC : adénylate cyclase	ESIPT : transfert de charge intramoléculaire à l'état excité
ACN : acétonitrile	FDA : Food and Drug Administration
ADN : acide désoxyribonucléique	Fmoc : fluorénylméthoxycarbonyle
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	FRET : transfert d'énergie de fluorescence par résonance de type Förster
AP2 : protéine 2 d'adaptation de la clathrine	GAE : groupe accepteur d'électrons
ARN : acide ribonucléique	GalR : récepteur de la galanine
$\beta$ -arr : $\beta$ -arrestine	GDE : groupe donneur d'électrons
Boc : <i>tert</i> -butoxycarbonyle	GDP : guanosine diphosphate
BRET : transfert d'énergie de résonance de bioluminescence	GFP : protéine fluorescente verte
BSA : albumine de sérum bovin	GIRK : canaux potassiques rectifiant couplés aux protéines G
CBT : carbétocine	GRK : RCPG kinase
CCPs : puits recouverts de clathrine	GTP : guanosine diphosphate
CFP : protéine fluorescente cyan	3HC : 3-hydroxychromone
Cellules CHO : cellules ovariennes de hamster chinois	HATU : hexafluorophosphate de N,N-diméthylméthaniminium
CMC : concentration micellaire critique	Cellules HEK : cellules embryonnaires humaines du rein
CREB : cAMP response element binding	HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Cy 5.5 : cyanine 5.5	HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
DAG : 1,2-diacylglycérol	HRMS : spectrométrie de masse à haute résolution
DBU 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	IC <sub>50</sub> : concentration inhibitrice médiane
DCC : dicyclohexylcarbodiimide	ICT : transfert de charge intramoléculaire
DCM : dichlorométhane	IP1 : inositol monophosphate
DCVJ : 9-(dicyanovinyl)-julolidine	IP3 : inositol triphosphate
DIC : N,N'-diisopropylcarbodiimide	K <sub>d</sub> : constante de dissociation
DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine	K <sub>i</sub> : constante d'inhibition
DMAP : 4-diméthylaminopyridine	LH : hormone lutéinisante
DMF : N,N-diméthylformamide	LC : chromatographie liquide
DMSO : diméthylsulfoxyde	LRMS : spectrométrie de masse à basse résolution
DOPC : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine	
DXB : dioxaborine	
EC <sub>50</sub> : concentration efficace médiane	
EDT : 1,2-éthanedithiol	
ESI : ionisation par électronébuliseur	

MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MEM : milieu essentiel minimum  
Mmt : monométhoxytrityle  
MS : spectrométrie de masse  
NBD : nitrobenzoxadiazole  
NA : ouverture numérique  
NMM : N-méthylmorpholine  
NMR : résonance magnétique nucléaire  
NR : Nile Red  
OT : ocytocine  
OTR : récepteur de l'ocytocine  
PAINT : accumulation de points pour l'imagerie en topographie nanométrique  
PBS : tampon phosphate salin  
PEG : polyéthylène glycol  
PET : transfert d'électron photoinduit  
PKA : protéine kinase A  
PKC : protéine kinase C  
PLC $\beta$  : phospholipase C $\beta$   
PyBOP : hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxypyrrolidinophosphonium  
QY : rendement quantique  
RCPG : récepteur couplé aux protéines G  
RLuc : *Renilla* luciferase  
RP-HPLC : HPLC en phase inverse  
RTG : rapport relatif de fluorescence « rouge sur verte »  
SiR : silicon-rhodamine  
SNC : système nerveux central  
SPPS : synthèse peptidique sur support solide  
SQ : squaraine  
TEA : triéthylamine  
TFA : acide trifluoroacétique  
TFE : 2,2,2-trifluoroéthanol  
THF : tétrahydrofurane  
TICT : transfert de charge intramoléculaire twisté  
TIRF : fluorescence par réflexion totale interne  
TMP : triméthoprim  
TNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique  
TOF : temps de vol  
TR-FRET : FRET en temps résolu  
YFP : protéine fluorescente jaune

# **Introduction générale**

---

## **Contexte et objectifs**

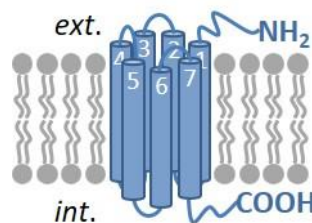


## Contexte

### 1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

#### 1.1. Structure et classification des RCPG

Il existe trois grands types de récepteurs membranaires : les récepteurs canaux, les récepteurs enzymes et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Finlay, Duffull, et Glass 2020). Ces derniers représentent la famille de récepteurs membranaires la plus importante chez les mammifères. De manière générale les RCPG sont composés d'une partie N-terminale extracellulaire, de sept hélices peptidiques  $\alpha$ , traversant la membrane cellulaire liées entre elles par des boucles intracellulaires et extracellulaires s'alternant et d'une partie C-terminale intracellulaire (Figure 1) (Coleman, Ngo, et Smith 2017).



**Figure 1.** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des RCPG.

Au total plus de 800 RCPG sont encodés dans le génome humain. Ils sont répertoriés selon six classes différentes en fonction de leurs homologies de séquences d'acides aminés. Parmi ces classes, quatre sont retrouvées chez l'Homme. Il s'agit des classes A, B, C et F. La classe A, présentant les RCPG de la famille de la rhodopsine, compte le plus grand nombre de RCPG qui est de 719 chez l'Homme. Cette classe de récepteurs sensoriels se divise entre les récepteurs olfactifs et les récepteurs visuels. Le nombre de récepteurs de la classe B s'élève quant à lui à 48 chez l'Homme. Cette classe regroupe les récepteurs de la sécrétine et ceux d'adhésion. La classe C des RCPG, au nombre de 22 chez l'Homme, présente des dimères stables, structure nécessaire pour leur signalisation. Le quatrième groupe, la classe F, comporte 11 RCPG chez les humains. Ces derniers se partagent entre 10 récepteurs frisés et un récepteur lissé (Congreve et al. 2020).

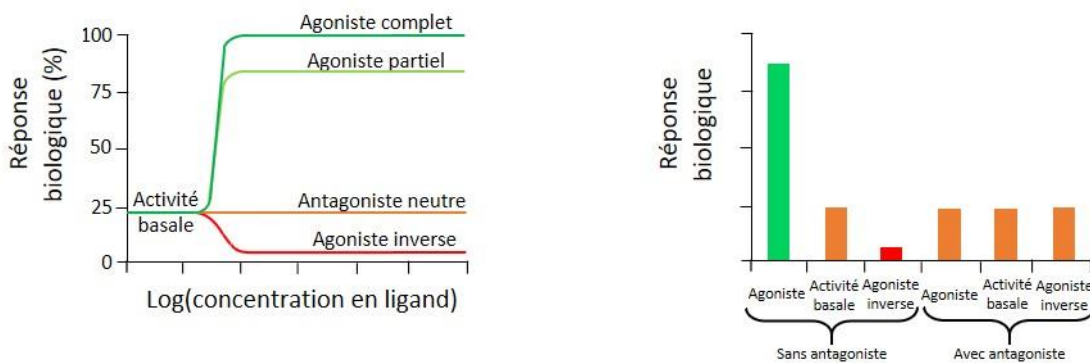
## 1.2. Expression des RCPG

Les RCPG sont exprimés dans plusieurs tissus et chaque tissu exprime différents RCPG. Par ailleurs beaucoup de ces récepteurs sont exprimés de manière importante voire même de façon exclusive au niveau du système central (SNC) (Hwang et al. 2011). Plus précisément la revue de Paul A. Insel de 2015 (Insel et al. 2015) décrit que chaque type cellulaire dans la plupart des tissus exprime plus de 100 RCPG différents se couplant à chacune des principales classes de protéines G hétérotrimériques ( $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  et  $G_{12/13}$ ). Il est mentionné que les RCPG les plus exprimés ne sont pas les plus étudiés et que nombreux d'entre eux ne présentent pas de ligand connu. Il a aussi été démontré que des cellules d'humains ou d'animaux souffrant de certaines pathologies ont une expression modifiée de différents RCPG, que ce soit une augmentation de leur expression ou une diminution de cette dernière. L'étude de l'expression des RCPG dans les différents types cellulaires peut de ce fait grandement aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

## 1.3. Signalisation des RCPG

La signalisation des RCPG régit une importante partie de la physiologie des vertébrés. De ce fait ces récepteurs se présentent comme des intermédiaires essentiels pour la transmission de l'information entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire (Rosenbaum, Rasmussen, et Kobilka 2009). Cette communication commence la plupart du temps par la liaison d'un ligand (peptides, protéines, petites molécules) au RCPG mais la stimulation extracellulaire des RCPG peut se faire également par la lumière. Cette activation du récepteur induit ainsi une cascade de signaux intracellulaires conduisant à des réponses physiologiques (Plouffe, Thomsen, et Irannejad 2020).

Même en l'absence de ligand, les RCPG sont très dynamiques et se trouvent dans un équilibre conformationnel entre des formes actives permettant leur couplage à des protéines G intracellulaires et des formes inactives. De ce fait chaque RCPG possède une activité dite « basale » (Figure 2).



**Figure 2.** Réponses biologiques induites par les différentes interactions ligand-RCPG.

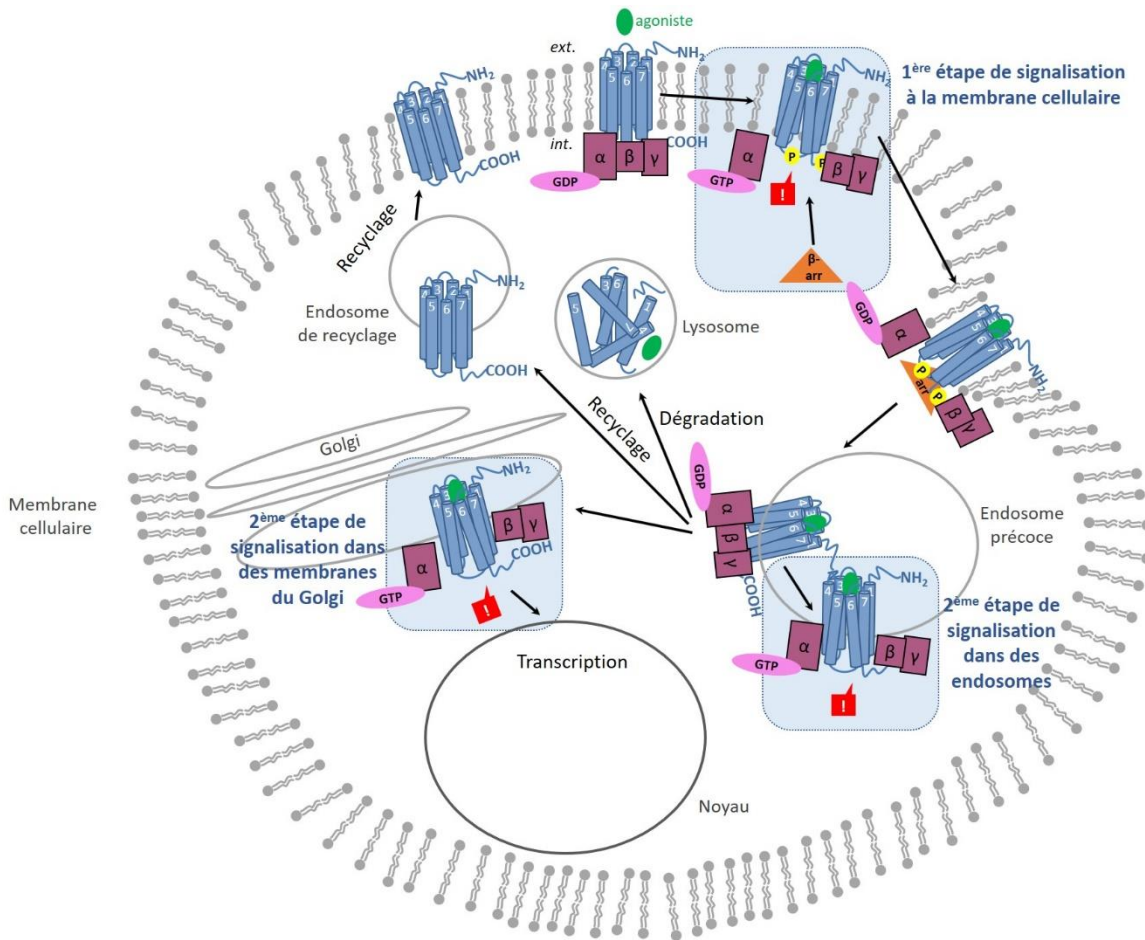
Cet équilibre conformationnel est modifié en fonction de la nature des ligands interagissant avec les RCPG. Un ligand *antagoniste* ne change pas cet équilibre et bloque ainsi l'activation du RCPG. À l'opposé un ligand *agoniste* active le récepteur, en déplaçant l'équilibre conformationnel vers les formes actives. Le ligand sera appelé *agoniste partiel* lorsque le RCPG est moins activé que par l'agoniste endogène dit *agoniste complet*. Finalement, des *agonistes inverses* stabilisent la forme inactive du récepteur et donc produisent une réponse opposée à celle des agonistes et montre ainsi une activité inférieure à l'activité basale du RCPG (Figure 2) (Congreve et al. 2020).

Au niveau mécanistique la transduction du signal débute, comme énoncé, par la stabilisation des conformations actives du RCPG qui peut ainsi se coupler à des protéines G hétérotrimériques étant constituées de trois sous unités ( $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ ). Le couplage avec la protéine  $G\alpha$  entraîne un échange de guanosine diphosphate (GDP) par du guanosine triphosphate (GTP). Ensuite la sous unité  $G\alpha$  et l'hétérodimère  $G\beta\gamma$  se dissocient, chacun modifiant alors l'activité d'effecteurs situés au niveau de la membrane cellulaire parmi lesquels l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) ainsi que des canaux ioniques. La réponse cellulaire est de ce fait orchestrée par des cascades de signaux intracellulaires qui sont induites par ces effecteurs et médiées par la production des seconds messagers. Le couplage d'un RCPG à la sous-unité  $G\alpha$  des protéines  $G_s$  et  $G_i$  induit l'activation ou l'inhibition de l'adénylate cyclase et l'augmentation ou la diminution de la production d'AMP cyclique respectivement. L'activation d'une sous-unité  $G\alpha_q$  mène quant à elle à la liaison de la protéine  $G_q$  à la phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ). Ceci induit l'hydrolyse de phospholipides en DAG et IP $_3$ . La formation d'IP $_3$  augmente ici la concentration en



calcium dans la cellule, cet ion activant différentes réponses cellulaires. Ceci ne représente que quelques exemples parmi les nombreux messagers existants et ceux qui continuent d'être découverts (A. C. Newton, Bootman, et Scott 2016).

La signalisation des RCPG peut également avoir lieu sans implication des protéines G. Suite à l'activation du récepteur, les acides aminés sérine et thréonine placés en partie C-terminale et/ou au niveau de la troisième boucle intracellulaire peuvent être phosphorylés par des RCPG kinases (GRKs), des protéines kinases A (PKA) et/ou des protéines kinases C (PKC). Cette transformation chimique mène au recrutement de  $\beta$ -arrestine ( $\beta$ -arr), induisant la dissociation du récepteur et de la protéine G et donc sa désensibilisation. Il s'en suit l'internalisation du récepteur dans la cellule, engagée par le recrutement, via la  $\beta$ -arr, de protéines comme la chaîne lourde de la clathrine et la protéine 2 d'adaptation de la clathrine (AP2), formant des puits recouverts de clathrine (CCPs) dans lesquels le récepteur désensibilisé est amené. La dynamine, une GTPase, permet alors la séparation des CCPs de la membrane cellulaire. Le RCPG est par la suite transporté vers des endosomes précoces. Le complexe  $\beta$ -arr-récepteur se dissocie puis, soit le RCPG est recyclé vers la membrane cellulaire, soit il est dégradé dans des lysosomes. D'autre part les  $\beta$ -arr emploient aussi un autre système de signalisation jouant le rôle d'adaptateurs et d'échafaudages permettant ainsi l'interaction avec beaucoup de molécules. La recherche ces dernières années a permis de mettre en évidence que certains RCPG peuvent avoir recours à différents mécanismes pour continuer leur activation des protéines G, suite à leur internalisation. Ceci peut être réalisé soit par la liaison d'un RCPG à une protéine G et une  $\beta$ -arr en même temps, en suivant une certaine conformation, ou encore par l'activation de la protéine G par le RCPG retrouvé dans le réseau du Golgi. La maîtrise spatio-temporelle de cette signalisation des RCPG, intervenant aussi bien au niveau de la transcription des gènes, copie des gènes de l'ADN en ARN messagers conduisant à la production de protéines lors de la traduction, que de l'activité des canaux ioniques, est un aspect fondamental pour assurer un bon maintien physiologique (Figure 3) (Plouffe, Thomsen, et Irannejad 2020).



**Figure 3.** Modèle de la signalisation des RCPG.

Finalement, il a été démontré que de nombreux RCPG s'oligomérisent dans des tissus natifs. L'oligomérisation des RCPG sous la forme d'homo- ou d'hétéromères est un processus qui influence la mobilité du récepteur au niveau de la membrane cellulaire, la liaison des ligands au récepteur, la signalisation et le trafic cellulaire de ce dernier (Lohse 2010).

#### 1.4. Intérêt thérapeutique des RCPG

Parmi les médicaments approuvés par les États-Unis ou l'Union Européenne, 35% ciblent les RCPG (Sriram et Insel 2018; Congreve et al. 2020). Au sein des RCPG, 103 sont la cible d'au moins un composé en phase clinique approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), dont 41 ciblés par des agonistes, 27 par des antagonistes et 35 par les deux types de ligands. De plus, le potentiel des RCPG dans la recherche médicale est encore très prometteur. En effet ce nombre de récepteurs mentionné représente seulement un quart du nombre de récepteurs pouvant être la cible de ligands pour une possible application thérapeutique. Il existe donc un potentiel important pour la découverte et le développement de nouveaux ligands à visée

thérapeutique, d'autant plus que plus d'un quart des RCPG non sensoriels sont orphelins et ne possèdent ni ligands, ni fonctions connus. Ceci démontre tout l'intérêt de l'étude des RCPG dans le développement de nouveaux médicaments. Ainsi au cours de ces cinq dernières années 19% des médicaments nouvellement approuvés par la FDA ciblent les RCPG.

Le processus de découverte de nouveaux médicaments passe par l'identification d'un nouveau ligand (« Hit ») qui sera ensuite optimisé en tête de série (« Lead »). Différents essais existent parmi lesquels, on peut citer (R. Zhang et Xie 2012) :

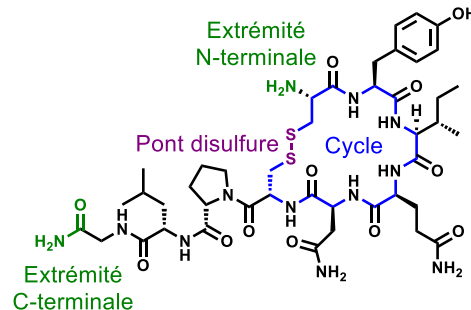
- Les **essais de liaison** employant soit des radioligands, soit des approches reposant sur le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance de type Förster (FRET). Ces approches nécessitent l'utilisation de ligands marqués fluorescents ou radioactifs, cependant elles peuvent être employées même pour un criblage sur des RCPG dont la signalisation n'est pas connue.
- La visualisation de l'internalisation du récepteur marqué ou du recrutement de  $\beta$ -arrestine par **imagerie de fluorescence**. Cette approche peut être utilisée même sans connaissance des protéines G intervenantes, cependant elle nécessite le marquage du récepteur par des protéines fluorescentes ou bioluminescentes.
- Une des méthodes universelles ne nécessitant pas d'utilisation de ligands ou de récepteurs marqués est **le criblage phénotypique** reposant sur la détection de la prolifération ou de la mort cellulaire.
- Finalement, les techniques de **dosage de seconds messagers** nécessitent la connaissance du type de couplage RCPG-protéine G. Il s'agit d'essais consistant à mesurer, après activation par un agoniste, l'accumulation de GTP, le changement de concentration de l'AMP cyclique, l'augmentation de la concentration de l'IP1 ou de l'IP3 ou la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par fluorescence, luminescence ou colorimétrie.

## 2. Des récepteurs d'intérêt du laboratoire : le récepteur de l'ocytocine (OTR) et les récepteurs de la galanine (GalR)

### 2.1. Le récepteur de l'ocytocine (OTR)

Le récepteur de l'ocytocine (OTR) fait partie de la classe A des RCPG (Jójárt, Balogh, et Márki 2007). Le ligand endogène de l'OTR, l'ocytocine (OT), est un peptide cyclique composé de 9 acides aminés, présentant un pont disulfure liant ses deux

cystéines (Figure 4) (H. Liu et al. 2020). L'OT est un neuropeptide et une hormone historiquement connue pour son rôle dans la stimulation de la contraction des muscles lisses de l'utérus pendant l'accouchement et de l'excrétion du lait pendant la lactation.



**Figure 4.** Structure de l'ocytocine (OT).

L'OTR est surtout exprimé dans les tissus de reproduction tels que l'utérus, les seins et les ovaires. En période de grossesse, l'expression dans l'utérus de l'OTR peut être doublée favorisant la liaison de l'ocytocine au niveau utérin. Après l'accouchement, cette expression diminue rapidement tandis que l'expression de l'OTR au niveau des glandes mammaires reste haute lors de la lactation (Zingg et Laporte 2003). L'OTR est également exprimé dans certaines parties du cerveau, dans des formes jeunes de cellules osseuses et des cellules endothéliales vasculaires (Blanks, Shmygol, et Thornton 2007).

Il a été démontré que l'OTR peut se coupler aux sous-unités  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{i/o}$  cependant sa liaison avec une sous-unité  $G\alpha_s$  reste discutable. En dehors des protéines G, l'OTR est phosphorylé par des GRKs conduisant au recrutement de  $\beta$ -arrestines. Ce type de stimulation de l'OTR participe à la régulation de la migration et la prolifération cellulaires (H. Liu et al. 2020).

Ces différentes voies de signalisation produisent de multiples réponses biologiques aussi bien au niveau périphérique qu'au sein du système nerveux central. Elles comprennent la reproduction avec l'instinct maternel, la sexualité, la contraction de l'utérus ou encore la lactation, la modulation du stress et celle du lien social (H. Liu et al. 2020). Le dernier rôle évoqué sous-entend le potentiel de l'OTR dans le traitement de l'autisme comme décrit dans la littérature. En effet des études ont montré un effet positif sur le comportement social après administration intranasale d'ocytocine chez des patients autistes (Benner et Yamasue 2018). D'autres effets de l'OTR ont également été observés sur l'alimentation ou encore la perception de la douleur (Jurek et Neumann 2018).

## 2.2. Les récepteurs de la galanine GalR2 et GalR3 : cibles de la spexine

Les trois récepteurs cibles du peptide galanine (GalR1, GalR2 et GalR3) appartiennent à la classe A des RCPG (Tikhonova, Gigoux, et Fourmy 2019).

Le ligand endogène de ces récepteurs est le neuropeptide galanine composé de 29 acides aminés, découvert en 1983 dans l'intestin de porc. Le nom de ce peptide provient de sa glycine en partie N-terminale et de son alanine en partie C-terminale. Le GalR1 est cartographié par autoradiographie dans le rat et le cerveau de primate à la fin des années 1980 et cloné dans les années 1990. Il s'en suit la détection et le clonage des gènes de deux récepteurs supplémentaires de la galanine, le GalR2 et le GalR3 (Lang et al. 2015).

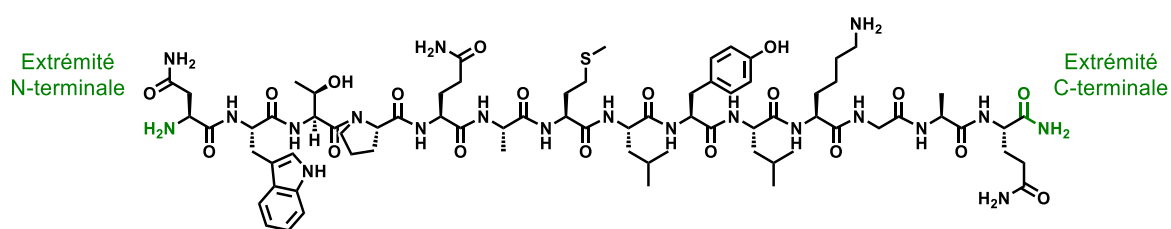
Les gènes du GalR1 et du GalR2 sont exprimés chez des vertébrés allant du poisson aux primates, alors que celui du GalR3 est uniquement présent chez certains mammifères (Z. Liu et al. 2010). Les trois récepteurs de la galanine sont exprimés de manière importante dans différents tissus de l'organisme tels que dans le cerveau, les glandes comme la thyroïde, les îlots de Langerhans du pancréas et les glandes surrénales, le tissu musculaire du cœur et le myocarde. Étant aussi retrouvé dans différents tissus périphériques, en plus du cerveau, le GalR2 présente une biodistribution plus large que le GalR1 (Webling et al. 2012).

La signalisation des récepteurs de la galanine est variée, les impliquant dans des réponses cellulaires différentes. Le GalR1 se couple surtout à des protéines  $G\alpha_i$ . Ceci peut induire l'ouverture de canaux potassiques rectifiant couplés aux protéines G (GIRK) ou encore stimuler l'activité des mitogen-activated protein kinases (MAPK) sans avoir recours aux protéin kinases C (PKC). Le GalR2 se lie principalement à des protéines  $G\alpha_q$  ou  $G\alpha_i$ . Il en résulte l'induction de la voie de signalisation des sous-unités  $G\alpha_{q/11}$  ou la stimulation des MAPK par l'intermédiaire des PKC et d'une sous-unité  $G\alpha_o$ . L'activation du GalR1 ou du GalR2 peut conduire à l'inhibition de la protéine cAMP response element binding (CREB). Le GalR3 se couple principalement aux sous-unités  $G\alpha_i$  avec une augmentation de potassium intracellulaire (Hirako 2016).

L'activité des récepteurs de la galanine induit des réponses biologiques très variées. Il a été démontré que la galanine a la capacité de gérer la reproduction, les cycles de sommeil et d'éveil, la connaissance, l'homéostasie osmotique et métabolique ou encore la douleur. Plus précisément, il a été démontré que le GalR1 est impliqué dans la neurotransmission, la douleur, l'anxiété et la récompense et le

GalR2 joue un rôle important dans la neurotransmission mais également le neurodéveloppement et le comportement affectif (Lang et al. 2015).

Un ligand peptidique, *la spexine*, ayant pour cible les récepteurs de la galanine a suscité un vif intérêt dans cette thèse. Ce peptide a été découvert dans le génome humain par Mirabeau en 2007, utilisant un modèle de Markov caché (Mirabeau et al. 2007). La spexine est conservée chez les vertébrés, laissant prédire un grand intérêt au niveau biologique. Elle est constituée de 14 acides aminés dont la séquence est présentée ci-après : NWTPQAMLYLKGAQ-NH<sub>2</sub>. Au niveau tridimensionnel, les résidus 1 à 4 montrent une certaine flexibilité et les acides aminés 5 à 14 s'organisent en hélice  $\alpha$  (Figure 5) (Lv et al. 2019).



**Figure 5.** Structure de la spexine.

Son expression a été détectée dans différentes régions du cerveau comme l'hypothalamus et au sein de zones périphériques variés telles que les organes reproducteurs, le cœur, les poumons ou encore les muscles (A. Ma et al. 2018). Le tryptophane 2, la thréonine 3 et la tyrosine 9 de la galanine représentent les résidus nécessaires pour son interaction et l'activation des GalR. Ces acides aminés présents aux mêmes positions dans la séquence peptidique de la spexine explique sa liaison aux GalR. La spexine active deux RCPG de la famille des récepteurs de la galanine, le GalR2 et le GalR3 mais pas le GalR1. Ce peptide est donc considéré comme ligand endogène des GalR2/GalR3 (Lim et al. 2019).

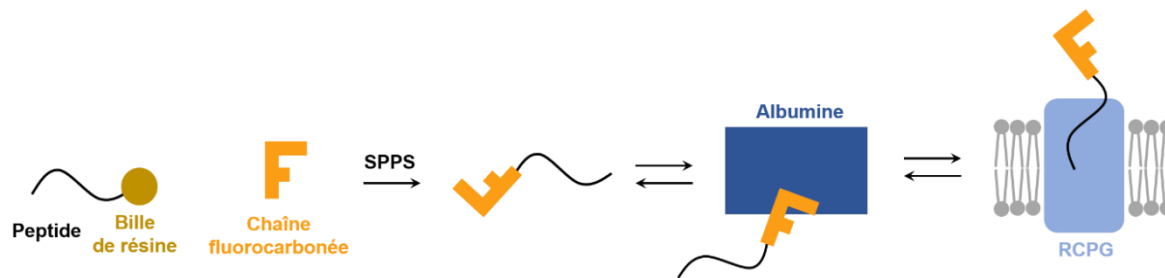
Plusieurs fonctions biologiques sont associées à la spexine. Elle agit sur le système endocrinien qui libère des hormones dans le sang en diminuant la libération d'hormone lutéinisante (LH) au niveau de l'hypophyse, la prolifération cellulaire dans le cortex surrénalien et en augmentant la sécrétion de stéroïdes surrénaliens dans ce même cortex. Elle influe sur l'homéostasie du glucose en améliorant la résistance à l'insuline et la tolérance au glucose dans le diabète de type 2 et la concentration sérique de la spexine diminue dans ce même type de diabète. Elle a un effet sur le mouvement au sein du tractus gastro-intestinal augmentant la motilité dans le petit intestin, la contraction de l'estomac, améliorant l'expulsion à partir du colon et

diminuant sa concentration sérique en cas de constipation. La spexine joue aussi un rôle dans le métabolisme lipidique et la régulation d'énergie. En effet, elle réduit la prise de poids, l'apport calorique et l'absorption d'acides gras dans le foie et dans la graisse et améliore la locomotion. Ce peptide d'intérêt possède également une fonction rénale et cardiovasculaire en diminuant les battements du cœur et l'écoulement d'urine et en augmentant la pression des artères et l'excrétion de sodium. De manière intéressante la spexine agit aussi au niveau du système nerveux central en ce qui concerne la gestion de l'alimentation et la douleur (A. Ma et al. 2018).

Cette dernière est un réel fléau mondial, affectant la vie quotidienne des individus. Des études ont montré que presque la moitié des patients ont reçu un traitement inadapté contre la douleur accompagné d'effets secondaires graves. Actuellement les agonistes opioïdes font partie des traitements les plus efficaces pour combattre la douleur. Cependant la prise de ces médicaments peut engendrer de l'hypersensibilité, une altération du système immunitaire, des étourdissements, des nausées, des vomissements et un traitement prolongé peut aussi conduire à de la tolérance et de la dépendance (Bach-Rojecky et al. 2019). Des travaux récents ont permis de démontrer que les récepteurs GalR1 et GalR2 (mais pas GalR3) interviennent dans la réponse neuronale à la douleur (A. Ma et al. 2018). N'agissant pas sur le GalR1, la spexine présente ainsi un outil intéressant pour étudier l'implication du GalR2 dans la douleur mais également un candidat pour le développement de nouveaux médicaments analgésiques n'activant pas de récepteurs opiacés et donc évitant les effets indésirables associés. Ce peptide a déjà montré un effet antinociceptif, c'est-à-dire antidouleur, après injection icv de spexine chez des souris, dans un test évaluant le temps de retrait de leur queue plongée dans un bain chaud (Toll et al. 2012; Esteouille et al. 2017). Une action sur la douleur a aussi été démontrée dans un test à la formaline, après injection de spexine dans l'hippocampe de rats (Pirzeh, et Taherianfard 2014; Moazen et al. 2018).

Très récemment, la stratégie FluoroPEP, permettant d'augmenter la stabilité métabolique des peptides par l'introduction de chaînes fluorocarbonées, a été mise au point dans notre équipe (Figure 6) (Iturrioz, Bonnet, et Llorens-Cortes 2016). Ces chaînes présentent une bonne affinité avec l'albumine, protéine circulante montrant la plus forte abondance dans le plasma (Bischel et al. 2011). De ce fait, il est suggéré que la stabilisation des peptides fluorocarbonés se fasse par l'intermédiaire de leur interaction avec cette protéine. Ces peptides sont ainsi protégés vis-à-vis de la

dégradation enzymatique au sein du système sanguin, leur permettant d'atteindre leurs récepteurs cibles.



**Figure 6.** Stratégie FluoroPEP pour stabiliser les peptides et mécanisme hypothétique de stabilisation.

L'introduction d'une telle chaîne sur la spexine a montré une amélioration de sa stabilité plasmatique, une augmentation significative de l'activité fonctionnelle *in cellulo* sur GalR2 et de l'efficacité analgésique *in vivo* de ce peptide (Esteouille et al. 2017). Il apparaît donc très intéressant de continuer le développement de spexines fluorocarbonées dans l'étude de la douleur et pour la conception de nouveaux analgésiques.

### 3. Introduction à la fluorescence : un outil puissant pour suivre les interactions ligand-RCPG

#### 3.1. Marquage des RCPG à la fluorescence

Afin d'étudier la liaison d'un ligand à son récepteur, la distribution des récepteurs dans des tissus natifs, la signalisation cellulaire et d'accélérer la découverte des médicaments ciblant les RCPG, il est important de posséder des outils permettant de visualiser le récepteur à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire.

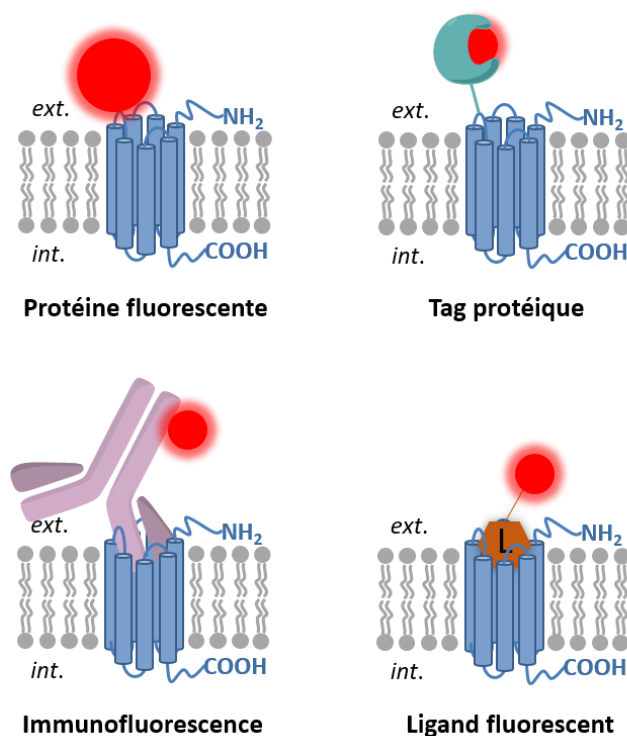
La fluorescence est une technique très puissante pour sonder le vivant grâce à son excellente sensibilité offrant la possibilité d'utiliser des concentrations subnanomolaires de fluorophore, à sa très bonne résolution spatiale (qui peut être de l'ordre de dizaines de nanomètres), à sa versatilité, à ses échelles de temps adéquates pour observer et pour quantifier les biomolécules et leurs activités en temps réel, tout en assurant une faible perturbation du système étudié (Böhme et Beck-Sickinger 2009).

Ces études pourraient se faire en mesurant la fluorescence intrinsèque des RCPG qui sont composés d'acides aminés fluorescents comme la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane. Cependant ces résidus possèdent des propriétés



spectrales limitées avec des rendements quantiques faibles (1-14%) et des longueurs d'onde d'émission de fluorescence faibles (258-365 nm) (Sinkeldam, Greco, et Tor 2010). Ceci montre qu'ils doivent être présents en grande quantité afin de pouvoir détecter leur fluorescence. De plus cette gamme de longueurs d'onde ne permet pas d'atteindre une bonne sensibilité. La revue de Shen (Shen et al. 2020), énonçant les dernières avancées en termes d'imagerie du vivant, souligne le fait que des composés fluorescents intrinsèquement présents dans les tissus biologiques limitent l'application des fluorophores excitables par la lumière ultraviolette ou bleue en imagerie *in vivo*. Cependant, ces signaux parasites sont limités lors de l'utilisation de fluorophores permettant de travailler à des longueurs d'onde d'absorption et d'émission situées dans le rouge ou proche infra-rouge (> 500 nm), offrant une meilleure pénétration dans les tissus et une meilleure résolution spatiale (Shen et al. 2020). Il est donc nécessaire de marquer les RCPG par le biais d'outils plus adaptés que les acides aminés qu'ils contiennent.

Différentes approches permettent de marquer un RCPG au moyen de la fluorescence de manière covalente ou non covalente (Figure 7).



**Figure 7.** Différentes approches pour le marquage fluorescent des RCPG.

Premièrement les RCPG peuvent être fusionnés à des **protéines fluorescentes** telles que la protéine fluorescente verte (GFP), la protéine fluorescente cyan (CFP) ou encore la protéine fluorescente jaune (YFP). Cette méthode donne accès à des

RCPG fluorescents en permanence ce qui permet de localiser le récepteur et de suivre son trafic cellulaire en temps réel (Rodriguez et al. 2017). De manière intéressante, l'activation d'un RCPG doublement marqué peut aussi être observée avec la détection de changements conformationnels du récepteur en employant la technique du FRET (Vilardaga et al. 2003). Le FRET employant des protéines fluorescentes est également utilisé pour étudier les interactions de plusieurs RCPG entre eux (Angers, Salahpour, et Bouvier 2002). Une technique semblable au FRET exploitant aussi un transfert d'énergie non radiatif est le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET). Contrairement au FRET, employant deux fluorophores ayant des propriétés spectrales différentes mais complémentaires pour assurer le transfert d'énergie, le BRET fait intervenir une enzyme *Renilla* luciferase (RLuc) et un fluorophore. Ne nécessitant pas de source de lumière externe, pouvant engendrer beaucoup de bruit de fond, pour émettre de la fluorescence, le BRET présente ainsi certains avantages en termes de sensibilité comparé au FRET. Le BRET est employé pour étudier les interactions entre RCPG (Ciruela et Fernández-Dueñas 2015) et aussi pour tester la capacité de ligands à activer un RCPG. Cette dernière évaluation peut être mise en place en introduisant RLuc sur le RCPG étudié et une protéine fluorescente sur la  $\beta$ -arrestine qui entre en interaction avec le RCPG uniquement lors de l'activation du récepteur (Kocan 2010). Parmi les inconvénients du marquage avec des protéines fluorescentes, on peut citer les propriétés spectrales de ces protéines (il n'y en a pas beaucoup qui sont excitées dans le rouge lointain ou le proche-infrarouge), leur brillance et leur photostabilité faibles. D'autre part, l'introduction d'une protéine fluorescente de grande taille sur un RCPG, comme la GFP, peut affecter la liaison du ligand au récepteur, son activité et son trafic cellulaire.

Afin de surmonter les limites des protéines fluorescentes, les **tags protéiques** ont été développés. Le principe de cette approche repose sur la fusion du récepteur d'intérêt à une enzyme suicide qui peut être marquée de façon covalente par des substrats fluorescents. Il s'agit entre autres du SNAP-tag (Keppler et al. 2004) et du CLIP-tag (Gautier et al. 2008), obtenus à partir d'O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, se liant respectivement aux dérivés de benzylguanine et benzylcytosine ; de l'Halo-tag (Los et al. 2008), dérivé de l'haloalkane dehalogenase qui réagit avec des chloroalcane ; le TMP-tag (Z. Chen et al. 2012), développé à partir de dihydrofolate reductase avec son ligand triméthopime (TMP). Contrairement aux protéines intrinsèquement fluorescentes, les fluorophores choisis ici peuvent présenter une gamme de fluorescence plus large, ainsi que de

meilleures propriétés photophysiques en termes de brillance et de photostabilité, permettant de visualiser les RCPG sur cellules vivantes avec un bon rapport signal sur bruit. Par exemple, le marquage des RCPG par des cryptates des lanthanides luminescents via le SNAP-tag a permis de développer une approche de criblage à haut débit en temps résolu TR-FRET (Maurel et al. 2008; Karpenko, Margathe, et al. 2015; Valencia et al. 2017) et d'étudier l'oligomérisation (Maurel et al. 2008) des RCPG de classe A et de classe C sur cellules vivantes. La limitation de cette approche réside dans la nécessité de modifier génétiquement les RCPG, ce qui ne permet pas d'étudier les récepteurs natifs.

**L'immunofluorescence** est une autre alternative pour le marquage fluorescent des RCPG. Elle repose sur la reconnaissance des RCPG par des anticorps fluorescents (J. Zhang et al. 1996). Cette technique peut être employée sur des RCPG non modifiés, mais malheureusement le choix des anticorps dirigés contre les RCPG non modifiés reste très limité. Afin d'universaliser cette approche, un tag génétique, reconnu sélectivement par un anticorps, peut être ajouté sur le RCPG d'intérêt (Young, Britton, et Robinson 2012). Cependant, il arrive que l'interaction d'un anticorps avec un RCPG cible change l'activité de ce récepteur, les anticorps étant trois fois plus imposants que les RCPG (Issafras et al. 2002). Ainsi l'utilisation de nanocorps (« nanobodies »), fractions d'anticorps pouvant aussi se lier à des antigènes de manière sélective mais étant dix fois plus petits que les anticorps, se révèlent être une bonne alternative (Muyldermans 2013). Les anticorps fluorescents sont beaucoup utilisés pour la détection de RCPG employant des techniques telles que la cytométrie en flux (Nevins et Marchese 2018), ou encore le Western Blot, permettant d'identifier un RCPG dans un mélange biologique complexe (Heimann et al. 2017). La dimérisation des RCPG peut aussi être étudiée avec des anticorps fluorescents au moyen d'immuno-FRET (McVey et al. 2001).

Si le but est d'étudier les récepteurs non modifiés sur cellules vivantes ou des tissus, une possibilité est d'avoir recours aux **ligands fluorescents**. Leur petite taille leur confère un grand avantage comparé aux tags génétiques minimisant l'impact d'une modification structurelle des récepteurs. Un très large choix de fluorophores synthétiques permet d'affiner les propriétés du ligand fluorescent selon l'application souhaitée.

Le principal défi réside dans la conception des ligands fluorescents. Idéalement, un ligand fluorescent pour étudier un RCPG dans son milieu natif doit satisfaire à certaines règles telles que :

- avoir une bonne affinité et spécificité pour le récepteur cible
- être chimiquement stable en milieu biologique
- avoir la capacité d'absorber et d'émettre dans la partie visible, idéalement dans le proche infrarouge du spectre afin de minimiser l'autofluorescence cellulaire et l'absorption des tissus
- pouvoir changer ses propriétés spectrales ou son intensité de fluorescence lors de sa liaison au récepteur cible

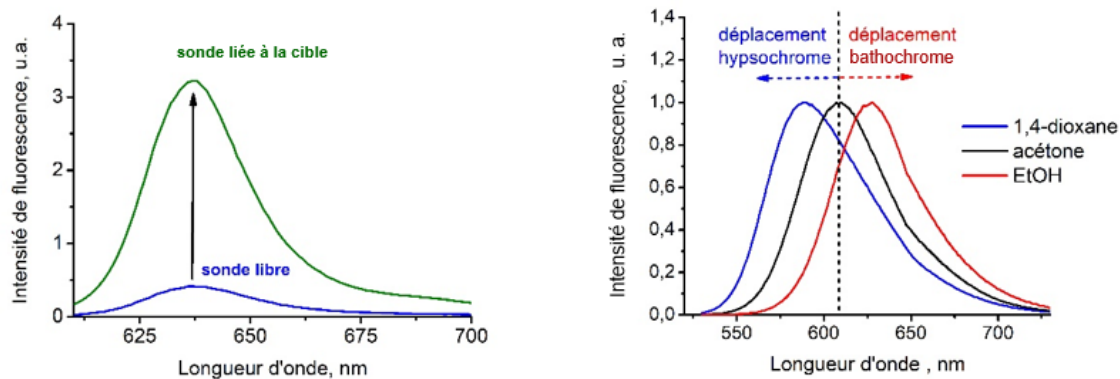
Cette dernière propriété distingue les ligands fluorescents classiques des **sondes fluorescentes sensibles à leur environnement**, que j'ai tout particulièrement étudiées au cours de ma thèse.

### 3.2. Les sondes sensibles à l'environnement : fluorogènes et solvatofluorochromes

#### 3.2.1. Mécanismes de la sensibilité à l'environnement

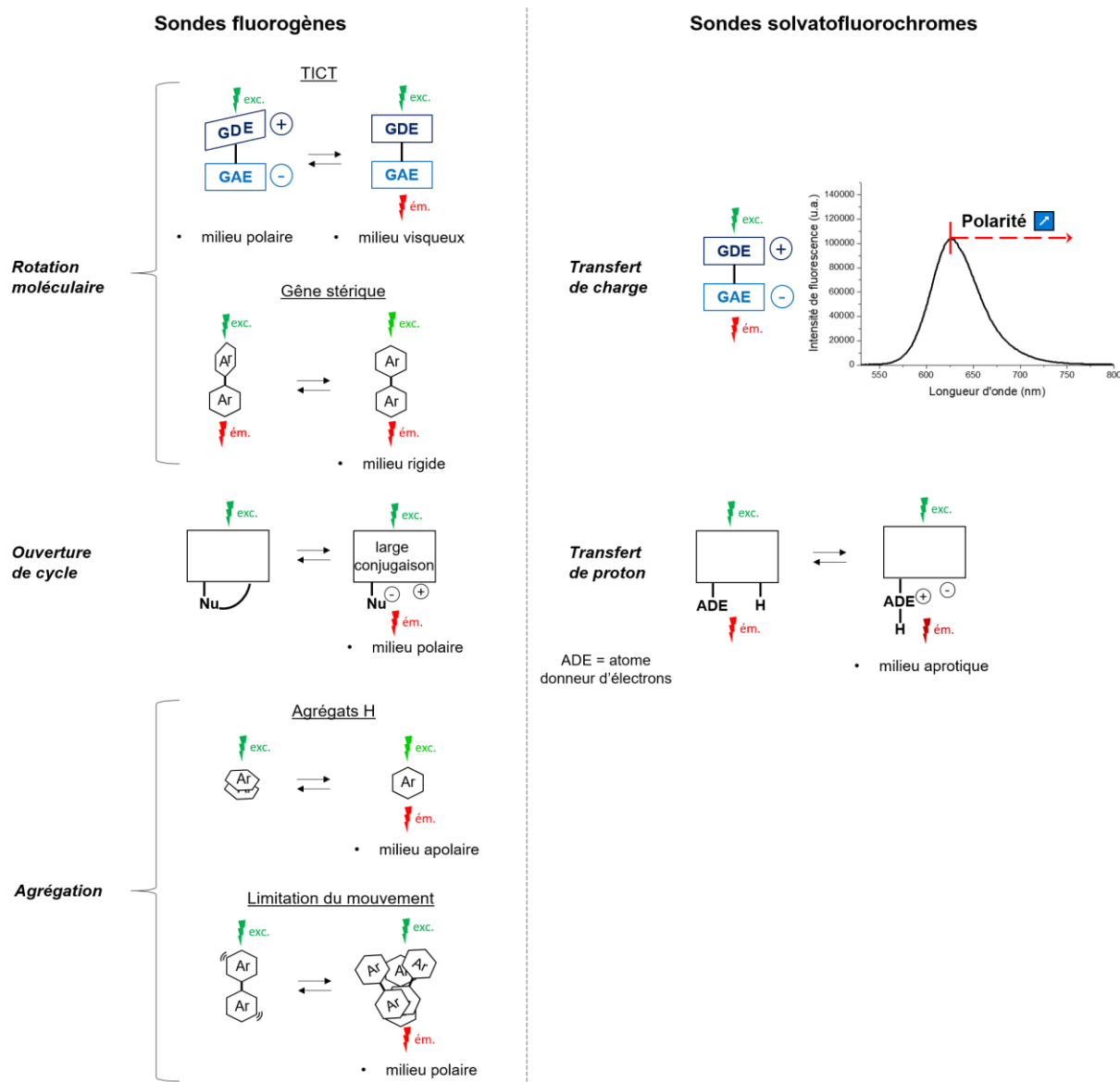
Un ligand fluorescent classique ne change pas ses propriétés spectrales en fonction du milieu dans lequel il se trouve. Ce type de ligand est fluorescent de la même manière avant et après avoir atteint son récepteur cible. Dans le cas de l'étude des RCPG sur cellules vivantes, il est primordial d'éliminer la fraction de ligand qui ne s'est pas liée à sa cible, par lavage, afin d'obtenir un bon rapport signal sur bruit, c'est-à-dire une bonne sensibilité de détection du marquage fluorescent du RCPG ciblé. Cependant cette étape peut induire la perte d'une fraction du ligand initialement liée au récepteur (Sridharan et al. 2014). De plus, les lavages deviennent beaucoup plus difficiles à réaliser, si on travaille sur des tissus natifs.

Néanmoins, pour contourner cette limite, il existe des ligands fluorescents dont les propriétés d'absorption et de fluorescence peuvent être modulées en fonction des propriétés de leur milieu proche. Ces ligands représentent ainsi des sondes dites **sensibles à leur environnement** (Klymchenko 2017). Ces sondes fluorescentes peuvent avoir une fluorescence exaltée lorsqu'elles se lient à leur cible, elles sont alors dites **fluorogènes** ou « **turn-on** » (Figure 8). Elles peuvent aussi présenter un changement de couleur, elles sont ainsi qualifiées de solvatochromes, ou plus précisément de **solvatofluorochromes**, si leur maximum d'émission de fluorescence est modifié en fonction de l'environnement dans lequel elles se situent (Figure 8).



**Figure 8.** Illustration des propriétés fluorogènes et solvatofluorochromes. À gauche : l'intensité de fluorescence de la sonde fluorogène augmente suite à la liaison à sa cible. À droite : le maximum d'émission d'un fluorophore solvatofluorochrome se déplace vers le rouge (déplacement bathochrome) quand la polarité du milieu augmente et vers le bleu (déplacement hypsochrome) quand la polarité du milieu diminue.

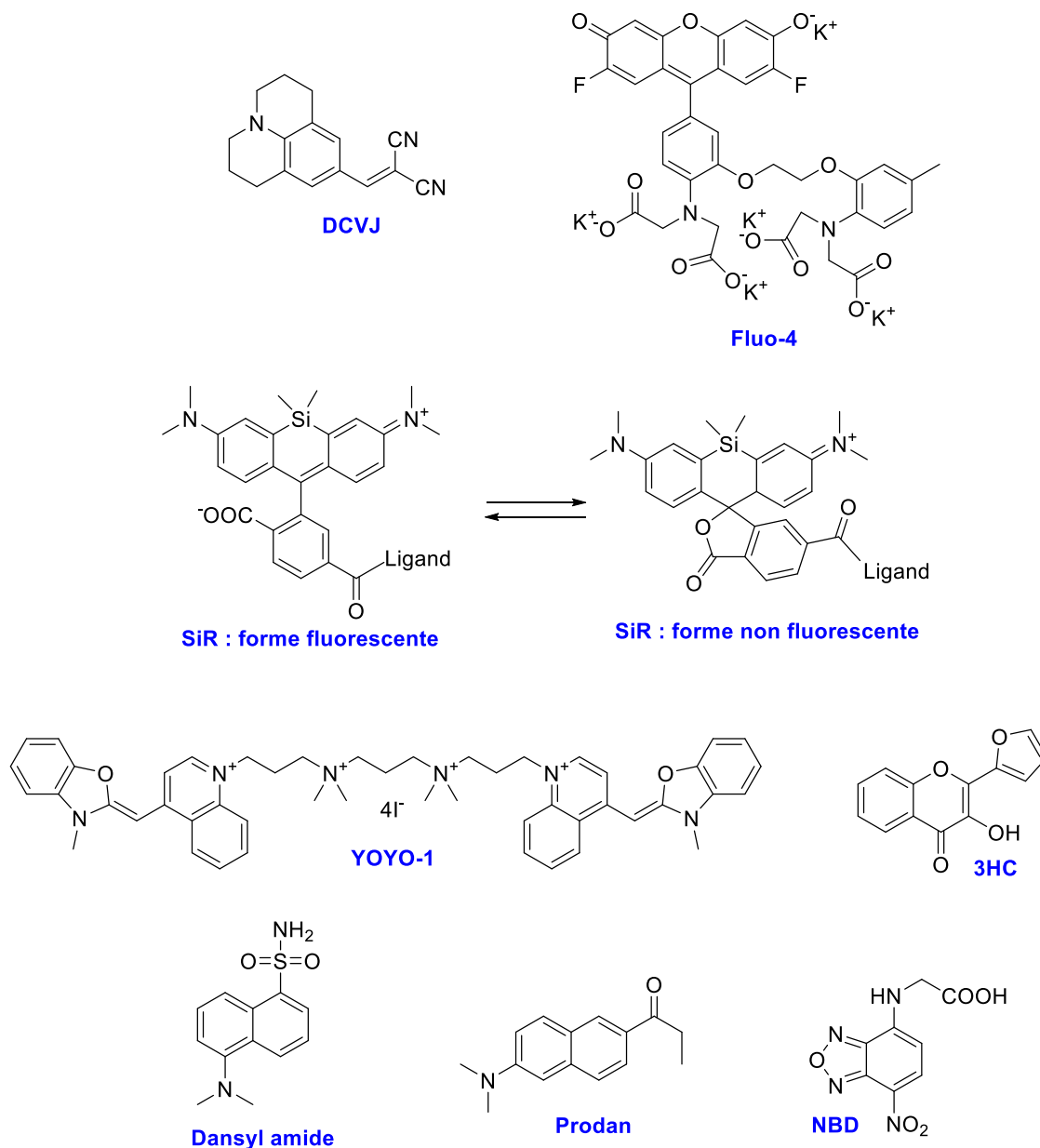
La sensibilité des sondes vis-à-vis de leur environnement dépend des propriétés intrinsèques du fluorophore qu'elles contiennent. Son origine peut provenir de différents phénomènes décrits ci-après (Figure 9).



**Figure 9.** Différents phénomènes expliquant la sensibilité à l'environnement de sondes fluorogènes (à gauche) et solvatofluorochromes (à droite).

La variation d'intensité de fluorescence en fonction du milieu caractérise les sondes fluorogènes. Cette modulation peut avoir lieu lors d'une **rotation moléculaire** au sein de leur structure. Les fluorophores de ce type sont typiquement des structures planes à l'état fondamental, présentant un groupement donneur d'électrons (GDE) et groupement accepteur d'électrons (GAE), situés de part et d'autre de la molécule. À l'état excité, la dissipation de l'énergie dans le milieu peut provoquer la rotation d'une partie de la molécule par rapport à l'autre jusqu'à une torsion de  $90^\circ$  qui détruit la conjugaison. Un tel état s'appelle l'état TICT (twisted intramolecular charge transfer), il est stabilisé par des solvants polaires et très souvent est peu ou n'est pas fluorescent (Sasaki, Drummen, et Konishi 2016;

Alhassawi et al. 2018). Par ailleurs, plus le milieu est visqueux, moins le composé pourra réaliser ce twist et plus il émettra de fluorescence. Un exemple classique de ce type de fluorophores, dits *rotors moléculaires* (Haidekker et Theodorakis 2007) est la 9-(dicyanovinyl)-julolidine (DCVJ) (Figure 10).



**Figure 10.** Exemples de fluorophores sensibles à leur environnement : fluorogènes (DCVJ, Fluo-4, SiR, YOYO-1) et solvatofluorochromes (3HC, dansyl amide, prodan, NBD).

**Le transfert d'électron photoinduit** (PET – photoinduced electron transfer) entre un fluorophore organique et un groupement donneur d'électrons (typiquement un groupe alkylamine) est un processus d'oxydoréduction souvent responsable de l'inhibition de fluorescence. Ce principe est exploité dans différentes

sondes pour des ions, par exemple la sonde calcique Fluo-4 (Gee et al. 2000) (Figure 10). En l'absence du calcium, la fluorescence de la sonde est inhibée par le PET entre le groupement dialkylamino du chélateur et le fluorophore. La complexation du calcium au chélateur rend le PET impossible, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence de la sonde.

Un composé peut aussi devenir fluorescent par **ouverture de cycle**, formant ainsi une large conjugaison au sein de l'espèce chimique. C'est notamment le cas de fluorescéines, rhodamines, carbopyronines et silicon rhodamines (Wang et al. 2020) (Figure 10) présentant un groupe spirolactone qui s'ouvre en milieu polaire, provoquant ainsi la fluorescence.

Des sondes fluorogènes ont également la possibilité d'être développées en se basant sur le principe de **l'agrégation**, causant une perte de fluorescence (Klymchenko 2017; Ostrowska et al. 2018). Cette agrégation provient de l'interaction intramoléculaire ou intermoléculaire entre groupements aromatiques. Ils se placent parallèlement l'un au-dessus de l'autre et leur interaction de type «  $\pi$ -stacking » forme ainsi des agrégats H. Ces multimères, organisés de cette manière, sont excités avec une énergie plus importante, induisant une absorption à de plus faibles longueurs d'onde. Il s'en suit une désexcitation rapide non radiative, puis une émission à plus hautes longueurs d'onde qu'à l'état de monomère mais ayant une faible probabilité d'avoir lieu. Cette agrégation est favorisée en milieu polaire rendant les sondes peu fluorescentes en milieu aqueux. Le principe de l'agrégation a été employé pour développer entre autres les sondes de la famille YOYO pour l'ADN (Figure 10) (Hirons, Fawcett, et Crissman 1994).

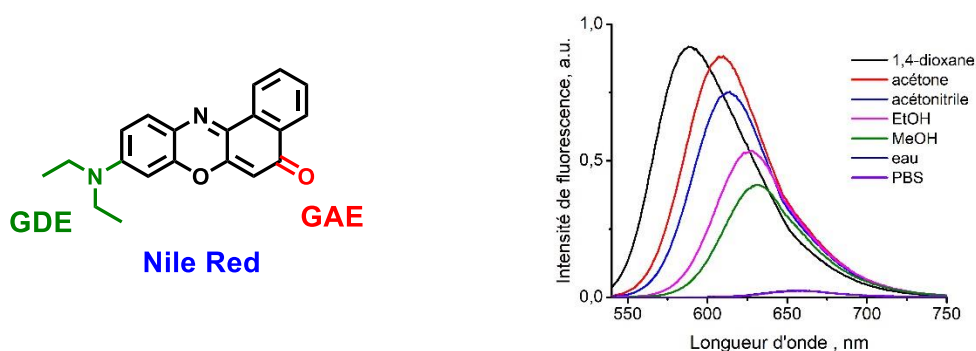
Concernant les sondes solvatofluorochromes, leur longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence varie en fonction de la polarité du milieu environnant. Un caractère solvatofluorochrome peut être observé chez des espèces réalisant, lorsqu'elles sont excitées, **un transfert de proton** (ESIPT – excited state intramolecular charge transfer) de manière intramoléculaire entre deux groupements qu'elles portent. Un exemple de ce type de fluorophores est la 3-hydroxychromone (3HC, Figure 10). Pour 3HC, l'ESIPT se traduit par l'apparition de deux bandes de fluorescence distinctes dont l'intensité respective dépend de la polarité du solvant, car les liaisons hydrogène avec les solvants protiques stabilisent la forme normale et défavorisent ainsi le transfert intramoléculaire de proton (Demchenko 2006).



Cependant le mécanisme le plus courant du solvatofluorochromisme reste le **transfert de charge intramoléculaire (ICT) photoinduit** (Sumalekshmy et Gopidas 2004). L'excitation d'un fluorophore possédant un groupe donneur d'électrons (GDE) conjugué à un groupe accepteur d'électrons (GAE) provoque une augmentation importante du moment dipolaire de la molécule jusqu'à la séparation des charges à l'état excité. Plus l'environnement est polaire, plus ce composé excité chargé sera stabilisé par le solvant. Cela se traduit par la diminution de la différence énergétique entre son état excité et son état fondamental et donc le composé émettra de la fluorescence à plus grandes longueurs d'onde quand la polarité du solvant augmente. Les exemples classiques de ce type de fluorophores sont le dansyl amide, le prodan, le NBD (Figure 10) ou le Nile Red (Figure 11) (Klymchenko 2017).

### 3.2.2. Le Nile Red : fluorophore sensible à l'environnement

Le Nile Red est un fluorophore à la fois fluorogène et solvatofluorochrome qui a suscité un grand intérêt dans ces travaux de thèse (Figure 11).



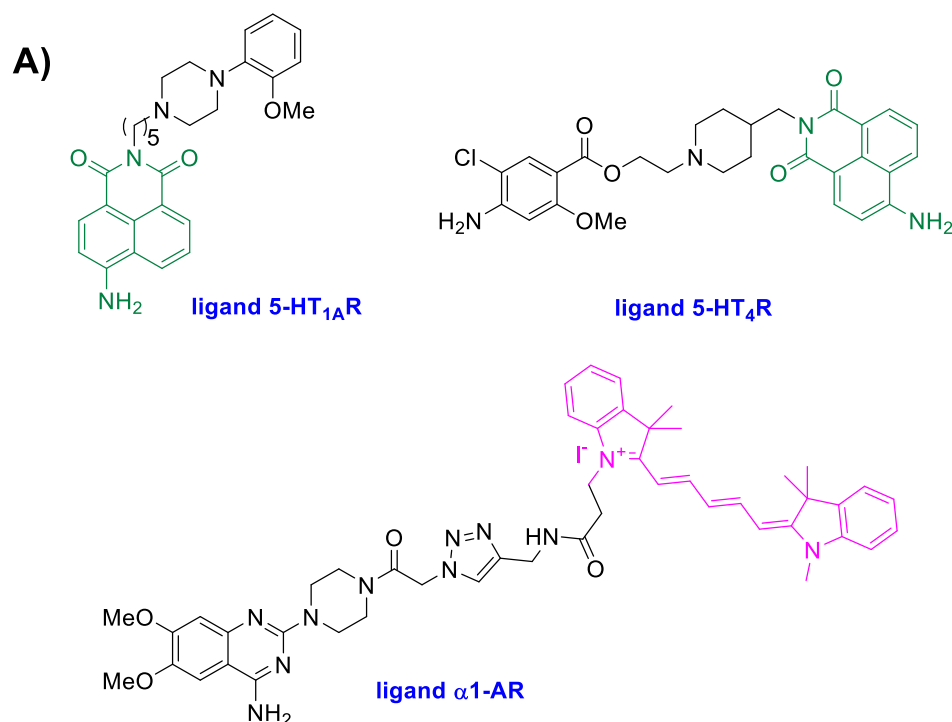
**Figure 11.** Structure du Nile Red et spectres de fluorescence de son dérivé NR-PEG-CBT (Karpenko et al. 2014) dans des solvants de polarités différentes.

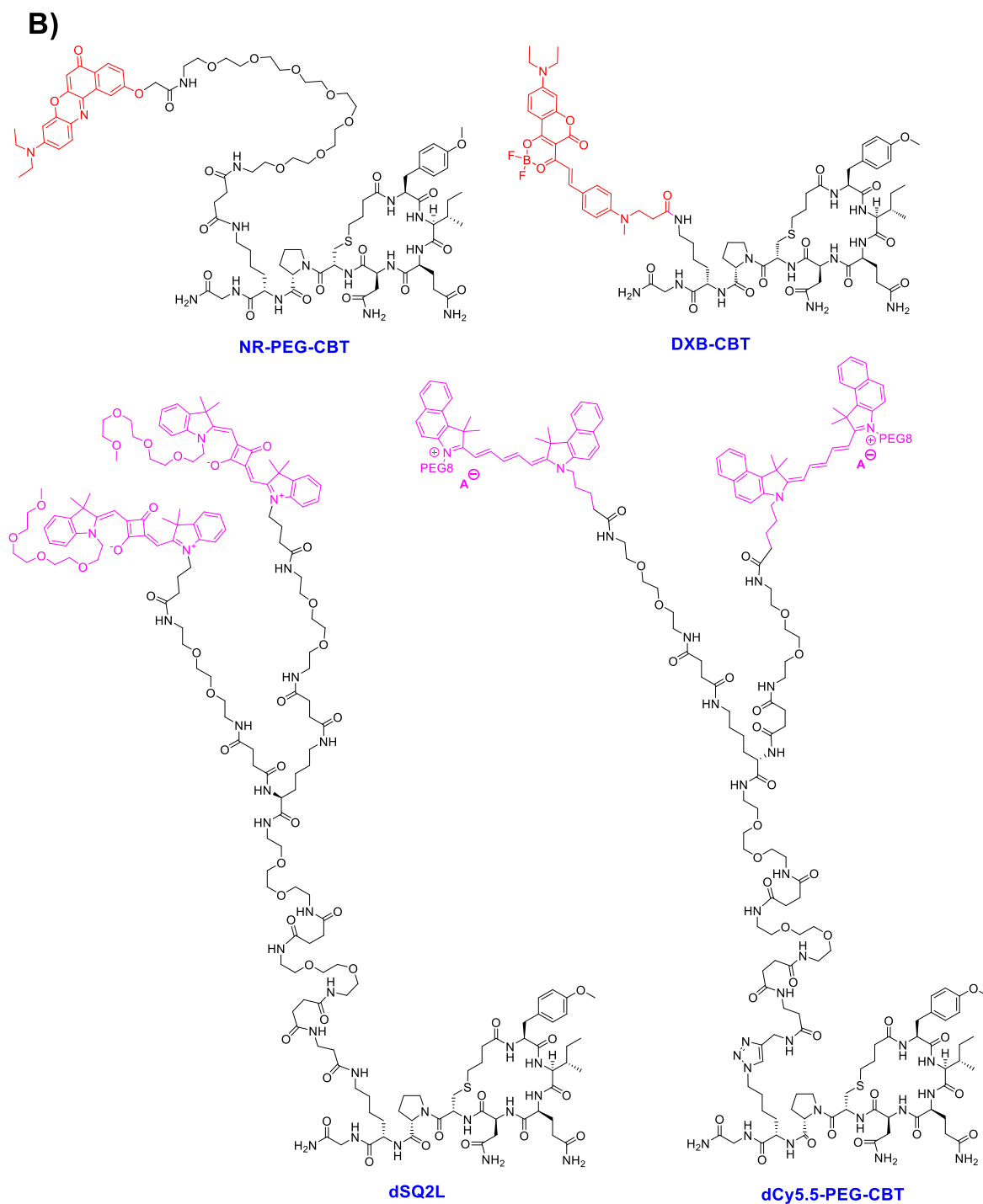
Le Nile Red appartient à la famille des benzo[α]phénoxazines, sous classe de la famille des phénoxazines (Martinez et Henary 2016). Cet ensemble de fluorophores présente une structure aromatique conjuguée qui minimise les voies de désexcitation non radiative et se traduit par des rendements quantiques de fluorescence très élevés (jusqu'à 80% dans les solvants apolaires). Le Nile Red possède un groupement électrodonneur, son amine tertiaire, ainsi qu'un groupe électroattracteur, son carbonyle, de part et d'autre d'un système aromatique conjugué. Cette structure particulière rend son absorption et sa fluorescence extrêmement sensibles à son environnement par le mécanisme ICT. Le Nile Red présente une longueur d'onde d'absorption maximale allant de 500 nm, dans le

cyclohexane, à 570 nm, dans l'eau. Sa fluorescence est ensuite émise dans une gamme spectrale allant de 554 nm, dans le cyclohexane, à 666 nm, dans l'eau, témoignant de son caractère solvatofluorochrome (Samsonova, Selivanov, et Kopylova 2014). De plus, grâce à son caractère fluorogène, la fluorescence du Nile Red est négligeable en milieu aqueux et est très exaltée en milieu apolaire. La diminution de fluorescence en milieu polaire provient très probablement d'une rotation TICT au niveau de la liaison entre son azote et son noyau aromatique qui accompagne un transfert d'électron photoinduit dans des solvants polaires et donneurs d'hydrogène (Golini, Williams, et Foresman 1998; Guido et al. 2010).

La sensibilité de la fluorescence du Nile Red à son environnement a déjà été mise à profit dans différentes applications. Les dérivés du Nile Red ont été utilisés pour l'étude de la polarité des biomembranes (Kucherak et al. 2010), pour le marquage des organites cellulaires (Jose et al. 2010), ainsi que pour le développement de senseurs de thiols (S.-J. Chen et Chang 2004).

Le Nile Red a été également sélectionné par notre groupe pour concevoir les premières sondes fluorogènes rouges pour étudier le récepteur de l'ocytocine par microscopie sur cellules vivantes dans des conditions homogènes (Figure 12B) (Karpenko et al. 2014).





**Figure 12.** Sondes sensibles à leur environnement de nature non peptidique (A) et peptidique (B) ciblant des RCPG.

### 3.2.3. Les sondes sensibles à leur environnement ciblant les RCPG

Les sondes sensibles à l'environnement représentent ainsi une option très intéressante pour étudier les RCPG. Le caractère fluorogène permet de visualiser le récepteur sur cellules vivantes ou même *in vivo* sans nécessité d'éliminer l'excès de sonde fluorescente, assurant ainsi un très bon contraste. Le caractère

solvatofluorochrome peut être utilisé pour analyser le microenvironnement du ligand après la fixation au récepteur et son changement suite à son activation.

Les premières sondes sensibles à l'environnement ciblant des RCPG ont été développées pour les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1A</sub>R (Lacivita et al. 2009) et 5-HT<sub>4A</sub>R (Berque-Bestel et al. 2003) (Figure 12A). Employant un fluorophore excitable par la lumière bleue, elles ont néanmoins permis de détecter la présence des récepteurs cibles sur la surface de cellules vivantes par microscopie ou spectroscopie de fluorescence.

La première sonde fluorescente rouge sensible à l'environnement ciblant un RCPG a été développée dans notre groupe (Figure 12B) (Karpenko et al. 2014) en utilisant le fluorophore mentionné précédemment, le Nile Red, et le ligand peptidique carbétocine (CBT). L'excellent caractère fluorogène du Nile Red a permis de visualiser et de quantifier l'OTR sur la surface de cellules vivantes dans des conditions homogènes (sans lavage). Toujours sur la base de la carbétocine, le rotor moléculaire DXB-CBT (Karpenko et al. 2016) a été ensuite développé. Finalement, le concept de dimère fluorogène a été employé avec succès pour développer les sondes fluorogènes dSQ2L (Karpenko, Collot, et al. 2015) et dCy5.5-PEG-CBT (Esteouille et al. 2020) permettant de visualiser le récepteur de l'ocytocine natif sur cellules vivantes et *in vivo* chez la souris allaitante, respectivement.

Cependant, les sondes rouges et proches-infrarouges fluorogènes mentionnées ci-dessus sont dérivées du ligand peptidique CBT. Afin d'étendre le concept de sondes fluorogènes à d'autres RCPG, il est nécessaire de valider l'approche sur des ligands non peptidiques, présentant en général une meilleure stabilité chimique mais une lipophilie plus importante et une solubilité nettement moins bonne comparées à celles des ligands peptidiques. La seule sonde fluorogène dérivée d'un ligand non peptidique ciblant un RCPG, l' $\alpha$ 1-AR, a été décrite en 2016 par Ma, et al. (Z. Ma et al. 2016). Cependant, le caractère fluorogène du fluorophore utilisé, la cyanine 5, est très peu prononcé et, de plus, ce fluorophore n'est pas solvatofluorochrome.



## Objectifs des travaux de thèse

---

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse consiste à développer des outils fluorescents innovants permettant de suivre les interactions ligands-RCPG. En particulier, ces outils doivent permettre de 1) étudier l'environnement local des ligands ciblant les RCPG et le changement de ce microenvironnement après la fixation au récepteur, 2) développer un test de liaison innovant, alternatif à la radioliation, sur des récepteurs sauvages.

Afin de répondre aux changements subtils de microenvironnement des ligands, le fluorophore employé doit avoir un fort caractère solvatofluochrome. D'autre part, le développement d'un test de liaison sur récepteur sauvage nécessite des fluorophores fluorogènes qui s'éclairent uniquement au contact de la cible et permettent de travailler dans des conditions homogènes, sans lavage. Enfin, le fluorophore optimal pour étudier les RCPG doit fluorescer dans le rouge ou proche-infrarouge pour minimiser le bruit de fond provoqué par l'autofluorescence cellulaire et augmenter la sensibilité de détection. Le fluorophore Nile Red répond parfaitement à ce cahier des charges.

Dans le premier chapitre de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la conception d'une sonde fluorescente sensible à l'environnement non peptidique et antagoniste pour le récepteur de l'ocytocine afin d'étudier le microenvironnement du récepteur par microscopie à deux couleurs et de développer un test de liaison « turn-on » sur le récepteur sauvage.

Dans le second chapitre, mes recherches se sont focalisées sur le développement d'acides aminés fluorogènes et solvatofluochromes originaux afin de concevoir des sondes peptidiques stables et sensibles à leur environnement. Nous avons choisi comme peptide modèle, la spexine et son récepteur GalR2. Ces sondes originales doivent nous permettre : 1) d'étudier de façon très fine les interactions de la spexine avec son récepteur sur cellules vivantes ; 2) de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'amélioration de la stabilité plasmatique et des propriétés pharmacologiques de la fluorospexine.



# Chapitre 1

---

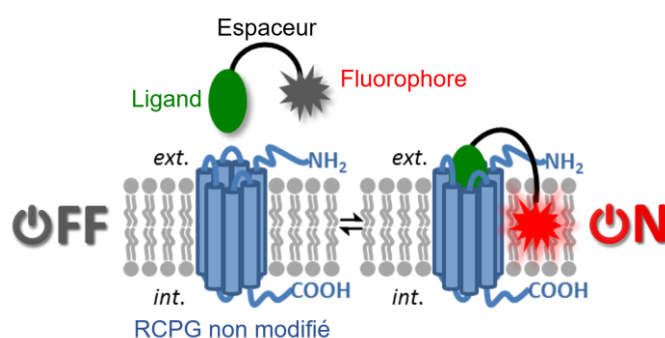
## Développement de sondes fluorescentes sensibles à l'environnement pour le récepteur de l'ocytocine





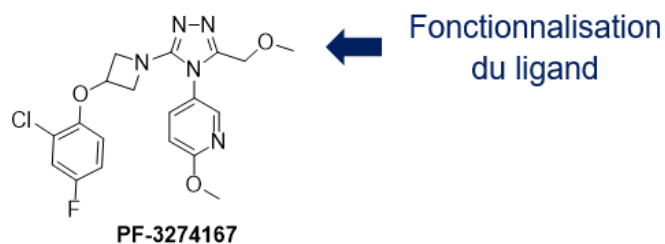
## 1. Conception et synthèse de sondes fluorescentes dérivées du Nile Red ciblant l'OTR

Le but de ce chapitre a été de développer les premières sondes fluorogènes et solvatofluorochromes non peptidiques rouges ciblant le récepteur de l'ocytocine. La Figure 13 illustre les propriétés souhaitées pour ces sondes. Afin d'avoir un bon rapport signal sur bruit sans étape d'élimination de la sonde par lavage, l'objectif est de disposer de sondes qui ciblent l'OTR de manière spécifique et qui deviennent fluorescentes uniquement à partir du moment où elles se lient à ce récepteur. Pour atteindre ces objectifs, ces sondes se composent de trois parties. D'une part, elles sont constituées d'un ligand, qui doit posséder une bonne affinité et sélectivité vis-à-vis du récepteur cible, et une position pouvant être fonctionnalisée par le fluorophore en limitant l'impact sur sa pharmacologie. D'autre part, ces sondes portent un fluorophore non fluorescent dans l'eau, fluorescent à une longueur d'onde suffisante pour éviter l'autofluorescence, sensible à son environnement, brillant et stable chimiquement et photochimiquement. Entre ces deux parties se trouve un espaceur qui a pour but d'améliorer la solubilité des sondes, réduire leurs interactions non spécifiques, tout en préservant l'affinité du ligand pour son RCPG.



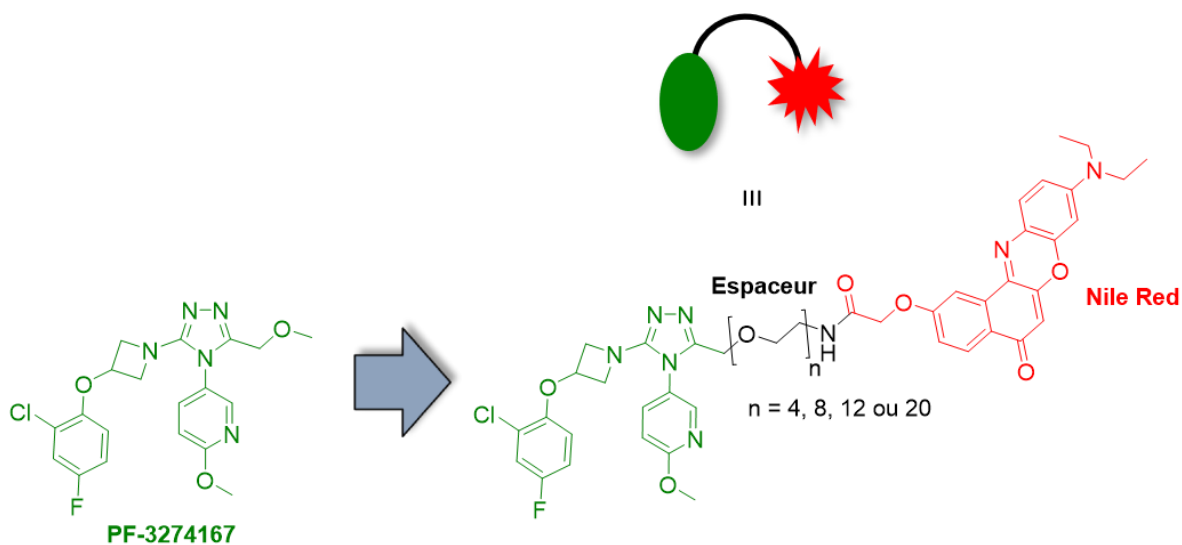
**Figure 13.** Principe de l'approche fluorogène pour le marquage fluorescent de RCPG non modifiés sans lavage.

Un ligand ayant une affinité nanomolaire pour l'OTR et une bonne sélectivité vis-à-vis des récepteurs de la vasopressine, le PF-3274167 ou cligosiban, a été sélectionné comme ligand (A. Brown et al. 2010). Par ailleurs, il a été montré au laboratoire que la fonctionnalisation de ce ligand en position 5 de son cycle triazole par des chaînes polyéthylène glycol (PEG) n'influçait pas l'affinité du ligand pour son récepteur (Figure 14) (Karpenko, Margathe, et al. 2015).



**Figure 14.** Structure du PF-3274167 et position de fonctionnalisation.

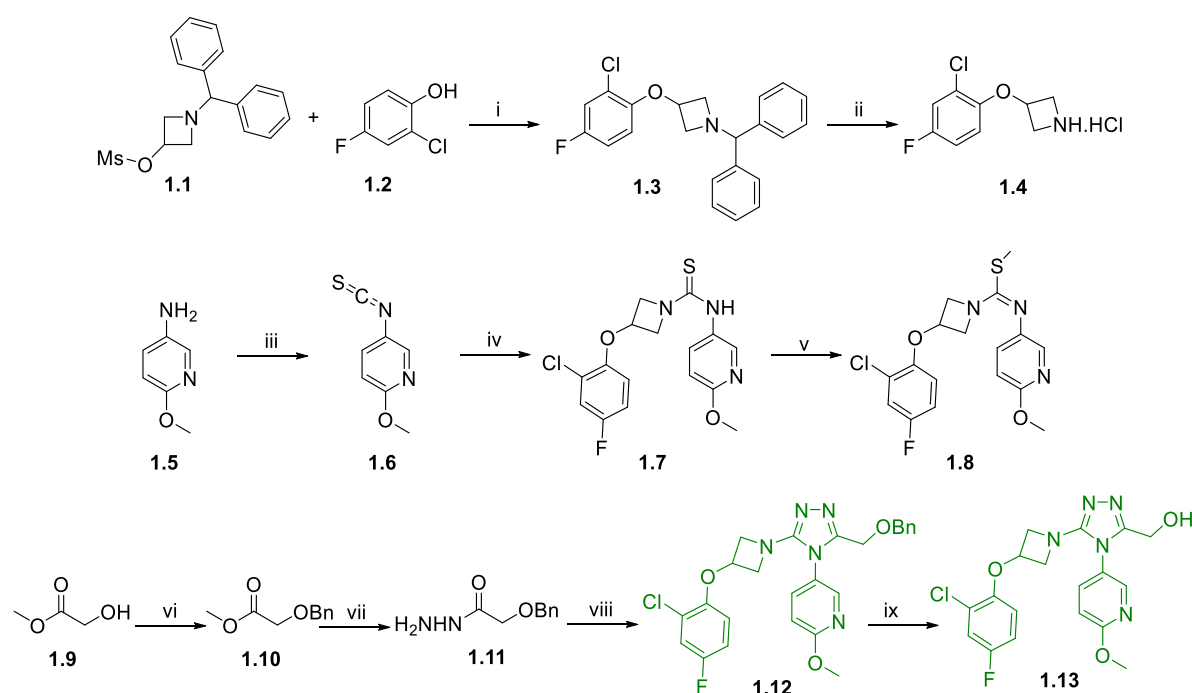
Le Nile Red, fluorophore très intéressant pour ces propriétés fluorogènes, solvatofluorochromes et sa gamme d'émission de fluorescence, a été choisi pour le marquage fluorescent de l'OTR. L'ajout d'un espaceur PEG, ces chaînes étant connues pour améliorer la solubilité dans l'eau, a été considéré entre le ligand et le fluorophore. La longueur de cette chaîne a été modulée (PEG<sub>4</sub>, PEG<sub>8</sub>, PEG<sub>12</sub> ou PEG<sub>20</sub>) afin de définir quelle longueur d'espaceur est nécessaire dans ce cas pour minimiser les interactions non spécifiques des sondes (Figure 15).



**Figure 15.** Conception de sondes non peptidiques sensibles à l'environnement pour l'OTR.

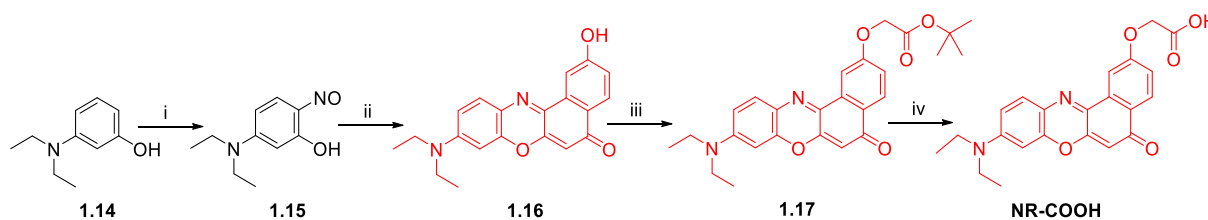
La synthèse de ces sondes non peptidiques dérivées du Nile Red ciblant l'OTR a démarré par la préparation du ligand **1.13**, dérivé déméthylé de l'antagoniste sélectif vis-à-vis de l'OTR PF-3274167 (Schéma 1). Cette synthèse a été réalisée en neuf étapes en se basant sur la stratégie développée par l'équipe de Watson et adaptée récemment au laboratoire à la synthèse d'autres dérivés fluorescents du PF-3274167 (Schéma 1) (A. Brown et al. 2010; Karpenko, Margathe, et al. 2015). Le 2-chloro-4-fluorophénol **1.2** a tout d'abord été alkylé avec le méthanesulfonate de

1-(diphénylméthyl)-3-azétidinyle **1.1** en présence de carbonate de potassium conduisant au composé **1.3**. La déprotection de sa fonction amine a ensuite été effectuée par réaction avec le chloroformiate de chloroéthyle menant au composé **1.4** avec un rendement global de 89%. En parallèle, l'isothiocyanate **1.6** a été préparé à partir de la 6-méthoxy-3-pyridinamine **1.5** en utilisant du 1,1'-thiocarbonyldiimidazole avec un rendement de 87%. L'addition de l'amine **1.4** sur l'isothiocyanate **1.6**, a conduit quantitativement à la thiourée **1.7**. Cette dernière a été méthylée en présence d'iodure de méthyle pour donner la *S*-méthylthiourée **1.8**. En parallèle, la fonction alcool du glycolate de méthyle **1.9** a été protégée par un groupement benzyle. Le traitement de l'ester **1.10** avec l'hydrazine a conduit à l'obtention de l'hydrazide **1.11** avec un excellent rendement de 98%. La cyclisation entre l'hydrazide **1.11** et la *S*-méthylthiourée **1.8** catalysée par l'acide trifluoroacétique a permis d'obtenir le triazole **1.12** avec un rendement de 68%. Finalement, le dérivé alcool de PF-3274167 **1.13** a été obtenu par élimination du groupement protecteur benzyle en présence de l'acide de Lewis  $\text{BCl}_3$  avec un rendement de 56%.



**Schéma 1.** Synthèse d'un dérivé alcool du PF-3274167 **1.13** : (i)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ACN, 82 °C, 2,5 h, 89% ; (ii)  $\text{CH}_3\text{CHClCOCl}$ , ACN, 0-82 °C, 1 h, puis MeOH, 65 °C, 3 h, quant. ; (iii) 1,1'-thiocarbonyldiimidazole, THF, 0-66 °C, 3,5 h, 87% ; (iv) **1.4**, NMM, THF, 0-25 °C, 5 h, quant. ; (v) MeI, *t*-BuOK, THF, 0 °C, 3,5 h, quant. ; (vi) BnBr,  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 35 °C, 20,5 h, 83% ; (vii) hydrate d'hydrazine, MeOH, 65 °C, 17 h, 98% ; (viii) **1.8**, TFA, THF, 66 °C, 6 h, 68% ; (ix)  $\text{BCl}_3$ , DCM, 0 °C, 4 h puis  $\text{H}_2\text{O}$ , 56%.

Ensuite la synthèse du dérivé acide du Nile Red, NR-COOH, a été effectuée (Schéma 2). La procédure reportée dans la littérature commence par la conversion du 3-diéthylaminophénol **1.14**, en nitrosophénol **1.15** qui est ensuite engagé dans une cyclisation oxydante intermoléculaire avec le 1,6-dihydroxynaphtalène pour obtenir le dérivé phénol du Nile Red **1.16**. Selon les protocoles originaux (Briggs et al. 1997; Martin-Brown et al. 2005), le nitrosophénol **1.15** est purifié par recristallisation à partir d'un mélange éthanol/éther diéthylique et ce composé est ensuite porté à reflux dans du DMF avec du 1,6-dihydroxynaphtalène pour produire le composé désiré **1.16** avec un rendement modéré de l'ordre de 42% sur deux étapes.



**Schéma 2.** Synthèse du NR-COOH. (i)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 2,5 h ; (ii) 1,6-dihydroxynaphtalène, DMF,  $110\text{ }^\circ\text{C}$ , 45 min, 44% ; (iii) *tert*-Butyl chloroacétate,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acétone,  $56\text{ }^\circ\text{C}$ , 6,5 h ; (iv) TFA, DCM,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 1,5 h, 84%.

Cependant, en pratique, la recristallisation du nitrosophénol **1.15** dans le DMF à reflux n'a pas été facilement reproduite. En effet, il a été observé que ce nitrosophénol se décompose dans du DMF à ébullition, donnant des rendements très variables et faibles pour la synthèse du dérivé du Nile Red **1.16** (27% au mieux). Nous avons alors cherché à optimiser le protocole de cette synthèse en omettant l'étape problématique de cristallisation. Il a été trouvé que de meilleurs rendements de **1.16** sont obtenus quand le nitrosophénol brut **1.15** est isolé par évaporation du mélange réactionnel acide et lorsque cet intermédiaire est ensuite directement engagé dans la cyclisation sans purification supplémentaire. Les conditions de la cyclisation ont également été optimisées (Tableau 1). Tout d'abord, cette étape a été réalisée en faisant réagir entre elles des quantités équimolaires de 1,6-dihydroxynaphtalène et nitrosophénol **1.15** sous reflux dans du méthanol pendant presque deux jours. Au final seulement 11% du produit désiré ont pu être obtenus dans ces conditions. Afin de tenter d'accélérer la conversion, le milieu réactionnel a été porté à ébullition dans des solvants permettant d'atteindre des températures plus élevées. Cependant ni l'éthanol, ni l'acétonitrile n'ont permis d'accéder au dérivé du Nile Red **1.16**, conduisant toujours à la décomposition du nitrosophénol **1.15**. Comme mentionné précédemment, la littérature décrit souvent

la réalisation de cette réaction sous reflux dans du DMF. Ainsi, partant d'1,1 équivalents du précurseur **1.15**, après 11 h d'ébullition dans du DMF, 27% du composé cyclisé **1.16** ont été isolés. Dans le but de diminuer ce temps de réaction, le milieu a été chauffé par micro-ondes à 160 °C pendant 15 min mais ceci n'a pas permis d'améliorer le rendement (18%). Par ailleurs, en chauffant à 80 °C pendant 10 h, un rendement similaire à celui obtenu sous reflux a été atteint. Ces données ont permis de remarquer qu'un chauffage intermédiaire est nécessaire, d'une part pour accélérer la réaction de cyclisation, et d'autre part pour éviter la décomposition du nitrosophénol. De plus, dans le but de disposer d'une quantité suffisante du nitrosophénol pour permettre la transformation avant d'observer sa dégradation complète, 2 équivalents de ce produit de départ ont été ajoutés dans le milieu réactionnel. Ainsi, de bons rendements isolés ont été atteints à 130 °C après 20 min de réaction (24-42%). De meilleurs rendements encore ont été obtenus lorsque la cyclisation a été réalisée avec 2 équivalents de nitrosophénol **1.15** dans du DMF à 110 °C pendant 45 min. Suivant ce protocole proposé, le dérivé phénolique du Nile Red **1.16** a été obtenu avec un rendement isolé de 44% sur deux étapes. Ce protocole a été reproduit sur une échelle de 0,5 à 3 mmol. Le phénol **1.16** a ensuite été alkylé avec du *tert*-butyl chloroacétate (Kashida et Asanuma 2012), puis l'ester de *tert*-butyle **1.17** a été converti en acide correspondant par traitement avec de l'acide trifluoroacétique pour produire du NR-COOH avec un rendement de 84% sur deux étapes.

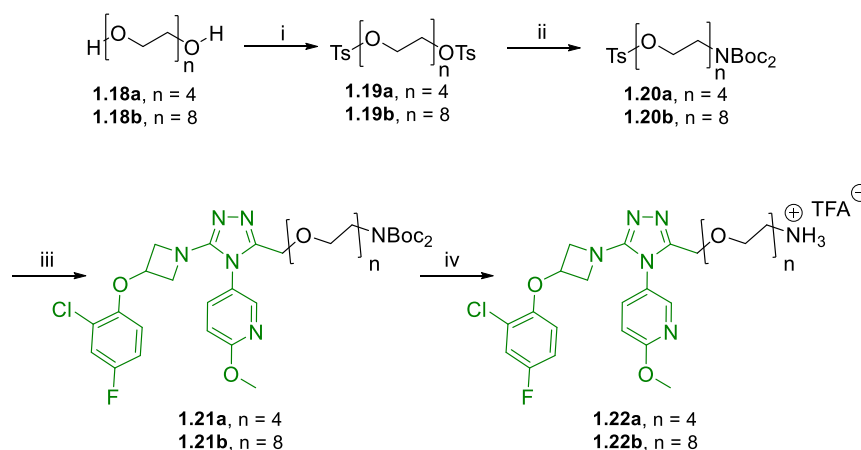
Solvant	Température	Temps	Nombre d'équivalents de <b>1.15</b>	Rendement isolé
MeOH	65 °C	44 h	1	11%
EtOH	79 °C	12 h	1,1	0%
ACN	82 °C	27 h	2	0%
DMF	153 °C	11 h	1,1	27%
DMF	160°C, MW <sup>[a]</sup>	15 min	1	18%
DMF	80°C	10 h	1	33%
DMF	130°C	20 min	2	24-42%
DMF	110°C	45 min	2	33-44%

**Tableau 1.** Optimisation des conditions de la cyclisation conduisant au dérivé du Nile Red **1.16**. [a] Chauffage micro-ondes.

Un espaceur PEG de longueur variable (4 à 20 unités) a ensuite été introduit sur l'alcool **1.13** (Schémas 3 et 4). Pour commencer, les espaceurs **1.20a** et **1.20b** ont été synthétisés à partir des PEG diols commerciaux correspondants (Schéma 3). Dans

un premier temps, ces diols ont été convertis en ditosylates. L'un des deux groupements tosylates a ensuite été substitué par du NHBoc<sub>2</sub>. L'ajout de NHBoc<sub>2</sub> a été réalisée très lentement à l'aide d'un pousse-seringue à 0 °C afin de ne substituer qu'un seul groupement tosylate. Les composés **1.20a** et **1.20b** ont ainsi été obtenus avec des rendements respectifs de 42% et de 26% sur deux étapes, respectivement.

Suite à leur préparation, les espaceurs PEG<sub>4</sub> **1.20a** et PEG<sub>8</sub> **1.20b** ont été utilisés pour alkyler l'alcool **1.13**, puis les groupements protecteurs Boc ont été éliminés par l'action du TFA, conduisant respectivement aux intermédiaires **1.21a** et **1.21b**. (Schéma 3). Différentes bases (DBU, NaH, *t*-BuOK et NaOH) ont été testées pour l'alkylation de **1.13** par **1.20a**, dans le but d'optimiser les conditions de l'introduction de ces chaînes. L'emploi des bases fortes comme le DBU ou le NaH dans du DMF à 45 °C a conduit à la dégradation des chaînes PEG. En revanche les bases KOH et *t*-BuOK ont permis de former le bon produit avec un meilleur rendement pour KOH (47% contre 34% pour un rendement isolé sur deux étapes). Ces rendements modérés peuvent s'expliquer par la formation de sous-produits à cause de l'instabilité du groupement di-(*tert*-butyl)-imidodicarboxylate dans le milieu réactionnel (la perte d'un Boc a été observée par HPLC et LC-MS). Néanmoins, ces conditions optimales (KOH dans le DMF à 45°C) ont été utilisées pour l'introduction de la chaîne PEG<sub>8</sub> **1.20b** sur l'alcool **1.13** menant au dérivé **1.22b** avec un rendement modéré de 28% sur deux étapes.

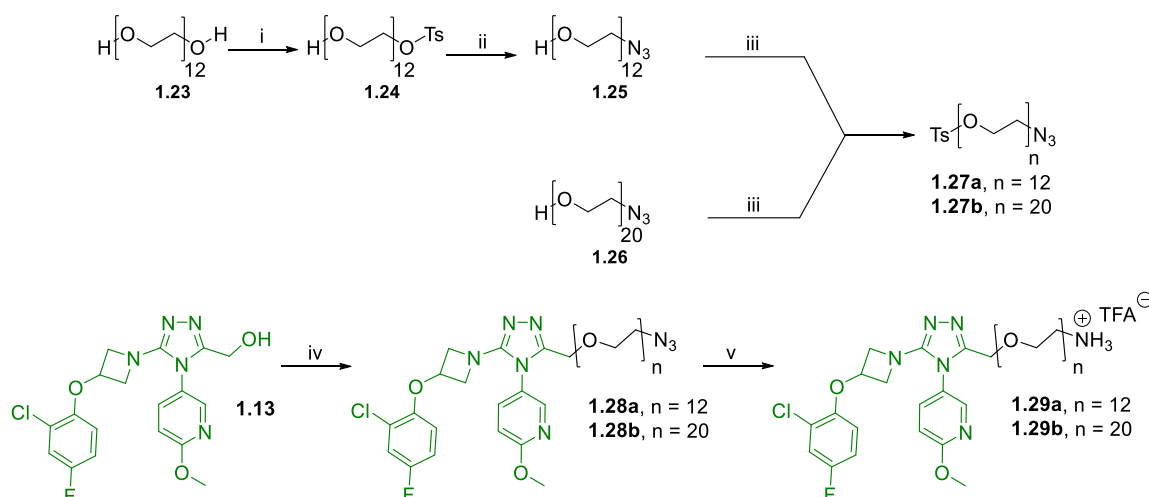


**Schéma 3.** Synthèse des espaceurs PEG<sub>4</sub> et PEG<sub>8</sub> et introduction sur le dérivé alcool du ligand PF-3274167 **1.13**. (i) TsCl, TEA, DCM, 0-25 °C, 17,5-20 h, 64% pour le **1.19a** et 58% pour le **1.19b** ; (ii) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NH(Boc)<sub>2</sub>, DMF, 0-25 °C, 19-26 h, 66% pour le **1.20a** et 44% pour le **1.20b** ; (iii) **1.13**, KOH, DMF, 0-45 °C, 65-67 h ; (iv) TFA, DCM, 25 °C, 0,5-3,5 h, 47% pour le **1.22a** et 28% pour le **1.22b**.

Avec la difficulté rencontrée pour introduire les chaînes PEG<sub>4</sub> et PEG<sub>8</sub> portant le groupement NBoc<sub>2</sub> sur le dérivé alcool du PF-3274167, une autre stratégie a été employée pour l'introduction des espaceurs PEG<sub>12</sub> et PEG<sub>20</sub> plus coûteux (Schéma 4). En effet, il a été proposé de synthétiser les amines **1.29a** et **1.29b** en réduisant les azotures correspondants par une réaction de Staudinger. Le précurseur commercial de l'espaceur **1.27a**, comportant 12 unités PEG, se présente sous la forme d'un diol tout comme celui des espaceurs PEG<sub>4</sub> et PEG<sub>8</sub>. En vue d'une substitution par du NaN<sub>3</sub>, nucléophile plus puissant que NHBoc<sub>2</sub> de par sa charge et son plus faible encombrement, le diol PEG<sub>12</sub> **1.23** a été monotosylé et non ditosylé comme les diols PEG<sub>4</sub> et PEG<sub>8</sub>, afin d'éviter une seconde substitution parasite. Suivant la procédure détaillée par Bouzide en 2002 (Bouzide et Sauvé 2002) le PEG<sub>12</sub> monotosylé **1.24** a ainsi été préparé avec un rendement de 41% en présence du chélateur Ag<sub>2</sub>O, favorisant cette monofonctionnalisation, et de KI, en quantité catalytique, accélérant la réaction par substitution d'halogènes *in situ*. Puis, le tosylate **1.24** a été substitué efficacement par une fonction azoture avec un rendement de 90%, formant ainsi l'intermédiaire **1.25**. La fonction alcool restante a finalement été classiquement tosylée en présence de chlorure de tosyloxy et d'une base pour conduire à l'espaceur **1.27a** avec un rendement de 75%. Quant à l'espaceur PEG<sub>20</sub> **1.27b**, son précurseur commercial *O*-(2-azidoéthyl)nonadécaéthylène glycol (**1.26**) a été directement tosylé avec un rendement de 81%.

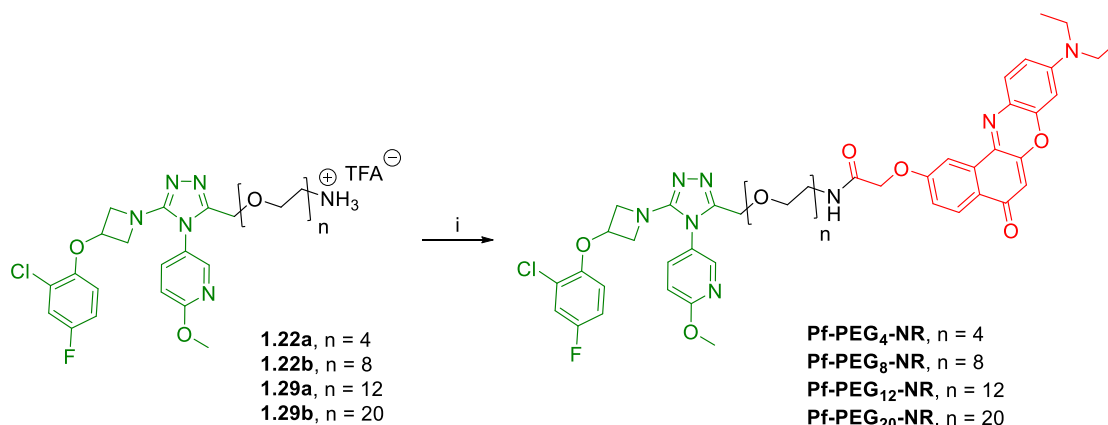


L'alkylation de l'alcool **1.13** par des chaînes PEG<sub>12</sub> **1.27a** et PEG<sub>20</sub> **1.27b**, comportant une fonction azoture à la place du groupement NBoc<sub>2</sub>, s'est avérée plus facile à réaliser (Schéma 4). Après 3 h de réaction, les triazoles pegylés **1.28a** et **1.28b** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 92% et 72%. Ensuite, ces azotures ont été respectivement convertis en amines **1.29a** et **1.29b** par une réduction de Staudinger employant de la triphénylphosphine sur support solide avec des rendements de 43% et 44%.



**Schéma 4.** Synthèse des espaceurs PEG<sub>12</sub> et PEG<sub>20</sub> et introduction sur le dérivé alcool du ligand PF-3274167 **1.13**. (i) TsCl, Ag<sub>2</sub>O, KI, DCM, 0-25 °C, 18 h, 41% ; (ii) NaN<sub>3</sub>, DMF, 70 °C, 4 h, 90% ; (iii) TsCl, KOH, DCM, 0-25 °C, 6 h-4 jours, 75% pour le **1.27a** et 81% pour le **1.27b** ; (iv) **1.27a** ou **1.27b**, KOH, DMF, 0-25 °C, 2,5-3 h, 92% pour le **1.28a** et 72% pour le **1.28b** ; (v) PPh<sub>3</sub> sur support, THF, 66 °C, 3,5-5 h, puis H<sub>2</sub>O, 66 °C, 1,5-2 h, 43% pour le **1.29a** et 44% pour le **1.29b**.

Finalement, afin d'accéder aux sondes désirées Pf-PEG<sub>4</sub>-NR, Pf-PEG<sub>8</sub>-NR, Pf-PEG<sub>12</sub>-NR et Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, les dérivés amines pegylées du PF-3274167 **1.22a-b** et **1.29a-b** ont été engagés dans une réaction de couplage avec le NR-COOH en présence de PyBOP (Schéma 5). Les sondes fluorescentes ont été obtenues avec des rendements allant de 39% à 78% et leur identité et leur pureté (> 95%) ont été prouvées par LC-HRMS.

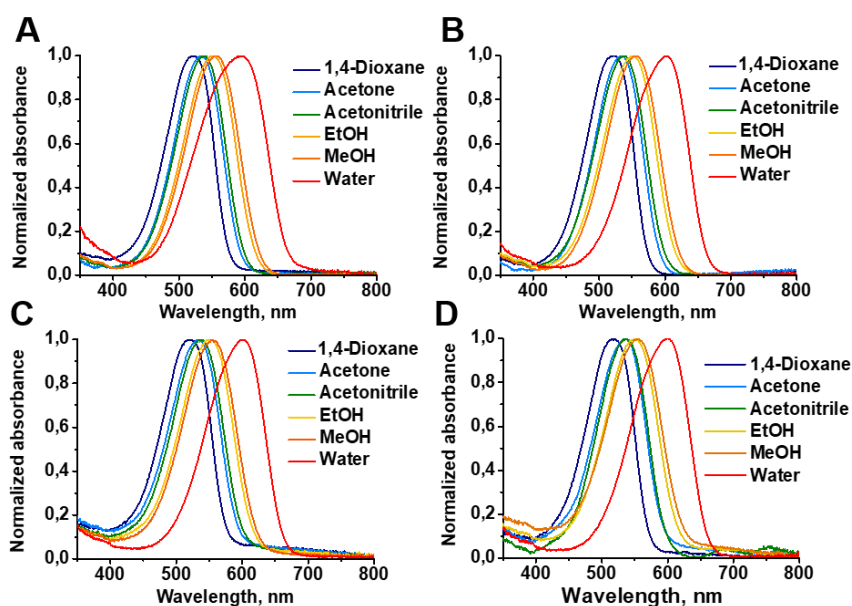


**Schéma 5.** Synthèse des sondes Pf-PEG-NR. (i) NR-COOH, PyBOP, DIPEA, DMF, 25 °C, 0,5-25 h, 39-78%.

## 2. Évaluation des propriétés spectrales de sondes de l'OTR dérivées du Nile Red

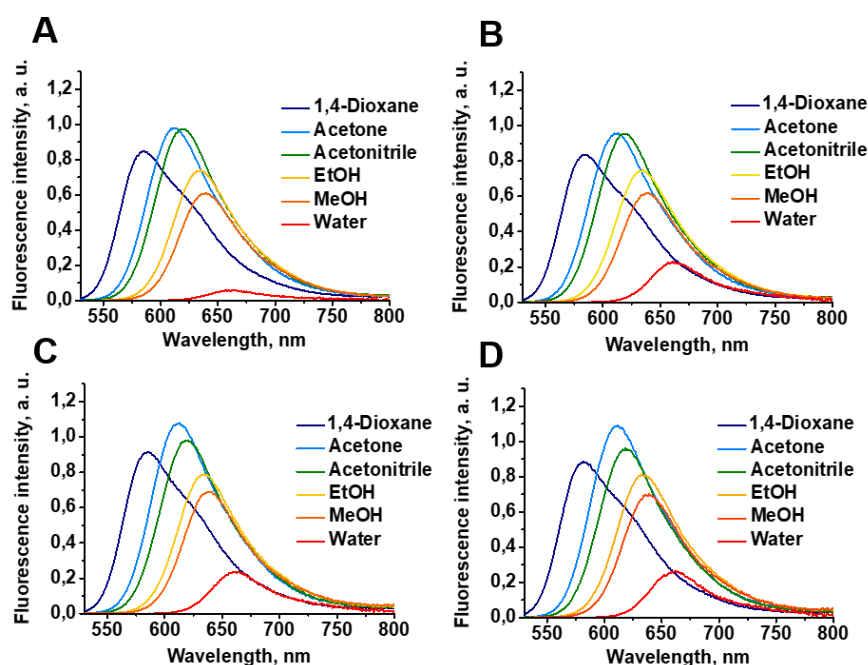
Les propriétés spectrales des sondes dérivées du Nile Red ont été étudiées, dans un premier temps, dans une série de solvants de polarités différentes (Figure 16, Figure 17 et Tableau 2).

Les spectres d'absorption montrent que les quatre sondes développées conservent le fort caractère solvatochrome du Nile Red, malgré la conjugaison de ce fluorophore à un ligand de l'OTR via des espaceurs PEG, avec un déplacement bathochrome des maximums d'absorption, avec l'augmentation de la polarité du solvant, allant de 521 nm dans le 1,4-dioxane, à 601 nm dans l'eau (Figure 16).



**Figure 16.** Absorption des sondes Pf-PEG-NR. Spectres d'absorption normalisés de (A) Pf-PEG<sub>4</sub>-NR, (B) Pf-PEG<sub>8</sub>-NR, (C) Pf-PEG<sub>12</sub>-NR et (D) Pf-PEG<sub>20</sub>-NR dans différents solvants.

L'étude de l'émission de fluorescence de ces sondes Pf-PEG-NR dans ces mêmes solvants a ensuite été menée (Figure 17). Ici les valeurs du spectre d'émission de fluorescence d'une sonde dans un solvant donné ont été divisées par l'absorbance de cette même sonde dans ce solvant à 520 nm, longueur d'onde d'excitation utilisée, afin de pouvoir comparer les intensités de fluorescence dans les différents solvants. Cette étude a révélé que les quatre sondes gardent également le fort caractère fluorogène du Nile Red avec une augmentation drastique de fluorescence lors du passage de l'eau au 1,4-dioxane. De la même manière, ces composés fluorescents affichent aussi un excellent caractère solvatofluorochrome avec un déplacement bathochrome des maximums de fluorescence, avec l'augmentation de la polarité de l'environnement, allant de 584 nm dans le 1,4-dioxane à 661 nm dans l'eau.



**Figure 17.** Fluorescence des sondes Pf-PEG-NR. Spectres d'émission de fluorescence de (A) Pf-PEG<sub>4</sub>-NR, (B) Pf-PEG<sub>8</sub>-NR, (C) Pf-PEG<sub>12</sub>-NR et (D) Pf-PEG<sub>20</sub>-NR dans différents solvants. L'intensité de fluorescence est rapportée à l'absorbance à 520 nm.

La mesure successive de l'absorption, puis de la fluorescence des sondes a permis de déterminer leurs rendements quantiques dans les solvants étudiés (Tableau 2). Pour ce faire, le rendement quantique du Nile Red de 70% dans le 1,4-dioxane, décrit dans la littérature, a été choisi comme référence (Sackett et Wolff 1987). Ces rendements quantiques sont très bons dans le 1,4-dioxane (65-68%) et diminue avec l'augmentation de la polarité du solvant jusqu'à 7% dans l'eau pour la

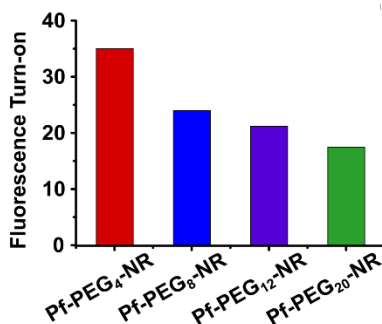
sonde présentant l'espaceur PEG le plus court, certainement la moins soluble en milieu aqueux. On peut donc conclure, que la solubilité de la sonde en milieu aqueux contribue également à sa fluorogénicité, provoquée par la rotation TICT favorisée dans des solvants polaires donneurs d'hydrogène.

Solvant	$E_T30$ , kcal/mol <sup>[a]</sup>	$\lambda_{max}$ , nm		$\Phi^{[d]}$ , %			
		abs <sup>[b]</sup>	fluo <sup>[c]</sup>	Pf-PEG <sub>4</sub> -NR	Pf-PEG <sub>8</sub> -NR	Pf-PEG <sub>12</sub> -NR	Pf-PEG <sub>20</sub> -NR
1,4-Dioxane	36,0	521	584	65	65	67	68
Acétone	42,2	534	612	65	64	65	66
Acétonitrile	45,6	538	619	62	60	63	65
Éthanol	51,9	551	634	48	48	51	52
Méthanol	55,4	556	639	37	38	39	41
Eau	63,1	601	661	7	10	11	11

[a] Paramètre de polarité de Reichardt (Reichardt 1994) [b] Position du maximum d'absorption. Des valeurs similaires (+/- 2 nm) sont observées pour les quatre dérivés. [c] Position du maximum d'émission de fluorescence. Des valeurs similaires (+/- 2 nm) sont observées pour les quatre dérivés. [d] Rendement quantique de fluorescence.

**Tableau 2.** Propriétés spectrales des sondes Pf-PEG-NR.

Un paramètre important pour les études cellulaires sans lavage est le rapport turn-on de fluorescence, une mesure quantitative des propriétés fluorogènes des sondes (Karpenko, Collot, et al. 2015). Ici, il a été défini comme le rapport entre l'intensité de fluorescence à 620 nm dans un solvant apolaire, le 1,4-dioxane, et celle dans l'eau (Figure 18). Cette longueur d'onde a été choisie à mi-chemin entre le maximum d'émission de fluorescence du Nile Red dans le 1,4-dioxane, 584 nm, et celui dans l'eau, 661 nm. Ainsi, les quatre conjugués du Nile Red démontrent d'excellentes propriétés fluorogènes avec des rapports turn-on entre 17 et 35. Ce rapport est d'autant plus élevé lorsque la sonde dérivée du Nile Red présente un espaceur PEG plus court, présentant une fluorescence diminuée dans l'eau, probablement dûe à une moins bonne solubilité dans ce milieu.

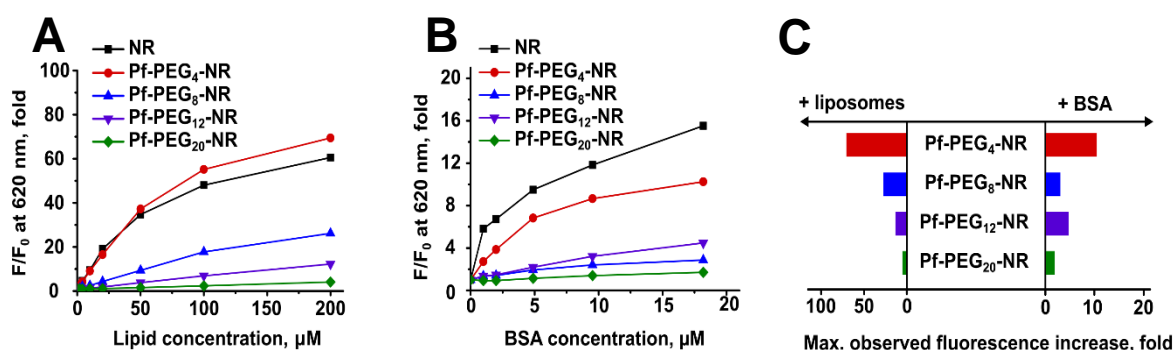


**Figure 18.** Propriétés fluorogènes des sondes Pf-PEG-NR. Le turn-on de fluorescence relatif a été calculé comme le rapport entre l'intensité de fluorescence à 620 nm dans le 1,4-dioxane (rapportée à l'absorbance à 520 nm) et l'intensité de fluorescence à 620 nm dans l'eau (rapportée à l'absorbance à 520 nm).

### 3. Évaluation des interactions non spécifiques de sondes de l'OTR dérivées du Nile Red *in vitro*

Dans le développement de sondes fluorescentes pour des études de récepteurs membranaires sur cellules vivantes, il est crucial d'évaluer soigneusement les interactions non spécifiques des sondes avec les membranes cellulaires et les protéines plasmatiques. Pour y parvenir, il a été utilisé de larges liposomes unilamellaires (LUV) 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DOPC)/cholestérol (2 : 1) comme modèles de membranes cellulaires et de la BSA pour évaluer la liaison aux protéines plasmatiques (Figure 19). Le rapport entre l'intensité de fluorescence à 620 nm de l'espèce fluorescente étudiée et celle de ce même composé sans liposomes ou BSA ( $F/F_0$ ) a permis de rendre compte du facteur d'augmentation de fluorescence, en fonction respectivement de l'augmentation de la concentration en liposomes ou en BSA. Le Nile Red est connu pour sa forte affinité (forte liaison non spécifique) pour les membranes lipidiques (Mukherjee, Raghuraman, et Chattopadhyay 2007), pour les gouttelettes lipidiques (Greenspan, Mayer, et Fowler 1985) et pour les poches hydrophobes des protéines (Sackett et Wolff 1987; Lampe et al. 2008; Black et al. 2008). En pratique, la fluorescence du Nile Red à une concentration fixe de 1  $\mu$ M (Figures 19A et 19B) a augmenté graduellement lors de l'addition de liposomes ou de BSA en solution aqueuse. Les dérivés du Nile Red ont été évalués dans les mêmes conditions. Comme attendu, l'augmentation de la longueur de l'espaceur polaire PEG a conduit à une décroissance progressive des interactions non spécifiques (Figure 19C). Ainsi, le Pf-PEG<sub>4</sub>-NR s'est lié aux liposomes avec une affinité similaire à celle du Nile Red. Son interaction avec la BSA a été moins prononcée, comparée à celle du Nile Red non

modifié mais encore significative, faisant de ce composé une sonde difficilement compatible avec les conditions d'imagerie sur cellules vivantes. Bien que le Pf-PEG<sub>8</sub>-NR et le Pf-PEG<sub>12</sub>-NR n'affichent pas de liaison significative à la BSA, ces sondes ont encore interagi fortement avec les modèles de membranes. Finalement, la liaison non spécifique aux membranes lipidiques et la liaison à la BSA sont devenues presque négligeables pour le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, faisant de cette sonde la plus prometteuse pour des études cellulaires de l'OTR. Ainsi, l'augmentation de la longueur de la chaîne PEG diminue le caractère lipophile des sondes et donc tend à minimiser leurs interactions non spécifiques.

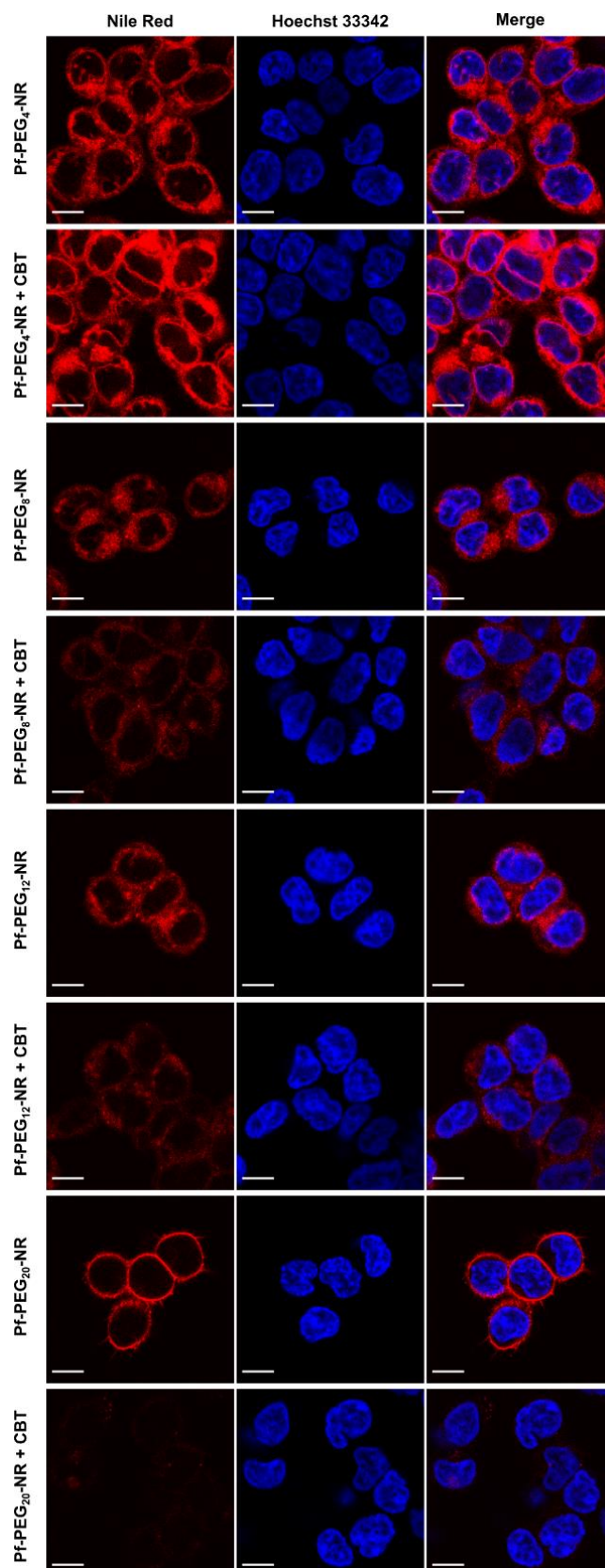


**Figure 19.** Interactions non spécifiques des sondes Pf-PEG-NR *in vitro*. (A) Évaluation des interactions non spécifiques des sondes Pf-PEG-NR et du Nile Red (NR) avec des liposomes DOPC/cholesterol (2:1) : augmentation de l'intensité de fluorescence à 620 nm ( $F/F_0$ ) en fonction de la concentration en liposomes dans du PBS. (B) Évaluation des interactions non spécifiques des sondes Pf-PEG-NR et du Nile Red (NR) avec de la BSA : augmentation de l'intensité de fluorescence à 620 nm ( $F/F_0$ ) en fonction de la concentration en BSA dans du PBS. (C) Augmentation de fluorescence maximale observée due aux interactions non spécifiques des sondes Pf-PEG-NR avec des liposomes et de la BSA.

#### 4. Évaluation des interactions non spécifiques de sondes de l'OTR dérivées du Nile Red *in cellulo*

Ensuite, une étude de microscopie confocale sur cellules vivantes HEK293 qui surexpriment l'OTR (HEK-OTR) a été réalisée dans le but d'évaluer la capacité des sondes développées à détecter l'OTR sans lavage (Figure 20). Ainsi, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, conjugué ayant la combinaison de propriétés la plus favorable dans les essais de liaison non spécifique, a permis de marquer clairement les membranes cellulaires avec une fluorescence de bruit de fond négligeable. De manière intéressante, cette sonde permet le marquage de l'OTR en surface sans induire son internalisation,

probablement dû au caractère antagoniste du PF-3274167. Afin d'étudier la spécificité d'interaction de la sonde vis-à-vis de son récepteur, un essai de compétition a été réalisé en présence d'un large excès de carbétocine (CBT), un ligand agoniste du récepteur. Ainsi, la fluorescence membranaire a disparu, indiquant que le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR se lie à la cellule de manière réversible uniquement en présence de l'OTR. Il a aussi été confirmé par microscopie confocale que les sondes avec les chaînes PEG de 4, 8 et 12 unités montrent une forte fluorescence non spécifique, comme attendu après les essais de liaison non spécifique *in vitro* (Figures 19A-C). Leur fluorescence n'a pas été influencée par l'addition de compétiteur non fluorescent et, de plus, ces sondes traversent rapidement la membrane cellulaire et colorent des structures intracellulaires.



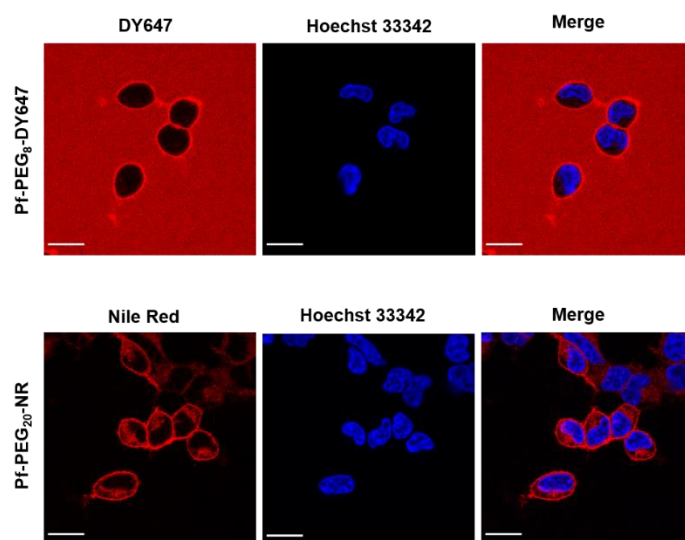
**Figure 20.** Microscopie confocale avec les sondes Pf-PEG-NR sans lavage sur cellules vivantes HEK293 surexprimant l'OTR. La fluorescence non spécifique est évaluée en présence d'un excès (200 x) d'un ligand de l'OTR non fluorescent, la



carbétocine (CBT). Concentrations : sondes dérivées du Nile Red : 10 nM ; CBT : 2  $\mu$ M. L'émission de fluorescence du Nile Red (570-630 nm) est affichée en rouge, les noyaux colorés avec Hoechst 33342 sont montrés en bleu. Barres d'échelle : 10  $\mu$ m.

L'évaluation par microscopie confocale de la capacité des sondes dérivés du Nile Red à détecter l'OTR sur cellules vivantes sans lavage a montré que le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR cible l'OTR de manière spécifique.

Afin de montrer tout l'intérêt de développer une sonde fluorogène, nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus précédemment au laboratoire avec notamment le Pf-PEG<sub>8</sub>-DY647 (Karpenko, Margathe, et al. 2015). Ce ligand présente le fluorophore DY647, absorbant et émettant dans le rouge, limitant ainsi grandement l'autofluorescence cellulaire. Cependant ce fluorophore n'est pas fluorogène et montre de ce fait une intensité de fluorescence similaire quel que soit l'environnement dans lequel il se trouve. À l'opposé, le fluorophore Nile Red, présent sur le ligand fluorescent Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, est fluorogène. Sa fluorescence est négligeable dans l'eau et elle est exaltée en milieu apolaire. Comme le montre la Figure 21, le caractère fluorogène du Nile Red permet d'avoir un excellent rapport signal sur bruit en utilisant le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR pour le marquage de l'OTR sur cellules vivantes sans lavage, contrairement au Pf-PEG<sub>8</sub>-DY647.

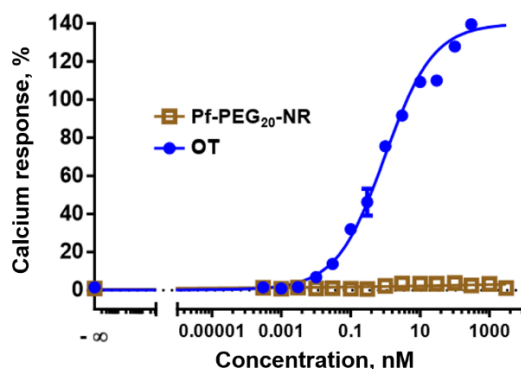


**Figure 21.** Microscopie confocale avec les sondes Pf-PEG<sub>8</sub>-DY647 et Pf-PEG<sub>20</sub>-NR sans lavage sur cellules vivantes HEK293 surexprimant l'OTR. Concentration en Pf-PEG<sub>8</sub>-DY647 et en Pf-PEG<sub>20</sub>-NR : 100 nM. L'émission de fluorescence du DY647 (650-700 nm) et celle du Nile Red (570-630 nm) sont affichées en rouge, les noyaux colorés avec du Hoechst 33342 sont montrés en bleu. Barres d'échelle : 20  $\mu$ m.

Ces études nous ont permis de développer la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR qui présente un fort potentiel pour l'imagerie de l'OTR à la surface des cellules vivantes. Afin de mieux caractériser cette sonde, nous avons alors décidé d'étudier l'activité fonctionnelle du ligand sur cellules exprimant l'OTR. En effet, les expériences de microscopie confocale montre que le ligand Pf-PEG<sub>20</sub>-NR n'induit pas l'internalisation de l'OTR et semble donc être un antagoniste du récepteur.

## 5. Évaluation de l'activité fonctionnelle sur l'OTR

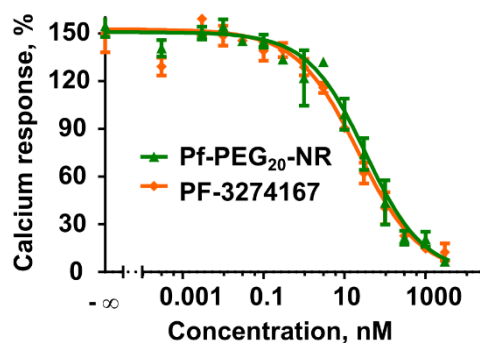
Afin de vérifier si l'introduction d'un long espaceur PEG<sub>20</sub> et du fluorophore Nile Red influençait l'activité fonctionnelle du ligand PF-3274167, la mesure d'accumulation de calcium dans des cellules HEK293 surexprimant de manière stable l'OTR (cellules HEK-OTR) a été effectuée. En effet, l'augmentation de calcium intracellulaire est l'une des réponses cellulaires engendrées par la liaison d'un agoniste à l'OTR. Dans un premier temps, un test agoniste a été réalisé. Comme contrôle, une augmentation progressive de la concentration en ocytocine (OT), agoniste endogène de l'OTR, a bien conduit à une augmentation graduelle de calcium à l'intérieur des cellules (Figure 22). À l'opposé, l'augmentation de la concentration en Pf-PEG<sub>20</sub>-NR n'a pas induit d'accumulation de calcium (Figure 22). Cette sonde dérivée du Nile Red développée ne présente donc pas de caractère agoniste vis-à-vis de l'OTR.



**Figure 22.** Activité fonctionnelle de l'ocytocine (OT) et du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR sur l'OTR. Courbes dose-réponse de l'OT et du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR. Données à partir de deux expériences indépendantes réalisées en duplicata. Valeurs moyennes ± écart moyen.

Dans un deuxième temps, un test antagoniste a été effectué. Il a consisté à évaluer la capacité du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR à déplacer l'OT avec une perte de concentration intracellulaire en calcium. Le ligand initial PF-3274167 et le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR inhibent totalement l'accumulation de calcium induite par l'OT en fonction de leur

concentration avec des valeurs d' $IC_{50}$  similaires de  $15 \pm 3$  nM et  $30 \pm 3$  nM respectivement, surlignant le caractère antagoniste des deux ligands (Figure 23). Ainsi, malgré l'introduction d'un espaceur PEG<sub>20</sub> et d'un fluorophore aromatique, le caractère antagoniste du ligand a été conservé.



**Figure 23.** Activité fonctionnelle du PF-3274167 et du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR sur l'OTR. Courbes dose-réponse des antagonistes d'OTR PF-3274167 et Pf-PEG<sub>20</sub>-NR en présence de 10 nM d'OT. Données à partir de deux expériences indépendantes réalisées en duplicata. Valeurs moyennes  $\pm$  écart moyen.

Après avoir caractérisé la pharmacologie de la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, nous avons voulu mettre en évidence les propriétés uniques d'une telle sonde solvatofluorochrome pour étudier le microenvironnement de l'OTR.

## 6. Utilisation de la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR pour l'étude du microenvironnement de l'OTR

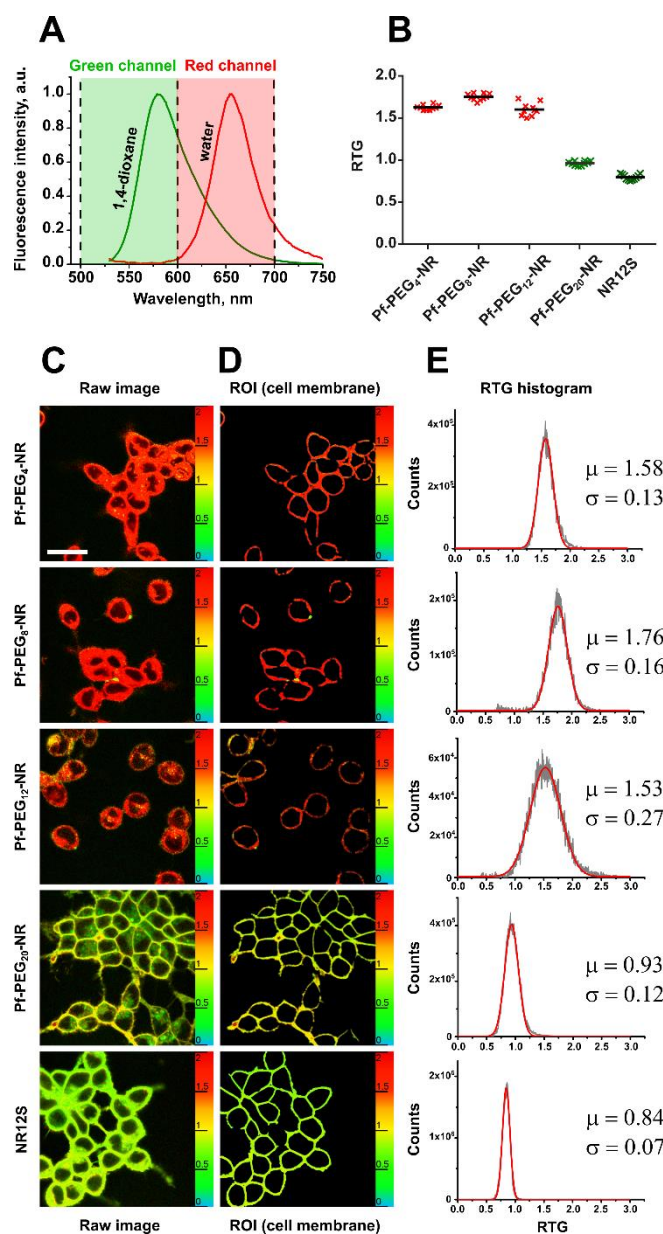
Les altérations locales du microenvironnement lipidique, telles que la présence de nanodomains lipidiques hautement organisés, appelés des radeaux lipidiques, peuvent affecter l'équilibre conformationnel d'un récepteur transmembranaire, son affinité pour ses ligands et ses interactions protéine-protéine (Mondal et al. 2013; Dijkman et Watts 2015; Bolivar et al. 2016; Gahbauer et Böckmann 2016; Yoshida et al. 2019; Gahbauer et Böckmann 2020). Par conséquent, l'étude du microenvironnement lipidique des récepteurs est d'une importance fondamentale pour comprendre et moduler la signalisation des RCPG (Becher et McIlhinney 2005). Cependant, les progrès dans ce domaine ont été entravés par le manque de méthodes expérimentales fiables et par les multiples controverses liées à l'existence de radeaux lipidiques (Levental, Levental, et Heberle 2020). Des sondes sensibles à l'environnement, telles que le Laurdhan (Dietrich et al. 2001), le di-4-ANEPPQ (Jin et al. 2006) ou encore des dérivés du Nile Red (Kucherak et al. 2010;

Danylchuk et al. 2019) peuvent donner directement des informations sur l'ordre des lipides dans les membranes biologiques par leur couleur d'émission de fluorescence (Klymchenko et Kreder 2014). Cependant, ces composés ne sont pas conçus pour sonder spécifiquement l'ordre des lipides dans l'environnement proche d'un récepteur. Un rare exemple décrit le FRET entre du Lumi4-Tb couplé via un SNAP-tag au GLP1R, un RCPG, et la sonde NR12S dérivée du Nile Red (Kucherak et al. 2010) pour sonder l'environnement lipidique de ce récepteur (Buenaventura et al. 2019). Néanmoins, l'étude du microenvironnement lipidique local des RCPG non modifiés reste un défi de taille.

Pour démontrer l'utilité des ligands fluorogènes développés dérivés du Nile Red pour l'analyse sélective du microenvironnement du récepteur de l'ocytocine, des expériences de microscopie confocale ratiométrique ont été réalisées sans lavage sur des cellules vivantes HEK-OTR. L'analyse ratiométrique de fluorescence, qui ne dépend ni de la concentration de ligand, ni du niveau d'expression du récepteur, facilite l'analyse quantitative des données de fluorescence (Klymchenko 2017). Sous l'excitation d'un laser à 488 nm, la lumière émise a été collectée séparément dans deux canaux, nommés ici le canal "vert" (500-600 nm) et le canal "rouge" (600-700 nm). Considérant le solvatofluorochromisme positif des dérivés du Nile Red, une forte fluorescence dans le canal "rouge" devrait indiquer un microenvironnement du fluorophore plus polaire (ou moins hydrophobe). Par concordance, une forte fluorescence dans le canal "vert" devrait indiquer un microenvironnement du fluorophore moins polaire (ou plus hydrophobe) (Figure 24A). En d'autres termes, le rapport relatif "rouge sur vert" (RTG pour "red-to-green") peut être utilisé comme simple mesure quantitative de la polarité du microenvironnement de la sonde considérée.

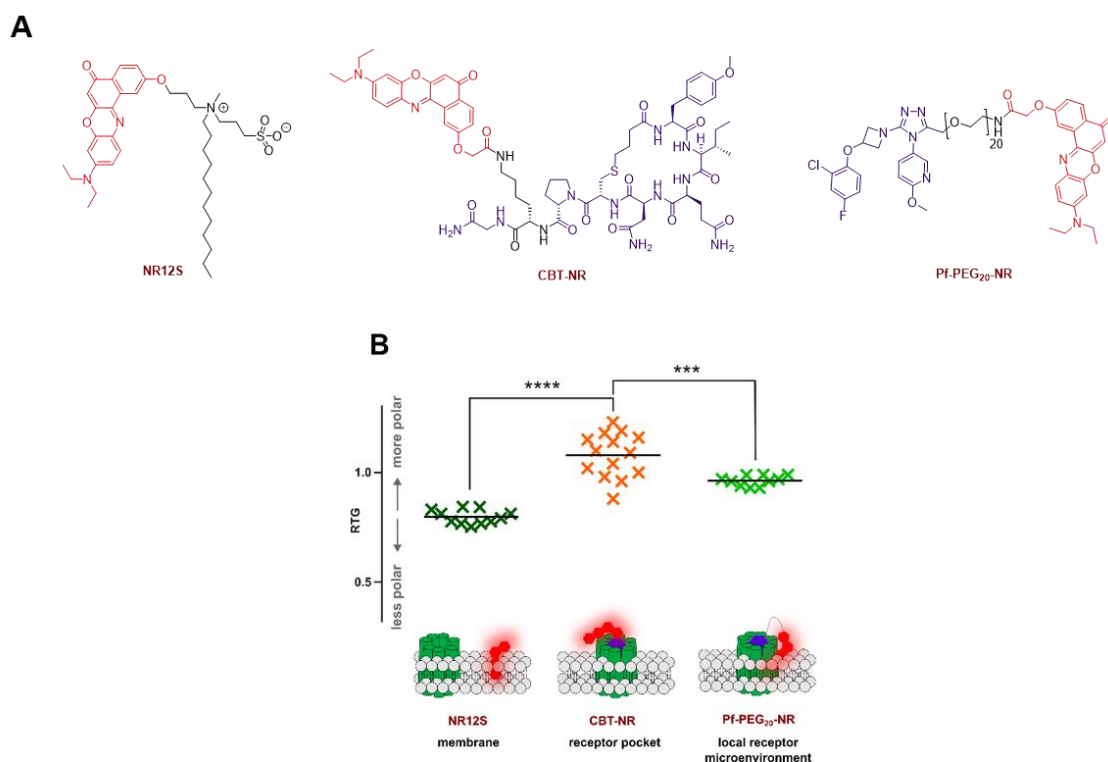
Les valeurs de RTG observées diffèrent drastiquement entre celles du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR et celles des autres sondes Pf-PEG-NR avec une longueur d'espaceur plus courte (Figures 24B-E). Sur cellules vivantes HEK-OTR, le fluorophore du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR est entouré d'un microenvironnement fortement apolaire avec une moyenne de valeurs de RTG de  $0,96 \pm 0,02$ . Pour comparer, la valeur moyenne de RTG observée pour la sonde membranaire dérivée du Nile Red NR12S, localisée dans la partie externe de la membrane plasmique (Kucherak et al. 2010) (Figure 25A), a été de  $0,80 \pm 0,02$ . À l'opposé, la fluorescence des dérivés du Nile Red avec un espaceur PEG plus court a été déplacée vers le rouge avec des valeurs moyennes de RTG supérieures à 1,50. Ces données confirment la conclusion établie à partir des images de microscopie confocale (Figure 20) concernant la pénétration indésirée des sondes

avec les PEG de 4, 8 ou 12 unités à l'intérieur des cellules et l'absence visuelle d'une localisation au niveau de la membrane plasmique. Ceci suggère que ces sondes résident certainement au sein d'un compartiment membranaire intracellulaire de composition différente de celle de la partie externe de la membrane plasmique délimitant la cellule. Les valeurs plus élevées de RTG observées à l'intérieur des cellules pour les sondes présentant les chaînes PEG les plus courtes reflètent la polarité plus importante des membranes intracellulaires comparées à celle des membranes plasmiques, précédemment reporté par des sondes solvatochromes capables de pénétrer dans les cellules (Niko et al. 2016; Ashoka et al. 2019). D'autre part, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR ne pénètre pas à l'intérieur des cellules et est localisé dans un environnement plus apolaire qui peut aussi bien être la bicouche lipidique environnant directement l'OTR qu'une poche de liaison allostérique apolaire de ce récepteur.



**Figure 24.** Imagerie par microscopie confocale ratiométrique avec des sondes dérivées du Nile Red. (A) Spectres de fluorescence normalisés du Pf-PEG<sub>4</sub>-NR dans le 1,4-dioxane et dans l'eau avec indication des canaux vert et rouge utilisés pour le calcul du rapport de RTG (canal rouge sur canal vert). (B) Comparaison des valeurs moyennes de RTG résultant de la coloration cellulaire par les différentes sondes. Les données à partir de deux expériences indépendantes, enregistrant cinq images par condition, ont été analysées. (C) Imagerie de sondes dérivées du Nile Red sur cellules vivantes HEK293 surexprimant l'OTR. Images obtenues après soustraction du bruit de fond. L'échelle de pseudocouleurs indique les valeurs de RTG de la fluorescence du Nile Red. Barre d'échelle : 30  $\mu\text{m}$ . (D) Régions d'intérêt (ROI) utilisées pour la quantification. (E) Fréquences (gris) et distributions normales ajustées (rouge) des valeurs de RTG des ROI présentées en (D).

Pour tenter de répondre à la question de la localisation du Nile Red du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR lié à l'OTR, ce ligand a été comparé avec le ligand peptidique spécifique de l'OTR, précédemment reporté, la CBT-NR, présentant un espaceur très court entre le ligand et le fluorophore (Karpenko et al. 2014) (Figure 25). Bien que la structure de la CBT liée à l'OTR ne soit pas connue, il a été suggéré que, pour les analogues peptidiques de l'OT, la poche de liaison de ces ligands est située au niveau de la partie externe du récepteur, proche de la surface membranaire (Gimpl et Fahrenholz 2001). Si tel est le cas, il est très peu probable que le fluorophore de la CBT-NR puisse être profondément inséré dans la membrane cellulaire. Effectivement, le rapport de RTG moyen de  $1,08 \pm 0,10$  obtenu pour le CBT-NR lié à l'OTR indique qu'ici le fluorophore réside dans un environnement plus polaire comparé à celui de la membrane plasmique (NR12S). Cet environnement est susceptible d'être une poche allostérique du récepteur située à proximité immédiate de la poche orthostérique ou à l'interface entre le récepteur et la membrane (Figure 25). Pour en revenir au ligand non peptidique de l'OTR, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, la polarité de son microenvironnement, caractérisée par une valeur de RTG de 0,96, est sensiblement différente de la polarité de l'environnement du CBT-NR ce qui suggère l'insertion du fluorophore du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR dans la membrane. Finalement, la différence de la valeur de RTG du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR de la valeur de RTG de la sonde membranaire NR12S qui rapporte la polarité moyenne de la membrane cellulaire, suggère que le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR pourrait sonder de manière unique la bicouche lipidique locale entourant le RCPG.



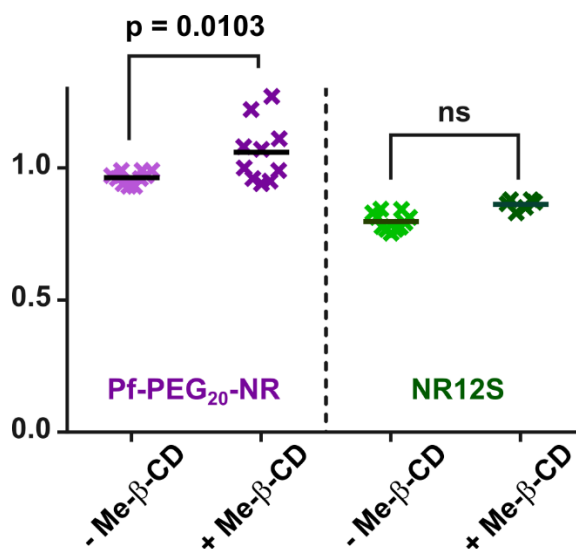
**Figure 25.** Évaluation de la polarité du microenvironnement local des sondes dérivées du Nile Red considérées. (A) Structure chimique de la sonde membranaire NR12S, du ligand peptidique de l'OTR CBT-NR (Karpenko et al. 2014) et du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR. (B) Comparaison des valeurs moyennes de RTG résultant de la coloration cellulaire par les différentes sondes. Les données à partir de deux expériences indépendantes, enregistrant au moins cinq images par condition, ont été analysées. Statistiques : ANOVA à un facteur de variabilité avec test de comparaison de multiple de Tukey (intervalle de confiance de 99%, valeurs p ajustées : \*\*\*\* < 0,0001, \*\*\* < 0,001).

Finalement, nous avons étudié la capacité de la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR à répondre aux changements subtils de l'ordre lipidique dans l'environnement immédiat du récepteur. Les membranes cellulaires présentent des phases plus ou moins ordonnées, régissant leur structure et leur fonction. Cet ordre dépend du type de lipides qu'elles contiennent. Ces phases sont notamment ordonnées lorsqu'elles sont enrichies en cholestérol, lipide pouvant représenter jusqu'à 40% de leur composition lipidique (Yeagle 1985; Kai Simons et Ikonen 1997; K. Simons 2000; D.A. Brown et London 1998; Deborah A. Brown et London 2000; Ohvo-Rekilä 2002; Maxfield et Tabas 2005). Précédemment, la sonde membranaire NR12S a permis, grâce à l'imagerie ratiométrique à deux couleurs, d'observer une différence de rapport d'émission de fluorescence en fonction de la quantité de cholestérol présente dans les systèmes lipidiques étudiés (Kucherak et al. 2010). Ainsi, le NR12S



a montré une fluorescence déplacée vers le vert dans des liposomes modèles plus ordonnées, enrichis en cholestérol, et une fluorescence déplacée vers le rouge dans un milieu lipidique moins ordonné. Cette tendance a été également confirmée sur cellules vivantes : le maximum de fluorescence du NR12S se déplace vers le rouge lors de la déplétion du cholestérol à l'aide de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (Kucherak et al. 2010). Cependant, contrairement au NR12S qui rapporte le changement global et moyen de l'ordre lipidique de la membrane cellulaire, la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR pourrait permettre de suivre les changements plus subtils de la phase lipidique qui entoure le récepteur.

La déplétion du cholestérol a été effectuée sur des cellules HEK-OTR vivantes en les traitant avec une solution de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine à 5 mM pendant 30 min à 37 °C. La déplétion du cholestérol a provoqué l'augmentation de la valeur de RTG du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR de 0,96 à 1,06 ce qui est cohérent avec la diminution de l'ordre lipidique de la membrane. Dans les mêmes conditions, le NR12S a induit une augmentation de la valeur de RTG moins significative (de 0,80 à 0,86) ce qui peut indiquer que la déplétion du cholestérol à proximité immédiate du récepteur a une influence plus importante sur l'ordre de phase comparée à cette déplétion dans la membrane globale.



**Figure 26.** Comparaison des valeurs moyennes de RTG avant et après déplétion du cholestérol. Données analysées à partir de deux expériences indépendantes, enregistrant au moins cinq images par condition. Statistiques : ANOVA à un facteur de variabilité avec test de comparaison de multiple de Tukey (intervalle de confiance de 95%).

Pour conclure sur cette partie, il y a très peu de méthodes qui permettent d'étudier l'hétérogénéité de la membrane autour des récepteurs couplés aux protéines G. Dans ce contexte, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR peut être considéré comme la première sonde fluorescente pour analyser le microenvironnement d'un RCPG. D'autres expériences sont cependant nécessaires pour prouver la pertinence biologique des variations observées du microenvironnement du récepteur. Une expérience de colocalisation et de codiffusion avec des lipides marqués fluorescents pourrait être envisagée. De plus, idéalement, le récepteur doit être étudié dans son environnement natif dans des cellules où il est exprimé de façon endogène. Par ailleurs, il serait aussi très intéressant de pouvoir marquer le récepteur au Nile Red, sans occuper sa poche orthostérique, à l'aide d'un tag protéique par exemple, afin de pouvoir suivre les changements du microenvironnement du récepteur, suite à son activation par des agonistes.

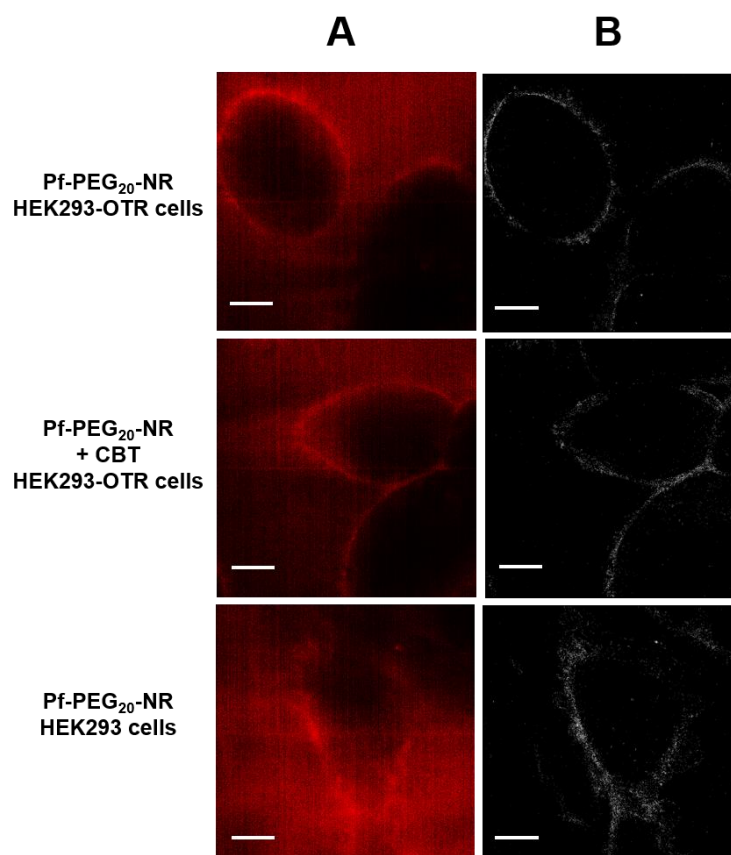
## **7. Utilisation de la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR pour l'imagerie super-résolution de l'OTR**

Afin de visualiser les interactions fines à l'échelle moléculaire en milieu cellulaire, la microscopie super-résolution est une technique en plein essor. La résolution en imagerie est en général limitée par la diffraction de la lumière émise. La super-résolution permet de dépasser cette limite par la mesure d'une émission de fluorescence alternativement élevée et faible en un même point. Cette succession d'événements donne l'opportunité de réaliser de l'imagerie à une échelle nanoscopique. Plus précisément, la technique PAINT, mise au point en 2006 et employant entre autres les dérivés du Nile Red, se base sur la liaison momentanée de ligands fluorescents ou plus simplement de fluorophores, à une molécule cible (Muslinkina et al. 2020).

L'équipe d'Andrey Klymchenko a récemment adapté la technique PAINT à l'analyse d'ordre lipidique des membranes cellulaires grâce à la sonde membranaire NR4A (Danylchuk et al. 2019). Il était alors intéressant d'étudier si cette technique pouvait être appliquée à la microscopie super-résolution des récepteurs couplés aux protéines G. L'idée a donc été d'évaluer le potentiel de la meilleure sonde développée ciblant l'OTR, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, en microscopie super-résolution PAINT, les propriétés fluorogènes du Nile Red faisant de lui un fluorophore intéressant pour l'observation de fluorescence « éteinte » et « allumée » lors de la liaison réversible du ligand au RCPG cible.

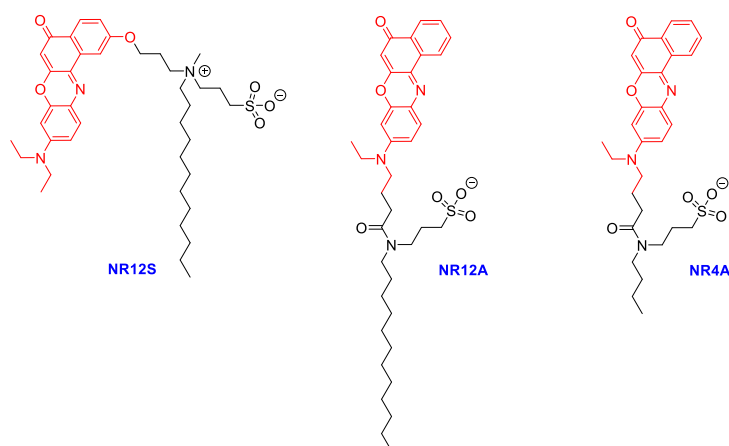
Cependant, l'expérience de microscopie à molécule unique TIRF de l'OTR sur cellules vivantes employant le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR a montré une intensité de fluorescence

spécifique très faible, probablement dûe à une photostabilité et une brillance de cette sonde qui ne sont pas suffisantes pour cette application (Figure 26).



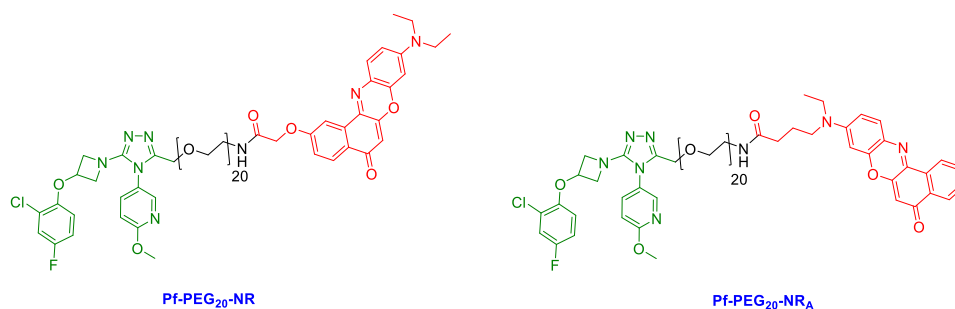
**Figure 26.** Imagerie super-résolution avec la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR sans lavage sur cellules vivantes. (A) Images de l'intensité intégrale de fluorescence de 5800 prises (30 ms par prise) par microscopie TIRF. La fluorescence non spécifique est évaluée en présence d'un excès (200 x) d'un ligand de l'OTR non fluorescent, la carbétocine (CBT). Concentrations : Pf-PEG<sub>20</sub>-NR : 10 nM ; CBT : 2 µM. L'émission de fluorescence du Nile Red (filtre passe-bande 593 ± 40 nm) est affichée en rouge. Barres d'échelle : 5 µm (B) Images super-résolues (PAINT). Temps d'intégration de 30 ms par prise (moyenne de 5800 prises par image).

Des travaux récents de l'équipe d'Andrey Klymchenko ont suggéré que la fonctionnalisation du Nile Red au niveau de son amine plutôt qu'au niveau d'un oxygène ajouté sur son cycle aromatique situé à son autre extrémité pouvait augmenter sa photostabilité, notamment lors de sa liaison à des liposomes composés de DOPC. De plus, cette position de fonctionnalisation augmente la brillance du fluorophore en super-résolution au contact des mêmes liposomes (Figure 27) (Danylchuk et al. 2019).



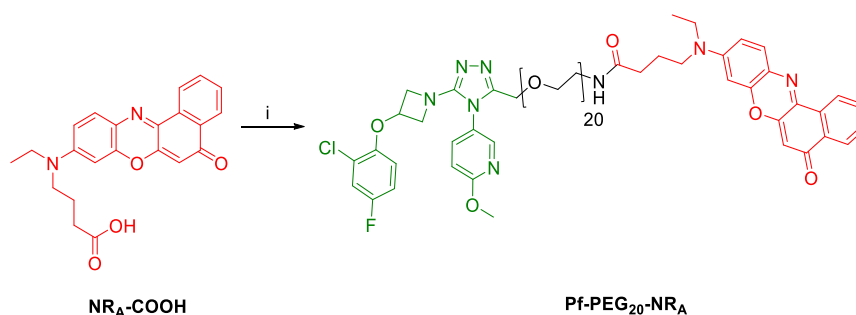
**Figure 27.** Structure de NR12S, fonctionnalisé au niveau de l'oxygène d'un cycle aromatique, et de NR12A et NR4A, fonctionnalisés au niveau d'une amine tertiaire.

Ces données ont conduit à la conception d'un analogue de la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR comportant le même ligand, le même espaceur mais avec un fluorophore lié au reste de la sonde par une substitution sur sa fonction amine. Une comparaison de leurs propriétés permettra d'énoncer si cet analogue possède des propriétés plus avantageuses pour une application en imagerie super-résolution. Ce nouveau dérivé est nommé Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>, NR<sub>A</sub> désignant ici le fluorophore Nile Red fonctionnalisé en cette autre position (Figure 28).



**Figure 28.** Structure du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR (à gauche) et du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> (à droite).

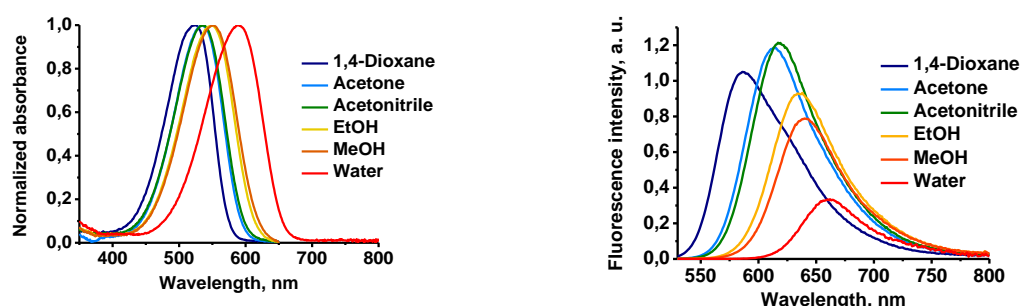
Les mêmes conditions de couplage que celles utilisées pour la préparation du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR ont été employées pour préparer le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> (Schéma 6). Cette réaction devrait être cependant répétée afin d'améliorer son rendement de 14%, cette faible valeur provenant des deux purifications menées pour obtenir le produit désiré avec une bonne pureté (> 95%, HPLC Méthode A, cf. Experimental part). Le composé souhaité a tout de même été obtenu comme démontré par LC-HRMS.



**Schéma 6.** Synthèse du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>. (i) **1.27b**, PyBOP, DIPEA, DMF, 25 °C, 17 h, 14%.

Les propriétés spectrales du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> ont été étudiées dans une série de solvants de polarités différentes (Figure 29 et Tableau 3).

Les spectres d'absorption et de fluorescence montrent que cette sonde conserve le fort caractère solvatochrome et fluorogène du Nile Red, similaire à celui des sondes développées précédemment (Figure 29).



**Figure 29.** Absorption (gauche) et fluorescence (droite) du Pf-PEG-NR<sub>A</sub>. Spectres d'absorption normalisés du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> dans différents solvants. L'intensité de fluorescence est rapportée à l'absorbance à 520 nm.

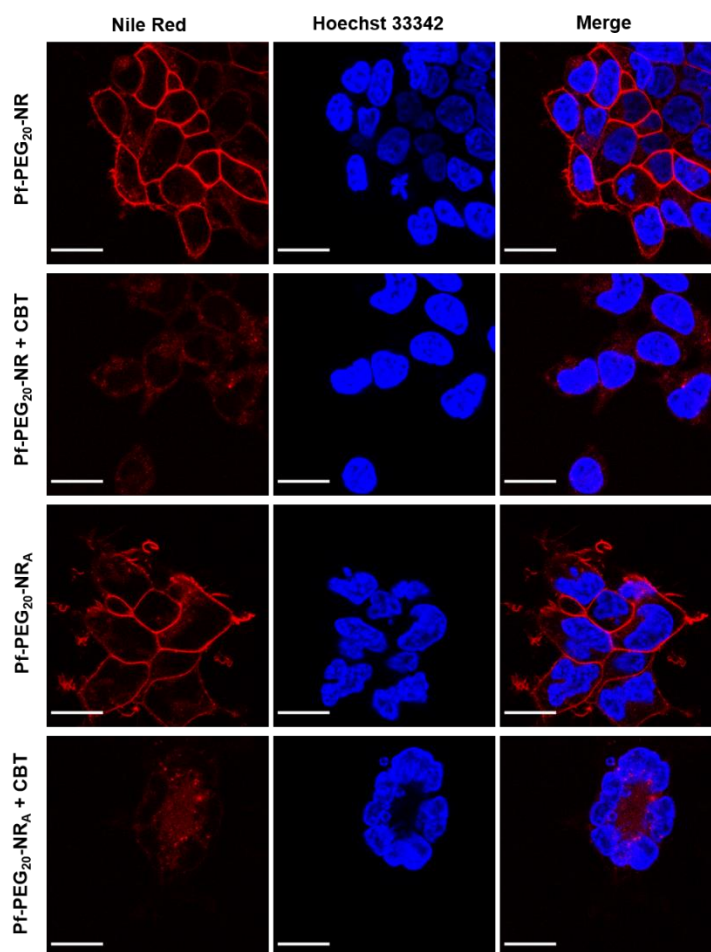
Les rendements quantiques du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> dans des solvants organiques ont été trouvés similaires aux rendements quantiques du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR. Cependant la nouvelle sonde est caractérisée par une fluorescence plus prononcée dans l'eau (16% contre 11% pour le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR) (Tableau 3), ce qui diminue légèrement son rapport turn-on (13 contre 17 pour le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR).

Solvant	$E_T30$ , kcal/mol <sup>[a]</sup>	$\lambda_{max}$ , nm		$\Phi^{[d]}$ , %
		abs <sup>[b]</sup>	fluo <sup>[c]</sup>	
1,4-Dioxane	36,0	523	586	64
Acétone	42,2	533	615	63
Acétonitrile	45,6	534	617	62
Éthanol	51,9	550	638	49
Méthanol	55,4	552	640	39
Eau	63,1	590	662	16

[a] Paramètre de polarité de Reichardt (Reichardt 1994) [b] Position du maximum d'absorption. [c] Position du maximum d'émission de fluorescence. [d] Rendement quantique de fluorescence.

**Tableau 3.** Propriétés spectrales du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>.

Ensuite, une étude de microscopie confocale sur cellules vivantes HEK-OTR a été réalisée dans le but d'évaluer la capacité de cette sonde à détecter l'OTR sans lavage (Figure 30). Tout comme la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> a permis de marquer clairement les membranes cellulaires avec une fluorescence de bruit de fond négligeable. D'autre part, ce nouveau dérivé n'induit pas l'internalisation de l'OTR, le marquage restant localisé à la surface des cellules, comme observé avec le ligand Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, montrant le caractère antagoniste du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>. Lors de l'addition d'un large excès de compétiteur non fluorescent se liant à l'OTR, la carbétocine (CBT), la fluorescence membranaire a disparu, montrant la spécificité de liaison du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> à l'OTR.

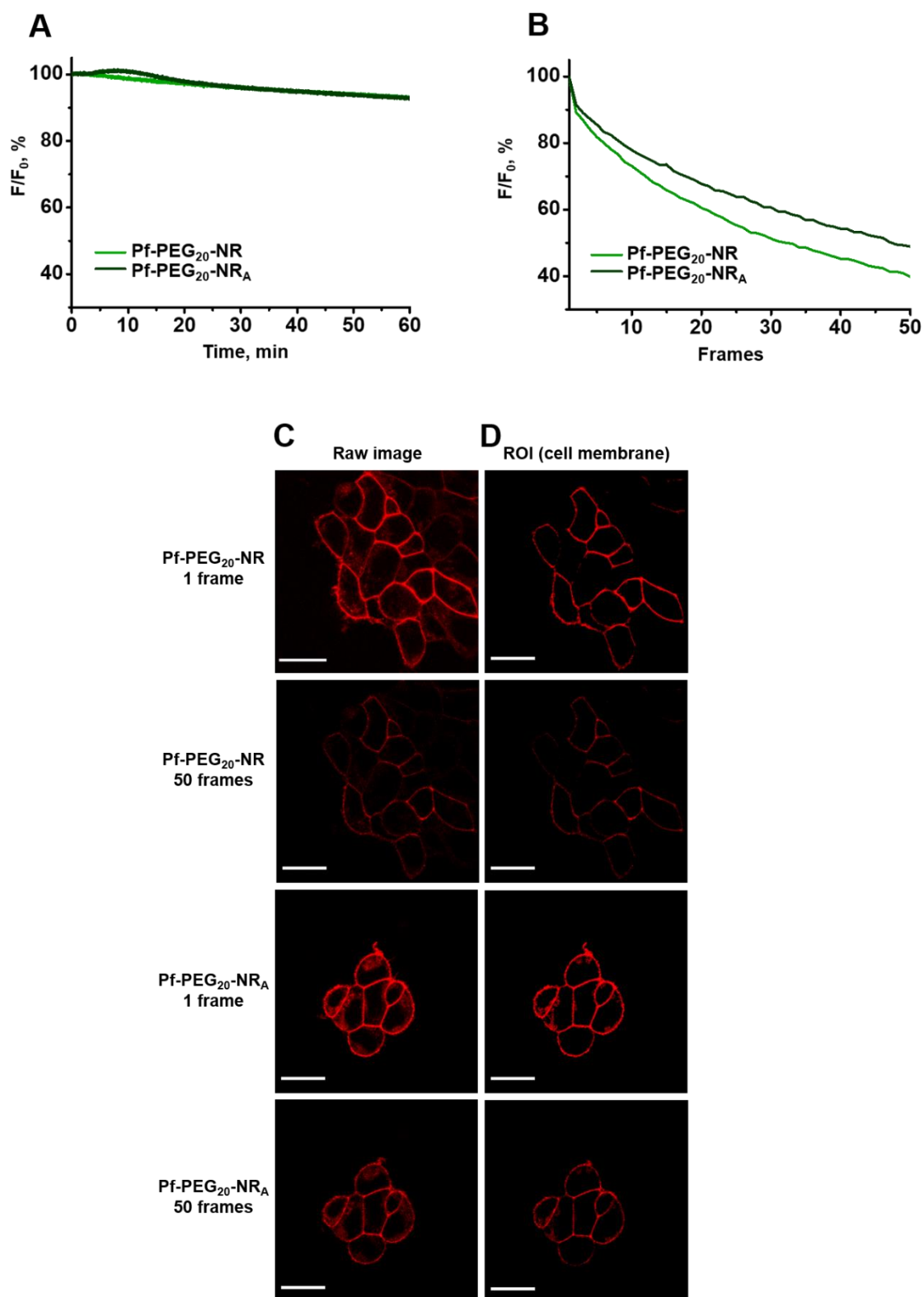


**Figure 30.** Microscopie confocale avec les sondes Pf-PEG<sub>20</sub>-NR et Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> sans lavage sur cellules vivantes HEK293 surexprimant l'OTR. La fluorescence non spécifique est évaluée en présence d'un excès (100 x) d'un ligand de l'OTR non fluorescent, la carbétocine (CBT). Concentrations : sondes dérivées du Nile Red : 20 nM ; CBT : 2 μM. L'émission de fluorescence du Nile Red (570-630 nm) est affichée en rouge, les noyaux colorés avec Hoechst 33342 sont montrés en bleu. Barres d'échelle : 20 μm.

Ensuite, la photostabilité du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> a été évaluée. Cette évaluation a dans un premier temps été réalisée en solution dans du 1,4-dioxane (Figure 31A). Sous une excitation à 520 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du Nile Red dans le 1,4-dioxane, l'évolution de l'intensité de fluorescence à 580 nm, longueur d'onde d'émission de fluorescence maximale dans le 1,4-dioxane, a été mesurée en fonction du temps. L'intensité de fluorescence de ces deux composés s'est révélée relativement stable dans ces conditions avec une perte de 7% de la fluorescence initiale ( $F_0$ ) après 1 h d'irradiation pour les deux sondes. Pour le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>, une très légère augmentation de la fluorescence a été observée en début d'étude, probablement dû à une fluctuation momentanée de la température mais n'ayant pas

influée sur la conclusion finale de cette évaluation. Pour vérifier si une différence de photostabilité entre ces deux composés était observée dans d'autres conditions expérimentales, une étude de photostabilité a été effectuée sur des cellules vivantes HEK-OTR (Figures 31B-D). Cette fois-ci, 50 excitations successives des sondes à 488 nm ont été réalisées et l'évolution des valeurs moyennes d'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'excitations a été tracée (Figure 31B). Ici, la baisse de fluorescence des deux sondes en fonction du temps a été plus nette. À l'issue des 50 excitations, une diminution de 60% de l'intensité de fluorescence initiale ( $F_0$ ) a été observée pour le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR et une réduction de 51% de la fluorescence initiale ( $F_0$ ) a été remarquée pour le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>. De ce fait, cette deuxième expérience a permis de mettre en évidence une meilleure photostabilité chez le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> que chez le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR. Ainsi, la deuxième sonde développée a semblé être une meilleure candidate pour l'imagerie super-résolution de l'OTR.

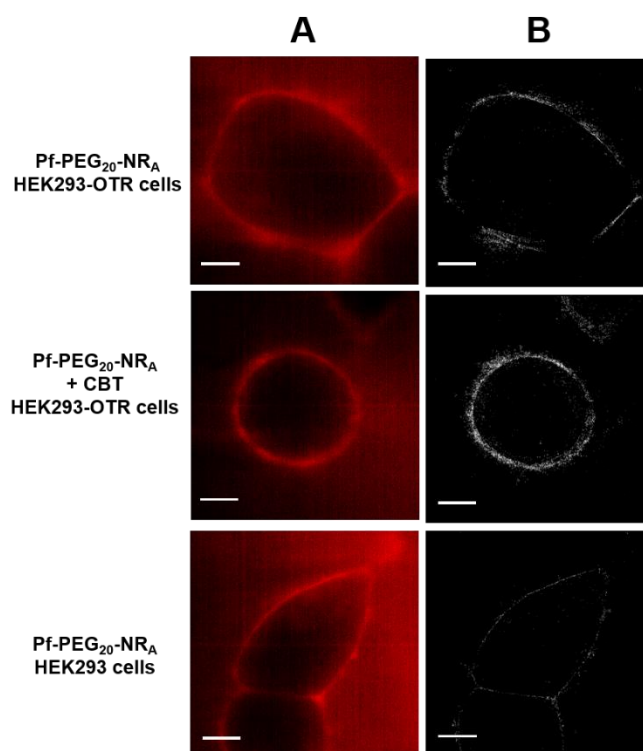




**Figure 31.** Comparaison de la photostabilité du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR avec celle du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>. (A) Spectroscopie de fluorescence. Une solution de sonde dérivée du Nile Red à 1  $\mu$ M dans du 1,4-dioxane est excitée à 520 nm pendant 1 h. L'intensité d'émission de fluorescence à 580 nm est mesurée en fonction du temps. (B) Valeurs moyennes d'intensité d'émission de fluorescence au niveau de la membrane cellulaire en fonction du nombre d'images

enregistrées, après excitation à 488 nm, obtenues à partir des images en (D). (C) Microscopie confocale sur cellules vivantes HEK293 surexprimant l'OTR. Concentration en sonde dérivée du Nile Red : 20 nM. L'émission du Nile Red (570-630 nm) est affichée en rouge. Images obtenues après soustraction du bruit de fond. Barres d'échelle : 20  $\mu$ m. (D) Régions d'intérêt (ROI) utilisées pour la quantification.

Cependant, cette augmentation de photostabilité n'a malheureusement pas été suffisante pour obtenir des images en microscopie TIRF de qualité exploitable (Figure 32). L'intensité de fluorescence et le nombre d'évènements détectés ont été trop faibles pour reconstituer des images en super-résolution de l'OTR. De plus, des différences très mineures entre les images en absence et en présence du compétiteur non fluorescent ont été observées. Une des explications possibles peut être liée au temps de résidence trop élevé des dérivés de PF-3274167 sur l'OTR qui se traduit par le photoblanchiment total de la fraction de la sonde liée au récepteur. Contrairement à cette liaison spécifique au récepteur, la liaison non spécifique de la sonde à la membrane (très faible mais non nulle) est beaucoup plus faible avec un temps de résidence très probablement plus court. La fraction de la sonde liée de manière non spécifique à la membrane et photoblanchie par une très forte irradiation TIRF est ainsi rapidement remplacée par une nouvelle fraction fluorescente, ce qui est enregistré comme un signal.



**Figure 32.** Imagerie super-résolution avec la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> sans lavage sur cellules vivantes. (A) Images de l'intensité intégrale de fluorescence de 9700 prises (30 ms par prise) par microscopie TIRF. La fluorescence non spécifique est évaluée en présence d'un excès (200 x) d'un ligand de l'OTR non fluorescent, la carbétocine (CBT). Concentrations : Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> : 10 nM ; CBT : 2 µM. L'émission de fluorescence du Nile Red (filtre passe-bande 593 ± 40 nm) est affichée en rouge. Barres d'échelle : 5 µm (B) Images super-résolues (PAINT). Temps d'intégration de 30 ms par prise (moyenne de 9700 prises par image).

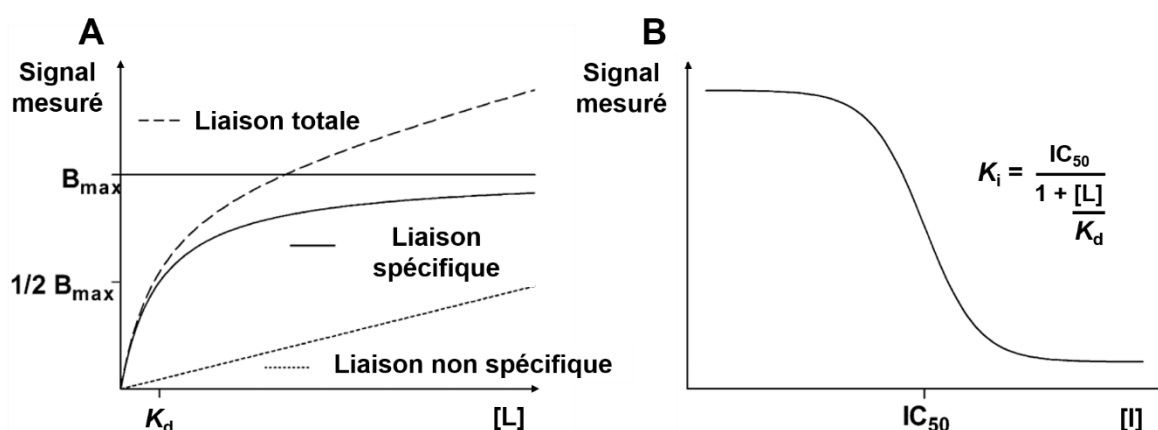
Cette observation remet en question l'utilisation de sondes fluorogènes classiques (fluorescentes en milieu apolaire et éteintes dans l'eau) pour l'imagerie super-résolution stochastique des RCPG. Même bien minimisées, les interactions non spécifiques de telles sondes avec la membrane ne peuvent pas être nulles, ce qui risque de produire un fort signal non spécifique en imagerie super-résolution PAINT. Par ailleurs, les fluorophores fluorogènes qui se basent sur le principe inverse – fluorescents dans l'eau et non fluorescents dans les membranes biologiques – peuvent s'avérer plus prometteurs pour l'imagerie super-résolution stochastique des RCPG. En effet, la silicon-rhodamine, dont la structure a été présentée en introduction de cette thèse, a été très récemment introduite sur un peptide ciblant le GLP1R, permettant ainsi de réaliser de la microscopie à molécule unique en mode TIRF pour étudier la distribution et la dynamique de ce récepteur (Ast et al. 2020).

### **8. Utilisation de la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR pour le développement d'un test de liaison à l'OTR**

L'objectif principal de ce sous-chapitre était de développer un essai fluorescent turn-on de liaison à un RCPG non modifié, en choisissant l'OTR comme exemple. Pour y parvenir la meilleure sonde non peptidique fluorogène dérivée du Nile Red développée et soigneusement caractérisée, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, a été utilisée. Le puissant caractère fluorogène du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR doit permettre de suivre la liaison du ligand au récepteur dans des conditions homogènes, sans avoir besoin d'éliminer la fraction non liée de la sonde. De plus, le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR est un ligand antagoniste de l'OTR, ce qui est favorable pour la mise au point d'un test de liaison. En effet, ce type de ligand n'étant pas internalisé dans les cellules exprimant le RCPG, son signal d'émission de fluorescence reste stable dans le temps.

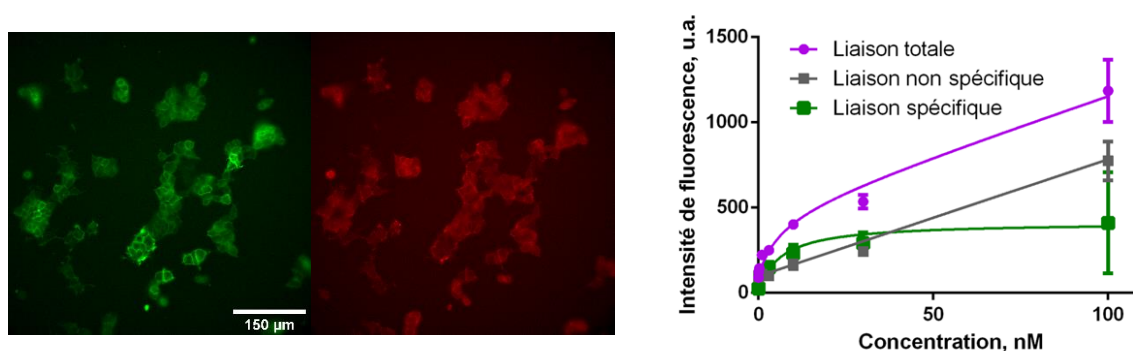
L'idée a alors été d'ajouter une concentration croissante du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR à des cellules exprimant l'OTR pour mesurer la **fluorescence totale** du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR (Figure

33). Ensuite la **fluorescence non spécifique**, comprenant la fluorescence provenant des interactions non spécifiques du ligand (la liaison non spécifique), ainsi que l'autofluorescence cellulaire, a été déterminée par réalisation des mêmes mesures en présence d'un excès d'un ligand de l'OTR non fluorescent, la carbétocine. Ceci a permis par soustraction de ces deuxièmes mesures d'avoir accès à la **liaison spécifique** du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR à l'OTR par le traçage d'une courbe de saturation. La constante de dissociation **K<sub>d</sub> du complexe Pf-PEG<sub>20</sub>-NR-OTR** a pu être extraite de cette courbe. Elle correspond à la concentration en Pf-PEG<sub>20</sub>-NR nécessaire pour occuper 50% d'OTR sans compétiteur. Par la suite des expériences de déplacement du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR seront envisagées. Pour ce faire, une concentration fixe en Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, ainsi qu'une concentration croissante en ligand non fluorescent étudié seront utilisées. De cette courbe de déplacement, la concentration inhibitrice médiane du ligand étudié, son IC<sub>50</sub>, correspondant à la concentration en ligand étudié nécessaire pour déplacer 50% du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR lié à l'OTR, pourra être extraite. Le calcul permettra, prenant en compte la concentration constante du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, son K<sub>d</sub> et l'IC<sub>50</sub> du ligand étudié, de déterminer la constante d'inhibition K<sub>i</sub> de ce ligand étudié, correspondant à la concentration en ligand étudié nécessaire pour occuper 50% de l'OTR sans compétiteur (Figure 33) (P. Newton, Harrison, et Clulow 2008; Hulme et Trevethick 2010). La comparaison des K<sub>i</sub> de ligands obtenus ainsi avec leurs K<sub>d</sub> déterminés par d'autres essais de liaison à l'OTR permettra de vérifier la fiabilité du test de liaison à l'OTR développé employant le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR.



**Figure 33.** Étapes à suivre pour la mise au point d'un test de liaison à un récepteur. (A) Détermination du K<sub>d</sub> du ligand marqué (L), B<sub>max</sub> représentant le nombre de récepteurs présents. (B) Détermination du K<sub>i</sub> d'un ligand non marqué (I).

Le test de liaison a été mis au point par microscopie à épifluorescence en utilisant un objectif 20x permettant d'imager le maximum de cellules. Afin de pouvoir quantifier la fluorescence membranaire indépendamment de la concentration en Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, l'expérience a été réalisée en présence d'une sonde membranaire proche-infrarouge dérivée de la cyanine 5.5 (sa structure n'est pas encore publiée). Une expérience préliminaire de liaison du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, à une concentration allant de 0,1 nM à 100 nM, a été effectuée dans des conditions homogènes, ce qui a permis de calculer son  $K_d$  de 6,2 nM (Figure 34). Cette expérience sera prochainement réalisée en triplicata afin de confirmer la valeur de  $K_d$  trouvée.



**Figure 34.** Résultats de la mise au point d'un test de liaison à l'OTR employant le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR. À gauche, une image de cellules HEK-OTR incubées avec 10 nM du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR. La fluorescence du Nile Red est montrée en vert, la fluorescence de la sonde membranaire dérivée de la cyanine 5.5 est montrée en rouge. À droite, les courbes de liaison totale, de liaison non spécifique et de liaison spécifique du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR. Au minimum 10 images par condition ont été traitées. Valeurs moyennes  $\pm$  écart moyen.

Cette première expérience très encourageante a démontré la possibilité de développer un test de liaison turn-on sur RCPG non modifié. Les prochaines étapes seront :

- la validation du  $K_d$  du Pf-PEG<sub>20</sub>-NR sur l'OTR
- la validation de la méthode par la mesure du  $K_i$  d'un agoniste et par la mesure du  $K_i$  d'un antagoniste connus de l'OTR (la carbétocine et le PF-3274167 par exemple)
- l'optimisation de la mesure de fluorescence : passage de boîtes 35 mm à des plaques 96 puits, automatisation de l'enregistrement de la fluorescence et automatisation du traitement

Au cours du développement de ce test de liaison, la fluorogénicité ou la brillance de la sonde employée pourraient se révéler comme des caractères limitants. Dans ce cas, il faudrait optimiser son caractère turn-on (en minimisant sa fluorescence dans l'eau par formation de dimères intramoléculaires, par exemple), ou encore minimiser ses interactions non spécifiques (en ajoutant des groupements chargés au niveau de l'espaceur ou sur le fluorophore ou en augmentant la longueur de la chaîne PEG).

## 9. Conclusions et perspectives

Dans ces travaux, la première sonde antagoniste sensible à l'environnement pour le récepteur de l'ocytocine a été développée en attachant de manière covalente le fluorophore Nile Red à un antagoniste non peptique par l'intermédiaire d'un espaceur PEG. Pour cela, nous avons synthétisé 4 sondes différentes possédant des espaceurs PEG de longueurs variables et étudié l'influence de ce paramètre sur la liaison non spécifique aux membranes et à la BSA. Cette première optimisation a permis de découvrir la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR qui possède une excellente fluorogénicité, un fort solvatochromisme positif et une liaison non spécifique très faible aux membranes lipidiques et aux protéines plasmatiques. Elle a permis l'imagerie par fluorescence de l'OTR sur des cellules en culture sans lavage avec une fluorescence de bruit de fond négligeable. Par ailleurs, nous avons montré que ce nouveau conjugué était un senseur du microenvironnement du récepteur de l'ocytocine, ayant notamment permis de mettre en évidence la diminution de l'ordre lipidique, suite à la déplétion du cholestérol, par microscopie ratiométrique de fluorescence. Peu de méthodes sont disponibles pour étudier l'hétérogénéité lipidique de la membrane cellulaire dans l'espace et dans le temps et aucune de ces méthodes n'a été utilisée pour l'analyse d'une fraction de la membrane associée à un récepteur non modifié. Ainsi le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR peut être considéré comme le premier ligand fluorescent ciblant un RCPG capable de sonder le microenvironnement de ce récepteur non modifié. En perspective, il serait très intéressant de pouvoir marquer le récepteur au Nile Red, sans occuper sa poche orthostérique, à l'aide d'un tag protéique de type SNAP-tag, afin de pouvoir suivre les changements du microenvironnement du récepteur, suite à son activation par des agonistes.

D'autre part, la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR s'est montrée très prometteuse pour le développement d'un test de liaison turn-on sur récepteur non modifié par microscopie de fluorescence. La mesure des  $K_i$  de ligands non fluorescents de l'OTR, comme la carbétocine ou le PF-3274167, en compétition avec le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR,

permettra de valider cette approche. Une optimisation technique allant jusqu'à l'utilisation d'un microscope automatique en format 96 puits pourrait permettre d'augmenter le débit de cette méthode.

Par la suite, la conception de sondes fluorogènes dérivées du Nile Red pourrait être étendue aux ligands peptidiques ou non peptidiques ciblant d'autres RCPG, afin de les visualiser sur cellules vivantes avec un bon rapport signal sur bruit sans lavage et aussi dans le but de mettre au point des essais de liaison sur ces récepteurs pour accélérer le développement de médicaments ciblant les RCPG.

## **Chapitre 2**

---

### **Développement de sondes fluorescentes dérivées de la spexine pour l'étude du récepteur GalR2**

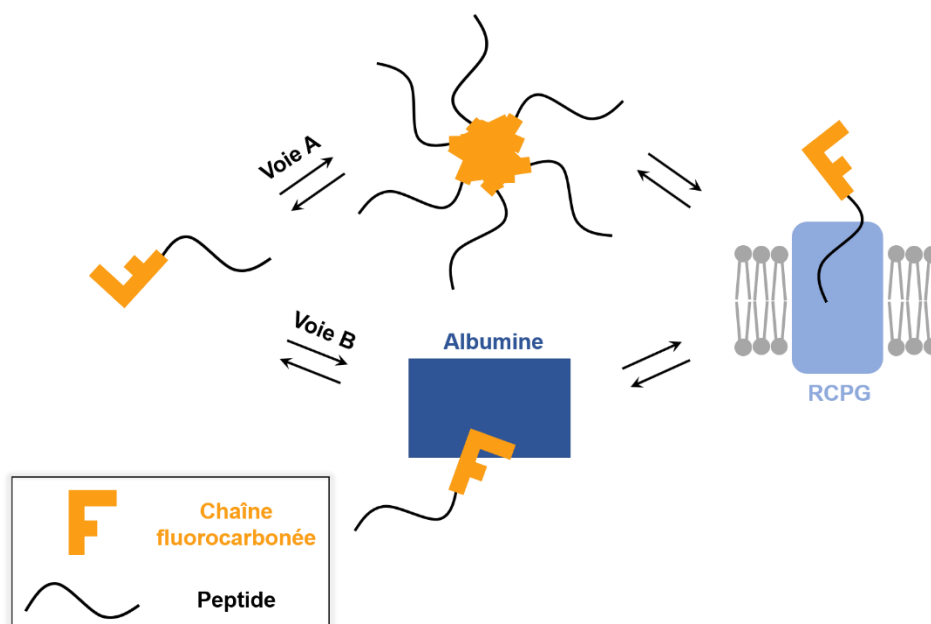




## 1. Conception et synthèse de spexines fluorescentes

Comme décrit en introduction, le neuropeptide spexine et son récepteur GalR2 représentent un système très prometteur pour le développement de nouveaux analgésiques non opiacés. À ce jour, il n'existe pas de dérivé fluorescent de la spexine, permettant de suivre sa liaison au récepteur, localiser le récepteur GalR2 sur cellules et sur tissus et suivre sa signalisation sur cellules vivantes. Dans ce contexte, le principal but de ce chapitre est de développer les premiers ligands fluorescents pour le GalR2 dérivés de la spexine.

D'autre part, cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet majeur du laboratoire qui a pour but de développer une nouvelle méthode pour augmenter la stabilité enzymatique de peptides ciblant les RCPG (Stratégie FluoroPEP décrite dans l'introduction). En utilisant cette approche, il a été découvert au laboratoire (Esteouille et al. 2017) que l'ajout d'une chaîne fluorocarbonée en partie N-terminale de la spexine permettait d'augmenter la stabilité métabolique de ce peptide, son activité fonctionnelle sur le récepteur GalR2 et son efficacité dans un modèle murin de douleurs inflammatoires. Il est important de comprendre les mécanismes conduisant à l'augmentation de la stabilité et de l'efficacité de la fluorospexine par comparaison avec la spexine. Nous avons fait l'hypothèse que l'amélioration de la stabilité plasmatique pourrait provenir soit 1) de la capacité de la fluorospexine à s'organiser en micelles conduisant ainsi à une protection vis-à-vis de la dégradation enzymatique par encombrement stérique ; soit 2) de la capacité de la fluorospexine à se lier à l'albumine et ainsi être protégée des enzymes contenues dans le plasma (Figure 35).

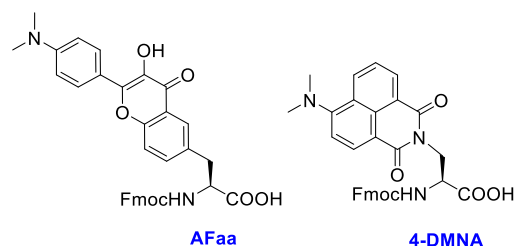


**Figure 35.** Représentation des deux hypothèses conduisant à l'augmentation de la stabilité métabolique des peptides fluorocarbonés. Deux mécanismes envisagés pour expliquer la protection induite par la chaîne fluorocarbonée contre la dégradation enzymatique : auto-organisation en micelles (Voie A) ou liaison à l'albumine (Voie B).

Pour valider ces hypothèses, nous avons voulu développer des sondes fluorescentes sensibles à l'environnement dérivées du Nile Red. Pour y parvenir, l'introduction d'un fluorophore sensible à l'environnement dans la séquence de la fluorospexine et de la spexine a été envisagée. Ainsi, ce marquage fluorescent permettrait d'étudier ces deux mécanismes de stabilisation possibles, pouvant prolonger le temps de résidence du peptide dans le système sanguin avant d'être éliminé, facilitant ainsi sa liaison à son récepteur cible. Grâce à ces sondes innovantes, nous pourrions étudier l'organisation en micelles (Krafft et Riess 2009) de la fluorospexine et de la spexine, avec la détermination d'une concentration micellaire critique (CMC), et leur liaison potentielle à l'albumine (Kratz 2008).

Une stratégie élégante pour rendre un peptide fluorescent consiste à introduire un acide aminé fluorescent, ayant des propriétés spectrales optimales, dans sa séquence peptidique. Celui-ci peut y être ajouté ou il peut substituer un des acides aminés naturels du peptide en veillant à ne pas perturber la structure, ni la fonction du ligand. Pour pouvoir suivre les interactions fines du peptide avec son environnement proche, l'acide aminé fluorescent choisi doit être solvatofluorochrome et pour avoir la capacité de travailler sur récepteur non modifié sans lavage, ce résidu fluorescent doit également être fluorogène. À ce jour, plusieurs acides aminés fluorescents sont décrits dans la littérature (Cheng et al.

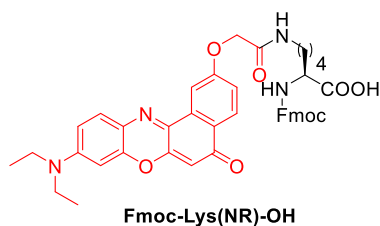
2020). Parmi eux, sont trouvés l'AFaa, qui permet d'étudier l'orientation du peptide méltittine au sein des membranes lipidiques (Postupalenko et al. 2013), et le 4-DMNA, développé pour suivre les interactions protéine-protéine (Loving et Imperiali 2008) (Figure 36).



**Figure 36.** Exemples d'acides aminés solvatofluorochromes existants.

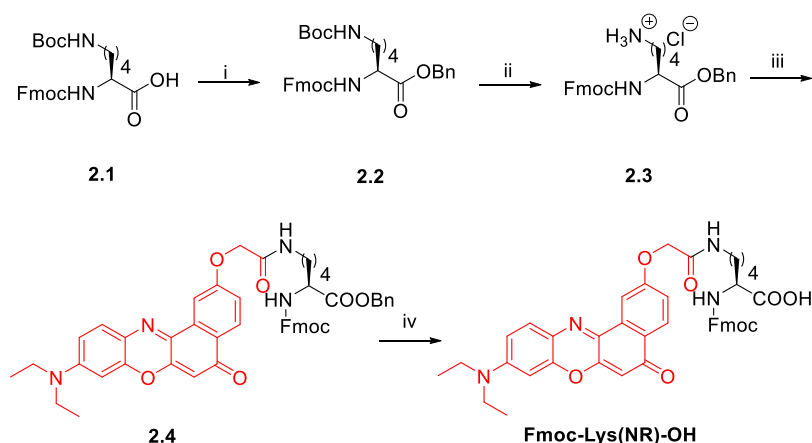
Bien que ces acides aminés permettent de suivre les interactions biomoléculaires avec une haute sensibilité *in vitro* ou dans des modèles cellulaires simples, ils ne sont pas adaptés aux études de la signalisation cellulaire des RCPG. En effet, l'excitation de ces acides aminés solvatofluorochromes par la lumière ultraviolette ou bleue provoque une forte autofluorescence cellulaire et ainsi un faible rapport signal sur bruit.

Dans ce contexte, il était intéressant de développer un acide aminé solvatofluorochrome qui fluoresce dans le rouge pour les études cellulaires afin d'augmenter la sensibilité de détection car il n'existait pas d'acide aminé fluorescent de ce type décrit dans la littérature. Un des objectifs de ce chapitre a de ce fait été de concevoir le premier acide aminé solvatofluorochrome et fluorogène qui fluoresce dans le rouge pour l'étude des interactions de la spexine et de la fluorospexine, ligands du GalR2. Le Nile Red, quant à lui, est un fluorophore solvatofluorochrome, fluorogène et émettant dans le rouge. Ce dernier a ainsi été sélectionné pour la préparation de l'acide aminé souhaité. L'idée a alors été de concevoir un acide aminé original dérivé du Nile Red et de la lysine, la Fmoc-Lys(NR)-OH (Figure 37 et Schéma 7).



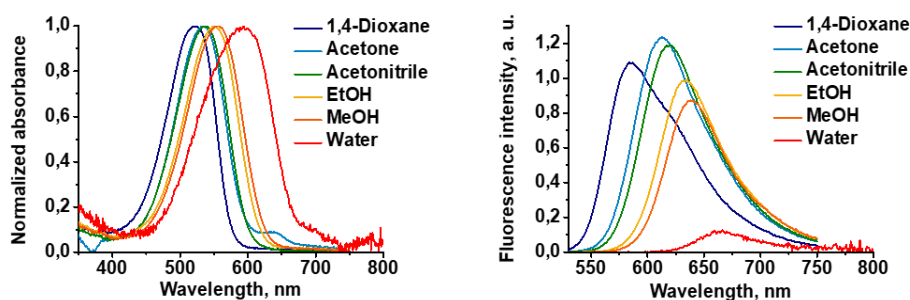
**Figure 37.** Structure du premier acide aminé dérivé du Nile Red développé, la Fmoc-Lys(NR)-OH.

La première étape de la synthèse de l'acide aminé Fmoc-Lys(NR)-OH a consisté à protéger la fonction acide carboxylique de la lysine commerciale Fmoc-Lys(Boc)-OH (**2.1**) par un groupement benzyle pour former le composé **2.2** avec un rendement de 85% (Schéma 7). Ensuite, le groupement protecteur Boc de la fonction amine de la chaîne latérale a été éliminé en milieu acide donnant accès de manière quantitative au composé **2.3** prêt à être couplé au dérivé acide carboxylique du Nile Red NR-COOH développé précédemment. Ce couplage a été effectué en présence de PyBOP et de DIPEA dans le DMF pour conduire à l'acide aminé fluorescent **2.4** avec un excellent rendement de 96%. Finalement, la fonction acide carboxylique de cet acide aminé a été déprotégée par hydrogénolyse catalytique pour accéder au premier acide aminé dérivé du fluorophore Nile Red, la Fmoc-Lys(NR)-OH, avec un rendement de 38%. Sa fonction amine protégée par un groupement Fmoc et son acide carboxylique libre le rendent tout à fait adapté pour une introduction de ce marqueur fluorescent par synthèse peptidique en phase solide (SPPS) en suivant la stratégie Fmoc/*t*-Bu.



**Schéma 7.** Synthèse de la Fmoc-Lys(NR)-OH. (i) BnOH, DCC, DMAP, DCM, 0-25 °C, 5 h, 85% ; (ii) HCl, 1,4-dioxane, 25 °C, 4,5 h, quant.; (iii) NR-COOH, PyBOP, DIPEA, DMF, 25 °C, 2,5 h, 96%; (iv) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 25 °C, 22 h, 38%.

Les propriétés spectrales de la Fmoc-Lys(NR)-OH ont été étudiées dans une série de solvants de polarités différentes (Figure 38 et Tableau 4). Ces spectres d'absorption montrent que la Fmoc-Lys(NR)-OH conserve le fort caractère solvatochrome du fluorophore seul, avec un déplacement bathochrome des maximums d'absorption, avec l'augmentation de la polarité du solvant, allant de 519 nm dans le 1,4-dioxane à 594 nm dans l'eau (Figure 38). L'étude de l'émission de fluorescence de la Fmoc-Lys(NR)-OH dans ces mêmes solvants a ensuite été menée (Figure 38). Les valeurs d'intensité de fluorescence dans un solvant donné ont été divisées par l'absorbance dans ce solvant à 520 nm, longueur d'onde d'excitation utilisée, afin de pouvoir comparer les intensités de fluorescence dans les différents solvants. Cette étude a révélé que la Fmoc-Lys(NR)-OH affiche aussi un excellent caractère solvatofluorochrome avec un déplacement bathochrome des maximums de fluorescence, avec l'augmentation de la polarité du milieu, allant de 584 nm dans le 1,4-dioxane à 666 nm dans l'eau. Ce dérivé garde également le fort caractère fluorogène du Nile Red avec une augmentation drastique de fluorescence lors du passage de l'eau au 1,4-dioxane.



**Figure 38.** Spectres d'absorption normalisés (gauche) et de fluorescence (droite) de l'acide aminé Fmoc-Lys(NR)-OH. Intensité de fluorescence rapportée à l'absorbance à 520 nm.

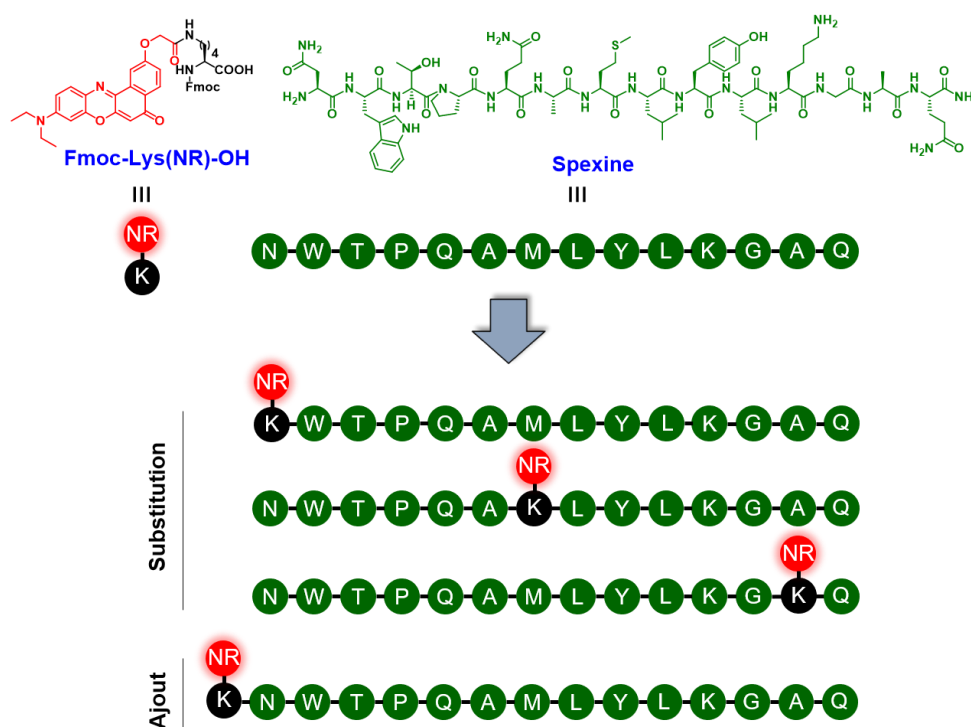
La mesure successive de l'absorption, puis de la fluorescence de la Fmoc-Lys(NR)-OH a permis de déterminer ses rendements quantiques dans les solvants étudiés (Tableau 4). Pour ce faire, le rendement quantique du Nile Red de 70% dans le 1,4-dioxane, décrit dans la littérature, a aussi été choisi comme référence (Sackett et Wolff 1987). Un très bon rendement quantique de 67% a été déterminé dans le 1,4-dioxane. Cette valeur a diminué avec l'augmentation de la polarité du solvant jusqu'à 6% dans l'eau, témoignant de la très bonne fluorogénicité de cet acide aminé. Pour conclure, la Fmoc-Lys(NR)-OH possède d'excellentes propriétés pour concevoir des dérivés fluorescents de la spexine et de la fluorospexine.

Solvant	$E_T30$ , kcal/mol <sup>[a]</sup>	$\lambda_{max}$ , nm		$\Phi^{[d]}$ , %
		abs <sup>[b]</sup>	fluo <sup>[c]</sup>	
1,4-Dioxane	36,0	519	584	67
Acétone	42,2	534	613	65
Acétonitrile	45,6	536	620	60
Éthanol	51,9	548	634	49
Méthanol	55,4	557	640	40
Eau	63,1	594	666	6

[a] Paramètre de polarité de Reichardt (Reichardt 1994) [b] Position du maximum d'absorption. [c] Position du maximum d'émission de fluorescence. [d] Rendement quantique de fluorescence.

**Tableau 4.** Propriétés spectrales de l'acide aminé Fmoc-Lys(NR)-OH.

La première étape dans le développement de spexines et de fluorospexines dérivées du Nile Red a été de trouver la position d'introduction de l'acide aminé Lys(NR) altérant le moins possible la liaison de ces peptides au GalR2. Les données recueillies dans la littérature montrent qu'une substitution des acides aminés présents en positions 1, 7 et 13 dans la séquence peptidique de la spexine respectivement par la glycine, l'alanine ou la proline n'affecte pas l'activité fonctionnelle de la spexine (Reyes-Alcaraz et al. 2016). D'autre part, la fonctionnalisation de son asparagine en position 1 par un groupement Fmoc, acétylé ou polyéthylène glycol ne diminue que très légèrement l'activité de ce peptide sur le GalR2. En se basant sur ces résultats, les positions 1, 7 et 13 ont été choisies pour l'intégration de la lysine dérivée du Nile Red par remplacement des acides aminés naturellement présents dans la spexine afin d'évaluer l'influence de cette modification sur l'activité fonctionnelle sur le GalR2. D'autre part, une spexine a également été produite conservant l'intégralité de sa séquence peptidique à laquelle une Lys(NR) a été ajoutée en partie N-terminale (Figure 39).



**Figure 39.** Conception des premières spexines fluorescentes.

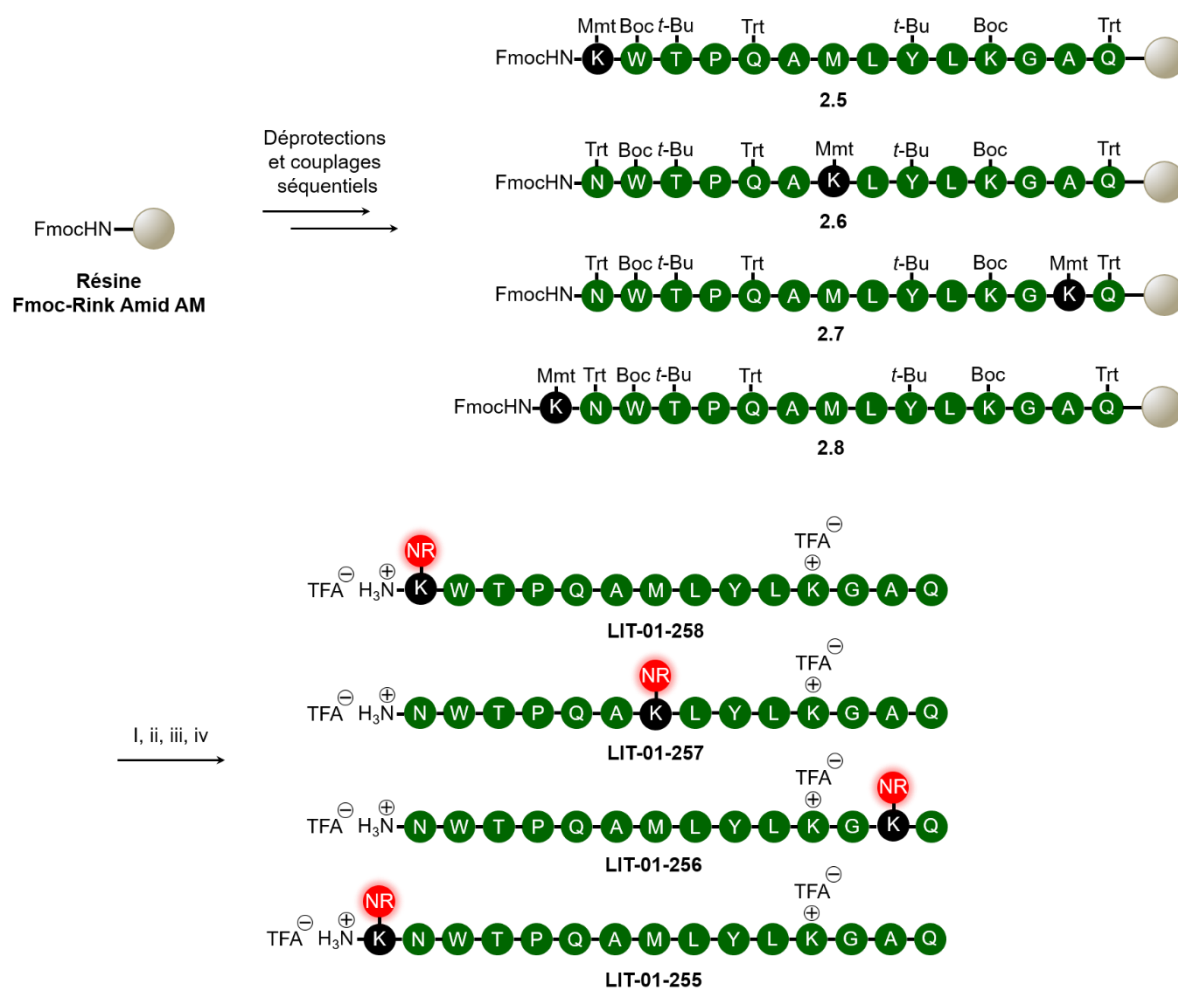
À ce stade de l'étude, nous avons envisagé deux stratégies pour la synthèse des quatre dérivés fluorescents de la spexine. La première consistait à coupler l'acide aminé Fmoc-Lys(NR)-OH sur support solide aux différentes positions choisies précédemment. Cette approche nécessitait la resynthèse à plus grande échelle de l'acide aminé. Aussi, afin d'accéder rapidement aux structures d'intérêt, nous avons opté pour une deuxième stratégie consistant à introduire le NR-COOH directement sur support solide via une lysine protégée au niveau de son amine latérale par un groupement monométhoxytrityle (Mmt) (Schéma 8).

Ainsi, la synthèse des séquences peptidiques **2.5** – **2.8** a été effectuée sur support solide de manière automatisée par chauffage micro-ondes assisté en utilisant l'association DIC/Oxyma comme agent de couplage dans le DMF et 20% v/v de pipéridine dans le DMF pour l'élimination des groupements protecteurs Fmoc. Seul l'acide aminé Fmoc-Lys(Mmt)-OH a été introduit manuellement en présence de l'agent de couplage HATU et de la base DIPEA, pour limiter la quantité employée de cet acide aminé plus coûteux. Ensuite le groupement Mmt de la lysine a été éliminé par traitement avec un mélange 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM. Cette déprotection a pu être suivie facilement par la libération du cation monométhoxytrityle, colorant le filtrat en jaune et détectable par HPLC analytique. Toujours sur support solide, une fois que l'amine fut libre au niveau de la chaîne latérale de la lysine déprotégée



chimiosélectivement, l'acide carboxylique NR-COOH précédemment synthétisé y a été couplé en présence de PyBOP. Après élimination du Fmoc en partie N-terminale, les peptides ont été décrochés du support solide avec un cocktail de clivage K (82.5:5:5:5:2.5 v/v TFA/thioanisole/eau/phénol/EDT) limitant les risques d'oxydation non désirée de la méthionine (Huang et Rabenstein 1999) et purifiés par RP-HPLC.

Ces quatre premières spexines fluorescentes dérivées du Nile Red **LIT-01-255** – **LIT-01-258** (Schéma 8) ont ainsi été obtenues avec des rendements modestes allant de 1 à 15%. Ces faibles rendements sont certainement dûs à un décrochage final incomplet, à une mauvaise précipitation des peptides, ou encore à la difficulté de purification, avec une certaine quantité de ces peptides relativement hydrophobes retenue sur la colonne. L'obtention de ces composés a tout de même permis par la suite de déterminer l'influence de l'introduction du Nile Red sur la spexine en ces quatre positions différentes sur l'activité fonctionnelle de ce peptide vis-à-vis du GalR2.

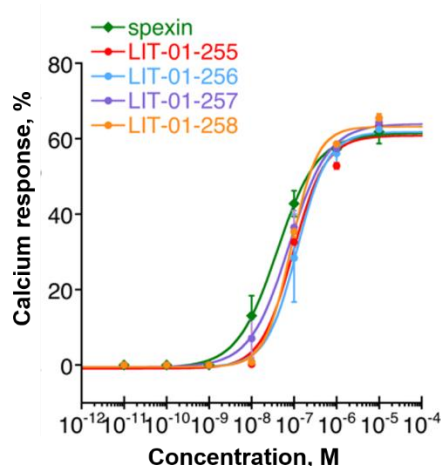


**Schéma 8.** Synthèse des premières spexines dérivées du Nile Red. (i) 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM, 25 °C, 22-34 min ; (ii) NR-COOH, PyBOP, DIPEA, DMF, 25 °C, 1 h ; (iii) 20%

v/v pipéridine dans DMF, 25 °C, 30 min ; (iv) 82.5:5:5:5:2.5 v/v TFA/phénol/thioanisole/H<sub>2</sub>O/EDT, 25 °C, 2-3 h, 1-15%.

## 2. Évaluation de l'activité fonctionnelle de spexines fluorescentes sur le GalR2

Une fois préparées, l'activité fonctionnelle de ces spexines fluorescentes a été évaluée sur des cellules HEK exprimant de manière stable le récepteur GalR2 (HEK-GalR2). Le caractère agoniste des spexines fluorescentes a été ici testé avec la spexine non maquée comme contrôle. Ci-dessous figurent les courbes représentant la réponse calcique induite par l'ajout d'une concentration croissante de composé ajouté (Figure 40). Similairement à la spexine native, les quatre dérivés de ce peptide engendrent une augmentation du calcium intracellulaire. Ainsi tous ces ligands sont des agonistes du RCPG GalR2. L'ajout du fluorophore Nile Red ne semble affecter que très légèrement l'activité de la spexine et ce quel que soit sa position au sein de la séquence peptidique de la spexine avec des valeurs d' $EC_{50}$  entre  $83 \pm 7$  et  $111 \pm 20$  nM comparées à l' $EC_{50}$  de la spexine s'élevant à  $61 \pm 7$  nM (Tableau 5).



**Figure 40.** Activité fonctionnelle de spexines fluorescentes sur le GalR2. Courbes dose-réponse de spexines fluorescentes (**LIT-01-255** en rouge, **LIT-01-256** en bleu, **LIT-01-257** en mauve et **LIT-01-258** en orange) et de la spexine (en vert). Données à partir d'une expérience réalisée en duplicata. Valeurs moyennes  $\pm$  écart moyen.

Composé	Séquence peptidique	EC <sub>50</sub> ± SEM, nM	Répétitions
Spexine	NWTPQAMLYLKGAQ	61 ± 14	4
<b>LIT-01-255</b>	K(NR)NWTPQAMLYLKGAQ	83 ± 7	3
<b>LIT-01-256</b>	NWTPQAMLYLKGGK(NR)Q	95 ± 13	3
<b>LIT-01-257</b>	NWTPQAK(NR)LYLKGAQ	84 ± 14	3
<b>LIT-01-258</b>	K(NR)WTPQAMLYLKGAQ	111 ± 20	3

**Tableau 5 :** Activité fonctionnelle de spexines fluorescentes sur le GalR2. Données à partir de trois ou quatre expériences indépendantes (répétitions) réalisées en duplicata. Valeurs moyennes d'EC<sub>50</sub> ± écart moyen déterminées en fonction de la réponse calcique induite par les dérivés de la spexine.

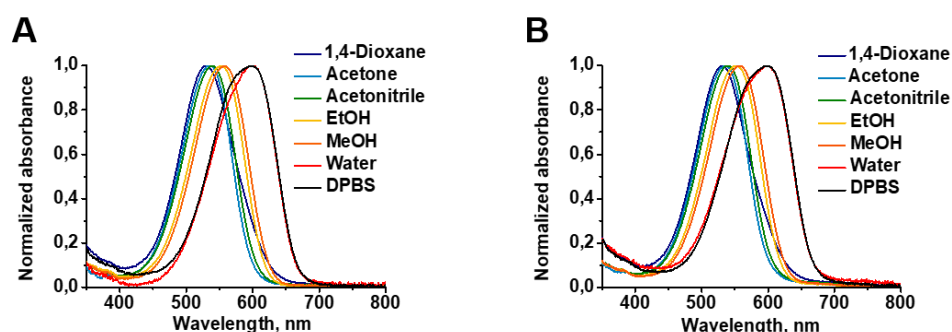
Ces données nous confirment l'obtention des premiers dérivés fluorescents de la spexine actifs sur le récepteur GalR2 et ouvre la possibilité de concevoir des fluorospexines fluorescentes en introduisant l'acide aminé Lys(NR) à la place des acides aminés 1, 7 ou 13 ou en extrémité N-terminale. En perspectives de l'étude des interactions de la fluorospexine avec l'albumine, l'introduction d'un acide aminé sensible à son environnement dans la séquence peptidique de la fluorospexine en deux positions bien distinctes permettrait d'avoir plus d'informations sur les résidus intervenant dans la liaison à l'albumine. Cette étude nous a permis de sélectionner deux spexines fluorescentes pour les évaluations photophysiques. Il s'agit du peptide **LIT-01-255**, modifié par la Lys(NR) en position N-terminale et possédant la meilleure EC<sub>50</sub> et le peptide **LIT-01-256**, modifié par la Lys(NR) en position 13 en extrémité C-terminale. Idéalement et si nous avions disposé de plus de temps pour cette étude, nous aurions pu sélectionner le dérivé **LIT-01-257** qui possède une activité fonctionnelle comparable à celle des **LIT-01-255** et **LIT-01-256** et le résidu Lys(NR) en position centrale du peptide. Cela nous aurait permis d'étudier l'influence de cette position du résidu fluorescent dans la séquence du peptide sur les propriétés spectrales de ce dernier.

### 3. Évaluation des propriétés spectrales de spexines fluorescentes

Les propriétés spectrales des spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256** ont été étudiées dans une série de solvants de polarités différentes (Figure 41, Figure 42 et Tableau 6).

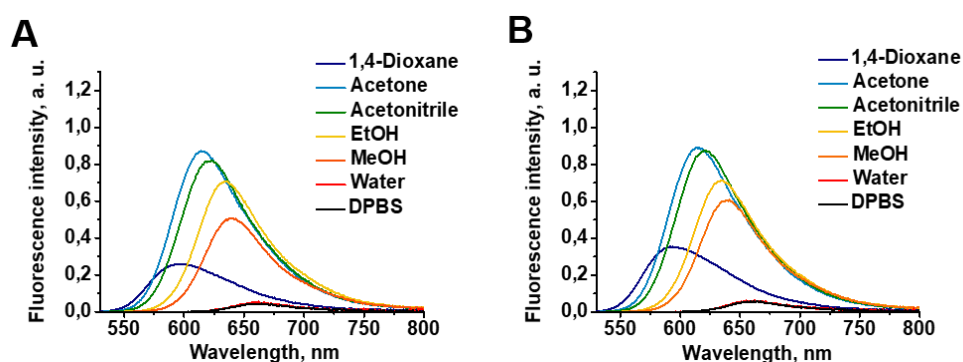
Le déplacement bathochrome des maximums d'absorption avec l'augmentation de la polarité du solvant similaire à celui de la Fmoc-Lys(NR)-OH est

observé pour ces peptides fluorescents (Figure 41). Ainsi ces spexines fluorescentes conservent le puissant caractère solvatochrome du Nile Red.



**Figure 41.** Absorption de spexines dérivées du Nile Red. Spectres d'absorption normalisés du (A) **LIT-01-255** et du (B) **LIT-01-256** dans différents solvants.

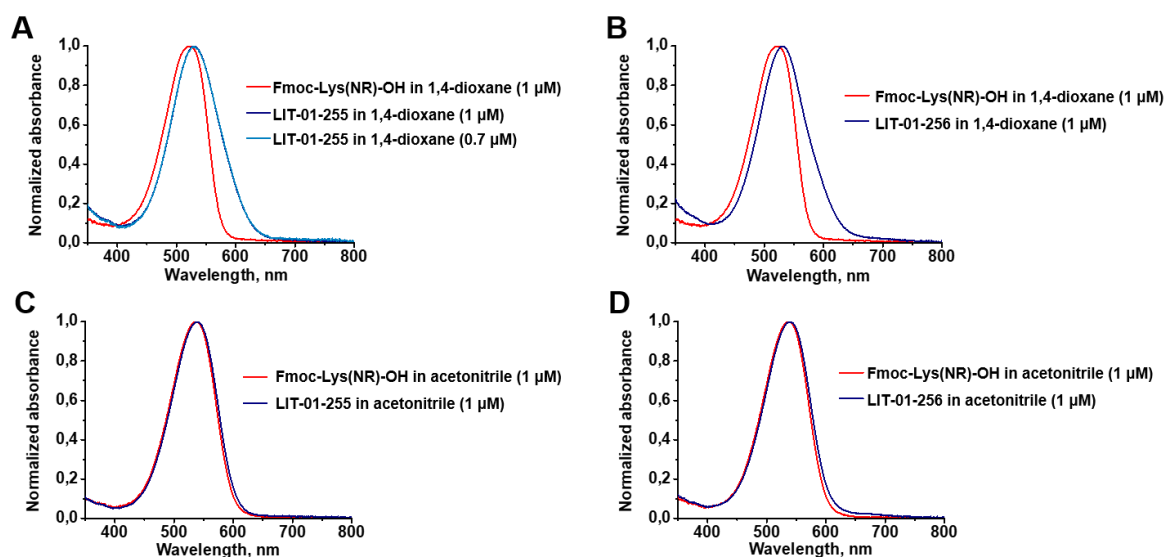
L'étude de l'émission de fluorescence de ces spexines dérivées du Nile Red dans ces mêmes solvants a ensuite été menée (Figure 42). Les valeurs du spectre d'émission de fluorescence d'un composé dans un solvant donné ont été divisées par l'absorbance de ce même composé dans ce solvant à 520 nm, longueur d'onde d'excitation utilisée, afin de pouvoir comparer les intensités de fluorescence dans les différents solvants. Cette étude a révélé que ces dérivés fluorescents développés affichent un excellent caractère solvatofluorochrome avec un déplacement bathochrome des maximums de fluorescence similaire à celui de la Fmoc-Lys(NR)-OH, avec l'augmentation de la polarité de l'environnement.



**Figure 42.** Fluorescence de spexines dérivées du Nile Red. Spectres d'émission de fluorescence du (A) **LIT-01-255** et du (B) **LIT-01-256** dans différents solvants. L'intensité de fluorescence est rapportée à l'absorbance à 520 nm.

En revanche, il a été remarqué que les composés **LIT-01-255** et **LIT-01-256** montrent une émission de fluorescence relativement faible dans le 1,4-dioxane à la

concentration étudiée de 1  $\mu\text{M}$ . Considérant le caractère fluorogène du Nile Red, l'observation d'une intensité de fluorescence plus élevée que celle présentée dans l'acétone était attendue. La solubilité de ces dérivés dans le 1,4-dioxane a de ce fait été remise en cause. L'absorption normalisée des **LIT-01-255** et **LIT-01-256** dans le 1,4-dioxane et celle dans l'acétonitrile ont été comparées à l'absorption normalisée de la Fmoc-Lys(NR)-OH dans ces mêmes solvants (Figure 43). Pour le **LIT-01-255**, comparé à la Fmoc-Lys(NR)-OH à la même concentration de 1  $\mu\text{M}$  dans le 1,4-dioxane, son spectre d'absorption est plus large, ce qui peut indiquer la formation d'agrégats de type J. Le même élargissement est observé après une dilution jusqu'à 700 nm, concentration limite pour pouvoir mesurer correctement l'absorption des dérivés du Nile Red à 520 nm (la longueur d'onde d'excitation pour la mesure des rendements quantiques). La situation est la même pour le **LIT-01-256** à la concentration de 1  $\mu\text{M}$  dans le 1,4-dioxane, son spectre d'absorption affiche la même forme élargie comparé à la Fmoc-Lys(NR)-OH. À l'opposé dans l'acétonitrile, solvant plus polaire que le 1,4-dioxane, les spectres d'absorption du **LIT-01-255** et du **LIT-01-256** sont tout à fait superposables à celui de la Fmoc-Lys(NR)-OH dans l'acétonitrile. Un spectre d'absorption élargi peut témoigner d'une faible solubilité du composé à la concentration étudiée qui provoque la formation d'agrégats (Ray, Das, et Chattopadhyay 2019). Ainsi les **LIT-01-255** et **LIT-01-256** montrent effectivement une solubilité limitée dans le 1,4-dioxane.



**Figure 43.** Comparaison de l'absorption normalisée des (A) Fmoc-Lys(NR)-OH et **LIT-01-255** dans le 1,4-dioxane, des (B) Fmoc-Lys(NR)-OH et **LIT-01-256** dans le 1,4-dioxane, des (C) Fmoc-Lys(NR)-OH et **LIT-01-255** dans l'acétonitrile et des (D) Fmoc-Lys(NR)-OH et **LIT-01-256** dans l'acétonitrile.

La mesure successive de l'absorption, puis de la fluorescence de ces peptides fluorescents a permis de déterminer leurs rendements quantiques dans les solvants étudiés (Tableau 6). Lors de cette évaluation, le rendement quantique du Nile Red de 70% dans le 1,4-dioxane, a aussi été utilisé comme référence (Sackett et Wolff 1987). Les rendements quantiques faibles des **LIT-01-255** et **LIT-01-256** dans le 1,4-dioxane (16% et 22% respectivement) confirment la faible solubilité de ces composés dans ce solvant qui induit la formation d'espèces non fluorescentes.

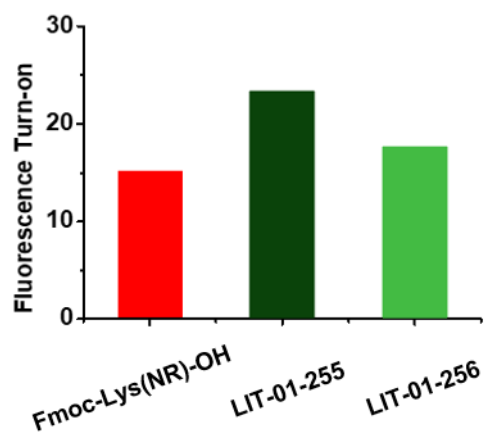
Composé	Solvant	$E_T30^{[a]}$ , kcal/mol	$\lambda_{max}$ , nm		$\Phi^{[d]}$ , %
			abs <sup>[b]</sup>	fluo <sup>[c]</sup>	
<b>LIT-01-255</b>	1,4-Dioxane	36,0	531	596	16
	Acétone	42,2	538	614	45
	Acétonitrile	45,6	540	623	41
	Éthanol	51,9	553	634	35
	Méthanol	55,4	558	639	24
	Eau	63,1	599	662	2
	DPBS	63,1	598	662	2
<b>LIT-01-256</b>	1,4-Dioxane	36,0	531	594	22
	Acétone	42,2	535	614	46
	Acétonitrile	45,6	540	620	43
	Éthanol	51,9	551	634	35
	Méthanol	55,4	556	639	28
	Eau	63,1	596	660	3
	DPBS	63,1	598	664	2

[a] Paramètre de polarité de Reichardt (Reichardt 1994) [b] Position du maximum d'absorption. [c] Position du maximum d'émission de fluorescence. [d] Rendement quantique de fluorescence.

**Tableau 6.** Propriétés spectrales de spexines dérivées du Nile Red.

La polarité du milieu capable de dissoudre aisément ces composés oscille entre la polarité de l'acétone et celle de l'eau. Ici, le rapport turn-on de fluorescence a ainsi été défini comme le rapport entre l'intensité de fluorescence à 640 nm dans

l'acétone et celle dans l'eau (Figure 44). Cette longueur d'onde a été choisie à mi-chemin entre le maximum d'émission de fluorescence de ces composés dans l'acétone, de 614 nm, et celui dans l'eau, de  $661 \pm 1$  nm. Avec une intensité de fluorescence à 640 nm multipliée au moins par 18 en passant de l'eau, milieu polaire protique, à l'acétone, milieu polaire aprotique, pour le **LIT-01-255** et le **LIT-01-256**, ces deux peptides conservent les excellentes propriétés fluorogènes du Nile Red, qui sont même meilleures que celle de l'acide aminé seul.



**Figure 44.** Propriétés fluorogènes de l'acide aminé Fmoc-Lys(NR)-OH et de spexines dérivées du Nile Red. Le turn-on de fluorescence relatif a été calculé comme le rapport entre l'intensité de fluorescence à 640 nm dans l'acétone (rapportée à l'absorbance à 520 nm) et l'intensité de fluorescence à 640 nm dans l'eau (rapportée à l'absorbance à 520 nm).

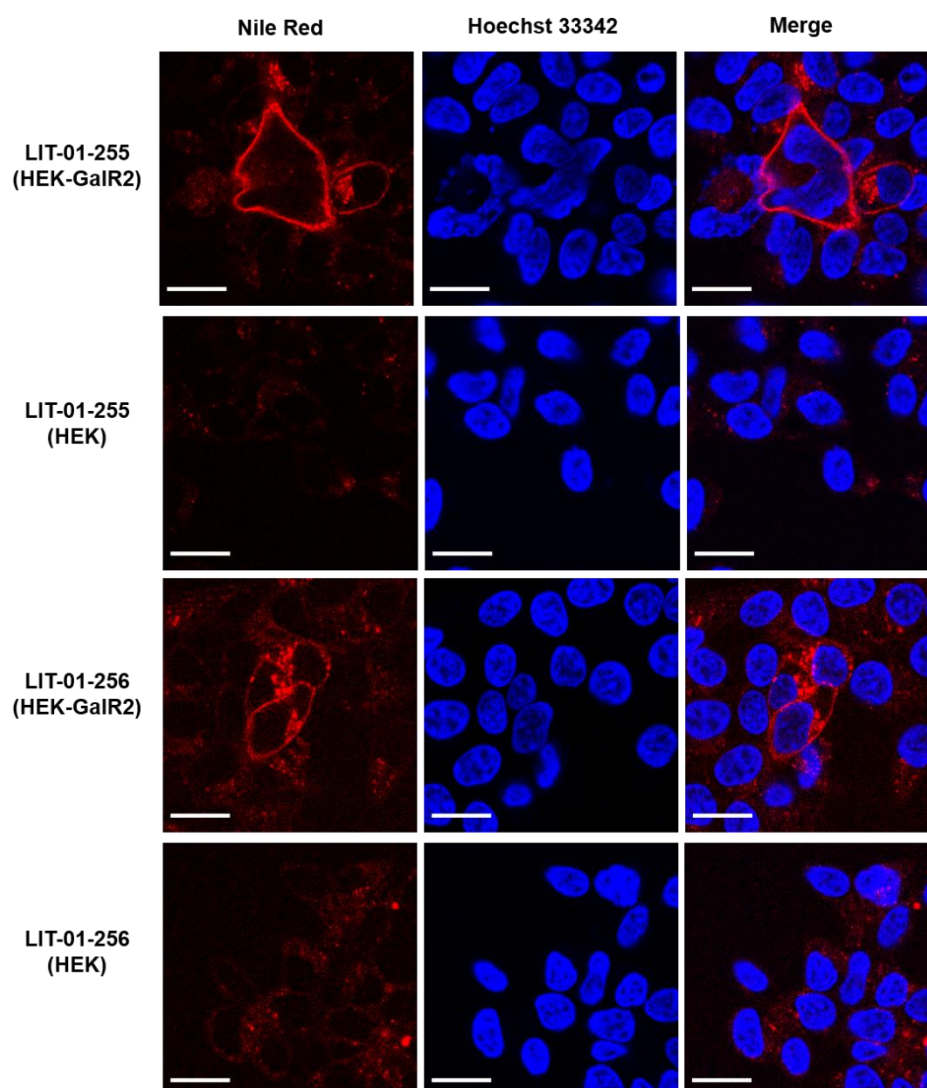
En bilan, malgré leur mauvaise solubilité dans le 1,4-dioxane, les spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256** sont bien solvatofluorochromes, ces composés sont caractérisés par un bon rapport turn-on de fluorescence entre l'eau et l'acétone, ils présentent une bonne activité sur le GalR2 et ils peuvent ainsi être considérés comme d'excellents outils pour visualiser le récepteur GalR2 sur cellules.

#### 4. Imagerie du récepteur GalR2 non modifié sur cellules vivantes en conditions homogènes avec des spexines fluorescentes

La capacité de ces deux spexines fluorescentes à détecter le GalR2 sans lavage a ainsi été évaluée, en réalisant, de la même manière que dans le chapitre 1 avec le récepteur de l'ocytocine, une étude de microscopie confocale sur deux lignées de cellules vivantes exprimant de manière stable le récepteur transmembranaire GalR2 ou ne l'exprimant pas (Figure 45 et 46).

La première expérience a été réalisée sur des cellules de lignée HEK293 (Figure 45). Sur les cellules exprimant le RCPG d'intérêt (HEK-GalR2), une première observation rend compte que le niveau d'expression du GalR2 est variable en fonction des cellules considérées avec un marquage membranaire plus ou moins intense. Toutefois les spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256** marquent clairement la membrane (marquage illustré en rouge) à une concentration de 100 nM, concentration du même ordre de grandeur que les  $EC_{50}$  précédemment déterminées pour ces composés. La fluorescence non spécifique, ayant pour origine à la fois l'autofluorescence cellulaire et les interactions non spécifiques des sondes, a été évaluée dans les mêmes conditions d'imagerie, à la différence que cette fois-ci des cellules HEK293 n'exprimant pas le récepteur GalR2 ont été employées. Dans ce cas, aucun marquage membranaire n'a été observé. Ceci montre que le marquage membranaire par ces ligands fluorescents dépend de la présence du récepteur. Cette première étude a permis de mettre en évidence la spécificité de liaison des **LIT-01-255** et **LIT-01-256** au GalR2. Cependant il a été remarqué que l'arrangement des cellules HEK293 en plusieurs couches et l'expression très hétérogène du récepteur remettent en question l'utilisation de la lignée HEK-GalR2 pour la microscopie du récepteur GalR2. Il a de ce fait été décidé d'évaluer une autre lignée cellulaire disponible qui exprime le récepteur GalR2 de manière stable, la lignée CHO-GalR2.

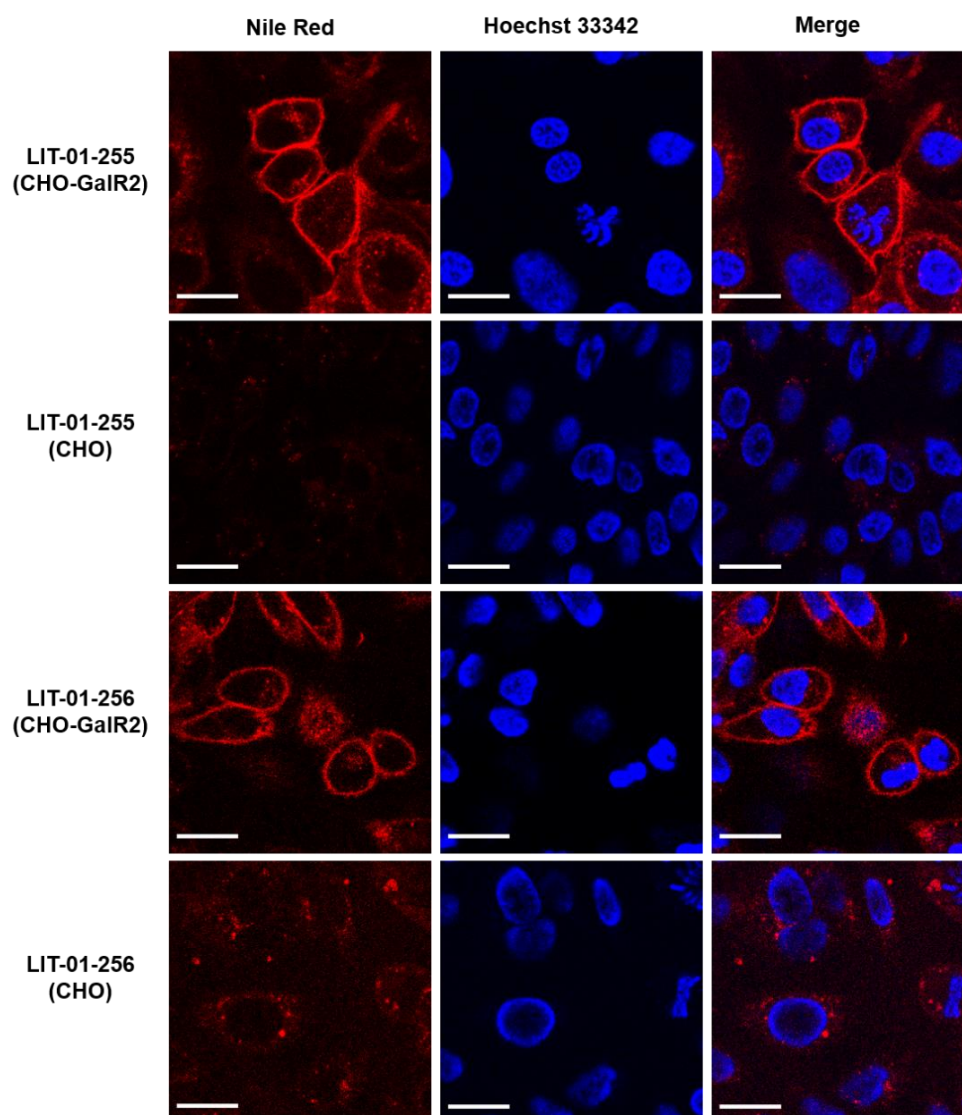




**Figure 45.** Microscopie confocale avec des spexines dérivées du Nile Red sans lavage sur cellules vivantes HEK293 exprimant le GalR2. La fluorescence non spécifique est évaluée sur cellules vivantes HEK293 n'exprimant pas le GalR2. Concentrations des spexines dérivées du Nile Red (**LIT-01-255** et **LIT-01-256**) : 100 nM. L'émission de fluorescence du Nile Red (570-750 nm) est affichée en rouge, les noyaux marqués avec Hoechst 33342 sont montrés en bleu. Barres d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

Une expérience employant des cellules CHO-GalR2 a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que pour les cellules HEK293 (Figure 46). Cette fois-ci, les dérivés fluorescents **LIT-01-255** et **LIT-01-256** montrent un marquage membranaire plus intense et homogène, ce qui indique le meilleur niveau d'expression du GalR2 sur les cellules CHO-GalR2. Afin de prouver que ce marquage dépend bien de la présence de ce récepteur à la surface des cellules, des images ont

aussi été enregistrées dans les mêmes conditions avec des cellules n'exprimant pas le récepteur GalR2. Sur ces cellules CHO non modifiées, il n'y a plus de marquage membranaire, ces dérivés fluorescents de la spexine ne se lient donc plus à la surface des cellules. Ainsi ces deux sondes ont une seconde fois montré, avec un type cellulaire différent, qu'elles marquent la membrane cellulaire uniquement lorsque le GalR2 est exprimé. La différence réside dans le fait qu'avec les cellules CHO, le marquage membranaire a été plus facilement détecté. Cette lignée cellulaire sera donc privilégiée pour l'imagerie par fluorescence du récepteur GalR2.



**Figure 46.** Microscopie confocale avec des spexines dérivées du Nile Red sans lavage sur cellules vivantes CHO exprimant le GalR2. La fluorescence non spécifique est évaluée sur cellules vivantes CHO n'exprimant pas le GalR2. Concentration des spexines dérivées du Nile Red (**LIT-01-255** et **LIT-01-256**) : 100 nM. L'émission de fluorescence du Nile Red (570–750 nm) est affichée en rouge, les noyaux marqués avec Hoechst 33342 sont montrés en bleu. Barres d'échelle :

20  $\mu\text{m}$ .

En conclusion de ces études par microscopie confocale, les **LIT-01-255** et **LIT-01-256** ont montré sur deux lignées cellulaires, que ces peptides se lient bien de manière spécifique au récepteur GalR2. Les résultats des études pharmacologiques, ayant montré que ces dérivés présentent une bonne activité fonctionnelle agoniste sur ce récepteur, corrélient bien avec ces observations. D'autre part, l'internalisation du récepteur GalR2 induite par les spexines fluorescentes peut être également observée par microscopie de fluorescence, comme visualisé sur l'image obtenue avec le **LIT-01-256** sur les cellules HEK-GalR2, Figure 45. Ceci ouvre la possibilité d'étudier la signalisation du GalR2 par le suivi de son internalisation au cours du temps. Par ailleurs, les spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256** ont montré d'excellentes propriétés fluorogènes, procurées par le fluorophore Nile Red, permettant la détection du GalR2 sur cellules vivantes avec un très bon rapport signal sur bruit sans lavage.

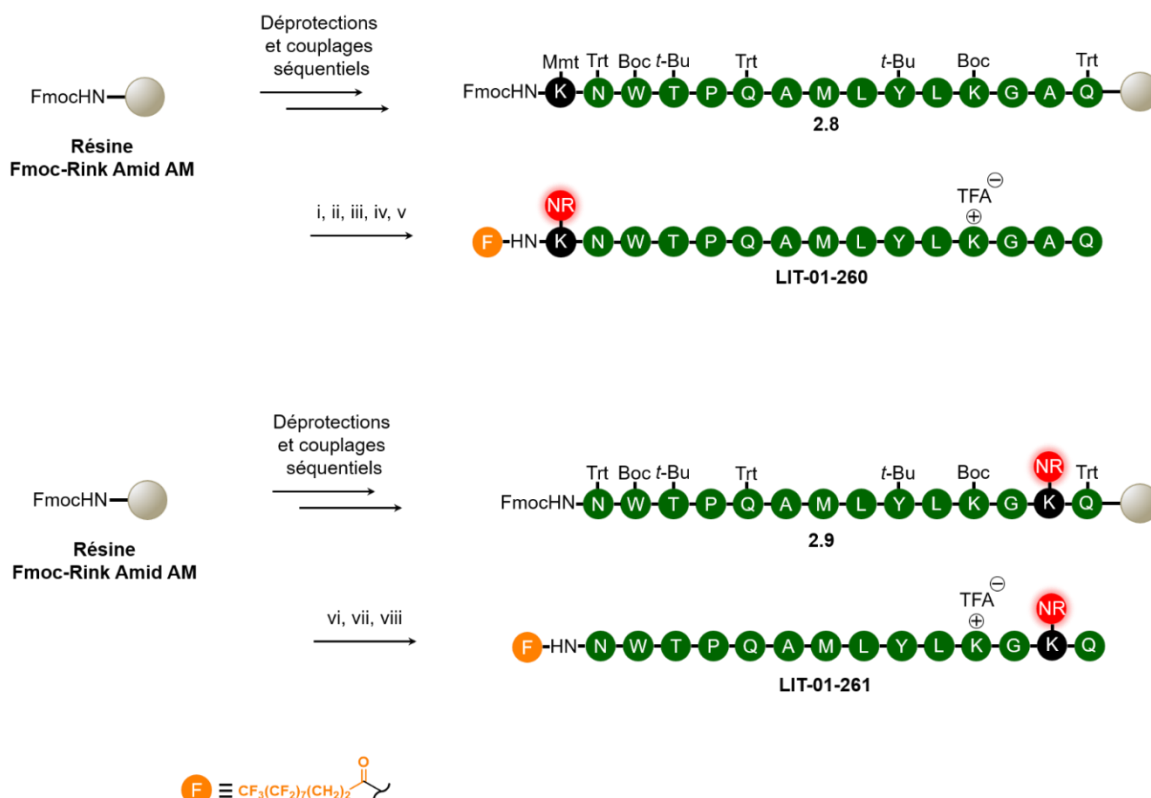
## 5. Conception et synthèse de fluorospexines fluorescentes

Avec les résultats très encourageants obtenus avec les spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256** aussi bien au niveau de leurs propriétés spectrales que de leur liaison spécifique au GalR2 avec une bonne activité fonctionnelle, la synthèse des analogues fonctionnalisés avec une chaîne fluorocarbonée de ces peptides fluorescents a été décidée (Schéma 9).

L'analogue fluorocarboné du **LIT-01-255** possédant l'acide aminé fluorescent en extrémité N-terminale a été préparé suivant la même procédure décrite pour la production des spexines fluorescentes, offrant la possibilité d'introduire le fluorophore sur support, par couplage au niveau de la chaîne latérale de la lysine introduite (Schéma 9). En effet, ce choix stratégique a été effectué, afin d'éviter un couplage probablement plus difficile de la chaîne fluorocarbonée, relativement coûteuse, sur la lysine N-terminale de l'acide aminé Lys(NR), possédant une structure aromatique encombrante pouvant occasionner une gêne stérique. Tout d'abord, l'intermédiaire **2.8** a été synthétisé sur support solide de manière automatisée par chauffage assisté par micro-ondes, à part l'acide aminé Fmoc-Lys(Mmt)-OH en partie N-terminale qui a été introduit manuellement. Toujours sur support solide, la fonction N-terminale protégée par un Fmoc de l'intermédiaire **2.8** a été déprotégée en présence de pipéridine dans du DMF et la chaîne fluorocarbonée a été couplée sur la fonction alpha-amino en présence de HATU avec

de la DIPEA dans du DMF. Il s'en est suivi la déprotection chimiosélective de la lysine portant le Mmt avec 10 traitements successifs avec un mélange 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM pour pouvoir ainsi coupler l'amine libérée au fluorophore NR-COOH. Le peptide fluorescent a été simultanément déprotégé et décroché du support solide et purifié par RP-HPLC pour donner le premier dérivé de la fluorospexine portant le fluorophore Nile Red **LIT-01-260** avec un rendement modeste de 8%.

Afin de tenter d'améliorer le rendement de la synthèse, une voie différente a été considérée pour l'obtention du dérivé fluorocarboné du **LIT-01-256** possédant l'acide aminé Lys(NR) en extrémité C-terminale. Pour éviter les nombreux lavages à répétition fastidieux nécessaires pour éliminer le Mmt, il a été décidé d'introduire le fluorophore sous forme d'acide aminé Fmoc-Lys(NR)-OH sur support solide et ainsi montrer tout l'intérêt d'avoir développé un acide aminé fluorescent. Cette fois le peptide a été synthétisé manuellement en utilisant le HATU comme agent de couplage en présence de DIPEA (Schéma 9). Puis, le Fmoc terminal du peptide **2.9** supporté a été éliminé sur support et la chaîne fluorocarbonée a été introduite sur l'amine N-terminale. Le peptide a été décroché du support solide et purifié par RP-HPLC semi-préparative pour conduire au dérivé fluorescent de la fluorospexine **LIT-01-261**. Malheureusement ce peptide a également été obtenu avec un rendement très faible de 7%. Un tel rendement peut provenir des possibles causes évoquées pour expliquer les faibles rendements obtenus lors de la synthèse des spexines fluorescentes et notamment la difficulté de purification des dérivés fluorocarbonés de la spexine qui sont encore davantage plus hydrophobes que les dérivés de la spexine. Les rendements de synthèse des spexines fluorescentes et des fluorospexines fluorescentes doivent donc être améliorés dans le futur.



**Schéma 9.** Synthèse de spexines fluorocarbonées dérivées du Nile Red. (i) 20% v/v pipéridine dans DMF, 25 °C, 30 min ; (ii)  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ , HATU, DIPEA, DMF, 25 °C, 1 h ; (iii) 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM, 25 °C, 20 min ; (iv) NR-COOH, PyBOP, DIPEA, DMF, 25 °C, 1 h ; (v) 82.5:5:5:5:2.5 v/v TFA/phénol/thioanisole/ $\text{H}_2\text{O}$ /EDT, 25 °C, 2 h, 8% ; (vi) 20% v/v pipéridine dans DMF, 25 °C, 20 min ; (vii)  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ , HATU, DIPEA, DMF, 25 °C, 1 h ; (viii) 82.5:5:5:5:2.5 v/v TFA/phénol/thioanisole/ $\text{H}_2\text{O}$ /EDT, 25 °C, 2,5 h, 7%.

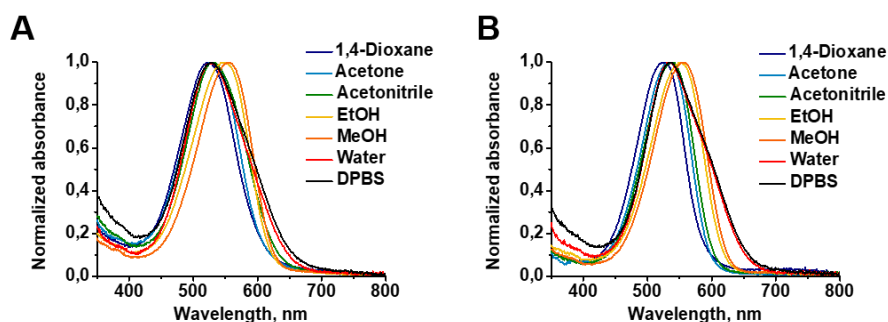
## 6. Évaluation de l'activité fonctionnelle de fluorospexines fluorescentes sur le GalR2

La mesure de l'activité fonctionnelle des fluorospexines fluorescentes produites sur le GalR2 a ensuite été entreprise en mesurant la libération du calcium intracellulaire induite par ces fluorospexines. Cependant une précipitation de ces fluorospexines aux concentrations de l'évaluation (allant jusqu'à 10  $\mu\text{M}$ ) a été observée. Il est donc nécessaire d'évaluer plus précisément la solubilité des fluorospexines fluorescentes et d'optimiser les conditions pour la mesure de l'activité fonctionnelle.

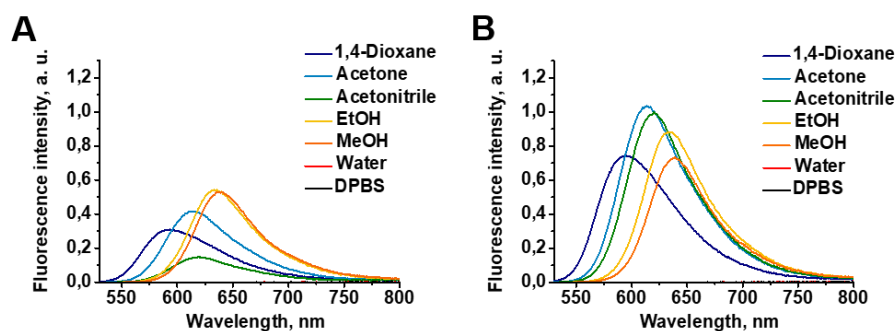
## 7. Évaluation des propriétés spectrales de fluorospexines fluorescentes

Les propriétés spectrales des fluorospexines fluorescentes **LIT-01-260** et **LIT-01-261** ont été évaluées de la même manière que les autres dérivés du Nile Red

(Figure 47, Figure 48 et Tableau 7). Ici, une solubilité très limitée a été observée pour ces deux dérivés à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  dans le 1,4-dioxane, l'acétone, l'acétonitrile et l'eau. Cette faible solubilité qui se traduit par la formation d'espèces non fluorescentes a un impact sur la position des maximums d'absorption, sur l'intensité de l'émission de fluorescence et par conséquent sur les rendements quantiques. De plus, dans l'eau un décalage du maximum d'absorption vers le bleu de  $64 \pm 6$  nm par rapport au maximum d'absorption de l'acide aminé Fmoc-Lys(NR)-OH indique la formation d'agrégats non fluorescents de type H (Figure 49). Effectivement, la fluorescence dans l'eau n'est pas détectable pour les deux fluorospexines (Figure 48). Les spectres d'émission de fluorescence montrent néanmoins un déplacement bathochrome de leurs maximums d'émission de fluorescence, démontrant le caractère solvatofluorochrome de ces dérivés fluorocarbonés.



**Figure 47.** Absorption de fluorospexines dérivées du Nile Red. Spectres d'absorption normalisés du (A) **LIT-01-260** et du (B) **LIT-01-261** dans différents solvants.

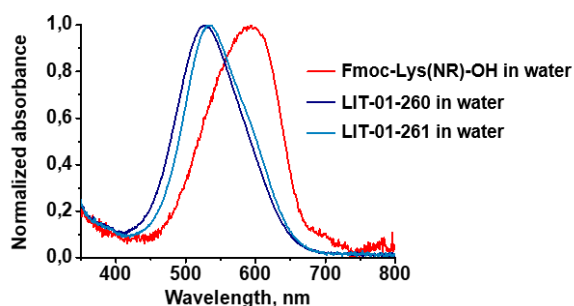


**Figure 48.** Fluorescence de fluorospexines dérivées du Nile Red. Spectres d'émission de fluorescence du (A) **LIT-01-260** et du (B) **LIT-01-261** dans différents solvants. L'intensité de fluorescence est rapportée à l'absorbance à 520 nm.

Composé	Solvant	$E_T30^{[a]}$ , kcal/mol	$\lambda_{max}$ , nm		$\Phi^{[d]}$ , %
			abs <sup>[b]</sup>	fluo <sup>[c]</sup>	
<b>LIT-01-260</b>	1,4-Dioxane	36,0	524	593	19
	Acétone	42,2	528	613	22
	Acétonitrile	45,6	529	619	8
	Éthanol	51,9	547	635	27
	Méthanol	55,4	556	640	25
	Eau	63,1	526	/	0
	DPBS	63,1	530	/	0
<b>LIT-01-261</b>	1,4-Dioxane	36,0	525	595	46
	Acétone	42,2	534	614	53
	Acétonitrile	45,6	537	620	49
	Éthanol	51,9	551	635	43
	Méthanol	55,4	556	639	34
	Eau	63,1	534	/	0
	DPBS	63,1	536	/	0

[a] Paramètre de polarité de Reichardt (Reichardt 1994) [b] Position du maximum d'absorption. [c] Position du maximum d'émission de fluorescence. [d] Rendement quantique de fluorescence.

**Tableau 7.** Propriétés spectrales de fluorospexines dérivées du Nile Red.



**Figure 49.** Comparaison de l'absorption normalisée des Fmoc-Lys(NR)-OH, **LIT-01-260** et **LIT-01-261** dans l'eau.

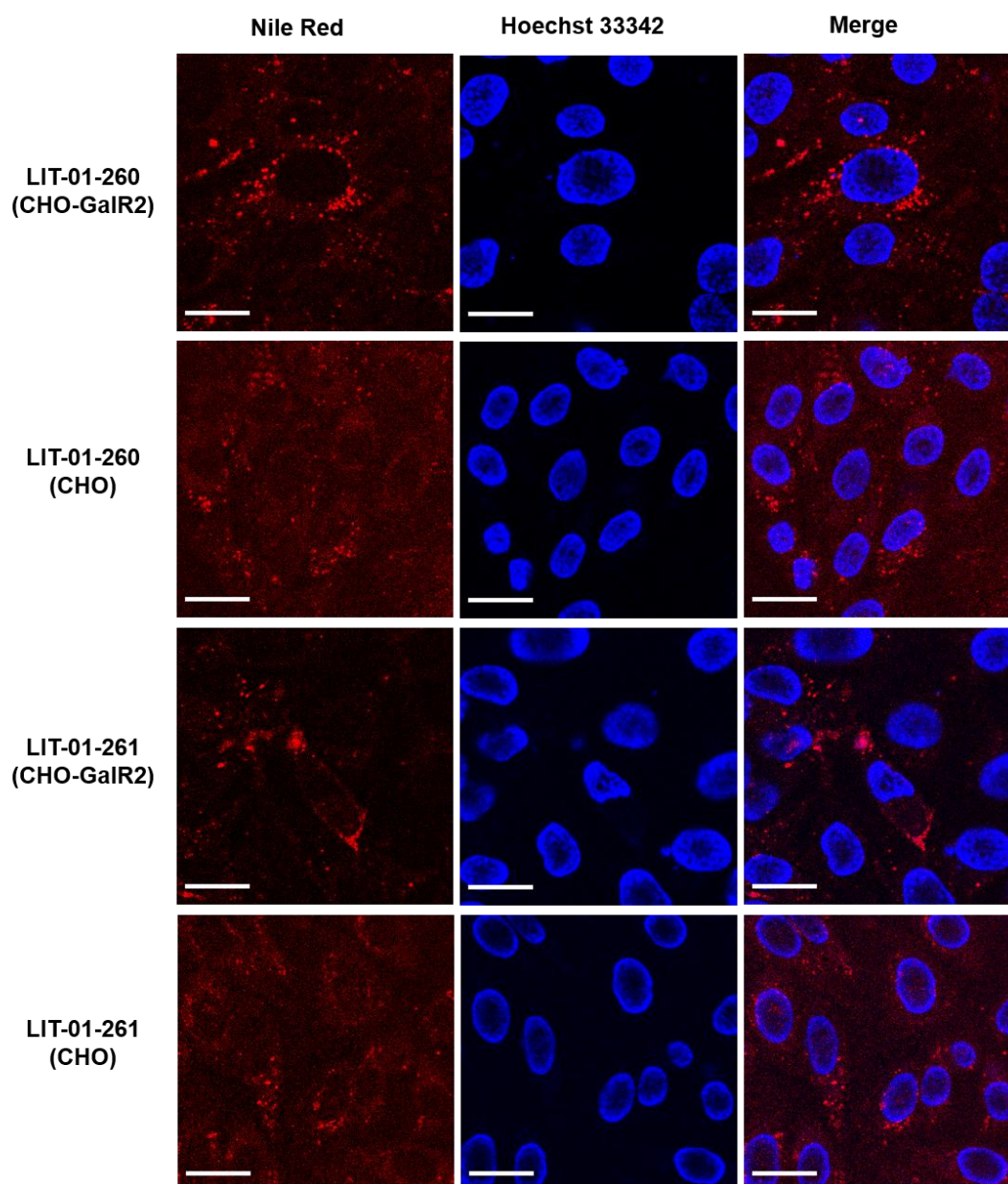
Ainsi, bien que ces deux fluorospexines fluorescentes conservent une certaine sensibilité à l'environnement, elles souffrent d'une faible solubilité dans plusieurs solvants à une concentration de 1  $\mu\text{M}$ .

### **8. Imagerie du récepteur GalR2 non modifié sur cellules vivantes en conditions homogènes avec des fluorospexines fluorescentes**

Malgré leurs problèmes de solubilité, les fluorospexines fluorescentes **LIT-01-260** et **LIT-01-261** ont toutefois été évaluées en milieu cellulaire. De ce fait, des expériences de microscopie confocale pour l'imagerie du GalR2, dans les mêmes conditions que celles effectuées avec les spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256**, ont été réalisées sur des cellules CHO-GalR2 afin de pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenus avec les analogues non fluorocarbonés.

Contrairement aux spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256**, l'ajout des fluorospexines fluorescentes **LIT-01-260** et **LIT-01-261** à une concentration de 100 nM n'affiche aucun marquage membranaire avec ou sans la présence du GalR2 (Figure 50). De plus, la formation d'agrégats fluorescents qui semblent traverser la membrane cellulaire de manière non spécifique au récepteur GalR2 est observée pour les deux fluorospexines. Ceci témoigne de la très faible solubilité des fluorospexines fluorescentes en milieu aqueux même à 100 nM.





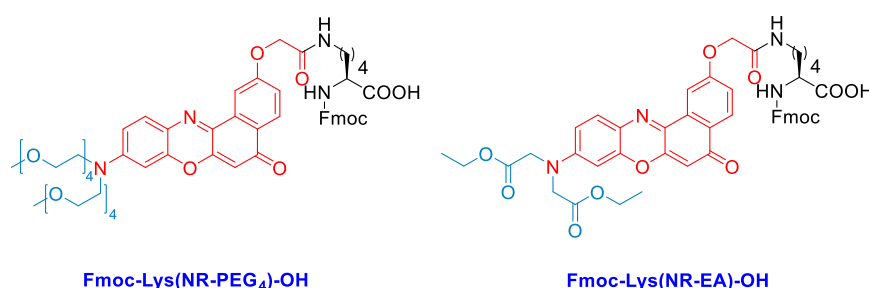
**Figure 50.** Microscopie confocale avec des fluorospexines dérivées du Nile Red sans lavage sur cellules vivantes CHO exprimant le GaIR2. La fluorescence non spécifique est évaluée sur cellules vivantes CHO n'exprimant pas le GaIR2. Concentration des fluorospexines dérivées du Nile Red (**LIT-01-260** et **LIT-01-261**) : 100 nM. L'émission de fluorescence du Nile Red (570-750 nm) est affichée en rouge, les noyaux marqués avec Hoechst 33342 sont montrés en bleu. Barres d'échelle : 20  $\mu$ m.

En conclusion, ces expériences de microscopie ont confirmé la très faible solubilité de ces fluorospexines fluorescentes qui a déjà été démontrée lors des expériences de spectroscopie et qui, tant qu'elle n'aura pas été améliorée, reste incompatible avec l'application de ces sondes pour la détection du récepteur GaIR2

sur cellules vivantes et pour l'étude du mécanisme de stabilisation de la fluorospexine.

### 9. Conception et synthèse d'acides aminés hydrosolubles dérivés du Nile Red

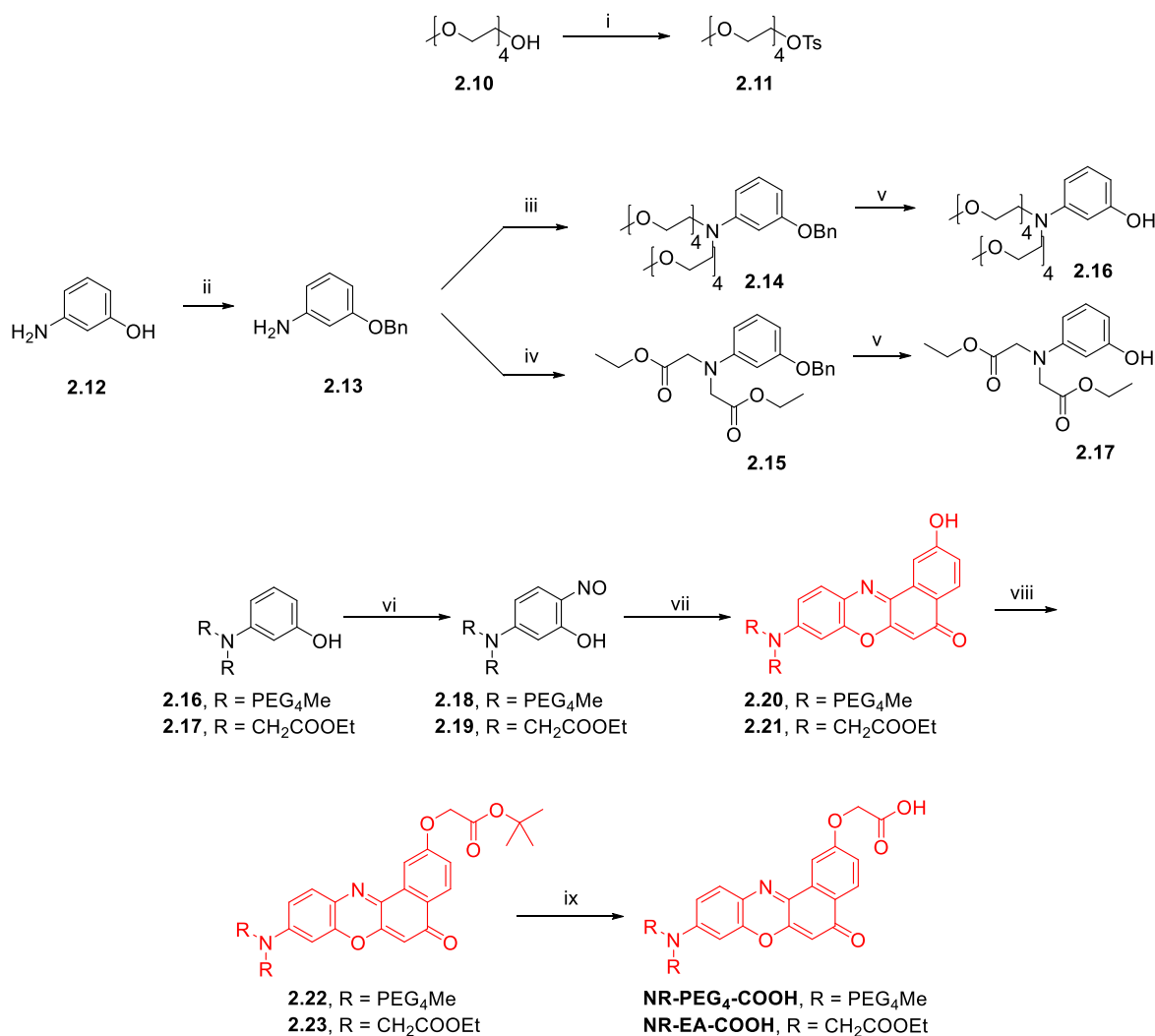
Dans l'objectif de pouvoir appliquer de manière efficace les fluorospexines fluorescentes à l'étude du mécanisme de stabilisation de la fluorospexine, il est nécessaire d'améliorer la solubilité de ces sondes, surtout dans l'eau, constituant principal du milieu employé dans ce type d'étude. Une piste pour améliorer la solubilité de ces fluorospexines a été de concevoir un acide aminé dérivé du Nile Red plus hydrosoluble. Pour ce faire, il a été décidé d'ajouter des groupements solubilisants sur l'amine du Nile Red (Figure 51). Des substituants non chargés ont été sélectionnés afin de ne pas ajouter de charges supplémentaires à la fluorospexine et d'éviter de perturber les interactions de ce peptide. Le Nile Red a été modifié par deux chaînes PEG de quatre unités, pas trop longues pour limiter la perturbation de la liaison de la fluorospexine au récepteur GalR2, mais pas trop courtes pour améliorer la solubilité dans l'eau du fluorophore. En se basant sur les travaux de Jose (Jose et al. 2010), nous avons également envisagé l'introduction de deux groupements acétates d'éthyle dans la structure de ce fluorophore.



**Figure 51.** Structures d'acides aminés solubilisants dérivés du Nile Red.

La synthèse mise au point pour produire ces dérivés du Nile Red est schématisée ci-dessous (Schéma 10). Dans un premier temps, la fonction phénol du 3-aminophénol **2.12** a été protégée sélectivement par un groupement benzyle, masquant ainsi la réactivité de cet alcool lors de l'introduction des groupes solubilisants. La réaction a été réalisée en présence d'une base forte, le *tert*-BuOK, et d'un ajout lent de bromure de benzyle à basse température, conduisant ainsi à l'intermédiaire **2.13** obtenu avec un excellent rendement de 95%. Les deux groupements solubilisants PEG<sub>4</sub> commerciaux choisis **2.10** sont méthylés au niveau d'un de leurs alcools pour masquer la réactivité de cette fonction lors de la réaction

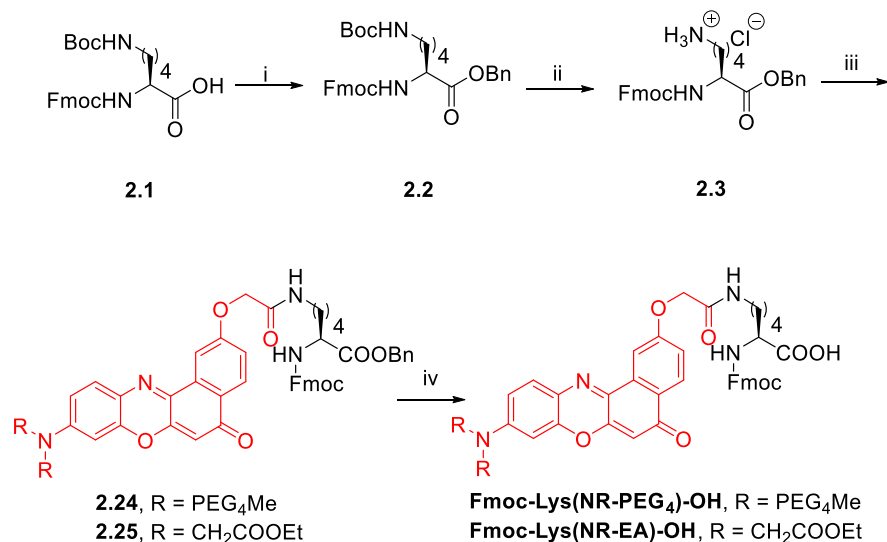
de tosylation, qui a permis de synthétiser efficacement le composé **2.11** (99%). L'amine du composé **2.13** a ensuite été doublement alkylée par le dérivé tosylé **2.11** en 45 min par chauffage micro-ondes à 160 °C (82%). En parallèle, l'aminophénol protégé **2.13** a été également doublement alkylé par du bromoacétate d'éthyle, réaction facilitée par une réaction de transhalogénéation *in situ* en présence de NaI, donnant quantitativement accès au produit **2.15**. Les deux intermédiaires **2.14** et **2.15** ont ensuite été déprotégés au niveau de leur fonction phénol par hydrogénolyse catalytique avec de très bons rendements (91% pour le **2.14** et 94% pour le **2.15**). Tout comme pour la préparation du Nile Red diéthylylé, les aminophénols disubstitués **2.16** et **2.17** ont été nitrosylés en ortho de leur fonction phénol. Les nitrosophénols instables **2.18** et **2.19** respectivement obtenus ont été directement engagés dans une réaction de cyclisation avec du naphthalène-1,6-diol dans du DMF (pour le nitrosophénol **2.18**) ou dans de l'EtOH (pour le nitrosophénol **2.19** en suivant le protocole de Jose, et al (Jose et al. 2010), produisant les deux nouveaux dérivés acides carboxyliques du Nile Red **2.20** et **2.21** respectivement avec des rendements de 32% et 65% sur deux étapes. En vue du couplage avec la chaîne latérale d'une lysine, ces deux phénols fluorescents **2.20** et **2.21** ont été alkylés par du chloroacétate de *tert*-butyle, formant ainsi respectivement les intermédiaires **2.22** et **2.23**. Puis, le groupement *tert*-butyle a été éliminé sous l'action de TFA pour synthétiser les dérivés acides carboxyliques du Nile Red NR-PEG<sub>4</sub>-COOH et NR-EA-COOH avec de très bons rendements sur deux étapes (91% et quantitatif, respectivement).



**Schéma 10.** Synthèse de dérivés acides carboxyliques du Nile Red plus hydrosolubles. (i) TsCl, NaOH, THF, H<sub>2</sub>O, 0-25 °C, 2,5 h, 99% ; (ii) BnBr, *tert*-BuOK, DMF, 0-25 °C, 18,5 h, 95% ; (iii) **2.10**, DIPEA, DMF, 160 °C MW, 45 min, 82% ; (iv) bromoacétate d'éthyle, NaI, DIPEA, ACN, 80 °C, 26 h, quant. ; (v) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 25 °C, 14-18 h, 91% pour le **2.16** et 94% pour le **2.17** ; (vi) NaNO<sub>2</sub>, HCl, H<sub>2</sub>O, 0 °C, 1-1,5 h ; (vii) 1,6-dihydroxynaphtalène, DMF (pour le **2.18**) ou EtOH (pour le **2.19**), 80 °C, 1-2,5 h, 32% pour le **2.20** et 65% pour le **2.21** ; (viii) chloroacétate de *tert*-butyle, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acétone, 25-56 °C, 3-9 h ; (ix) TFA, DCM, 25 °C, 1,5-15 h, 91% pour le NR-PEG<sub>4</sub>-COOH et quant. pour le NR-EA-COOH.

Pour la formation des nouveaux acides aminés dérivés du Nile Red, comme pour la préparation de la lysine portant le Nile Red diéthylé, la synthèse de la lysine diprotégée **2.3** a été préalablement réalisée, suivant la même procédure mise au point (Schéma 11). Le couplage de cette amine **2.3**, en présence du réactif PyBOP et de la base DIPEA, avec les acides carboxyliques NR-PEG<sub>4</sub>-COOH et NR-EA-COOH a permis de produire les acides aminés sous la forme d'esters benzylés **2.24** et **2.25**.

Finalement, le groupement benzyle a été éliminé par hydrogénélyse en présence de Pd/C, pour aboutir aux acides aminés Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et Fmoc-Lys(NR-EA)-OH avec un rendement respectivement de 63% et 11% sur deux étapes. Le rendement modeste de l'acide aminé Fmoc-Lys(NR-EA)-OH peut s'expliquer par des difficultés de purification sur silice ou en phase inverse entraînant des pertes du produit sur la colonne.



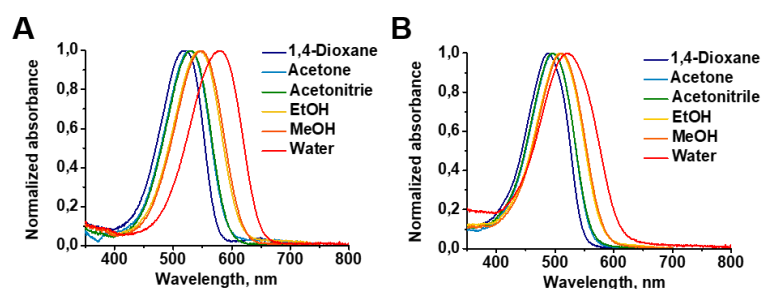
**Schéma 11.** Synthèse d'acides aminés solubilisants dérivés du Nile Red. (i) BnOH, DCC, DMAP, DCM, 0-25 °C, 5 h, 85% ; (ii) HCl, 1,4-dioxane, 25 °C, 4,5 h, quant. ; (iii) NR-PEG<sub>4</sub>-COOH ou NR-EA-COOH, PyBOP, DIPEA, DMF, 25 °C, 0,5-3 h ; (iv) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 25 °C, 2-17,5 h, 63% pour la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et 11% pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH.

## 10. Évaluation des propriétés spectrales d'acides aminés solubilisants dérivés du Nile Red

Les propriétés spectrales des nouveaux acides aminés synthétisés dérivés du Nile Red ont été étudiées dans une série de solvants de polarités différentes et comparées à celle de la Fmoc-Lys(NR)-OH (Figure 52, Figure 53 et Tableau 8).

Les spectres d'absorption montrent que l'acide aminé présentant les substituants PEG<sub>4</sub> conserve, comme le dérivé diéthylié, le fort caractère solvatochrome du Nile Red, ainsi qu'une même gamme de longueurs d'onde d'absorption que le premier acide aminé développé (Figure 52). De manière inattendue, le troisième acide aminé, la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH, montre un déplacement vers le bleu de tous ses spectres d'absorption par comparaison avec ceux des autres acides aminés. Par exemple, son maximum d'absorption dans le 1,4-dioxane est de 488 nm contrairement au maximum d'absorption de la Fmoc-Lys(NR)-

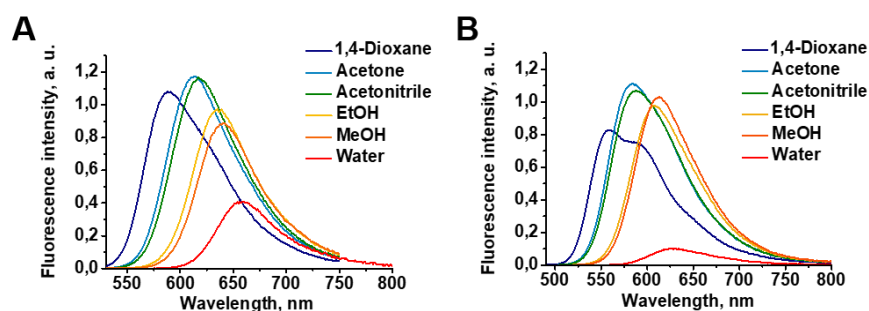
OH qui est de 519 nm. Ce déplacement non désiré s'accompagne aussi d'un resserrement des maximums d'absorption pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH, avec une différence d'uniquement 32 nm entre ses maximums dans le 1,4-dioxane et dans l'eau contre 62 à 75 nm pour les deux autres acides aminés, montrant ainsi un moins bon caractère solvatochrome pour ce dérivé.



**Figure 52.** Absorption des acides aminés Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et Fmoc-Lys(NR-EA)-OH. Spectres d'absorption normalisés de la (A) Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et de la (B) Fmoc-Lys(NR-EA)-OH dans différents solvants.

L'émission de fluorescence de ces deux acides aminés dérivés du Nile Red, dans ces mêmes solvants, a ensuite été étudiée et comparée à celle de la Fmoc-Lys(NR)-OH (Figures 47 et 53). Le dérivé dipegylé, présentant des gammes d'absorption similaires à celles du Fmoc-Lys(NR)-OH, a aussi été excité à 520 nm, tandis que l'acide aminé Fmoc-Lys(NR-EA)-OH, a été excité à 480 nm afin de pouvoir enregistrer l'intégralité de ses spectres d'émission de fluorescence. Les valeurs d'intensité d'émission de fluorescence de la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH dans un solvant donné ont été divisées par l'absorbance dans ce solvant à 520 nm, afin de pouvoir comparer les intensités de fluorescence dans les différents solvants. La même opération a été appliquée pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH mais cette fois-ci en rapportant à l'absorbance à 480 nm. Cette étude a révélé que, comme pour les spectres d'absorption, la gamme d'émission de fluorescence de la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH est comparable à celle du Nile Red non modifié, alors que les spectres de fluorescence de la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH sont décalés vers le bleu d'une trentaine de nm. Toutefois, concernant le déplacement relatif de leurs maximums de fluorescence, ces deux acides aminés conservent le puissant caractère solvatofluorochrome du Nile Red, avec une différence entre les maximums de fluorescence dans le 1,4-dioxane et dans l'eau légèrement plus importante pour la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH que pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH (71 nm contre 66 nm). Cette étude a aussi montré que les deux acides aminés solubilisants préservent un bon

caractère fluorogène qui se traduit par l'augmentation de leur fluorescence, lors de leur passage de l'eau au 1,4-dioxane.



**Figure 53.** Fluorescence des acides aminés Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et Fmoc-Lys(NR-EA)-OH. Spectres d'émission de fluorescence de la (A) Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et de la (B) Fmoc-Lys(NR-EA)-OH dans différents solvants. L'intensité de fluorescence est rapportée à l'absorbance à 520 nm pour la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et elle est rapportée à l'absorbance à 480 nm pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH.

La mesure successive de l'absorption, puis de la fluorescence de ces acides aminés dérivés du Nile Red a permis de déterminer leurs rendements quantiques dans les solvants étudiés (Tableau 8). Un rendement de 53% a été calculé pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH dans le 1,4-dioxane. Cette valeur plus faible provient probablement d'une solubilité légèrement moins bonne pour ce dérivé dans le 1,4-dioxane. Dans les autres solvants, ce composé présente des rendements quantiques très proches de ceux de la lysine diéthylée, notamment dans l'eau. Cette dernière observation est une indication que l'acide aminé Fmoc-Lys(NR-EA)-OH présente vraisemblablement une solubilité dans l'eau similaire à celle de la Fmoc-Lys(NR)-OH. À l'opposé, la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH possède un rendement quantique dans l'eau de 20%, ce qui est plus élevé comparé à celui des dérivés NR diéthylé ou présentant deux groupes acétates d'éthyle. Ceci peut certainement être expliqué par une meilleure solubilité de la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH en milieu aqueux ce qui montre que cet acide aminé est un candidat optimal pour le développement de fluorospexines fluorescentes plus solubles.

Composé	Solvant	$E_T30^{[a]}$ , kcal/mol	$\lambda_{max}$ , nm		$\Phi^{[d]}$ , %
			abs <sup>[b]</sup>	fluo <sup>[c]</sup>	
Fmoc-Lys(NR-PEG <sub>4</sub> )-OH	1,4-Dioxane	36,0	518	588	68
	Acétone	42,2	529	614	63
	Acétonitrile	45,6	529	617	61
	Éthanol	51,9	545	635	49
	Méthanol	55,4	548	640	43
	Eau	63,1	580	659	20
Fmoc-Lys(NR-EA)-OH	1,4-Dioxane	36,0	488	560	53
	Acétone	42,2	497	584	60
	Acétonitrile	45,6	495	588	57
	Éthanol	51,9	507	607	49
	Méthanol	55,4	510	613	48
	Eau	63,1	520	626	5

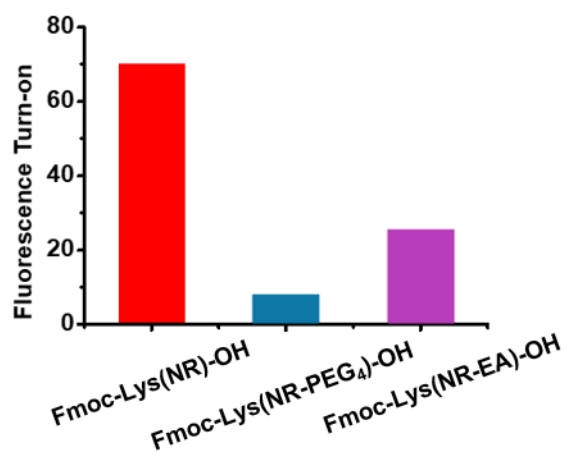
[a] Paramètre de polarité de Reichardt. (Reichardt 1994) [b] Position du maximum d'absorption. [c] Position du maximum d'émission de fluorescence. [d] Rendement quantique de fluorescence.

**Tableau 8.** Propriétés spectrales des acides aminés Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et Fmoc-Lys(NR-EA)-OH.

Le rapport turn-on de fluorescence rend très bien compte de cette différence de fluorescence dans l'eau. (Figure 54) Cette valeur a ici été calculée comme le rapport entre l'intensité de fluorescence dans le 1,4-dioxane et l'intensité de fluorescence dans l'eau. Afin de s'affranchir du décalage des spectres d'émission de fluorescence de la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH vers le bleu, pour ces deux gammes de fluorescence, le rapport turn-on a été calculé à la longueur d'onde du maximum de fluorescence dans l'acétonitrile, étant un solvant de polarité intermédiaire. Ainsi le rapport turn-on a été défini comme le rapport d'intensité de fluorescence dans le 1,4-dioxane et dans l'eau à 620 nm pour les Fmoc-Lys(NR)-OH et Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et à 590 nm pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH. Ces trois acides aminés montrent donc



une augmentation significative de leur fluorescence, lors de leur passage de l'eau au 1,4-dioxane. Ce caractère est davantage prononcé chez la Fmoc-Lys(NR)-OH et la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH, bien que la différence de fluorescence reste tout de même conséquente chez la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH.



**Figure 54.** Propriétés fluorogènes des acides aminés Fmoc-Lys(NR)-OH, Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et Fmoc-Lys(NR-EA)-OH. Le turn-on de fluorescence relatif a été calculé comme le rapport entre l'intensité de fluorescence à 620 nm dans le 1,4-dioxane (rapportée à l'absorbance à 520 nm) et l'intensité de fluorescence à 620 nm dans l'eau (rapportée à l'absorbance à 520 nm) pour les Fmoc-Lys(NR)-OH et Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et comme le rapport entre l'intensité de fluorescence à 590 nm dans le 1,4-dioxane (rapportée à l'absorbance à 480 nm) et l'intensité de fluorescence à 590 nm dans l'eau (rapportée à l'absorbance à 480 nm) pour la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH.

L'ensemble des études menées a permis d'établir si un acide aminé plus hydrosoluble que la Fmoc-Lys(NR)-OH a été préparé (Tableau 9).

Afin d'évaluer la solubilité aqueuse des Fmoc-Lys(NR)-OH, Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH et Fmoc-Lys(NR-EA)-OH nous avons comparé les temps de rétention obtenus par une analyse par HPLC de leurs précurseurs correspondants NR-COOH, NR-PEG<sub>4</sub>-COOH et NR-EA-COOH. Ainsi, les dérivés NR-PEG<sub>4</sub>-COOH et NR-EA-COOH présentent des temps de rétention plus courts (4,11 et 4,36 min respectivement) que le dérivé NR-COOH (4,57 min) sur une colonne C<sub>18</sub>. Ce type de colonne retient davantage les composés lipophiles. Plus les composés analysés sont hydrosolubles, moins ils sont retenus sur la colonne, étant élués plus rapidement. Avec ces données, les deux nouveaux acides aminés fluorescents semblent donc plus solubles dans l'eau que la Fmoc-Lys(NR)-OH, la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH étant la plus soluble.

L'étude des propriétés spectrales de ces composés fluorescents a partiellement confirmé cette hypothèse. En effet, lorsque la fluorescence dans l'eau est analysée, comme espéré, la lysine dipegylée montre une émission de fluorescence beaucoup plus importante dans l'eau ( $\Phi = 20\%$ ) que celle du premier acide aminé dérivé du Nile Red développé ( $\Phi = 6\%$ ). Cet acide aminé est donc certainement plus hydrosoluble que la lysine diéthylée. À l'opposé, avec une fluorescence dans l'eau identique ( $\Phi = 5\%$ ) à celle du dérivé diéthylé, les groupements acétates d'éthyle n'ont visiblement pas beaucoup aidé à solubiliser l'analogue de départ en milieu aqueux. De plus, cet acide aminé montre un décalage de ces spectres d'absorption et de fluorescence vers le bleu par rapport au Nile Red de départ, ce qui est une propriété indésirable pour une application *in cellulose*. Une meilleure solubilité dans l'eau a dans tous les cas été démontrée avec l'acide aminé fluorescent Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH, portant notre choix sur ce dérivé pour le marquage de la fluorospexine.

Ces travaux ont donc permis de développer la Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH, un acide aminé hydrosoluble, dérivé du Nile Red, conservant les puissantes propriétés solvatochromes de ce fluorophore qui seront mises à profit de la synthèse de spexines et fluorospexines fluorescentes et hydrosolubles afin d'imager le GalR2 à la surface de cellules mais également d'étudier les mécanismes de stabilisation de la fluorospexine.

Composé	HPLC $t_R$ <sup>[a]</sup> , min	$\lambda_{max}$ , nm		$\Phi$ , %	
		fluo (1,4-dioxane) <sup>[b]</sup>	fluo (eau) <sup>[c]</sup>	1,4-dioxane <sup>[d]</sup>	eau <sup>[e]</sup>
Fmoc-Lys(NR)-OH	4,57	584	666	67	6
Fmoc-Lys(NR-PEG <sub>4</sub> )-OH	4,11	588	659	68	20
Fmoc-Lys(NR-EA)-OH	4,36	560	626	53	5

[a] Temps de rétention HPLC sur colonne C<sub>18</sub> du NR-COOH, du NR-PEG<sub>4</sub>-COOH ou du NR-EA-COOH respectivement, Méthode A (cf. Experimental Part). [b] Position du maximum d'émission de fluorescence dans le 1,4-dioxane. [c] Position du maximum d'émission de fluorescence dans l'eau. [d] Rendement quantique de fluorescence dans le 1,4-dioxane. [e] Rendement quantique de fluorescence dans l'eau.

**Tableau 9.** Comparaison des propriétés physico-chimiques et des propriétés spectrales des trois acides aminés développés dérivés du Nile Red.

## 11. Conclusions et perspectives

Ce chapitre a été dédié à la conception, à la synthèse et aux évaluations pharmacologiques et photophysiques de fluorospexines fluorescentes dans l'objectif de disposer de sondes permettant d'étudier les interactions avec le récepteur GalR2 à la surface de cellules vivantes mais également de comprendre le mécanisme de stabilisation de la fluorospexine dans le cadre du développement de nouveaux traitements non opiacés contre la douleur.

Le Nile Red a été choisi pour marquer la fluorospexine, dans le but de détecter les interactions fines de ce peptide grâce à l'extrême sensibilité de ce fluorophore vis-à-vis de son environnement. La stratégie a consisté à substituer un de ses résidus par un acide aminé dérivé du Nile Red ou à ajouter un tel acide aminé dans sa séquence peptidique sans altérer l'activité fonctionnelle de ce peptide sur le GalR2. Pour pouvoir choisir dans un premier temps la position la plus adaptée pour introduire cette fonctionnalisation, un dérivé acide carboxylique du Nile Red a été couplé à l'amine d'une chaîne latérale de lysine en fin d'élongation de la spexine dans laquelle cette lysine avait été incorporée en quatre positions différentes. Nous avons pu montrer que l'introduction de la lysine marquée au Nile Red n'a que très légèrement modifié l'activité fonctionnelle de la spexine sur le GalR2 quel que soit la position d'introduction. Ainsi dans l'espoir de détecter des différences même minimales d'interactions de la fluorospexine, deux positions extrêmes dans la séquence de la spexine ont été conservées pour insérer l'acide aminé fluorescent sur la fluorospexine. Ensuite, les deux spexines fluorescentes sélectionnées ont montré qu'elles conservent la sensibilité à l'environnement du Nile Red, ce qui a donné l'opportunité de réaliser de l'imagerie par fluorescence du GalR2 sur cellules vivantes en conditions homogènes. Ces expériences ont permis d'observer que ces deux spexines modifiées se liaient bien au GalR2, de manière spécifique. Ces expériences ont été l'occasion d'imager pour la première fois le GalR2 non modifié sans lavage au moyen d'un ligand fluorescent.

En perspectives, les spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256** sont des outils très intéressants qui offrent la possibilité de suivre la signalisation cellulaire du GalR2 et de développer un test de liaison sur ce même RCPG, de la même manière que le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR sur l'OTR dans le chapitre 1. Des expériences de microscopie confocale ratiométrique permettraient, par ailleurs, de déterminer si une différence d'environnement, en termes de polarité, est mesurable, en fonction de la position du Nile Red dans la séquence peptidique des peptides fluorescents sélectionnés. Ceci

donnerait une idée de la position de ces peptides par rapport au GalR2 lors de leur interaction avec ce RCPG.

Les premières fluorospexines fluorescentes **LIT-01-260** et **LIT-01-261** ont été ensuite conçues comme analogues des spexines **LIT-01-255** et **LIT-01-256**. Même si ces fluorospexines dérivées du Nile Red conservent leurs propriétés solvatofluorochromes, la faible solubilité de ces composés a été remarquée au cours de l'évaluation de leur activité fonctionnelle, de l'évaluation de leurs propriétés spectrales et de l'étude de leur liaison au GalR2 par microscopie confocale.

Les problèmes de solubilité des fluorospexines fluorescentes rencontrés au cours des différentes expériences a donc été l'occasion de développer des acides aminés dérivés du Nile Red plus hydrosolubles. Après avoir mis au point leur synthèse et évalué leurs propriétés spectrales, nous avons montré que la Fmoc-Lys(NR-EA)-OH ne présentait pas une meilleure solubilité dans l'eau que l'acide aminé fluorescent Fmoc-Lys(NR)-OH et présentait un déplacement hypsochrome de ces spectres par rapport au Nile Red non modifié, ce qui n'est pas avantageux pour des études cellulaires. Nous avons donc écarté cet acide aminé fluorescent de la conception de fluorospexines fluorescentes plus solubles en milieu aqueux. À l'opposé, le deuxième acide aminé, portant deux groupements PEG<sub>4</sub> s'est avéré plus intéressant. En effet, ce dernier conserve d'excellentes propriétés solvatochromes et solvatofluorochromes. De plus, il est plus soluble dans l'eau, donc plus fluorescent dans ce milieu. Même si son caractère fluorogène diminue, sa fluorescence est cependant suffisante dans l'eau pour être détectée dans une large gamme d'environnements de polarités différentes. L'acide aminé Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH possède donc des propriétés optimales en termes de solubilité et de propriétés spectrales. Ainsi, il sera très prochainement introduit par SPPS dans la fluorospexine pour pouvoir étudier sa liaison au récepteur GalR2 par microscopie de fluorescence mais également le mécanisme conduisant à l'augmentation de stabilité de ce nouveau peptide d'intérêt thérapeutique.



## **Conclusion générale**

---



Les récepteurs couplés aux protéines G représentent des cibles de choix pour le développement de nouveaux médicaments. Afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et de pouvoir les moduler mais également de localiser ces récepteurs *in vitro* et *in vivo*, il est important de concevoir et de développer des outils moléculaires performants. Ainsi, l'utilisation de ligands fluorescents notamment permet de détecter ces récepteurs, de les cartographier, de suivre leurs interactions avec leurs ligands et de suivre leur signalisation intracellulaire, tout en travaillant sur récepteur natif. Plus particulièrement, ces ligands fluorescents sont très intéressants lorsqu'ils sont sensibles à leur environnement avec un changement de leurs propriétés de fluorescence en fonction de leur milieu proche. En effet, une bonne sensibilité de détection, sans étape de lavage pour éliminer le ligand non lié, peut être obtenue si ces ligands sont fluorogènes. Cette sensibilité peut être encore améliorée lorsque ces ligands sont solvatofluorochromes, ce qui leur permet également d'étudier de manière précise certains changements de leur environnement. Afin de préserver un bon rapport signal sur bruit dans des études cellulaires, il est nécessaire de disposer de ligands émettant vers le rouge. Le fluorophore Nile Red, étant fluorogène, solvatofluorochrome avec une excellente sensibilité à la polarité de son milieu et émettant dans le rouge-orange, est tout à fait approprié pour la conception de sondes fluorescentes sensibles à l'environnement. Ces travaux de thèse ont permis ainsi de développer des sondes fluorescentes dérivées du Nile Red ciblant deux RCPG d'intérêt thérapeutique, l'OTR et le GalR2.

Le premier chapitre de ma thèse a été consacré au développement d'une sonde fluorescente sensible à l'environnement ciblant l'OTR, afin de pouvoir suivre le récepteur dans le temps et développer un test de liaison fluorogène. Le Nile Red et l'antagoniste sélectif non peptidique de l'OTR PF-3274167 ont été conjugués via des espaceurs PEG d'une longueur variable pour moduler la solubilité et les interactions non spécifiques des quatre sondes ainsi conçues. Après avoir remarqué que ces quatre dérivés conservaient la sensibilité à la polarité de l'environnement du Nile Red, leurs interactions non spécifiques ont été évaluées afin de déterminer la sensibilité de détection de ces sondes. Cette évaluation a été effectuée *in vitro* à la fois sur des liposomes mimant la membrane cellulaire, les RCPG étant des récepteurs insérés dans cette membrane, et sur la BSA, une protéine couramment présente dans les tampons employés lors d'études pharmacologiques. Ces évaluations ont montré que les interactions non spécifiques diminuaient lors de l'augmentation de la longueur de la chaîne PEG. Ces interactions non spécifiques ont aussi été évaluées



sur des cellules surexprimant l'OTR en compétition avec un ligand non fluorescent en excès. Ceci a permis de montrer que parmi les quatre sondes, celle présentant l'espaceur PEG le plus long, le dérivé Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, était la seule sonde se liant de manière spécifique et réversible à l'OTR avec un très bon rapport signal sur bruit en conditions homogènes. Elle représente la première sonde non peptidique solvatofluorochrome rouge se liant spécifiquement à un RCPG. De plus, il a aussi été montré que cette sonde conservait le caractère antagoniste du ligand initial, avec une IC<sub>50</sub> de 30 ± 3 nM, malgré l'introduction de l'espaceur et du fluorophore. Après avoir été soigneusement caractérisée, cette sonde sensible à l'environnement a pu trouver deux applications.

La première a mis à profit son caractère solvatofluorochrome pour étudier le microenvironnement de l'OTR. Grâce à cet outil, nous avons montré par microscopie confocale qu'une fois la sonde liée à l'OTR, le fluorophore Nile Red, se situait dans un environnement de polarité unique dans la membrane à proximité du RCPG. Cette observation a permis d'évaluer l'ordre lipidique environnant l'OTR. Après déplétion du cholestérol, un changement de la polarité de l'environnement du fluorophore Nile Red présenté par cette sonde, comparé au changement de polarité plus faible observé avec une sonde membranaire dérivée du Nile Red, a suggéré que la membrane entourant l'OTR était sensiblement organisée. En perspectives, en raison de cette extrême sensibilité à l'environnement du Nile Red, il serait très intéressant de marquer directement l'extrémité terminale de l'OTR avec le Nile Red *via* un tag protéique pour suivre le changement de polarité, au cours du processus de signalisation de ce RCPG, après activation de ce récepteur par des agonistes.

Dans la deuxième application, la sonde Pf-PEG<sub>20</sub>-NR a également été mise à contribution dans le développement d'un test de liaison fluorogène à l'OTR. Après avoir imagé par fluorescence des cellules exprimant l'OTR en conditions homogènes grâce à cette sonde, avec ou sans la présence d'un ligand non fluorescent en excès, et traité ces images de microscopie, une courbe de saturation a pu être tracée. Il en a été extrait un K<sub>d</sub> de 6,2 nM. Il s'en suivra la confirmation de cette valeur par une autre méthode qui peut être le TR-FRET employant le récepteur marqué au Lumi4-Tb et le Pf-PEG<sub>20</sub>-NR comme accepteur de sa luminescence. La fiabilité de cet essai de liaison sera aussi évaluée en déterminant les K<sub>i</sub> connus de différents ligands de l'OTR. Après ces validations, cet essai de liaison pourrait représenter le premier essai sur RCPG natif et en conditions homogènes, avec une application directe dans le criblage à haut débit de ces récepteurs pour la découverte de nouveaux ligands de RCPG. Ces résultats prometteurs montrent tout le potentiel des ligands fluorogènes

comme outils pour mieux comprendre la fonction des RCPG et accélérer la découverte de sondes pharmacologiques et/ou candidats médicaments.

Dans le deuxième chapitre de ma thèse, je me suis intéressé à une nouvelle méthode développée au sein du laboratoire pour améliorer la stabilité métabolique des peptides à visée thérapeutique ciblant des RCPG. Cette approche consiste à introduire une chaîne fluorocarbonée sur les peptides d'intérêt. L'application de cette approche à la spexine, ligand endogène des récepteurs GalR2/GalR3, a permis de montrer que l'analogue fluorocarboné de ce peptide présentait une meilleure stabilité enzymatique, une meilleure activité fonctionnelle sur le GalR2 et une meilleure efficacité sur un modèle de douleur inflammatoire que la spexine native. Dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à l'augmentation de la stabilité métabolique et de l'efficacité des dérivés fluorospexines *in vitro* et *in vivo*, nous avons envisagé la conception de sondes peptidiques dérivées du Nile Red. Ces sondes sensibles à leur environnement doivent nous permettre notamment d'étudier les interactions fluorospexine-GalR2 mais également la capacité d'organisation des fluorospexines en solution ainsi que leur capacité à se lier à l'albumine. Une approche élégante pour marquer un peptide à la fluorescence est d'y introduire un acide aminé fluorescent. Cependant, les acides aminés fluorescents sensibles à l'environnement sont habituellement dérivés de fluorophores excitables par la lumière ultraviolette ou bleu. Il a été donc proposé de développer un acide aminé fluorescent innovant sensible à l'environnement et fluorescent dans le rouge. Un tel acide aminé dérivé du Nile Red et de la lysine, la Lys(NR), a conservé le caractère solvatofluochrome et fluorogène du Nile Red. De manière rationnelle, en se basant sur la littérature, quatre positions ont été choisies dans la séquence peptidique de la spexine pour introduire la Lys(NR). Les quatre spexines fluorescentes synthétisées, présentant l'acide aminé Lys(NR), ont conservé une bonne activité fonctionnelle sur le GalR2, très proche de celle de la spexine native. Deux dérivés, présentant le Nile Red en deux positions extrêmes dans leur séquence peptidique, dans l'espoir d'observer des différences spectrales significatives dépendant de ces positions, ont été sélectionnés afin de concevoir les analogues fluorocarbonés. Malgré une solubilité limitée dans le 1,4-dioxane, ces deux spexines fluorescentes **LIT-01-255** et **LIT-01-256** ont montré de bonnes propriétés fluorogènes et solvatofluochromes. Grâce à ces caractéristiques et à leur très bonne spécificité d'interaction avec leur récepteur cible, ces deux dérivés ont permis d'imager le GalR2 en conditions homogènes avec une très bonne sensibilité de détection. Ces spexines fluorescentes pourront de ce fait être

employées pour suivre la signalisation intracellulaire du GalR2 et pour développer un test de liaison fluorogène au GalR2. Ensuite, les analogues fluorocarbonés de ces spexines fluorescentes **LIT-01-260** et **LIT-01-261** ont été préparés. Cependant ces fluorospexines fluorescentes ont montré des limites de solubilité lors d'études de pharmacologie, de spectroscopie et de microscopie, bien qu'elles conservent une certaine sensibilité à l'environnement. Une option pour améliorer la solubilité dans l'eau de ces peptides d'intérêt a été de concevoir un acide aminé fluorescent plus hydrosoluble. Après avoir ajouté deux groupements PEG<sub>4</sub> solubilisants sur la fonction amine du Nile Red, le couplage de l'acide carboxylique dérivé du fluorophore ainsi obtenu à la lysine a permis d'accéder à l'acide aminé Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH. Ce dernier est fluorogène, solvatofluorochrome et plus soluble dans l'eau que la Fmoc-Lys(NR)-OH. L'introduction de cet acide aminé innovant dans la séquence peptidique de la fluorospexine sera très bientôt réalisée, offrant ainsi l'opportunité de suivre son interaction avec le GalR2 par microscopie de fluorescence et d'étudier le mécanisme conduisant à l'amélioration de la stabilité et de l'efficacité de la fluorospexine, ce fluoropeptide suscitant une attention particulière pour le développement de nouveaux médicaments comme alternatives non opiacées pour le traitement de la douleur.

## **Experimental part**

---



## 1. General information

### 1.1. Chemical synthesis: starting material

Reagents were obtained by commercial suppliers and used without any prior purification.

### 1.2. Chemical synthesis: monitoring

Merck silica gel 60F254 plates were used for thin-layer chromatography.

Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography separations were performed on an Agilent Technologies 1200 series HPLC system with the detection set at 200.8 nm, 210.8 nm, 220.8 nm, 254.8 nm, 280.8 nm, 365.8 nm and 530.8 nm using the following methods:

- Method A: Ascentis Express C<sub>18</sub> column (2.7 μm, 4.6 mm × 75 mm) using a linear gradient (5% to 100% v/v in 7.39 min, flow rate of 1.6 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA v/v in ACN) in solvent A (0.1% TFA v/v in H<sub>2</sub>O)
- Method B: SunFire C<sub>18</sub> column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient (5% to 100% v/v in 7.39 min, flow rate of 1.5 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA v/v in ACN) in solvent A (0.1% TFA v/v in H<sub>2</sub>O)
- Method C: Kinetex C<sub>18</sub> column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient (5% to 100% v/v in 7.3 min, flow rate of 1.5 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA v/v in ACN) in solvent A (0.1% TFA v/v in H<sub>2</sub>O)

### 1.3. Purification of compounds

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

Reverse-phase semi-preparative HPLC purifications were performed on a Waters SunFire C18 OBD Prep column (5 μm, 19 × 150 mm) on a Gilson PLC2020 system.

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

### 1.4. Physico-chemical characterization

<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 400 MHz and 500 MHz and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 101 MHz and 126 MHz on a Bruker Advance spectrometer.

Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) and coupling constants (J) are reported in hertz (Hz). Signals are described as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), p (pentuplet) and m (multiplet).

Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography was performed as described above (Chemical synthesis: monitoring).

Low resolution mass spectra (LRMS) and high resolution mass spectra (HRMS) were obtained on an Agilent Technologie 6520 Accurare-Mass Q.Tof LC/MS apparatus equipped with a Zorbax SB C<sub>18</sub> column (1.8  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm) using electrospray ionization (ESI) and a time-of-flight analyzer (TOF).

### **1.5. Fluorescence spectroscopy**

Absorption and fluorescence measurement were performed in 114F-QS 10 mm quartz fluorescence cuvettes (Hellma Analytics). The solvents used were either of spectroscopy or HPLC grade. Absorption spectra were recorded on a Cary 4000-HP spectrophotometer (Varian) and fluorescence spectra on a FluoroMax 4 spectrofluorometer (Jobin Yvon, Horiba) equipped with a thermostated cuvette holder at 20 °C. The absorbance of sample solutions at the excitation wavelength were kept below 0.05 to avoid inner filter effects. All fluorescence spectra were corrected for instrumental effects. Data treatment was performed using Origin software.

Fluorescence quantum yields (QY) were determined using Nile Red in 1,4-dioxane as a reference ( $\Phi = 70\%$  (Sackett et Wolff 1987)). To that end a solution of Nile Red or of the studied fluorescent compound in DMSO (2  $\mu$ L, 0.5 mM) was introduced in a quartz cuvette containing the studied solvent (998  $\mu$ L) to measure, after performing the baseline correction, the absorbance of this solution between 350 and 800 nm. Then, the same solution was excited at 520 nm and the fluorescence emission was measured between 530 and 800 nm (excitation slit: 2 nm, emission slit: 2 nm). S1c/R1 values of fluorescence intensity were considered for the calculation of fluorescence quantum yields and for the calculation of the fluorescence turn-on ratios. The fluorescence of the blank was subtracted for all measurements in water.

### **1.6. Fluorescence microscopy**

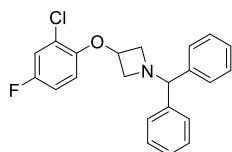
Fluorescence confocal microscopy experiments were performed on a Leica TCS SPE-II microscope with an HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS objective. All images were

processed with ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda).

## 2. Chapter 1: Development of environment-sensitive fluorescent probes for the oxytocin receptor

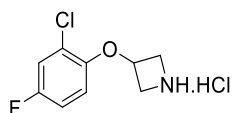
### 2.1. Design and synthesis of fluorescent Nile Red-based derivatives targeting the OTR<sup>1</sup>

#### 1-Benzhydryl-3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidene (**1.3**)



To a solution of 1-benzhydrylazetidene-3-yl methanesulfonate (1.00 g, 3.15 mmol, 1.2 eq.) and 2-chloro-4-fluorophenol (281  $\mu$ L, 2.63 mmol, 1 eq.) in anhydrous ACN (30 mL) was added  $K_2CO_3$  (907 mg, 26.3 mmol, 2.5 eq.). The mixture was stirred at 82  $^{\circ}C$  for 2.5 h. After evaporation of the ACN under vacuum, DCM (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous  $Na_2SO_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 2% v/v EtOAc in pentane to afford after evaporation under vacuum a white solid (860 mg, 89%). HPLC  $t_R$  = 4.48 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.27 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 4H), 7.02–7.16 (m, 6H), 6.96 (dd,  $J$  = 6.6, 2.9 Hz, 1H), 6.59–6.76 (m, 1H), 6.42 (dd,  $J$  = 8.9, 6.6 Hz, 1H), 4.62 (p,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.58 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.00 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  158.07, 155.65, 149.57, 141.90, 128.71, 127.59, 127.51, 123.50, 118.11, 117.85, 114.23, 114.16, 114.00, 78.39, 67.67, 60.60.

#### 3-(2-Chloro-4-fluorophenoxy)azetidene hydrochloride (**1.4**)



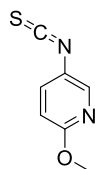
To a solution of **1.3** (1.80 g, 4.90 mmol, 1 eq.) in anhydrous ACN (28 mL) at

<sup>1</sup> Compound **1.8** was synthesized according to Karpenko, et al. (Karpenko, Margathe, et al. 2015). Compound **1.17** was synthesized according to Kashida, et al. (Kashida et Asanuma 2012). Compounds **1.24** and **1.27a** were synthesized according to P. Zhang, et al. (P. Zhang et al. 2015).



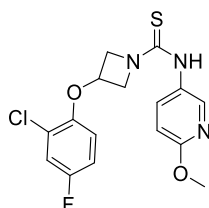
iced water temperature was dropwise added 1-chloroethyl chloroformate (1.06 mL, 9.80 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred at 82 °C for 1 h. ACN was evaporated under reduced pressure and the obtained residue was dissolved in anhydrous MeOH (28 mL) and stirred at 65 °C for 3 h. After evaporation of the MeOH under vacuum, pentane (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL). The aqueous layer was then lyophilized to afford a white solid (1.17 g, quant.). HPLC  $t_R$  = 2.74 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.61-9.86 (s, 2H), 7.50 (dd,  $J$  = 6.6, 2.9 Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J$  = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J$  = 8.9, 6.6 Hz, 1H), 5.11 (p,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 4.42 (m, 2H), 4.00 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, D $_2$ O)  $\delta$  157.43, 147.99, 123.52, 117.78, 116.12, 114.67, 69.38, 53.11.

### 5-Isothiocyanato-2-methoxy pyridine (**1.6**)



To a solution of 6-methoxy pyridin-3-amine (189  $\mu\text{L}$ , 2.35 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (2 mL) was added at iced water temperature over a period of 15 min a solution of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (699 mg, 3.53 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous THF (6 mL). The mixture was stirred at iced water temperature for 30 min, then at 66 °C for 2.5 h. After evaporation of the THF under reduced pressure, the crude product was purified on a silica gel column eluted with DCM to afford after evaporation under vacuum a white solid (341 mg, 87%). HPLC  $t_R$  = 4.86 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl $_3$ )  $\delta$  8.09-8.13 (m, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 6.74 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CDCl $_3$ )  $\delta$  162.45, 144.09, 135.69, 131.01, 128.96, 111.82, 54.11.

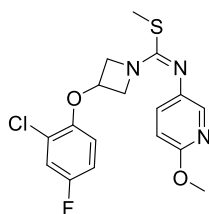
### 3-(2-Chloro-4-fluorophenoxy)-N-(6-methoxy pyridin-3-yl)azetidine-1-carbothioamide (**1.7**)



To a suspension of **1.4** (1.93 g, 8.11 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (48 mL) at 0 °C was added NMM (1.07 mL, 9.73 mmol, 1.2 eq.) and then was dropwise added

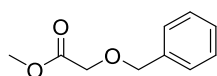
a solution of **1.6** (1.35 g, 8.11 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (32 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 4 h. After evaporation of the THF under reduced pressure, water (50 mL) was added and the organic layer was extracted with DCM (2 x 50 mL), washed with brine (50 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to afford a white powder (2.98 g, quant.). HPLC t<sub>R</sub> = 4.66 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.01-8.10 (m, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.86-6.98 (m, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 8.9, 6.6 Hz, 1H), 4.86-4.95 (m, 1H), 4.37-4.60 (m, 2H), 4.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 181.38, 162.72, 157.45, 144.11, 137.58, 131.03, 128.77, 118.48, 114.55, 114.46, 114.39, 110.96, 66.31, 59.38, 53.93.

*Methyl (E)-3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)-N-(6-methoxypyridin-3-yl)azetidine-1-carbimidothioate (1.8)*



To a solution of **1.7** (1.85 g, 5.03 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (65 mL) at iced water temperature was added *t*-BuOK (677 mg, 6.03 mmol, 1.2 eq.). After stirring at iced water temperature for 5 min, was added MeI (376 μL, 6.03 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 3.5 h. After evaporation of the THF under reduced pressure, EtOAc (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (2 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to afford a yellow oil (1.92 g, quant.). HPLC t<sub>R</sub> = 4.04 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.81-7.89 (m, 1H), 7.20-7.31 (m, 2H), 6.84-7.05 (m, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.30-4.56 (m, 2H), 4.09-4.30 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).

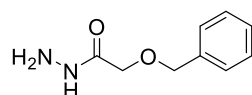
*Methyl 2-(benzyloxy)acetate (1.10)*



To a solution of Ag<sub>2</sub>O (7.60 g, 32.8 mmol, 2.2 eq.) in anhydrous Et<sub>2</sub>O (14 mL) were added methyl 2-hydroxyacetate (1.20 mL, 15.1 mmol, 1 eq.) and BnBr (2.77 mL, 22.7 mmol, 1.5 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 20.5 h. After

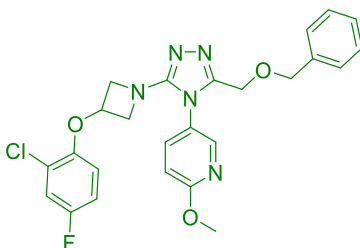
filtration through Celite and evaporation of the Et<sub>2</sub>O under reduced pressure, the crude product was purified on a silica gel column eluted with 20% v/v EtOAc in pentane to afford after evaporation under vacuum a colorless liquid (2.26 g, 83%). HPLC  $t_R$  = 3.72 min (> 95% purity [254.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.18-7.30 (m, 5H), 4.52 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.64 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.92, 137.19, 128.66, 128.22, 128.20, 73.53, 67.27, 51.99.

### 2-(Benzyloxy)acetohydrazide (**1.11**)



To a solution of **1.10** (1.64 g, 9.08 mmol, 1 eq.) in anhydrous MeOH (50 mL) was added hydrazine hydrate (1.35 mL, 27.2 mmol, 3 eq.). The mixture was stirred at 65 °C for 17 h. Hydrazine hydrate was co-evaporated with MeOH under vacuum to afford a colorless oil (1.60 g, 98%). HPLC  $t_R$  = 2.06 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.70 (s, 1H), 7.21-7.35 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.26-3.92 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.97, 136.75, 128.80, 128.47, 128.08, 73.86, 69.18.

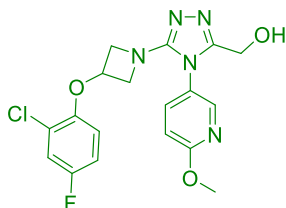
### 5-(3-((Benzyloxy)methyl)-5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-2-methoxypyridine (**1.12**)



To a solution of **1.8** (675 mg, 1.77 mmol, 1 eq.) and **1.11** (373 mg, 2.07 mmol, 1.2 eq.) in anhydrous THF (22 mL) was added TFA (65.7 μL, 885 μmol, 0.5 eq.). The mixture was stirred at 66 °C for 6 h. After evaporation of the THF under vacuum, DCM (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 2% MeOH in DCM to afford after evaporation under vacuum a yellow oil (600 mg, 68%). HPLC  $t_R$  = 4.88 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.19 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.33 (m, 1H), 7.28-7.38 (m, 2H), 7.21 (m, 1H), 7.09-7.23 (m, 2H), 6.85-6.93 (m, 1H), 6.82 (d,  $J$  =

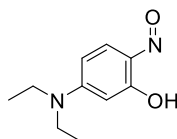
8.8 Hz, 1H), 6.50 (dd,  $J = 8.9, 6.6$  Hz, 1H), 4.83-4.95 (m, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.00 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.38, 157.52, 153.97, 148.64, 148.61, 146.29, 137.95, 136.46, 128.68, 128.36, 128.21, 124.20, 121.49, 118.36, 114.90, 114.50, 112.29, 72.86, 68.87, 60.66, 60.34, 54.49.

(5-(3-(2-Chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4-(6-methoxypyridin-3-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methanol (**1.13**)



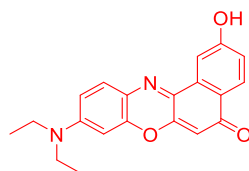
To a solution of **1.12** (985 mg, 1.99 mmol, 1 eq.) in anhydrous DCM (50 mL) at iced water temperature was added a 1 M solution of  $\text{BCl}_3$  in DCM (7.95 mL, 7.95 mmol, 4 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 4 h. After washing with water (50 mL), a first organic layer was recovered. To the aqueous layer was added an aqueous 2 M NaOH solution (pH 13). A second organic layer was extracted with DCM (50 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The first organic layer was purified on a silica gel column eluted with 10% v/v MeOH in DCM to afford, after gathering with the solid obtained after the second extraction, a white solid (448 mg, 56%). HPLC  $t_R = 3.79$  min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.27 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.73 (dd,  $J = 8.8, 2.6$  Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.11 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.50 (dd,  $J = 8.9, 6.6$  Hz, 1H), 4.89 (p,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.08-4.20 (m, 2H), 3.97-4.05 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.76, 157.56, 153.24, 148.56, 147.89, 146.32, 138.13, 124.28, 120.69, 118.39, 114.96, 114.54, 112.69, 68.89, 60.48, 54.60, 53.84.

5-(Diethylamino)-2-nitrosophenol (**1.15**)



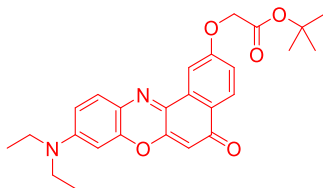
To a solution of 3-(diethylamino)phenol (1.00 g, 5.87 mmol, 1 eq.) in a mixture of water (6 mL) and concentrated HCl (6 mL, 70.5 mmol, 12 eq.) at iced water temperature was dropwise added a solution of NaNO<sub>2</sub> (418 mg, 5.87 mmol, 1 eq.) in water (4 mL) over a period of 30 min. The mixture was stirred at iced water temperature for 2 h and then concentrated under vacuum to afford a brown solid (1.14 g). This unstable product was directly used for the next step. HPLC  $t_R$  = 2.22 min (Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.31 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 1H), 6.53 (dd,  $J$  = 9.9, 2.5 Hz, 1H), 5.66 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 3.48 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 4H), 1.26 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  169.36, 157.23, 149.68, 135.57, 113.69, 96.12, 46.07, 13.00.

*9-(Diethylamino)-2-hydroxy-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (1.16)*



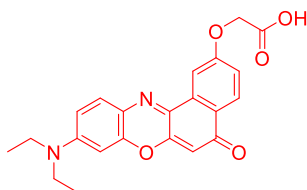
A solution of 1,6-dihydroxynaphthalene (73.0 mg, 0.45 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (4 mL) was added to a solution of **1.15** (175 mg, 0.90 mmol, 2 eq.) in anhydrous DMF (1 mL). The mixture was stirred at 110 °C for 45 min. DMF was removed under reduced pressure and the crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 15-70% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (66.5 mg, 44%). HPLC  $t_R$  = 4.47 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HPLC  $t_R$  = 6.41 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.40 (s, 1H), 7.96 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.87 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 7.56 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.08 (dd,  $J$  = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J$  = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 6.62 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 3.48 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 1.15 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  181.37, 159.78, 151.56, 150.71, 144.95, 138.59, 134.87, 132.01, 128.40, 125.16, 123.11, 118.34, 110.01, 107.47, 105.80, 95.33, 45.28, 12.98.

*tert*-Butyl 2-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[*a*]phenoxazin-2-yl)oxy)acetate  
(**1.17**)



To a solution of **1.16** (537 mg, 1.60 mmol, 1 eq.) and  $K_2CO_3$  (1.32 g, 9.58 mmol, 6 eq.) in acetone (16 mL) was added *tert*-butyl chloroacetate (0.7 mL, 4.79 mmol, 3 eq.). The mixture was stirred under reflux for 6.5 h. After evaporation of the acetone under reduced pressure, EtOAc (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (20 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The crude product was used without further purification. HPLC  $t_R$  = 6.10 min (Method A).

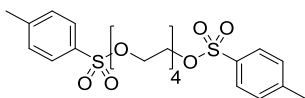
**NR-COOH**



The obtained crude **1.17** was dissolved in DCM (9 mL) and TFA (6 mL, 80.8 mmol, 51 eq.) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 1.5 h. After evaporation of the volatiles under reduced pressure, EtOAc (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (20 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous  $Na_2SO_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 30-80% v/v ACN (0.1% TFA) in  $H_2O$  (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (721 mg, 84%). HPLC  $t_R$  = 4.57 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HPLC  $t_R$  = 5.21 min (> 95% purity [220.8 nm], Method C).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.01 (d,  $J$  = 8.7, 1H), 7.84 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.53 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H), 7.24 (dd,  $J$  = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 6.79 - 6.72 (m, 1H), 6.57 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 4.87 (s, 2H), 3.46 (m, 4H), 1.15 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 6H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  181.12, 169.74, 160.26, 151.68, 150.86, 146.42, 137.97, 133.40, 130.91, 127.19, 125.23, 124.00, 117.80, 110.14, 106.51, 103.98, 95.94, 64.74, 44.43, 12.43.

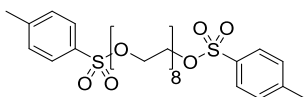
((Oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl)  
methylbenzenesulfonate) **(1.19a)**

bis(4-



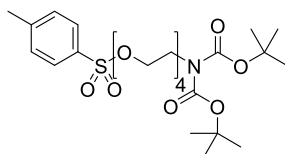
To a solution of 2,2'-((oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethane-1-ol) (2.00 mL, 11.5 mmol, 1 eq.) in anhydrous DCM (43 mL) were added **TsCl** (4.84 g, 25.4 mmol, 2.2 eq.) and Et<sub>3</sub>N (3.53 mL, 25.4 mmol, 2.2 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 1.5 h, then at 25 °C for 16 h. DCM (30 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 50% v/v EtOAc in pentane to afford after evaporation under vacuum a colorless oil (3.74 g, 64%). HPLC  $t_R$  = 5.22 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.70 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 4H), 7.25 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 4H), 4.04-4.13 (m, 4H), 3.59 (t,  $J$  = 4.6 Hz, 4H), 3.34-3.52 (m, 8H), 2.35 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.94, 133.23, 129.97, 128.12, 70.91, 70.72, 69.39, 68.86, 21.77.

3,6,9,12,15,18,21-Heptaoxatricosane-1,23-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate)  
**(1.19b)**



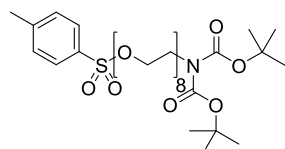
To a solution of 3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosane-1,23-diol (1.01 g, 2.72 mmol, 1 eq.) in anhydrous DCM (10 mL) were added TsCl (1.51 g, 7.94 mmol, 2.9 eq.) and Et<sub>3</sub>N (1.10 mL, 7.94 mmol, 2.9 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 2 h, then at 25 °C for 18 h. DCM (30 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 2% v/v MeOH in DCM to afford after evaporation under vacuum a colorless oil (1.07 g, 58%). HPLC  $t_R$  = 5.13 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 4H), 7.34 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 4H), 4.15 (t,  $J$  = 4.6 Hz, 4H), 3.66-3.70 (m, 4H), 3.54-3.67 (m, 24H), 2.44 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.92, 133.25, 129.97, 128.14, 70.91, 70.78, 70.73, 70.68, 69.39, 68.85, 21.78.

*5-(tert-Butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-aza-hexadecan-16-yl 4-methylbenzenesulfonate (1.20a)*



To a solution of **1.19a** (554 mg, 1.10 mmol, 2 eq.) in anhydrous DMF (20 mL) was added Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.44 g, 4.41 mmol, 8 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 15 min, then was added over a period of 2.5 h (7 mL/h) a solution of NH(Boc)<sub>2</sub> (119 mg, 548 μmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (20 mL). The mixture was stirred at iced water temperature for 2 h, then at 25 °C for 21 h. After evaporation of the DMF under vacuum, DCM (100 mL) was added and the organic layer was washed with water (2 x 150 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 20-95% v/v ACN in H<sub>2</sub>O in 30 min. The recovered fraction was basified with an aqueous 1 M NaHCO<sub>3</sub> solution (pH 8.5). After evaporation of the ACN under reduced pressure, DCM (100 mL) was added and the organic layer was washed with water (2 x 100 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to afford a colorless oil (201 mg, 66%). HPLC t<sub>R</sub> = 5.95 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.31-7.39 (m, 2H), 4.16 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.75-3.81 (m, 2H), 3.66-3.71 (m, 2H), 3.54-3.63 (m, 10H), 2.45 (s, 3H), 1.49 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 152.78, 144.91, 133.20, 129.95, 128.12, 82.41, 70.88, 70.76, 70.68, 70.34, 69.41, 69.36, 68.83, 45.32, 28.20, 21.77.

*5-(tert-Butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26-octaoxa-5-aza-octacosan-28-yl 4-methylbenzenesulfonate (1.20b)*

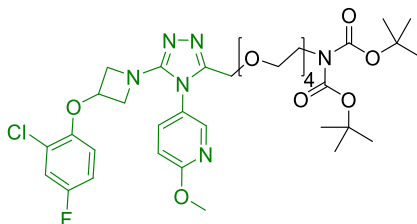


To a solution of **1.19b** (1.04 g, 1.53 mmol, 1.7 eq.) in anhydrous DMF (50 mL) was added Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.53 g, 10.8 mmol, 12 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 15 min, then a solution of NH(Boc)<sub>2</sub> (196 mg, 0.90 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (20 mL) was added dropwise over period of 2.5 h (7 mL/h). The mixture was stirred at iced water temperature for 1 h, at 25 °C for 15 h. After



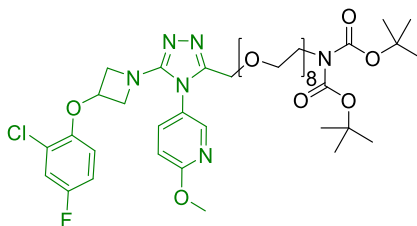
evaporation of the DMF under vacuum, DCM (100 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 100 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 20–95% v/v ACN in H<sub>2</sub>O in 30 min. The obtained fraction was basified with 1 M NaHCO<sub>3</sub> solution (pH = 8.5), then ACN was evaporated, DCM (100 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to afford a colorless oil (285 mg, 44%). HPLC t<sub>R</sub> = 5.80 min (Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.13–4.19 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.74–3.83 (m, 2H), 3.68 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.55–3.65 (m, 26H), 2.45 (s, 3H), 1.50 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 152.79, 144.92, 133.25, 129.97, 128.14, 82.40, 77.36, 70.91, 70.77, 70.73, 70.68, 70.42, 70.39, 70.37, 69.44, 69.37, 68.85, 45.36, 28.21, 21.78.

*Di-tert-butyl* (1-(5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4-(6-methoxypyridin-3-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)iminodicarbonate (**1.21a**)



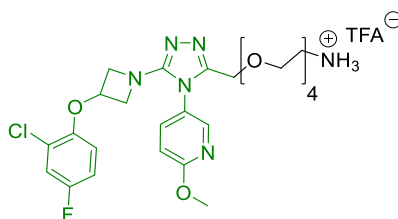
To a solution of **1.13** (10 mg, 24.6 μmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (1.7 mL) at iced water temperature were added KOH (8.0 mg, 143 μmol, 6 eq.) and a solution of **1.20a** (16 mg, 29.6 μmol, 1.2 eq.) in anhydrous DMF (1.7 mL). The mixture was stirred at iced water temperature for 2 h, at 25 °C for 21 h. Then KOH (6.0 mg, 107 μmol, 4.5 eq.) was added, the mixture was stirred at 25 °C for 19 h and at 45 °C for 23 h. DCM (40 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 40 mL), brine (10 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. HPLC t<sub>R</sub> = 4.73 min (Method A).

*Di-tert-butyl* (1-(5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4-(6-methoxy-pyridin-3-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-2,5,8,11,14,17,20,23-octa-oxapentacosan-25-yl)iminodicarbonate (**1.21b**)



To a solution of **1.13** (10.6 mg, 26.2  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (1.7 mL) at iced water temperature were added KOH (22.0 mg, 392  $\mu\text{mol}$ , 15 eq.) and, after 10 min of stirring, a solution of **1.20b** (28.4 mg, 39.2  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq.) in anhydrous DMF (1.7 mL). The mixture was stirred at iced water temperature for 1 h, at 25 °C for 2 h and at 45 °C for 64 h. DCM (60 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 60 mL), brine (30 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. HPLC  $t_{\text{R}}$  = 4.76 min (Method A).

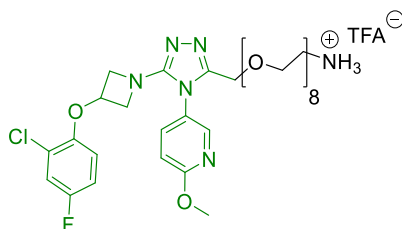
*2,2,2-Trifluoroacetaldehyde*, 1-(5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4-(6-methoxy-pyridin-3-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-2,5,8,11-tetra-oxatridecan-13-aminium salt (**1.22a**)



The obtained residue **1.21a** was dissolved in DCM (1.34 mL) and TFA (1.34 mL, 18 mmol, 732 eq.) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 30 min. After evaporation of the volatiles under reduced pressure, the crude product was purified by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 10-40% v/v ACN (0.1% TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a yellow oil (8.0 mg, 47%). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 3.69 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.28 (s, 3H), 8.23 (m, 2H), 7.87 (dd,  $J$  = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.07-7.18 (m, 1H), 6.84-6.96 (m, 2H), 6.51 (dd,  $J$  = 8.9, 6.6 Hz, 1H), 5.42-5.70 (m, 2H), 4.88-5.14 (m, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.04-4.19 (m, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.72-3.84 (m, 2H), 3.57-3.72 (m, 10H), 3.22 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  163.94, 156.25, 149.21, 148.53, 148.51, 146.16, 138.83, 123.09, 122.07, 121.96, 117.61, 114.84, 114.83, 111.20, 69.78, 69.71, 69.68, 69.66, 69.44, 68.86, 68.36,

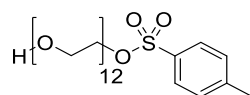
66.66, 61.75, 59.18, 53.86, 38.55.

*2,2,2-Trifluoroacetaldehyde, 1-(5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4-(6-methoxypyridin-3-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-aminium salt (1.22b)*



The obtained residue **1.21b** was dissolved in DCM (2 mL) and TFA (2 mL, 27 mmol, 1029 eq.) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 3.5 h. After evaporation of the volatiles under reduced pressure, the crude product was purified by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 10-60% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a yellow oil (6.4 mg, 28%). HPLC  $t_R$  = 3.82 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.39 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 8.29 (s, 3H), 7.82-8.14 (m, 4H), 7.46 (dd,  $J$  = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.07-7.17 (m, 1H), 7.01 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 6.90 (dd,  $J$  = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 5.02-5.15 (m, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.22-4.32 (m, 2H), 3.89-3.94 (m, 5H), 3.59-3.63 (m, 2H), 3.53-3.58 (m, 4H), 3.45-3.53 (m, 18H), 3.39-3.44 (m, 6H), 2.90-3.02 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164.13, 156.27, 148.94, 148.44, 148.41, 146.41, 138.98, 122.37, 122.04, 121.94, 117.62, 114.84, 114.82, 111.20, 69.76, 69.71, 69.66, 69.63, 69.40, 68.93, 68.29, 66.64, 61.53, 59.42, 53.87, 38.52.

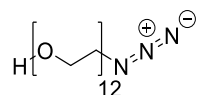
*35-Hydroxy-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxapentatriacontyl 4-methylbenzenesulfonate (1.24)*



To a suspension of 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxapentatriacontane-1,35-diol (102 mg, 187 μmol, 1 eq.) and Ag<sub>2</sub>O (64.9 mg, 0.28 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous DCM (166 μL) at iced water temperature were added TsCl (39.1 mg, 205 μmol, 1.1 eq.) and KI (6.19 mg, 37.3 μmol, 0.2 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 18 h. After filtration through Celite and evaporation of the DCM under reduced pressure, the crude product was purified on a silica gel column eluted with 3-10% v/v MeOH in DCM to afford after evaporation under vacuum a colorless oil (54.0 mg, 41%). HPLC  $t_R$  = 3.89 min (>

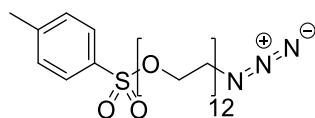
95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.70 (d,  $J = 7.03$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 7.53$  Hz, 2H), 4.02-4.12 (m, 2H), 3.43-3.76 (m, 46H), 2.35 (s, 3H).

**35-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaioxapentatriacontan-1-ol (1.25)**



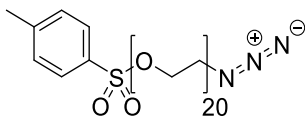
To a solution of **1.24** (49.9 mg, 71.2  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (203  $\mu\text{L}$ ) was added  $\text{NaN}_3$  (10.0 mg, 154  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq.). The mixture was stirred at 70  $^\circ\text{C}$  for 4 h. After evaporation of the DMF under reduced pressure, DCM (70 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum to afford a colorless oil (36.6 mg, 90 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.53-3.71 (m, 46H), 3.35 (t,  $J = 4.89$  Hz, 2H), 1.21 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  72.63, 70.56, 70.29, 70.01, 61.68, 50.70.

**35-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaioxapentatriacontyl 4-methylbenzenesulfonate (1.27a)**



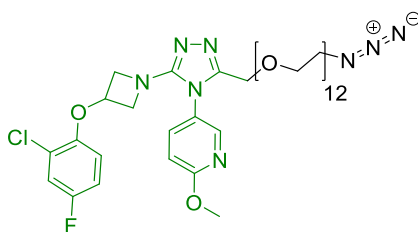
To a solution of **1.25** (35.1 mg, 61.4  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DCM (1 mL) were added TsCl (11.7 mg, 61.4  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and KOH (17.2 mg, 307  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 30 min and at 25  $^\circ\text{C}$  for 4 h. Then TsCl (2.34 mg, 12.3  $\mu\text{mol}$ , 0.2 eq.) was added and the mixture was stirred at 25  $^\circ\text{C}$  for 1.5 h. DCM (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 40 mL), brine (40 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20-45% v/v ACN (0.1% TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a colorless oil (33.5 mg, 75%). HPLC  $t_r = 4.51$  min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.70 (d,  $J = 7.28$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 7.78$  Hz, 2H), 4.06 (m, 2H), 3.46-3.68 (m, 44H), 3.30 (m, 2H), 2.35 (s, 3H).

59-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-nonadecaonanapentacontyl 4-methylbenzenesulfonate (**1.27b**)



To a solution of 59-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-nonadecaonanapentacontan-1-ol (50.0 mg, 54.1  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DCM (1 mL) were added TsCl (21.0 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) and KOH (18.2 mg, 325  $\mu\text{mol}$ , 6 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 1 h and at 25 °C for 4 days. DCM (50 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 5-10% v/v MeOH in DCM to afford after evaporation under vacuum a colorless oil (47.2 mg, 81%). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 4.58 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.75 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 7.30 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 4.11 (t,  $J$  = 4.4 Hz, 2H), 3.67 – 3.52 (m, 76H), 3.34 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  144.79, 133.15, 129.85, 128.00, 70.77, 70.73, 70.70, 70.67, 70.60, 70.55, 70.05, 69.27, 68.71, 50.74, 21.65.

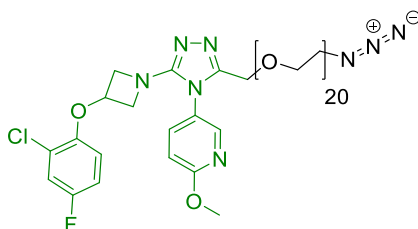
5-(3-(37-Azido-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaheptatriacontyl)-5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-2-methoxypyridine (**1.28a**)



To a solution of **1.13** (19.5 mg, 47.9  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (3 mL) at iced water temperature was added KOH (19 mg, 302  $\mu\text{mol}$ , 6.3 eq.). After 5 min of stirring at iced water temperature, a solution of **1.27a** (34.8 mg, 47.9  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (3 mL) was added. The mixture was stirred at iced water temperature for 1.5 h and at 25 °C for 1 h. After evaporation of the DMF under reduced pressure, DCM (70 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , concentrated under vacuum and lyophilized to afford a yellow oil (42,5 mg, 92%). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 4.57 min (>

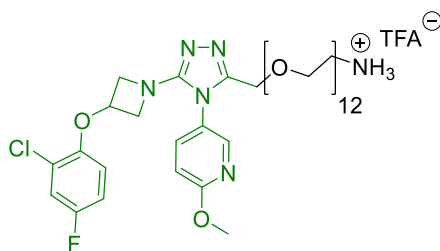
95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.22 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J$  = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.13 (dd,  $J$  = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 6.86 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 6.51 (dd,  $J$  = 9.0, 4.7 Hz, 1H), 4.90 (p,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.18 – 4.10 (m, 2H), 4.05 – 4.00 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.70 – 3.53 (m, 46H), 3.38 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.42, 158.34, 149.74, 148.88, 145.56, 137.74, 123.58, 118.26, 118.00, 114.31, 114.09, 111.78, 70.72, 70.70, 70.66, 70.59, 70.52, 70.27, 70.05, 69.30, 68.86, 62.45, 59.46, 54.09, 50.74.

5-(3-(61-Azido-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59-icosaoxahenhexacontyl)-5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-2-methoxypyridine (**1.28b**)



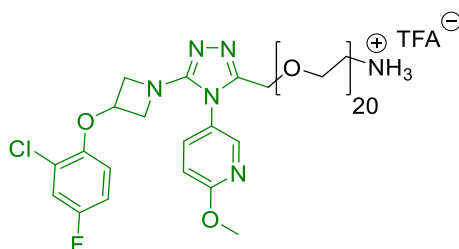
To a solution of **1.13** (10.0 mg, 24.6  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (1.7 mL) at iced water temperature was added KOH (19.4 mg, 295  $\mu\text{mol}$ , 14 eq.). After 10 min of stirring at iced water temperature, a solution of **1.27b** (26.6 mg, 24.6  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (1.6 mL) was added. The mixture was stirred at iced water temperature for 30 min and at 25 °C for 2.5 h. DCM (70 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20-50% v/v ACN (0.1%TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a colorless oil (23.2 mg, 72%). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 4.67 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.32 (s, 1H), 7.81 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.12 (dd,  $J$  = 7.9, 2.7 Hz, 1H), 6.95 – 6.85 (m, 2H), 6.55 (dd,  $J$  = 9.2, 4.6 Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.40 (s, 2H), 4.13 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.64 (s, 78H), 3.38 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H). LRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{58}\text{H}_{98}\text{ClFN}_8\text{O}_{22}$  ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ )/2: 656.323, found: 656.283.

*2,2,2-Trifluoroacetaldehyde, 1-(5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4-(6-methoxypyridin-3-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaheptatriacontan-37-aminium salt (1.29a)*



Polymer-bound triphenylphosphine (70.8 mg, 3 mmol/g, 8 eq.) was added to a solution of **1.28a** (25.5 mg, 26.6  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous THF (1 mL). The mixture was stirred under reflux for 3.5 h, then water (400  $\mu\text{L}$ ) was added and the obtained mixture was stirred under reflux for another 1.5 h. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure and lyophilized. The crude product was purified by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20–45% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% v/v TFA) in 30 min to afford after lyophilization a yellow oil (11.9 mg, 43%). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 3.94 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.27 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.77 (dd,  $J$  = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.68 (s, 2H), 7.12 (dd,  $J$  = 8.0, 3.1 Hz, 1H), 6.90 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 6.53 (dd,  $J$  = 9.1, 4.7 Hz, 1H), 5.02 – 4.89 (m, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.39 – 4.31 (m, 2H), 4.08 (dd,  $J$  = 8.7, 3.6 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.80 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 2H), 3.71 – 3.56 (m, 44H), 3.23 – 3.12 (m, 2H).

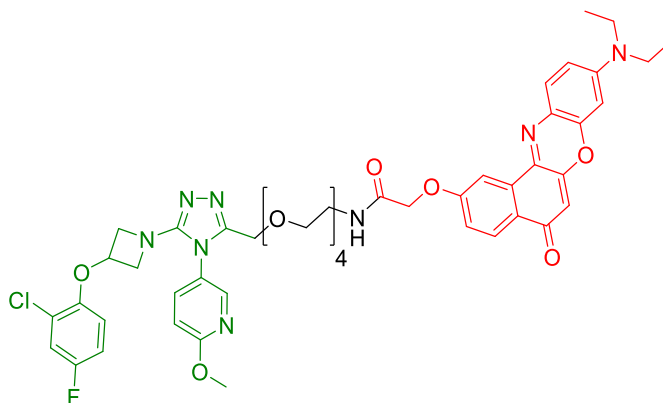
*2,2,2-Trifluoroacetaldehyde, 1-(5-(3-(2-chloro-4-fluorophenoxy)azetidin-1-yl)-4-(6-methoxypyridin-3-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59-icosaoxahenhexacontan-61-aminium salt (1.29b)*



Polymer-bound triphenylphosphine (33.8 mg, 3 mmol/g, 10 eq.) was added to a solution of **1.28b** (13.3 mg, 10.1  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous THF (500  $\mu\text{L}$ ). The mixture was refluxed for 5 h, then water (200  $\mu\text{L}$ ) was added and the obtained mixture was stirred under reflux for another 2 h. The mixture was filtered and the

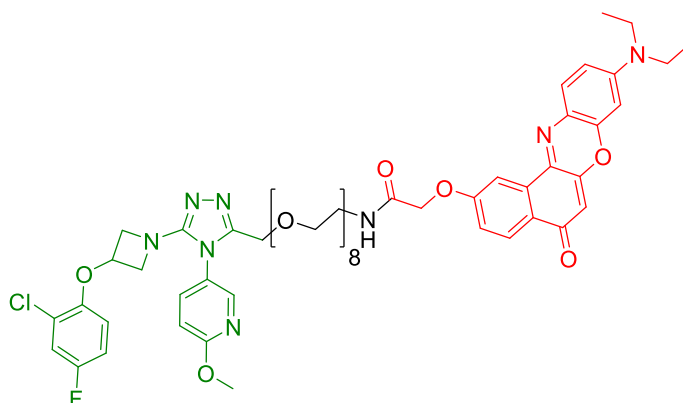
filtrate was concentrated under reduced pressure and lyophilized. The crude product was purified by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20-45% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% v/v TFA) in 30 min to afford after lyophilization a colorless oil (5.8 mg, 44%). HPLC  $t_R$  = 4.31 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.20 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.65 (dd,  $J$  = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.10 (dd,  $J$  = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 6.89 – 6.77 (m, 2H), 6.49 (dd,  $J$  = 9.0, 4.7 Hz, 1H), 4.88 (p,  $J$  = 6.2, 5.6 Hz, 1H), 4.39 (s, 2H), 4.17 – 4.05 (m, 2H), 4.04 – 3.97 (m, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.66 – 3.58 (m, 78H), 2.99 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H). LRMS (ESI) calcd for C<sub>58</sub>H<sub>100</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>22</sub> ([M+2H]<sup>2+</sup>)/2: 643.328, found: 643.764.

### **Pf-PEG<sub>4</sub>-NR**

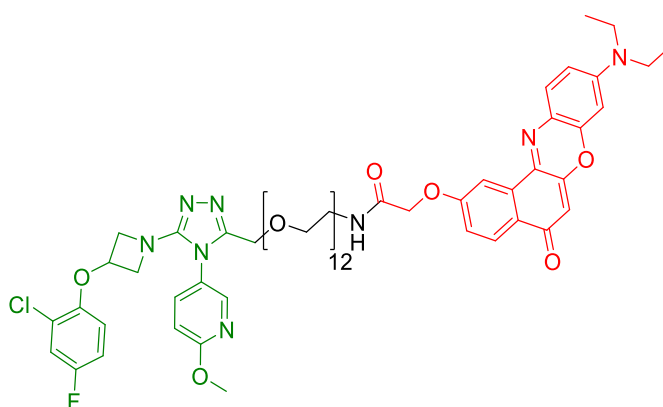


To a solution of NR-COOH (3.6 mg, 9.17 μmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (300 μL) were added a solution of **1.22a** (7.0 mg, 10.1 μmol, 1.1 eq.) in anhydrous DMF (300 μL), a solution of PYBOP (14 mg, 26.3 μmol, 2.6 eq.) in anhydrous DMF (300 μL) and DIPEA (13 μL, 80.6 μmol, 8 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 1 h and the product was then isolated by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20-60% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% v/v TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (6.8 mg, 78%). HPLC  $t_R$  = 5.37 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HRMS (ESI) calcd for C<sub>48</sub>H<sub>54</sub>ClFN<sub>8</sub>O<sub>10</sub> ([M+2H]<sup>2+</sup>)/2: 478.1818, found: 478.1824.



**Pf-PEG<sub>8</sub>-NR**

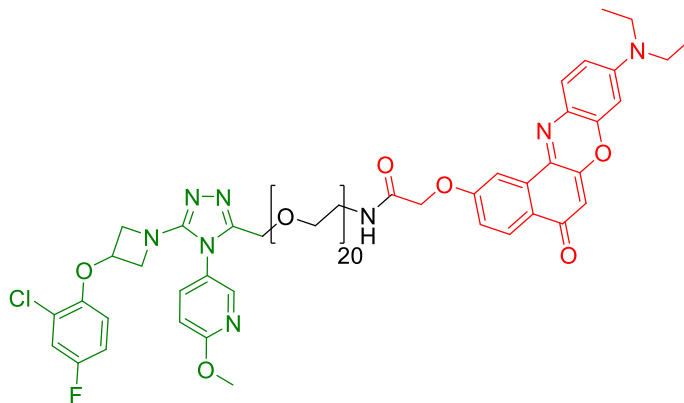
To a solution of NR-COOH (0.6 mg, 1.61  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (65  $\mu\text{L}$ ) were added a solution of **1.22b** (1.4 mg, 1.61  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (65  $\mu\text{L}$ ), a solution of PYBOP (2.1 mg, 4.02  $\mu\text{mol}$ , 2.5 eq.) in anhydrous DMF (65  $\mu\text{L}$ ) and DIPEA (2.1  $\mu\text{L}$ , 12.9  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 30 min and then were added PYBOP (2.1 mg, 4.02  $\mu\text{mol}$ , 2.5 eq.) and DIPEA (2.1  $\mu\text{L}$ , 12.9  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 2 h and the product was then isolated by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20–60% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% v/v TFA) in 30 min to afford after lyophilization a black purple solid (1.3 mg, 71%). HPLC  $t_R$  = 5.39 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HRMS (ESI) calcd for C<sub>56</sub>H<sub>70</sub>ClFN<sub>8</sub>O<sub>14</sub> ([M+2H]<sup>2+</sup>)/2: 566.2342, found: 566.2341.

**Pf-PEG<sub>12</sub>-NR**

To a solution of **1.29a** (3.4 mg, 3.25  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) in anhydrous DMF (290  $\mu\text{L}$ ) were added NR-COOH (1.2 mg, 2.96  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.), PYBOP (4.4 mg, 8.42  $\mu\text{mol}$ , 2.6 eq.) and DIPEA (4.3  $\mu\text{L}$ , 26.0  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 30 min and the product was then isolated by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20–55% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% v/v TFA) in

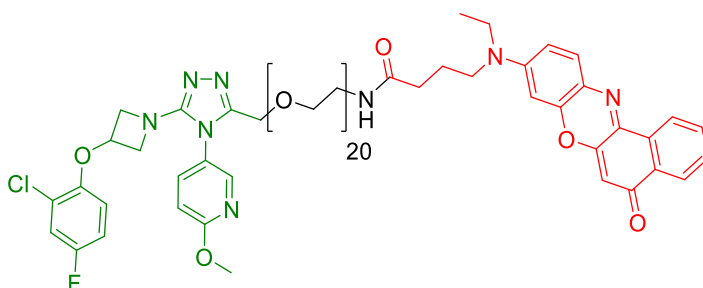
30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (1.5 mg, 39%). HPLC  $t_R$  = 5.37 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HRMS (ESI) calcd for  $C_{64}H_{86}ClFN_8O_{18}$  ( $[M+2H]^{2+}$ )/2: 654.2866, found: 654.2871.

### **Pf-PEG<sub>20</sub>-NR**



To a solution of **1.29b** (2.7 mg, 1.93  $\mu$ mol, 1 eq.) in anhydrous DMF (172  $\mu$ L) were added NR-COOH (1.5 mg, 3.86  $\mu$ mol, 2 eq.), PYBOP (7.5 mg, 14.5  $\mu$ mol, 7.5 eq.) and DIPEA (10  $\mu$ L, 61.7  $\mu$ mol, 32 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 25 h and the product was then isolated by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20-60% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% v/v TFA) to afford after lyophilization a dark purple solid (1.6 mg, 50%). HPLC  $t_R$  = 5.58 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HRMS (ESI) calcd for  $C_{80}H_{119}ClFN_8O_{26}$  ( $[M+3H]^{3+}$ )/3: 554.2583, found: 554.2582.

### **Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>**



To a solution of **1.29b** (2.8 mg, 2.18  $\mu$ mol, 1 eq) in anhydrous DMF (50  $\mu$ L) were added NR<sub>A</sub>-COOH (0.8 mg, 2.18  $\mu$ mol, 1 eq.), a solution of PYBOP (2.8 mg, 5.45  $\mu$ mol, 2.5 eq.) in anhydrous DMF (50  $\mu$ L) and DIPEA (2.9  $\mu$ L, 17.4  $\mu$ mol, 8 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 17 h. EtOAc (30 mL) was added and the organic layer was washed with water (20 mL) in the presence of brine (5 mL) and

brine (15 mL). The obtained aqueous layer was extracted with EtOAc (20 mL). The gathered organic layers were dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 6-10% v/v MeOH in DCM to afford after evaporation under vacuum a dark purple solid which was then purified again by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20-55% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% v/v TFA) to afford after lyophilization a dark purple solid (0.5 mg, 14%). HPLC  $t_r$  = 4.73 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{80}\text{H}_{118}\text{ClFN}_8\text{O}_{25}$  ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ )/2: 822.3940, found: 822.3987.

## **2.2. Evaluation of the spectral properties of Nile Red-based probes of the OTR**

All information about the determination of fluorescence quantum yields and fluorescence turn-on ratio is mentioned above (section 1.5.).

## **2.3. Evaluation of the non-specific interactions of Nile Red-based probes of the OTR *in vitro***

### **2.3.1. Preparation of 1 mM DOPC/cholesterol (2:1) liposomes**

To a solution of DOPC (667  $\mu\text{L}$ , 5 mM) in  $\text{CHCl}_3$  was added a solution of cholesterol (333  $\mu\text{L}$ , 5 mM) in  $\text{CHCl}_3$  and the solvent was slowly evaporated under reduced pressure. The obtained film was rehydrated with PBS (5 mL, pH 7.1 - 7.5), vortexed for 5 min and kept at 25 °C for 30 min. The suspension of multilamellar vesicles was extruded by using a Lipex Biomembranes extruder using a 0.2  $\mu\text{m}$  filter for 7 passages and then 0.1  $\mu\text{m}$  filter for 10 passages. This generates monodisperse LUVs were characterized by a mean diameter of 0.15  $\mu\text{m}$  as measured with a Malvern Zetamaster 300 particle size analyser.

### **2.3.2. Evaluation of non-specific interactions with liposomes**

The 1  $\mu\text{M}$  solutions of the studied probes in PBS with increasing amounts of DOPC/cholesterol (2:1) liposomes were prepared as follows. 5  $\mu\text{L}$  of 0.2 mM stock DMSO solution of a studied probe were added accordingly to 995  $\mu\text{L}$ , 993  $\mu\text{L}$ , 991  $\mu\text{L}$ , 985  $\mu\text{L}$ , 975  $\mu\text{L}$ , 945  $\mu\text{L}$ , 895  $\mu\text{L}$  and 795  $\mu\text{L}$  of PBS. Then 0  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  and 200  $\mu\text{L}$  of 1 mM DOPC/cholesterol (2:1) liposomes were respectively added and the solutions were carefully mixed. The solution was excited at 520 nm and the fluorescence intensity was measured between 530 and 800 nm at

20 °C (excitation slit: 2 nm, emission slit: 3 nm). The increase of fluorescence intensity was plotted taking S1/R1 values into consideration.

### **2.3.3. Evaluation of non-specific interactions with BSA**

The titrations of the studied probes with BSA were performed as follows. 1  $\mu$ M solution of the studied probes in PBS were prepared by diluting 5  $\mu$ L of 0.2 mM DMSO stock solutions in 995  $\mu$ L of PBS. Then successively 5  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 15  $\mu$ L, 25  $\mu$ L, 60  $\mu$ L of 0.2 mM stock solution of BSA in PBS were added and the solutions were carefully mixed. The solution was excited at 520 nm and the fluorescence intensity was measured between 530 and 800 nm at 20 °C (excitation slit: 2 nm, emission slit: 3 nm). The increase of fluorescence intensity was plotted taking S1/R1 values into consideration.

## **2.4. Evaluation of the non-specific interactions of Nile Red-based probes of the OTR *in cellulo***

### **2.4.1. Cell lines and culture conditions<sup>2</sup>**

HEK293 cells stably overexpressing the OTR (HEK-OTR cells) were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM, Invitrogen 21090) with 10% FBS, 100 U/mL of penicillin, 100  $\mu$ g/mL of streptomycin, 2 mM of glutamine and 500  $\mu$ g/mL of G418 at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. 70-80% cell confluence was maintained by removal of a portion of the culture and replacement with fresh medium twice a week. Cells were seeded into 35 mm ibiTreat  $\mu$ -dish (IBiDi) at 40 000 cells per dish 3 days before imaging.

### **2.4.2. Live-cell no-wash imaging of the OTR**

For the comparison of the probes Pf-PEG<sub>4</sub>-NR, Pf-PEG<sub>8</sub>-NR, Pf-PEG<sub>12</sub>-NR and Pf-PEG<sub>20</sub>-NR, the culture medium was removed, the cells were washed with PBS and incubated with a 1  $\mu$ g/mL solution of Hoechst 33342 in MEM (1 mL) at 37 °C for 15 min. The medium was removed, the cells were washed with PBS and a 10 nM solution of the studied probe in PBS (1 mL) or a mixture of 10 nM of the studied probe and 2  $\mu$ M of carbetocin in PBS (1 mL) were added. The cells were incubated at 25 °C for 5 min prior to the imaging. The imaging by confocal microscopy was performed at 22 °C. Nile Red was excited with a 488 nm 10 mW laser at 80% intensity and detected at

---

<sup>2</sup> Performed by Christel Valencia and Sophie Gioria under the supervision of Dr. Pascal Villa (UMS 3286, PCBIS, Illkirch).

570 - 630 nm. Hoechst 33342 was excited with a 405 nm 25 mW laser at 10% intensity and detected at 430 - 480 nm. The pinhole was set to 1 airy unit. The images were acquired at 1.5x magnification as a mean of 2 scans in 1024x1024 size. An additional 2x magnification was applied upon processing. The same brightness and contrast parameters for the Nile Red channel were applied to all the images.

For the comparison of the probes Pf-PEG<sub>20</sub>-NR and Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>, the culture medium was removed, the cells were washed with Opti-MEM and incubated with a mixture of 20 nM of the studied probe and 1 µg/mL of Hoechst 33342 in Opti-MEM (1 mL) or a mixture of 20 nM of the studied probe, 2 µM of carbetocin and 1 µg/mL of Hoechst 33342 in Opti-MEM (1 mL) at 37 °C for 20 min prior to the imaging. The imaging by confocal microscopy was performed at 22 °C. Nile Red was excited with a 488 nm 10 mW laser at 80% intensity and detected at 570 - 630 nm. Hoechst 33342 was excited with a 405 nm 25 mW laser at 10% intensity and detected at 430 - 480 nm. The pinhole was set to 1 airy unit. The images were acquired at 1.5x magnification as a mean of 2 scans in 1024x1024 size. An additional 1.4x magnification was applied upon processing. The same brightness and contrast parameters for the Nile Red channel were applied to all the images.

For the evaluation of signal-to-noise ratio of Pf-PEG<sub>20</sub>-NR and Pf-PEG<sub>8</sub>-DY647, the culture medium was removed, the cells were washed with Opti-MEM and incubated with a mixture of 100 nM of the studied probe and 1 µg/mL of Hoechst 33342 in Opti-MEM (1 mL) at 37 °C for 15 min prior to the imaging. The imaging by confocal microscopy was performed at 22 °C. Nile Red was excited with a 488 nm 10 mW laser at 70% intensity and detected at 570 - 630 nm. DY647 was excited with a 635 nm 18 mW laser at 70% intensity and detected at 650 - 700 nm. Hoechst 33342 was excited with a 405 nm 25 mW laser at 10% intensity and detected at 430 - 480 nm. The pinhole was set to 1 airy unit. The images were acquired at 1.5x magnification as a mean of 2 scans in 1024x1024 size. The same brightness and contrast parameters for the Nile Red channel and the DY647 channel were applied to all the images.

## **2.5. Evaluation of the functional activity on the OTR<sup>3</sup>**

Antagonist properties of the OTR ligands were determined by measuring their capacities to inhibit oxytocin-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> release. HEK293 cells stably overexpressing the OTR were first incubated with 5 µM of Indo-1 AM in HEPES buffer

---

<sup>3</sup> Performed by Christel Valencia under the supervision of Dr. Pascal Villa (UMS 3286, PCBIS, Illkirch).

(10 mM HEPES, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM KCl, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 5.6 mM glucose, pH 7.4) supplemented with 0.1% BSA for 45 minutes at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were then washed, resuspended in HEPES buffer supplemented with 0.1% BSA buffer, seeded into 384 well polystyrene plates (Greiner 781091) at 50000 cells/well and then centrifuged for 5 min at 800 rpm. Addition of compounds was performed using the FlexStation® 3 automated pipettor. Compounds were tested at concentrations from 0.3 pM to 3 μM in the presence of 10 nM of oxytocin. Intracellular Ca<sup>2+</sup> release measurements were performed by monitoring the fluorescence of Indo-1 using a FlexStation® 3 microplate reader (Molecular Devices Corp.). Excitation was set at 338 nm, emissions were recorded at 401 nm and 475 nm at 25 °C. Fluorescence emission ratio 401 nm/ 475 nm was calculated in order to follow the calcium release. In order to assess the maximum calcium level, addition of digitonin (Sigma Aldrich) at 100 μM was performed 110 s after the addition of the compounds. Dose-response curves were obtained by plotting the normalized signal of calcium release against the logarithmic values of compound concentration. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) were calculated using GraphPad Prism software. Data resulted from two independent experiments performed in duplicate. Values are means ± SEM.

## **2.6. Use of the probe Pf-PEG<sub>20</sub>-NR for the study of the OTR microenvironment**

### **2.6.1. Cell lines and culture conditions<sup>4</sup>**

The same cell lines and culture conditions mentioned above were used (section 2.4.1.).

### **2.6.2. Ratiometric fluorescence imaging**

The culture medium was removed, the cells were washed with Opti-MEM (no phenol red) and incubated with 20 nM solutions of the studied probe in Opti-MEM (no phenol red) for 20 min at 37 °C. The confocal microscopy imaging was performed at 22 °C. Nile Red was excited with a 488 nm 10 mW laser at 30% (Pf-PEG<sub>4</sub>-NR), 50% (Pf-PEG<sub>8</sub>-NR) or 80% (for other probes). The fluorescence was collected from 500 nm to 600 nm ("green" channel C1) and from 600 nm to 700 nm ("red" channel C2). Images were acquired at 1.5x magnification in 512x512 size, 20

---

<sup>4</sup> Performed by Christel Valencia and Sophie Gioria under the supervision of Dr. Pascal Villa (UMS 3286, PCBIS, Illkirch).

scans in each channel. Fluorescence intensity in each channel was averaged using z-stack projection. The mean of grey values of background signal was subtracted in both channels. Membrane ROI were created using the "Otsu" threshold. RTG values of the cell membrane were calculated by dividing the mean of grey values in the obtained masks in C2 by that in C1. The ratiometric confocal microscopy images were generated using the ImageJ macros "Ratio Intensity color Version 2.5" (developed by Romain Vauchelles, UMR 7213, Illkirch) that divides background-subtracted image of the "red" channel by background-subtracted image of the "green" channel. For each pixel, a pseudocolor scale is used for coding the RTG ratio.

For cholesterol depletion, cells were treated with 5 mM solution of M $\beta$ CD in Opti-MEM (25  $\mu$ L of a 200 mM solution of M $\beta$ CD in water, filtered with a filter of 0.2  $\mu$ m porosity, in 975  $\mu$ L of Opti-MEM) at 37 °C for 30 min.

## **2.7. Use of the probe Pf-PEG<sub>20</sub>-NR for the super-resolution imaging of the OTR**

### **2.7.1. Cell lines and culture conditions<sup>5</sup>**

HEK293 cells stably overexpressing the OTR and HEK293 cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM, Invitrogen 21090) with 10% FBS, 100 U/mL of penicillin, 100  $\mu$ g/mL of streptomycin, 2 mM of glutamine and 500  $\mu$ g/mL of G418 at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. 70-80% cell confluence was maintained by removal of a portion of the culture and replacement with fresh medium twice a week. Cells were seeded into 35 mm high Glass Bottom 81158  $\mu$ -dish (IBiDi) at 40 000 cells per dish for HEK-OTR cells and at 50 000 cells per dish for HEK cells 3 days before imaging.

### **2.7.2. Super-resolution imaging of the OTR<sup>6</sup>**

The culture medium was removed, the cells were washed with Opti-MEM and a 10 nM solution of the studied probe in Opti-MEM (1 mL) or a mixture of 10 nM of the studied probe and 2  $\mu$ M of carbetocin in Opti-MEM (1 mL) were added. The cells were incubated for 20 min at 25 °C prior to the imaging. The imaging was performed at 22 °C. Super-resolution microscopy imaging of cells was performed in TIRF mode

---

<sup>5</sup> Performed by Christel Valencia and Sophie Gioria under the supervision of Dr. Pascal Villa (UMS 3286, PCBIS, Illkirch).

<sup>6</sup> Performed with the help of Dmytro Danylchuk under the supervision of Dr. Andrey Klymchenko (UMR 7021, LBP, Illkirch).

using Nikon Ti-E inverted microscope, equipped with 100× objective (Apo TIRF, oil, NA 1.49, Nikon) and a Hamamatsu Orca Flash 4 sCMOS camera with a bandpass filter  $593 \pm 40$  nm (Semrock FF01-593/40-25). The excitation in was provided by a 532 nm diode laser (OXXIUS). For PAINT super-resolution imaging, 5800 frames (for the Pf-PEG<sub>20</sub>-NR) and 9700 frames (for the Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub>) were recorded with an integration time of 30 ms per frame. All images were processed with ImageJ using a ThunderSTORM plugin. An additional 50x magnification was applied upon processing. The same brightness and contrast parameters were applied to all the images.

### **2.7.3. Evaluation of the photostability of the probes selected for super-resolution imaging of the OTR**

#### 2.7.3.1. Fluorescence spectroscopy

A 1  $\mu$ M solution of Pf-PEG<sub>20</sub>-NR or Pf-PEG<sub>20</sub>-NR<sub>A</sub> in 1,4-dioxane in a 50  $\mu$ L black quartz cuvette was irradiated at 520 nm over a period of 1 h. The fluorescence emission was measured every 0.5 second at 580 nm (excitation slit: 8 nm, emission slit: 0.7 nm). The decrease of fluorescence intensity in time was plotted taking S1/R1 values into consideration.

#### 2.7.3.2. Fluorescence microscopy

##### *Cell lines and culture conditions<sup>7</sup>*

The same cell lines and culture conditions mentioned above were used (section 2.4.1).

##### *Confocal microscopy experiments*

The culture medium was removed, the cells were washed with Opti-MEM and a 20 nM solution of the studied probe in Opti-MEM (1 mL) was added. The cells were incubated at 37 °C for 20 min prior to the imaging. The imaging was performed at 22 °C. Nile Red was excited with a 488 nm 10 mW laser at 80% intensity and detected at 570 - 630 nm. The pinhole was set to 1 airy unit. The images (50 images per probe) were acquired at 1.5x magnification as a mean of 2 scans in 512x512 size. An additional 1.3x magnification was applied upon processing in ImageJ. The mean of grey values of background signal was subtracted. The same brightness and contrast

---

<sup>7</sup> Performed by Christel Valencia and Sophie Gioria under the supervision of Dr. Pascal Villa (UMS 3286, PCBIS, Illkirch).



parameters were applied to all the images. Membrane ROI were created using the "Otsu" threshold. For each image, the mean of grey values in the obtained mask was taken as the mean value of fluorescence intensity at the cell membrane. Data treatment was performed using Origin software.

### **2.8. Use of the probe Pf-PEG<sub>20</sub>-NR for the development of an OTR binding assay<sup>8</sup>**

The culture medium was removed, the cells were washed with PBS and a (0-100 nM) solution of Pf-PEG<sub>20</sub>-NR in PBS (1 mL) or a mixture of a (0-100 nM) solution of Pf-PEG<sub>20</sub>-NR and 2 μM of carbetocin in PBS (1 mL) were added. A membrane probe Cy5.5A (developed by Dmytro Danylchuk) was systematically added to the solutions at 50 nM concentration. The cells were incubated for 20 min at 22 °C prior to the imaging. Imaging of cells was performed in widefield mode using Nikon Ti-E inverted microscope, equipped with 20× objective (Plan Apo, NA 0.75, Nikon) and a Hamamatsu Orca Flash 4 sCMOS camera with a bandpass filter 593 ± 40 nm (Semrock FF01-593/40-25) for Nile Red and 647 nm longpass filter for Cy5.5A. The excitation in was provided by light-emitting diodes (SpectraX, Lumencor) at 550 nm (Nile Red) and 640 nm (Cy5.5A). The acquisition time was set to 500 ms for Cy5.5A and 2s for Nile Red. The output power was 13.46 mW for 550 nm diode and 8.37 mW for 640 nm diode. All images were processed with ImageJ. The mean of grey values of background signal was subtracted in the Nile Red channel. Membrane ROI were created using the "Otsu" threshold in the Cy5.5A channel. For each image, the mean of grey values in the obtained mask was taken as the mean value of fluorescence intensity at the cell membrane. Data treatment was performed using GraphPad Prism software. Values are means ± SEM.

## **3. Chapter 2: Development of environment-sensitive spexin-based fluorescent probes for the GalR2 receptor**

### **3.1. Manual solid-phase peptide synthesis**

Manual SPPS was carried out in polypropylene tubes containing polyethylene frits and closed with polypropylene caps. The stirring of these tubes was performed

---

<sup>8</sup> Performed with the help of Dmytro Danylchuk under the supervision of Dr. Andrey Klymchenko (UMR 7021, LBP, Illkirch).

at 40 rpm by means of a Stuart Rotator Model SB3. Solvents were removed from the tubes using a Supelco Visiprep SPE 12-port vacuum manifold.

### 3.2. Automated solid-phase peptide synthesis

Automated SPPS was carried out using a CEM Liberty Blue automated microwave-assisted peptide synthesizer. Fmoc protecting groups were removed using 20% v/v piperidine in DMF at 90 °C for 4 min. The coupling of all amino acids (0.2 M in DMF peptide grade) was performed at 90 °C for 4 min using DIC/Oxyma in DMF peptide grade. For 100 µmol-scale synthesis, a 0.5 M solution of DIC in DMF peptide grade and a 1 M solution of Oxyma in DMF peptide grade were used. For 50 µmol-scale synthesis, a 0.25 M solution of DIC in DMF peptide grade and a 0.5 M solution of Oxyma in DMF peptide grade were used. At the end of the synthesis, the beads were transferred from the microwave reactor to polypropylene tubes containing polyethylene frits and closed with polypropylene caps for additional deprotection, coupling and cleavage.

### 3.3. Solid-phase peptide synthesis: monitoring

The progress rate of solid-phase peptide reactions was monitored using the Kaiser test (Sarin et al. 1981), the TNBS test (Hancock et Battersby 1976) and HPLC analysis after cleavage and deprotection of a small portion of peptide from the beads.

The Kaiser test was performed adding few beads, one drop of 0.3 M ninhydrin solution in EtOH, one drop of 43 M phenol solution in EtOH and three drops of 20 µM solution in 2% v/v H<sub>2</sub>O in pyridine to a small glass tube which was stirred heating using a heat gun. Dark blue beads show the presence of primary amines on the beads.

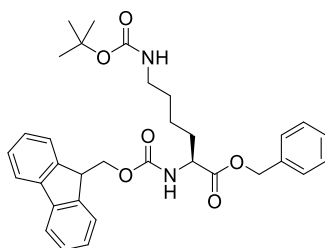
The TNBS test was performed adding few beads, 3 µL of TNBS and a drop of 10% DIPEA solution in DMF to a small glass tube which was stirred heating using a heat gun. Red or deep-orange beads show the presence of primary amines on the beads.

Reaction monitoring by cleavage and deprotection of a small portion of peptide from the beads was performed by transferring few beads to a 1.5 mL Eppendorf tube. Reagent K (50 µL, 82.5:5:5:5:2.5 v/v/v/v/v TFA/H<sub>2</sub>O/phenol/thioanisole/EDT) was added and the mixture was stirred at 25 °C for 30 min. In order to avoid the transfer of beads, only 40 µL of the mixture was

dropwise added to cold Et<sub>2</sub>O (400 μL). The obtained mixture was centrifuged at 25 °C for 2 min. The supernatant was removed by decantation. This washing step with cold Et<sub>2</sub>O (400 μL) was repeated twice. The precipitate was dissolved in a mixture of 9:1 ACN/H<sub>2</sub>O (50 μL) and then analyzed by HPLC.

### 3.4. Design and synthesis of fluorescent spexins and fluorospexins<sup>9</sup>

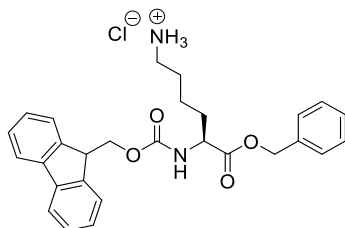
*Benzyl N<sup>2</sup>-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N<sup>6</sup>-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinate (2.2)*



To a solution of Fmoc-Lys(Boc)-OH (1.00 g, 2.13 mmol, 1 eq.) in anhydrous DCM (4.15 mL) at iced water temperature were added BnOH (265 μL, 2.56 mmol, 1.2 eq.), DCC (528 mg, 2.56 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (26.1 mg, 213 μmol, 0.1 eq.). The mixture was stirred at iced water temperature for 2 h and at 25 °C for 3 h. After filtration and evaporation of the DCM under vacuum, EtOAc (20 mL) was added and the organic layer was washed with water (3 x 20 mL), a 0.5 M HCl aqueous solution (20 mL), a NaHCO<sub>3</sub> sat. aqueous solution (20 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 0-30% v/v EtOAc in pentane to afford after evaporation under vacuum white crystals (1,01 g, 85%). HPLC t<sub>R</sub> = 6.21 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HPLC t<sub>R</sub> = 8.33 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (d, *J* = 7.53 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 7.28 Hz, 2H), 7.26 - 7.54 (m, 9H), 5.41 (d, *J* = 7.03 Hz, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.18 (q, *J* = 12.13 Hz, 2H), 4.48 - 4.57 (m, 1H) 4.51 (s, 1H) 4.34 - 4.45 (m, 1H) 4.33 - 4.54 (m, 1H), 4.33 - 4.34 (m, 1H), 4.22 (t, *J* = 7.03 Hz, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.28 Hz, 1H), 3.07 (d, *J* = 6.02 Hz, 2H), 2.05 (s, 1H), 1.79 - 1.96 (m, 1H), 1.70 - 1.71 (m, 1H), 1.70 - 1.71 (m, 1H), 1.65 - 1.77 (m, 1H), 1.62 (s, 1H), 1.39 - 1.40 (m, 1H), 1.28 - 1.53 (m, 10H), 1.28 - 1.39 (m, 1H).

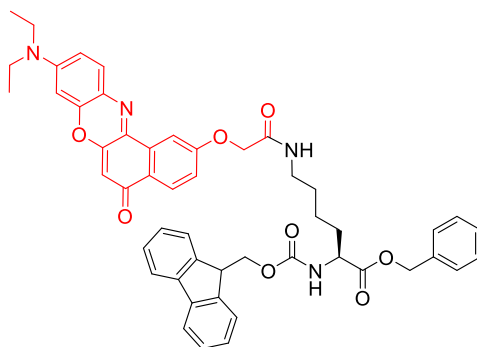
<sup>9</sup> Compound **2.2** was synthesized according to Rafai Far, et al. (Rafai Far et al. 2011).

*(S)*-5-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-(benzyloxy)-6-oxohexan-1-aminium chloride (**2.3**)



To the compound **2.2** (1.01 g, 1.81 mmol, 1 eq.) was added a 4 M HCl solution in 1,4-dioxane (17.8 mL, 71.2 mmol, 39 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 4.5 h. 1,4-Dioxane was evaporated under reduced pressure and co-evaporated with toluene (3 x 17 mL) to afford after evaporation under vacuum a pale yellow solid (896 mg, quant.). HPLC  $t_R$  = 4.52 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HPLC  $t_R$  = 5.68 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.95 - 8.16 (m, 2H), 7.87 - 7.93 (m, 2H), 7.71 (d,  $J$  = 6.78 Hz, 2H), 7.13 - 7.50 (m, 10H), 5.13 (s, 2H), 4.25 - 4.44 (m, 1H), 3.97 - 4.49 (m, 1H), 3.97 - 4.24 (m, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.64 - 2.83 (m, 2H), 1.70 (s, 2H), 1.55 (s, 2H), 1.35 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.18, 156.19, 143.80, 143.72, 140.72, 135.93, 128.39, 128.01, 127.75, 127.62, 127.05, 125.20, 120.18, 120.05, 65.90, 65.66, 53.85, 46.63, 38.34, 29.96, 26.38, 22.40.

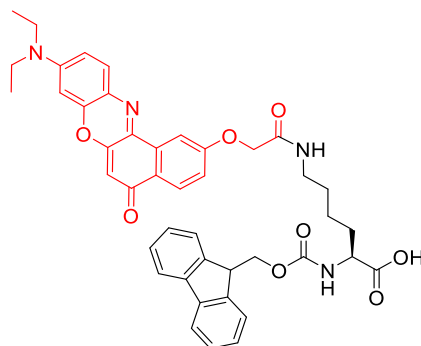
Benzyl  $N^2$ -((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)- $N^6$ -(2-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[*a*]phenoxazin-2-yl)oxy)acetyl)-L-lysinate (**2.4**)



To the compound NR-COOH (44.6 mg, 113  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) were added a solution of **2.3** (56.0 mg, 113  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (700  $\mu\text{L}$ ), a solution of PYBOP (70.6 mg, 136  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) in anhydrous DMF (700  $\mu\text{L}$ ) and DIPEA (112  $\mu\text{L}$ , 678  $\mu\text{mol}$ , 6 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 2.5 h. EtOAc (30 mL) was added and the organic layer was washed with a 30  $\mu\text{M}$  HCl aqueous solution (20 mL) and brine (20 mL). The obtained aqueous layer was extracted with EtOAc (20 mL). The gathered organic layers were dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and

concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 70-90% v/v EtOAc in heptane and then 10% v/v MeOH in EtOAc to afford after evaporation under vacuum a dark purple solid (91 mg, 96%). HPLC  $t_R$  = 6.54 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.21 (d,  $J$  = 8.54 Hz, 2H) 8.01 - 8.07 (m, 2H) 7.75 - 7.79 (m, 5H) 7.68 (d,  $J$  = 7.63 Hz, 1H) 7.67 - 7.69 (m, 1H) 7.59 (d,  $J$  = 8.85 Hz, 1H) 7.52 - 7.54 (m, 1H) 7.39 - 7.41 (m, 4H) 7.31 - 7.35 (m, 5H) 6.66 - 6.70 (m, 1H) 6.48 (d,  $J$  = 2.75 Hz, 1H) 6.36 (s, 1H) 5.50 (s, 1H) 5.49 (s, 1H) 4.64 (s, 2H) 4.38 - 4.44 (m, 2H) 4.36 (t,  $J$  = 7.02 Hz, 1H) 4.17 (t,  $J$  = 6.87 Hz, 1H) 3.49 (q,  $J$  = 7.22 Hz, 4H) 3.29 - 3.38 (m, 2H) 1.82 - 1.94 (m, 2H) 1.67 - 1.78 (m, 2H) 1.55 - 1.65 (m, 2H) 1.26 - 1.29 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  181.63, 172.38, 167.87, 159.63, 156.17, 152.15, 151.71, 147.24, 143.93, 143.83, 141.32, 138.17, 135.40, 134.20, 131.72, 128.75, 128.61, 128.40, 128.03, 127.77, 127.11, 126.04, 125.85, 125.14, 120.00, 118.06, 110.99, 106.95, 104.30, 96.32, 67.41, 67.30, 67.18, 53.88, 48.56, 48.52, 47.24, 46.52, 46.47, 45.48, 38.78, 32.17, 29.39, 29.09, 26.53, 26.45, 26.26, 26.16, 22.53, 12.76. LRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 833.3550, found: 833.3581.

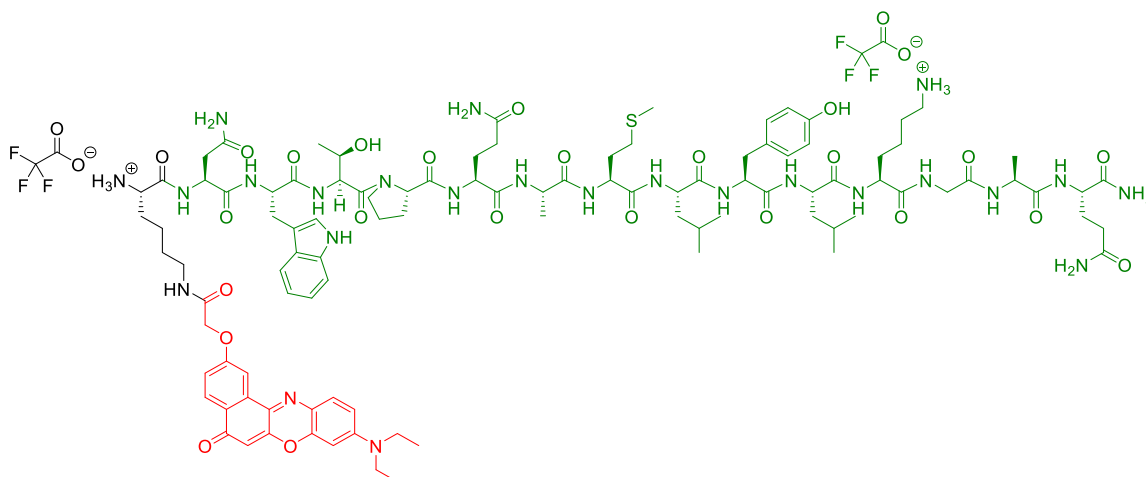
### **Fmoc-Lys(NR)-OH**



To a solution of **2.4** (16 mg, 19.5  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous MeOH (1.5 mL), flushed with argon, was added Pd/C (5.0 mg, 10 wt. % loading, 4.70  $\mu\text{mol}$ , 0.2 eq.) and the mixture, flushed with argon and then with  $\text{H}_2$ , was stirred under  $\text{H}_2$  at 25  $^\circ\text{C}$  for 20 h. After filtration through Celite and evaporation under reduced pressure, the obtained residue was dissolved in anhydrous MeOH (1.5 mL), flushed with argon, Pd/C (10 mg, 10 wt. % loading, 9.40  $\mu\text{mol}$ , 0.5 eq.) was added and the mixture, flushed with argon and then with  $\text{H}_2$ , was stirred under  $\text{H}_2$  at 25  $^\circ\text{C}$  for 2 h. After filtration through Celite and evaporation under vacuum, the crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 10-70% v/v ACN (0.1% TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (5.5 mg, 38%). HPLC  $t_R$  = 5.39 min (> 95% purity

[220.8 nm], Method A),  $t_R = 6.82$  min (> 95% purity [220.8 nm], Method C).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.47 (s, 1H), 8.28 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 8.03 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.94 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.69 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.62 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.38 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.29 (t,  $J = 7.8$  Hz, 3H), 6.75 (dd,  $J = 9.2, 2.7$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 4.64 (s, 3H), 4.25 (dd,  $J = 7.2, 3.7$  Hz, 2H), 4.21 – 4.16 (m, 1H), 3.99 – 3.85 (m, 1H), 3.46 (q,  $J = 7.0$  Hz, 5H), 3.17 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.75 – 1.67 (m, 1H), 1.67 – 1.58 (m, 1H), 1.58 – 1.42 (m, 2H), 1.35 (tt,  $J = 14.5, 7.1$  Hz, 2H), 1.14 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  181.23, 173.94, 166.89, 160.16, 156.12, 151.70, 150.80, 146.40, 143.77, 140.65, 138.06, 133.41, 130.79, 127.56, 127.17, 126.98, 125.29, 125.23, 125.19, 123.97, 120.02, 117.59, 110.09, 107.26, 104.04, 95.95, 67.02, 65.57, 53.72, 46.63, 44.42, 38.11, 30.39, 28.67, 23.01, 12.42. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 743.3081, found: 743.3062.

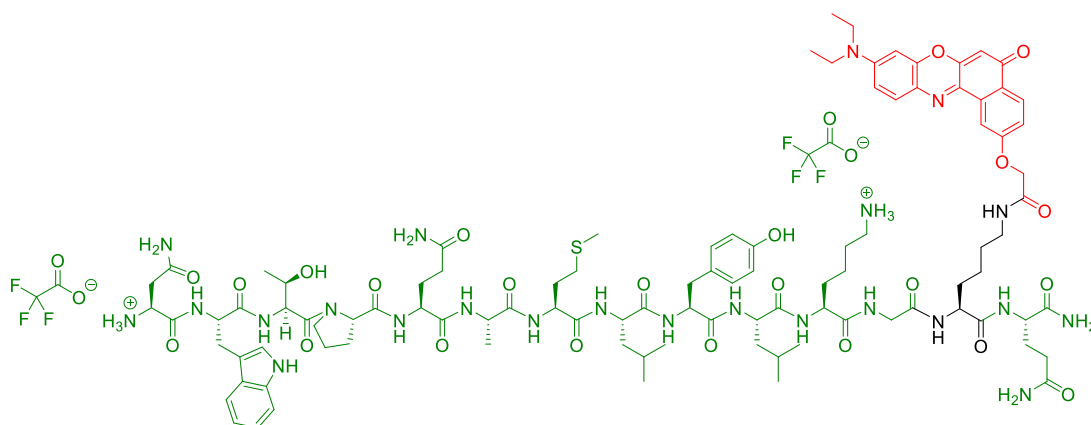
### LIT-01-255



Fmoc Rink Amide beads (250 mg, 100  $\mu\text{mol}$ ) were swollen in DMF and then introduced into the microwave reactor of a CEM Liberty Blue automated microwave-assisted peptide synthesizer. The peptide sequence Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(*t*-Bu)PQ(Trt)AMLY(*t*-Bu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink was automatically synthesized (section 3.2.). The beads were washed three times with  $\text{Et}_2\text{O}$  and dried under vacuum. A tenth of the obtained resin-bound peptide (52 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) was transferred to a 1 mL fritted syringe tube and swollen in DMF for 30 min. DMF was removed, a solution of 20% v/v piperidine in DMF (250  $\mu\text{L}$ , 2.53 mmol, 253 eq.) was added and the mixture was stirred at 25  $^\circ\text{C}$  for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of Fmoc-

Lys(Mmt)-OH (12.8 mg, 20  $\mu$ mol, 2 eq.), HATU (7.2 mg, 19  $\mu$ mol, 1.9 eq.) and DIPEA (13.8  $\mu$ L, 80  $\mu$ mol, 8 eq.) in anhydrous DMF (250  $\mu$ L). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM to afford the peptide sequence **2.8**. The beads were then swollen in DCM for 30 min. For the cleavage of the Mmt protecting group, DCM was removed, a mixture of 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM (250  $\mu$ L) was added and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 2 min. The liquid was removed, the beads were washed with DCM and this step was repeated 10 times. The presence of the Mmt residue in solution was monitored by analytical HPLC. After the complete cleavage of the Mmt group, the beads were washed with a solution of 10% DIPEA in DCM (3 x 250  $\mu$ L), two times with DCM, MeOH and DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of NR-COOH (3.9 mg, 10  $\mu$ mol, 1 eq.) and PyBOP (13 mg, 25  $\mu$ mol, 2.5 eq.) in anhydrous DMF (250  $\mu$ L) and DIPEA (13.8  $\mu$ L, 80  $\mu$ mol, 8 eq.). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. To cleave the N-terminal Fmoc group, to the beads was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (250  $\mu$ L, 2.53 mmol, 253 eq.). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 15 min, the liquid was removed and this step was repeated once. For the cleavage from the resin and the final deprotection, the beads were washed five times with DMF, three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. A cleavage cocktail K (0.9 mL) was added to the beads and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 2 h. The filtrate was dropwise added to cold Et<sub>2</sub>O (8 mL), the mixture was centrifuged for 2 min and the supernatant was removed. The precipitate was resuspended in cold Et<sub>2</sub>O (8 mL), centrifuged, the supernatant was removed and this step was repeated once. The precipitate was lyophilized and then purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 20-70% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (3.1 mg, 15%). HPLC  $t_R$  = 4.52 min (> 95% purity [220.8 nm], Method C). HRMS (ESI) calcd for C<sub>102</sub>H<sub>146</sub>N<sub>24</sub>O<sub>24</sub>S ([M+2H]<sup>2+</sup>)/2: 1061.5331, found: 1061.5359.

## LIT-01-256

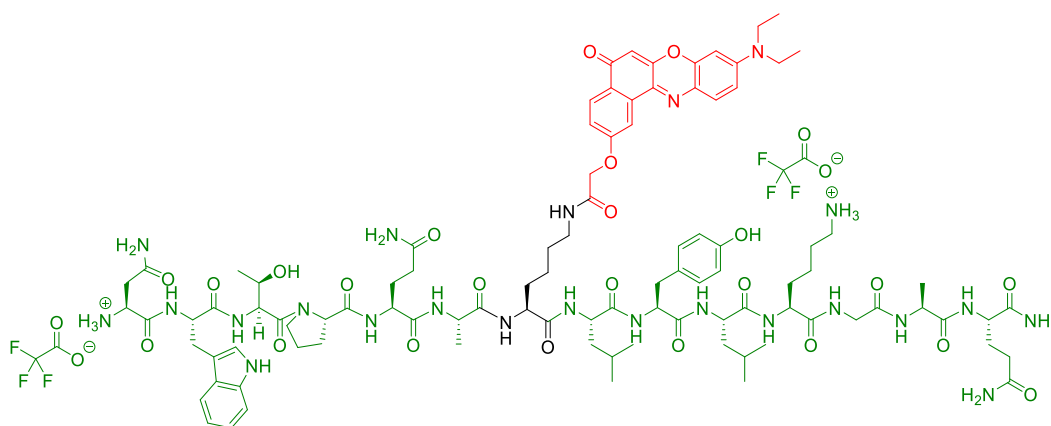


Fmoc Rink Amide beads (125 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) were swollen in DMF for 30 min in a 3 mL fritted syringe tube. DMF was removed, a solution of 20% v/v piperidine in DMF (1.25 mL, 12.7 mmol, 253 eq.) was added and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads were added a mixture of Fmoc-Gln(Trt)-OH (122 mg, 200  $\mu\text{mol}$ , 4 eq.), HBTU (72.1 mg, 190  $\mu\text{mol}$ , 3.8 eq.), HOBT (27.0 mg, 200  $\mu\text{mol}$ , 4 eq.) and DIPEA (105  $\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{mol}$ , 12 eq.) in anhydrous DMF (1.25 mL). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 45 min. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. To the beads was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (1.25 mL, 12.7 mmol, 253 eq.) and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of Fmoc-Lys(Mmt)-OH (64 mg, 100  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.), HATU (36 mg, 95  $\mu\text{mol}$ , 1.9 eq.) and DIPEA (69  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.) in anhydrous DMF (1.25 mL). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. The beads were introduced into the microwave reactor of a CEM Liberty Blue automated microwave-assisted peptide synthesizer. The peptide sequence Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(*t*-Bu)PQ(Trt)AMLY(*t*-Bu)LK(Boc)G was coupled to the resin-bound peptide with this synthesizer to afford the peptide sequence **2.7** (section 3.2.). The beads were washed three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. Half of the obtained resin-bound peptide (144 mg, 25  $\mu\text{mol}$ ) was transferred to a 3 mL fritted syringe tube and then swollen in DCM for 30 min. For the cleavage of the Mmt protecting group, DCM was removed, a mixture of 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM (625  $\mu\text{L}$ ) was added and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 2 min. The liquid was removed, the beads were washed with DCM and this step was repeated 16 times.



The presence of the Mmt residue in solution was monitored by analytical HPLC. After the complete cleavage of the Mmt group, the beads were washed with a solution of 10% DIPEA in DCM (3 x 625  $\mu$ L), two times with DCM, MeOH and DMF and once with anhydrous DMF. To the beads were added a mixture of NR-COOH (9.8 mg, 25  $\mu$ mol, 1 eq.) and PyBOP (33 mg, 63  $\mu$ mol, 2.5 eq.) in anhydrous DMF (625  $\mu$ L) and DIPEA (33  $\mu$ L, 200  $\mu$ mol, 8 eq.). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. To cleave the N-terminal Fmoc group, to the beads was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (650  $\mu$ L, 6.33 mmol, 253 eq.) and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. For the cleavage from the resin and the final deprotection, the beads were washed five times with DMF, three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. A cleavage cocktail K (2.3 mL) was added to the beads and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 3 h. The filtrate was dropwise added to cold Et<sub>2</sub>O (20 mL), the mixture was centrifuged for 2 min and the supernatant was removed. The precipitate was resuspended in cold Et<sub>2</sub>O (20 mL), centrifuged, the supernatant was removed and this step was repeated once. The precipitate was lyophilized and then purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 20–70% v/v ACN (0.1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (1.8 mg, 4%). HPLC  $t_R$  = 3.98 min (> 95% purity [220.8 nm], Method C). HRMS (ESI) calcd for C<sub>99</sub>H<sub>139</sub>N<sub>23</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>23</sub>S ([M+2Na]<sup>2+</sup>)/2: 1047.9965, found: 1047.9971.

### LIT-01-257

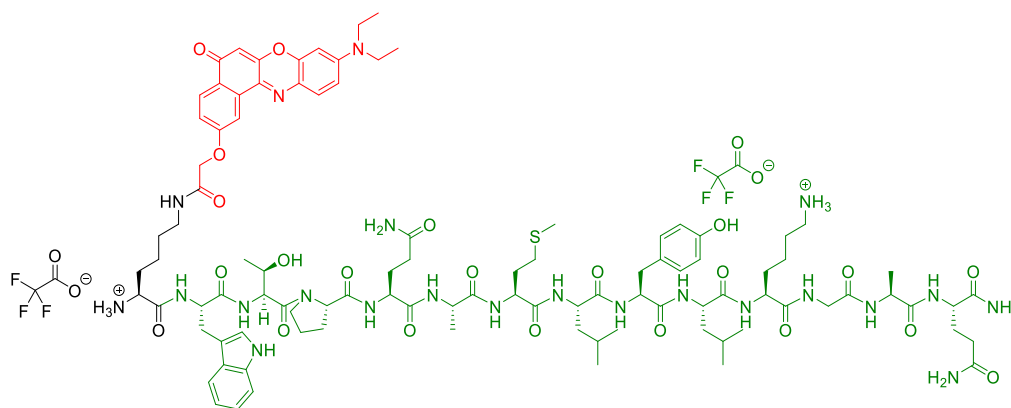


Fmoc Rink Amide beads (125 mg, 50  $\mu$ mol) were swollen in DMF and then introduced into the microwave reactor of a CEM Liberty Blue automated microwave-assisted peptide synthesizer. The peptide sequence Fmoc-LY(t-Bu)LK(Boc)GAN(Trt)-Rink was automatically synthesized (section 3.2.). The

obtained resin-bound peptide (50  $\mu\text{mol}$ ) was introduced in a 3 mL fritted syringe tube and a solution of 20% v/v piperidine in DMF (1.25 mL, 12.7 mmol, 253 eq.) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of Fmoc-Lys(Mmt)-OH (64 mg, 100  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.), HATU (36 mg, 95  $\mu\text{mol}$ , 1.9 eq.) and DIPEA (69  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.) in anhydrous DMF (1.25 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. The beads were introduced into the microwave reactor of a CEM Liberty Blue automated microwave-assisted peptide synthesizer. The peptide sequence Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(*t*-Bu)PQ(Trt)A was coupled to the resin-bound peptide with this synthesizer to afford the peptide sequence **2.6** (section 3.2.). The beads were washed three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. Half of the obtained resin-bound peptide (135 mg, 25  $\mu\text{mol}$ ) was transferred to a 3 mL fritted syringe tube and then swollen in DCM for 30 min. For the cleavage of the Mmt protecting group, DCM was removed, a mixture of 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM (625  $\mu\text{L}$ ) was added and the mixture was stirred at 25 °C for 2 min. The liquid was removed, the beads were washed with DCM and this step was repeated 15 times. The presence of the Mmt residue in solution was monitored by analytical HPLC. After the complete cleavage of the Mmt group, the beads were washed with a solution of 10% DIPEA in DCM (3 x 625  $\mu\text{L}$ ), two times with DCM, MeOH and DMF and once with anhydrous DMF. To the beads were added a mixture of NR-COOH (9.8 mg, 25  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and PyBOP (33 mg, 63  $\mu\text{mol}$ , 2.5 eq.) in anhydrous DMF (625  $\mu\text{L}$ ) and DIPEA (33  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. To cleave the N-terminal Fmoc group, to the beads was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (650  $\mu\text{L}$ , 6.33 mmol, 253 eq.) and the mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. For the cleavage from the resin and the final deprotection, the beads were washed five times with DMF, three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. A cleavage cocktail K (2.3 mL) was added to the beads and the mixture was stirred at 25 °C for 3 h. The filtrate was dropwise added to cold Et<sub>2</sub>O (20 mL), the mixture was centrifuged for 2 min and the supernatant was removed. The precipitate was resuspended in cold Et<sub>2</sub>O (20 mL), centrifuged, the supernatant was removed and this step was repeated once. The precipitate was lyophilized and then purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 5-60% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1%

TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (1.8 mg, 4%). HPLC  $t_R = 3.89$  min ( $> 95\%$  purity [220.8 nm], Method C). HRMS (ESI) calcd for  $C_{97}H_{135}N_{23}Na_2O_{23}$  ( $[M+2Na]^{2+}$ )/2: 1017.9948, found: 1017.9950.

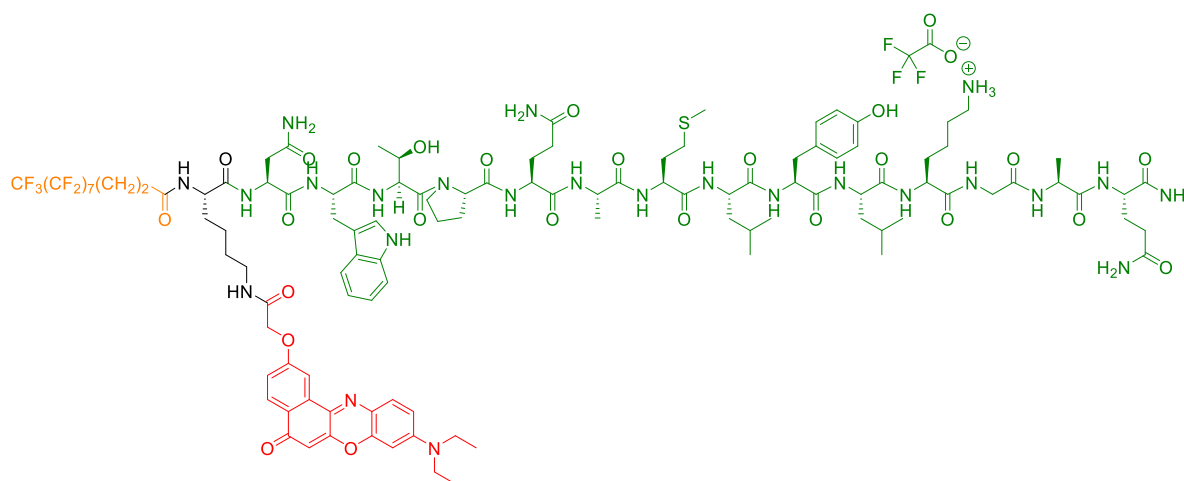
### LIT-01-258



Fmoc Rink Amide beads (125 mg, 50  $\mu$ mol) were swollen in DMF and then introduced into the microwave reactor of a CEM Liberty Blue automated microwave-assisted peptide synthesizer. The peptide sequence Fmoc-W(Boc)T(*t*-Bu)PQ(Trt)AMLY(*t*-Bu)LK(Boc)GAQ(Trt)-Rink was automatically synthesized (section 3.2.). The obtained resin-bound peptide (50  $\mu$ mol) was introduced in a 3 mL fritted syringe tube and a solution of 20% v/v piperidine in DMF (1.25 mL, 12.7 mmol, 253 eq.) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of Fmoc-Lys(Mmt)-OH (64 mg, 100  $\mu$ mol, 2 eq.), HATU (36 mg, 95  $\mu$ mol, 1.9 eq.) and DIPEA (69  $\mu$ L, 400  $\mu$ mol, 8 eq.) in anhydrous DMF (1.25 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM to afford the peptide sequence **2.5**. The beads were washed three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. Half of the obtained resin-bound peptide (126 mg, 25  $\mu$ mol) was transferred to a 3 mL fritted syringe tube and then swollen in DCM for 30 min. For the cleavage of the Mmt protecting group, DCM was removed, a mixture of 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM (625  $\mu$ L) was added and the mixture was stirred at 25 °C for 2 min. The liquid was removed, the beads were washed with DCM and this step was repeated 15 times. The presence of the Mmt residue in solution was monitored by analytical HPLC. After the complete cleavage of the Mmt group, the beads were washed with a solution of 10% DIPEA in DCM (3 x 625  $\mu$ L), two times with DCM, MeOH and DMF and once with anhydrous DMF. To the beads were added a mixture

of NR-COOH (9.8 mg, 25  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and PyBOP (33 mg, 63  $\mu\text{mol}$ , 2.5 eq.) in anhydrous DMF (625  $\mu\text{L}$ ) and DIPEA (33  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. To cleave the N-terminal Fmoc group, to the beads was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (650  $\mu\text{L}$ , 6.33 mmol, 253 eq.) and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. For the cleavage from the resin and the final deprotection, the beads were washed five times with DMF, three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. A cleavage cocktail K (2.3 mL) was added to the beads and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h. The filtrate was dropwise added to cold Et<sub>2</sub>O (20 mL), the mixture was centrifuged for 2 min and the supernatant was removed. The precipitate was resuspended in cold Et<sub>2</sub>O (20 mL), centrifuged, the supernatant was removed and this step was repeated once. The precipitate was lyophilized and then purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 5-60% v/v ACN (0.1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (0.4 mg, 1%). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 4.09 min (> 95% purity [220.8 nm], Method C). HRMS (ESI) calcd for C<sub>98</sub>H<sub>138</sub>N<sub>22</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>22</sub>S ([M+2Na]<sup>2+</sup>)/2: 1026.4936, found: 1026.4955.

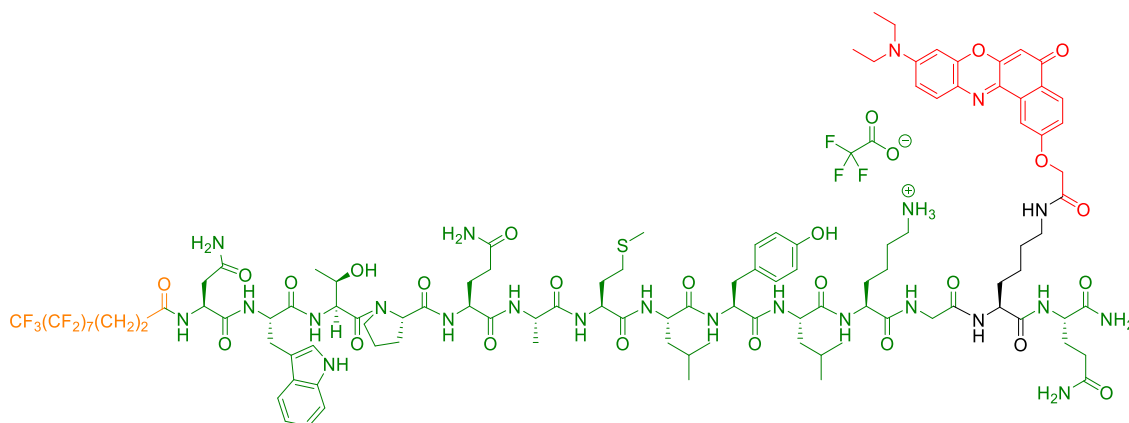
### LIT-01-260



To the peptide sequence **2.8** (10  $\mu\text{mol}$ ) was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (250  $\mu\text{L}$ , 506  $\mu\text{mol}$ , 51 eq.) and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH (9.8 mg, 20  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.), HATU (7.2 mg, 19  $\mu\text{mol}$ , 1.9 eq.) and DIPEA (13.8  $\mu\text{L}$ , 80  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.) in anhydrous DMF (250  $\mu\text{L}$ ). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The beads were washed three times with DMF,

MeOH and DCM. The beads were then swollen in DCM for 30 min. For the cleavage of the Mmt protecting group, DCM was removed, a mixture of 1:2:7 v/v AcOH/TFE/DCM (250  $\mu$ L) was added and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 2 min. The liquid was removed, the beads were washed with DCM and this step was repeated nine times. The presence of the Mmt residue in solution was monitored by analytical HPLC. After the complete cleavage of the Mmt group, the beads were washed with a solution of 10% DIPEA in DCM (3 x 250  $\mu$ L) and two times with DCM, MeOH and DMF. The beads were washed with anhydrous DMF. To the beads were added a mixture of NR-COOH (3.9 mg, 10  $\mu$ mol, 1 eq.) and PyBOP (13 mg, 25  $\mu$ mol, 2.5 eq.) in anhydrous DMF (250  $\mu$ L) and DIPEA (13.8  $\mu$ L, 80  $\mu$ mol, 8 eq.). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 1 h. For the cleavage from the resin and the final deprotection, the beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM, three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. A cleavage cocktail K (0.9 mL) was added to the beads and the mixture was stirred at 25  $^{\circ}$ C for 2 h. The filtrate was dropwise added to cold Et<sub>2</sub>O (8 mL), the mixture was centrifuged for 2 min and the supernatant was removed. The precipitate was resuspended in cold Et<sub>2</sub>O (8 mL), centrifuged, the supernatant was removed and this step was repeated once. The precipitate was lyophilized and then purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 30-90% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (2.2 mg, 8%). HPLC  $t_r$  = 6.26 min (> 95% purity [220.8 nm], Method C). HRMS (ESI) calcd for C<sub>113</sub>H<sub>147</sub>F<sub>17</sub>N<sub>24</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>25</sub>S ([M+2Na]<sup>2+</sup>)/2: 1320.5107, found: 1320.5124.

### LIT-01-261

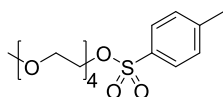


Fmoc Rink Amide beads (25 mg, 10  $\mu$ mol) were introduced in a 1 mL fritted syringe tube and swollen in DMF for 30 min. DMF was removed, a solution of 20% v/v piperidine in DMF (250  $\mu$ L, 2.53 mmol, 253 eq.) was added and the

mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of Fmoc-Gln(Trt)-OH (24 mg, 40  $\mu$ mol, 4 eq.), HBTU (14 mg, 38  $\mu$ mol, 3.8 eq.), HOBt (5.4 mg, 40  $\mu$ mol, 4 eq.) and DIPEA (21  $\mu$ L, 120  $\mu$ mol, 12 eq.) in anhydrous DMF (250  $\mu$ L). The mixture was stirred at 25 °C for 45 min. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. To the beads was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (250  $\mu$ L, 2.53 mmol, 253 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of Fmoc-Lys(NR)-OH (11 mg, 15  $\mu$ mol, 1.5 eq.), HATU (5.3 mg, 14  $\mu$ mol, 1.4 eq.) and DIPEA (10.5  $\mu$ L, 60  $\mu$ mol, 6 eq.) in anhydrous DMF (190  $\mu$ L). The mixture was stirred at 25 °C for 1 h. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. To the beads was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (250  $\mu$ L, 2.53 mmol, 253 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of Fmoc-Gly-OH (12 mg, 40  $\mu$ mol, 4 eq.), HATU (14 mg, 38  $\mu$ mol, 3.8 eq.) and DIPEA (21  $\mu$ L, 120  $\mu$ mol, 12 eq.) in anhydrous DMF (250  $\mu$ L). The mixture was stirred at 25 °C for 45 min. The beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM. The peptide sequence Fmoc-N(Trt)W(Boc)T(*t*-Bu)PQ(Trt)AMLY(*t*-Bu)LK(Boc) was coupled to the resin-bound peptide following the same procedures of deprotection and coupling as those used for the introduction of the Fmoc-Gly-OH to afford the peptide sequence **2.9**. To the obtained resin-bound peptide was added a solution of 20% v/v piperidine in DMF (250  $\mu$ L, 2.53 mmol, 253 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 15 min. The liquid was removed and this step was repeated once. The beads were washed five times with DMF and once with anhydrous DMF. To the beads was added a mixture of CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH (9.8 mg, 20  $\mu$ mol, 2 eq.), HATU (7.2 mg, 19  $\mu$ mol, 1.9 eq.) and DIPEA (13.8  $\mu$ L, 80  $\mu$ mol, 8 eq.) in anhydrous DMF (250  $\mu$ L). The mixture was stirred at 25 °C for 1 h. For the cleavage from the resin and the final deprotection, the beads were washed three times with DMF, MeOH and DCM, three times with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. A cleavage cocktail K (0.9 mL) was added to the beads and the mixture was stirred at 25 °C for 2.5 h. The filtrate was dropwise added to cold Et<sub>2</sub>O (8.5 mL), the mixture was centrifuged for 2 min and the supernatant was removed. The precipitate was resuspended in cold Et<sub>2</sub>O (8.5 mL), centrifuged, the supernatant was removed and this step was repeated once.

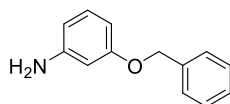
The precipitate was lyophilized and then purified by reverse-phase semi-preparative HPLC using a linear gradient of 20-65% v/v ACN (0.1% v/v TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% v/v TFA) to afford after lyophilization a dark purple solid (1.8 mg, 7%). HPLC  $t_R$  = 5.65 min (> 95% purity [220.8 nm], Method C). HRMS (ESI) calcd for C<sub>110</sub>H<sub>142</sub>F<sub>17</sub>N<sub>23</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>24</sub>S ([M+2Na]<sup>2+</sup>)/2: 1284.9921, found: 1284.9933.

### 2,5,8,11-Tetraoxatridecan-13-yl 4-methylbenzenesulfonate (**2.11**)



To a solution of 2-(2-(2-((ethyl(methyl)-1,3-oxidaneyl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (700  $\mu$ L, 3.32 mmol, 1 eq.) in THF (960  $\mu$ L) at iced water temperature was added a solution of NaOH (243 mg, 6.08 mmol, 1.8 eq.) in distilled water (829  $\mu$ L). The mixture was stirred at iced water temperature for 15 min. To the obtained mixture at iced water temperature was dropwise added for a period of 15 min a solution of TsCl (632 mg, 3.32 mmol, 1 eq.) in THF (1.39 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 2 h. THF was evaporated under reduced pressure and distilled water (25 mL) was added. The organic layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 x 25 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to afford a pale yellow liquid (1.19 g, 99%). HPLC  $t_R$  = 3.84 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.71 - 7.85 (m, 2H), 7.32 (d,  $J$  = 8.03 Hz, 2H), 4.02 - 4.22 (m, 2H), 3.44 - 3.76 (m, 14H) 3.35 (s, 3H), 2.42 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.76, 133.13, 129.81, 127.96, 71.94, 70.74, 70.60, 70.52, 69.24, 68.68, 58.98, 21.60. LRMS (ESI) calcd for C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>): 363.148, found: 363.146.

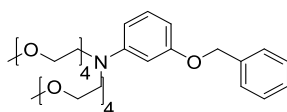
### 3-(Benzyloxy)aniline (**2.13**)



To a solution of 3-aminophenol (1.0 g, 9.16 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (50 mL) at iced water temperature was added *t*-BuOK (2.1 g, 18.3 mmol, 2 eq.). The mixture color changed from yellow to purple. The reaction was stirred at iced water temperature for 30 min. Then at iced water temperature was dropwise added (10 mL/h) a solution of BnBr (1.1 mL, 9.16 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (40 mL). The mixture color changed from purple to brown and was stirred at 25 °C for 14 h. After evaporation of the DMF under reduced pressure, the crude product

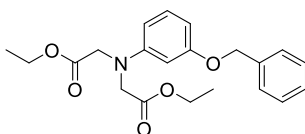
was purified on a silica gel column eluted with 20-100% v/v EtOAc in heptane and then 10% v/v MeOH in EtOAc to afford after evaporation under vacuum an orange oil (1.7 g, 95%). HPLC  $t_R$  = 3.05 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.49 – 7.29 (m, 5H), 7.09 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 6.44 (ddd,  $J$  = 8.2, 2.3, 0.9 Hz, 1H), 6.38 – 6.30 (m, 2H), 5.04 (s, 2H), 3.71 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.11, 147.79, 130.23, 128.64, 127.96, 127.54, 108.36, 105.05, 102.20, 69.92.

*N*-(3-(Benzyloxy)phenyl)-*N*-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-amine (**2.14**)



To the compound **2.11** (954 mg, 2.63 mmol, 3.5 eq.) were added a solution of **2.13** (150 mg, 753  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (3.5 mL) and DIPEA (747  $\mu\text{L}$ , 4.52 mmol, 6 eq.). The mixture was heated in a sealed glass tube at 160 °C for 45 min by MW. Water (150 mL) was added and the organic layer was extracted with DCM (2 x 100 mL), washed with brine (2 x 100 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column neutralized with 2% v/v  $\text{Et}_3\text{N}$ , eluted with 70-90% v/v EtOAc in heptane and then 10% v/v MeOH in DCM to afford after evaporation under vacuum a pale yellow oil (358 mg, 82%). HPLC  $t_R$  = 5.31 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.46 – 7.40 (m, 2H), 7.38 (ddd,  $J$  = 7.6, 6.7, 1.4 Hz, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 1H), 7.12 – 7.06 (m, 1H), 6.39 – 6.22 (m, 3H), 5.03 (s, 2H), 3.66 – 3.51 (m, 32H), 3.37 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.28, 149.31, 137.52, 130.06, 128.66, 127.95, 127.64, 105.23, 101.82, 99.38, 72.06, 70.79, 70.76, 70.74, 70.64, 70.02, 68.62, 59.14, 51.13. LRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{NNaO}_9$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ): 602.3305, found: 602.3326.

3-(Benzyloxy)-*N,N*-bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)benzenamine (**2.15**)

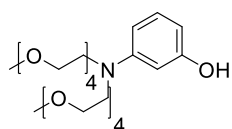


To a solution of ethyl bromoacetate (278  $\mu\text{L}$ , 2.51 mmol, 5 eq.) in anhydrous ACN (320  $\mu\text{L}$ ) were added a solution of **2.13** (100 mg, 502  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in

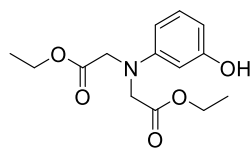


anhydrous ACN (1 mL), NaI (376 mg, 2.51 mmol, 5 eq.) and DIPEA (415  $\mu$ L, 2.51 mmol, 5 eq.). The mixture was stirred at 80 °C for 26 h. DCM (30 mL) was added and the organic layer was washed with water (2 x 20 mL). The obtained aqueous layer was extracted with DCM (20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica column eluted with 20% v/v EtOAc in heptane to afford after evaporation under vacuum a pale yellow oil (172 mg, quant.). HPLC  $t_R$  = 7.53 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.48 – 7.27 (m, 5H), 7.12 (td,  $J$  = 8.0, 0.7 Hz, 1H), 6.42 (ddd,  $J$  = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1H), 6.31 – 6.14 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.21 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 4H), 4.11 (s, 4H), 1.27 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.95, 160.13, 149.48, 137.33, 130.16, 129.95, 128.68, 128.12, 128.02, 127.68, 105.92, 104.17, 100.47, 70.89, 70.72, 70.66, 70.08, 61.24, 53.64, 29.83, 14.36. LRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NNaO<sub>5</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>): 394.1630, found: 394.1619.

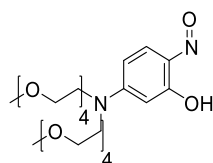
*N*-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-amine (**2.16**)



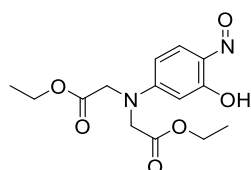
To a solution of **2.14** (132 mg, 228  $\mu$ mol, 1 eq.) in anhydrous MeOH (2.5 mL), flushed with argon, was added Pd/C (26.4 mg, 10 wt. % loading, 24.8  $\mu$ mol, 0.1 eq.) and the mixture, flushed with argon and then with H<sub>2</sub>, was stirred under H<sub>2</sub> at 25 °C and 1 atm. for 18 h. The mixture was filtered through Celite and the filtrate was evaporated under vacuum to afford a pale yellow oil (102 mg, 91%). HPLC  $t_R$  = 3.79 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.19 (s, 1H), 7.28 – 7.17 (m, 2H), 6.85 (ddd,  $J$  = 8.3, 6.1, 2.1 Hz, 2H), 3.71 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 4H), 3.67 – 3.58 (m, 12H), 3.53 (ddt,  $J$  = 7.4, 6.0, 3.7 Hz, 11H), 3.47 (dd,  $J$  = 5.6, 3.0 Hz, 4H), 3.32 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159.03, 139.48, 130.90, 115.87, 111.29, 108.61, 71.89, 70.37, 70.33, 65.27, 58.94, 56.88. LRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>9</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 490.3016, found: 490.3027.

*Diethyl 2,2'-((3-hydroxyphenyl)azanediyl)diacetate (2.17)*

To a solution of **2.15** (442 mg, 1.19 mmol, 1 eq.) in anhydrous MeOH (11 mL), flushed with argon, was added Pd/C (88.0 mg, 10 wt. % loading, 82.7  $\mu$ mol, 0.1 eq.) and the mixture, flushed with argon and then with H<sub>2</sub>, was stirred under H<sub>2</sub> at 25 °C and 1 atm. for 14 h. The mixture was filtered through Celite and the filtrate was evaporated under vacuum to afford the desired product (315 mg, 94%). HPLC  $t_R$  = 3.60 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HPLC  $t_R$  = 5.73 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.04 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 6.32 - 6.00 (m, 3H), 4.21 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 4H), 4.10 (s, 4H), 1.27 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.98, 156.87, 149.45, 130.21, 105.51, 105.13, 99.97, 61.20, 53.55, 14.21. LRMS (ESI) calcd for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 282.1341, found: 282.1282.

*5-(Di(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)amino)-2-nitrosophenol (2.18)*

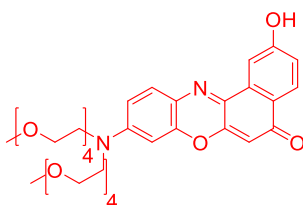
To a solution of **2.16** (7.6 mg, 15.5  $\mu$ mol, 1 eq.) in a mixture of water (17  $\mu$ L) and a 12 M HCl (23  $\mu$ L, 264  $\mu$ mol, 17 eq.) aqueous solution at iced water temperature was dropwise added a solution of NaNO<sub>2</sub> (1.3 mg, 18.3  $\mu$ mol, 1.2 eq.) in water (100  $\mu$ L). The mixture became orange and was stirred at iced water temperature for 1.5 h and then lyophilized to afford an orange oil (8 mg). This unstable product was directly used for the next transformation. HPLC  $t_R$  = 4.20 min (Method B).

*Diethyl 2,2'-((3-hydroxy-4-nitrosophenyl)azanediyl)diacetate (2.19)*

To a solution of **2.17** (125 mg, 444  $\mu$ mol, 1 eq.) in a mixture of water

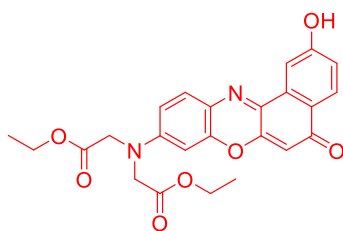
(1.49 mL) and a 12 M HCl (1.49 mL, 17.4 mmol, 39 eq.) aqueous solution at iced water temperature was dropwise added a solution of NaNO<sub>2</sub> (34.8 mg, 489 μmol, 1.1 eq.) in water (100 μL). The mixture became orange and was stirred at iced water temperature for 1 h and then concentrated under vacuum to afford a brown solid (138 mg). This unstable product was directly used for the next transformation. HPLC t<sub>R</sub> = 5.60 min (Method B).

*9-(Di(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)amino)-2-hydroxy-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (2.20)*



A solution of 1,6-dihydroxynaphthalene (10.9 mg, 67.4 μmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (510 μL) was added to **2.18** (34.9 mg, 67.4 μmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (1 mL). The mixture was stirred at 80 °C for 2.5 h. The crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 30-80% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (14.4 mg, 32%). HPLC t<sub>R</sub> = 4.10 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HPLC t<sub>R</sub> = 5.56 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.04 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.61 – 6.44 (m, 1H), 6.26 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 3.72 – 3.45 (m, 32H), 3.33 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182.41, 160.69, 151.95, 146.42, 138.99, 134.12, 131.10, 127.86, 125.91, 123.82, 118.73, 111.05, 109.24, 103.91, 96.76, 71.95, 70.79, 70.69, 70.65, 70.62, 70.50, 68.45, 59.03, 51.41. LRMS (ESI) calcd for C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 659.3180, found: 659.3195.

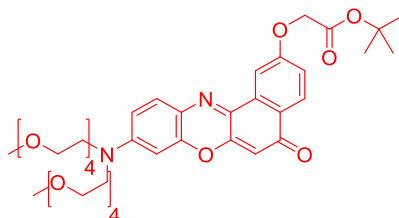
*Diethyl 2,2'-((2-hydroxy-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-9-yl)azanediyl)diacetate (2.21)*



A solution of **2.19** (97.2 mg, 313 μmol, 1 eq.) in EtOH (1.7 mL) was added

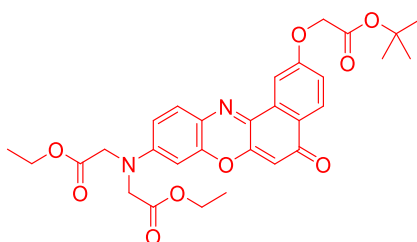
in four times to 1,6-dihydroxynaphtalene (50.8 mg, 314  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.). The mixture was stirred at 80 °C for 15 min after each addition. The volatiles were removed under reduced pressure and the crude product was purified on a silica column eluted with 50-100% v/v EtOAc in heptane and then with 20% v/v MeOH in EtOAc to afford after evaporation under vacuum a black solid (92.3 mg, 65%). HPLC  $t_R$  = 4.39 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HPLC  $t_R$  = 6.28 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.19 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.59 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.58 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.40 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.31 - 4.20 (m, 8H), 1.33 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H). LRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_7$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 451.1505, found: 451.1495.

*tert*-Butyl 2-((9-(di(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)amino)-5-oxo-5H-benzo[*a*]phenoxazin-2-yl)oxy)acetate (**2.22**)



To a solution of **2.20** (30 mg, 45.4  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (25 mg, 182  $\mu\text{mol}$ , 4 eq.) in acetone (701  $\mu\text{L}$ ) was added *tert*-butyl chloroacetate (13.4  $\mu\text{L}$ , 90.8  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 2 h and at 56 °C for 1 h. DCM (40 mL) was added and the organic layer was washed with brine (2 x 20 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. The crude compound was engaged into the next transformation without further purification. HPLC  $t_R$  = 5.38 min (Method A).

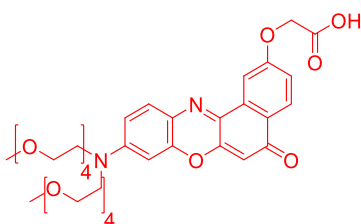
Diethyl 2,2'-((2-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethoxy)-5-oxo-5H-benzo[*a*]phenoxazin-9-yl)azanediyl)diacetate (**2.23**)



To a solution of **2.21** (90.8 mg, 202  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (223 mg, 1.61 mmol, 8 eq.) in acetone (6 mL) was added *tert*-butyl chloroacetate (178  $\mu\text{L}$ , 1.21

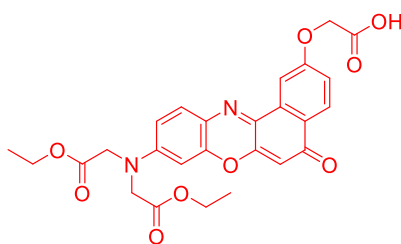
mmol, 6 eq.). The mixture was stirred under reflux for 9 h. After evaporation of the acetone under reduced pressure, EtOAc (60 mL) was added and the organic layer was washed with washed with water (20 mL), brine (15 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude compound was engaged into the next transformation without further purification. HPLC t<sub>R</sub> = 7.78 min (Method B).

### NR-PEG<sub>4</sub>-COOH



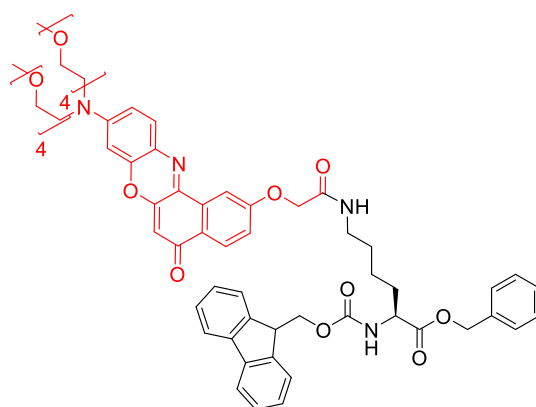
The obtained crude product **2.22** was dissolved in DCM (486  $\mu$ L) and TFA (325  $\mu$ L, 4.37 mmol, 96 eq.) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 15 h. After evaporation of the volatiles under reduced pressure, the crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 10-40% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (29.7 mg, 91%). HPLC t<sub>R</sub> = 4.12 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.02 (dd, *J* = 19.4, 8.7 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 29.9 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 35.8, 8.8 Hz, 1H), 7.33 – 7.11 (m, 1H), 6.83 (dd, *J* = 31.2, 9.7 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 41.1 Hz, 1H), 6.15 (d, *J* = 31.5 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 13.8 Hz, 2H), 3.70 – 3.32 (m, 32H), 3.21 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  181.25, 169.73, 160.27, 151.51, 146.08, 138.64, 133.30, 130.52, 127.17, 125.27, 124.10, 117.83, 110.36, 106.62, 104.20, 96.68, 71.25, 70.04, 69.84, 69.82, 69.77, 69.56, 67.93, 64.76, 57.99, 50.67. HRMS (ESI) calcd for C<sub>36</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 717.3235, found: 717.3256.

### NR-EA-COOH



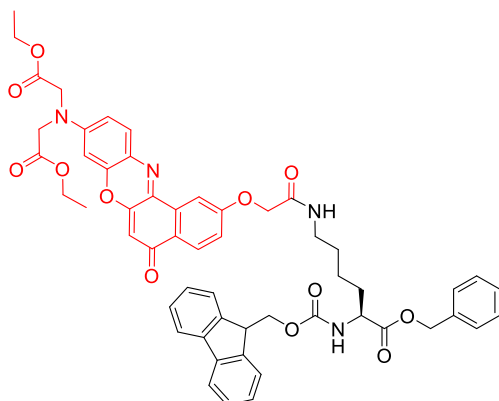
The obtained crude product **2.23** was dissolved in DCM (1.12 mL) and TFA (754  $\mu\text{L}$ , 10.2 mmol, 50 eq.) was added. The mixture was stirred at 25 °C for 1.5 h. After evaporation of the volatiles under reduced pressure, water (30 mL) was added and the organic layer was extracted with EtOAc (2 x 20 mL), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica gel column eluted with 10-30% v/v MeOH in EtOAc to afford after evaporation under vacuum a dark purple solid (102 mg, quant.). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 4.36 min (> 95% purity [254.8 nm], Method A). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 6.17 min (> 95% purity [254.8 nm], Method B).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.05 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.93 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.66 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.30 – 7.24 (m, 1H), 6.74 (dt,  $J$  = 9.1, 2.9 Hz, 1H), 6.67 (t,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.41 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 4H), 4.16 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 2.53 – 2.52 (m, 6H). LRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_9$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 509.1560, found: 509.1530.

*Benzyl*  $N^2$ -(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)- $N^6$ -(2-((9-(di(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)amino)-5-oxo-5H-benzo[*a*]phenoxazin-2-yl)oxy)acetyl)-L-lysinate (**2.24**)

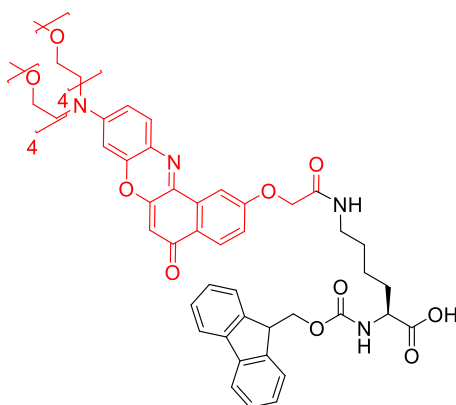


To the compound NR-PEG<sub>4</sub>-COOH (11 mg, 14.6  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) were added a solution of **2.3** (8.0 mg, 16.2  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) in anhydrous DMF (290  $\mu\text{L}$ ), a solution of PYBOP (19 mg, 36.5  $\mu\text{mol}$ , 2.5 eq.) in anhydrous DMF (290  $\mu\text{L}$ ) and DIPEA (19.3  $\mu\text{L}$ , 117  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.). The mixture was stirred at 25 °C for 30 min and then concentrated under vacuum. The crude compound was engaged into the next transformation without further purification. HPLC  $t_{\text{R}}$  = 5.93 min (Method A).

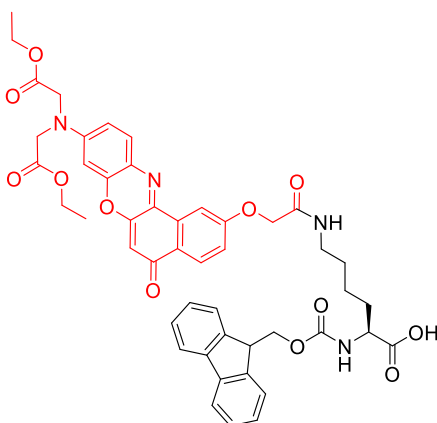
Diethyl 2,2'-((2-(2-((5-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-(benzyloxy)-6-oxohexyl)amino)-2-oxoethoxy)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-9-yl)azanediyl)(S)-diacetate (**2.25**)



To the compound NR-EA-COOH (102 mg, 201  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) were added a solution of **2.3** (99.3 mg, 201  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous DMF (2 mL), a solution of PYBOP (125 mg, 241  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) in anhydrous DMF (0.5 mL) and DIPEA (199  $\mu\text{L}$ , 1.20 mmol, 6 eq.). The mixture was stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h. EtOAc (30 mL) was added and the organic layer was washed with a 0.1 M HCl aqueous solution (20 mL) and brine (20 mL). The obtained aqueous layer was extracted with EtOAc (20 mL). The gathered organic layers were dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 20–60% v/v ACN (0.1% TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (59.7 mg, 31%). HPLC  $t_{\text{R}}$  = 8.15 min (> 95% purity [220.8 nm], Method B).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.27 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H), 8.05 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.99 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.90 – 7.76 (m, 3H), 7.68 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.61 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.46 – 7.17 (m, 10H), 6.71 (dd,  $J$  = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 6.65 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.40 (s, 4H), 4.28 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 4.16 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 4.12 – 3.96 (m, 2H), 3.15 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 1.78 – 1.57 (m, 2H), 1.55 – 1.39 (m, 2H), 1.39 – 1.28 (m, 2H), 1.22 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  181.57, 172.27, 169.45, 166.85, 160.34, 156.14, 151.58, 151.47, 145.61, 143.75, 140.66, 135.94, 133.23, 130.35, 128.88, 128.34, 127.95, 127.68, 127.56, 127.30, 127.24, 126.98, 125.42, 125.15, 124.84, 121.33, 120.03, 118.05, 110.33, 107.83, 104.81, 97.76, 67.06, 65.81, 65.65, 60.75, 53.90, 52.67, 46.61, 38.04, 30.25, 28.59, 22.82, 14.07. LRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{54}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_{12}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 949.3660, found: 949.3658.

**Fmoc-Lys(NR-PEG<sub>4</sub>)-OH**

The obtained crude product **2.24** was dissolved in anhydrous MeOH (1.5 mL), flushed with argon, Pd/C (10 mg, 10 wt. % loading, 9.40  $\mu\text{mol}$ , 0.6 eq.) was added and the mixture, flushed with argon and then with H<sub>2</sub>, was stirred under H<sub>2</sub> at 25 °C and 1 atm. for 2 h. After filtration through Celite and evaporation under reduced pressure, the crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 20-60% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (9.8 mg, 63%). HPLC  $t_R$  = 5.00 min (> 95% purity [220.8 nm], Method A). HRMS (ESI) calcd for C<sub>57</sub>H<sub>70</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>16</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>): 1089.4685, found: 1089.4699.

**Fmoc-Lys(NR-EA)-OH**

To a solution of **2.25** (29.7 mg, 31.3  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in anhydrous MeOH (4 mL), flushed with argon, was added Pd/C (40 mg, 10 wt. % loading, 37.6  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) and the mixture, flushed with argon and then with H<sub>2</sub>, was stirred under H<sub>2</sub> at 25 °C and 1 atm. for 18 h. After filtration through Celite and evaporation under reduced pressure, the crude product was purified by reverse-phase flash chromatography using a linear gradient of 30-80% v/v ACN (0.1%TFA) in H<sub>2</sub>O



(0.1% TFA) in 30 min to afford after lyophilization a dark purple solid (9.6 mg, 36%). HPLC  $t_r$  = 5.44 min (> 95% purity [220.8 nm], Method C).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.53 (s, 1H) 8.30 (s, 1H) 8.07 (d,  $J$  = 8.78 Hz, 1H) 8.00 - 8.04 (m, 1H) 7.80 - 7.92 (m, 3H) 7.71 (d,  $J$  = 7.53 Hz, 3H) 7.60 - 7.67 (m, 2H) 7.27 - 7.43 (m, 5H) 6.69 - 6.76 (m, 1H) 6.67 (s, 1H) 6.25 (s, 1H) 4.67 (s, 2H) 4.41 (s, 4H) 4.24 - 4.29 (m, 2H) 4.22 (br s, 1H) 4.12 - 4.20 (m, 4H) 3.88 - 3.96 (m, 1H) 3.17 (d,  $J$  = 6.27 Hz, 2H) 1.60 - 1.75 (m, 2H) 1.49 (d,  $J$  = 6.53 Hz, 3H) 1.31 - 1.42 (m, 2H) 1.23 (t,  $J$  = 7.03 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  181.60, 173.94, 169.46, 166.96, 166.84, 160.37, 156.13, 151.64, 151.49, 145.63, 143.77, 140.65, 133.26, 131.70, 131.56, 130.37, 128.64, 127.61, 127.57, 127.32, 126.99, 125.43, 125.24, 125.20, 124.84, 120.03, 118.07, 110.36, 107.86, 104.82, 97.76, 67.39, 67.05, 65.57, 60.76, 53.70, 52.66, 46.63, 38.10, 38.07, 30.38, 29.78, 28.64, 28.34, 23.23, 23.00, 22.37, 14.08, 13.86, 10.78. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{NaO}_{12}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ): 881.3010, found: 881.3010.

### 3.5. Evaluation of the functional activity on the GalR2<sup>10</sup>

Solutions of fluorescent spexins in DMSO molecular biology grade were prepared (10 mM) and then diluted in HEPES/1% BSA (10 mM HEPES, 0.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 137.5 mM NaCl, 1.25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1% (W/V) BSA, pH = 7.4) physiological buffer.

HEK293 cells stably expressing the human GalR2 were cultivated at 37 °C and 5% of  $\text{CO}_2$  in DMEM in the presence of glucose (4.5 g/L, Gibco), supplemented with 10% of fetal calf serum (Gibco), 100 U/mL of penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of streptomycin (Gibco). The day of the experiment, they were treated with 5  $\mu\text{M}$  of Indo-1 AM (Molecular Probes) for 45 min, rinsed and distributed in black 96-well plate (about 500 000 cells/well in HEPES/1% BSA). After an excitation at 338 nm, their fluorescence at 401 nm and at 475 nm was measured over time at 37 °C in the reader-pipettor FlexStationIII (Molecular Devices) of the PCBIS platform (UMS3286, Illkirch). Agonists, added by the device, were tested at final concentrations varying from 10 pM to 10  $\mu\text{M}$ . At the end of the kinetics, the cells were lysed with 150  $\mu\text{M}$  of digitonin in order to saturate the calcium probe.

The ratio of the fluorescence emission at 401 nm to the fluorescence emission at 475 nm was first calculated. Then, the basal mean values before addition

---

<sup>10</sup> Performed by Valérie Utard under the supervision of Dr. Frédéric Simonin (UMR 7242, BSC, Illkirch).

of the agonists were deduced. The amplitude of response to each agonist dose was related to the maximum fluorescence intensity of the well obtained after cell lysis. Finally, the amplitudes obtained after this normalization were plotted depending on the agonist concentration using KaleidaGraph software (SynergySoftware) which calculated the EC<sub>50</sub> value of the agonist.

### **3.6. Evaluation of the spectral properties of fluorescent amino acids, spexins and fluorospexins**

All information about the determination of fluorescence quantum yields and fluorescence turn-on ratio is mentioned above (section 1.5.) except for the Fmoc-Lys(NR-EA)-OH for which the excitation was performed at 480 nm and the fluorescence intensity was measured from 490 nm to 800 nm.

### **3.7. Imaging of the unmodified GalR2 in homogeneous conditions**

#### **3.7.1. Cell lines and culture conditions<sup>11</sup>**

HEK293 cells stably expressing the GalR2 (HEK-GalR2) were cultured in DMEM with 10% of fetal calf serum, 100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were seeded into 35 mm ibiTreat µ-dish (IBiDi) at 100 000 cells per dish 3 days before imaging.

HEK293 cells (HEK) were cultured in MEM with 10% of fetal calf serum, 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin and 2 mM of L-glutamine at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were seeded into 35 mm ibiTreat µ-dish (IBiDi) at 200 000 cells per dish 3 days before imaging.

CHO cells stably expressing the GalR2 (CHO-GalR2) were cultured in Ham's F12 with 5% of fetal calf serum, 100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were seeded into 35 mm ibiTreat µ-dish (IBiDi) at 100 000 cells per dish 1 day before imaging.

CHO cells (CHO) were cultured in Ham's F12 with 5% of fetal calf serum, 100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were seeded into 35 mm ibiTreat µ-dish (IBiDi) at 250 000 cells per dish 1 day before imaging.

---

<sup>11</sup> Performed by Valérie Utard under the supervision of Dr. Frédéric Simonin (UMR 7242, BSC, Illkirch).

### 3.7.2. Live-cell no-wash imaging of the GalR2

The culture medium was removed, the cells were washed with Opti-MEM and incubated with a mixture of 100 nM of the studied probe and 1 µg/mL of Hoechst 33342 in Opti-MEM (1 mL) at 25 °C for 10 min prior to the imaging. The imaging by confocal microscopy was performed at 22 °C. Nile Red was excited with a 488 nm 10 mW laser at 80% intensity and detected at 570 - 750 nm. Hoechst 33342 was excited with a 405 nm 25 mW laser at 10% intensity and detected at 430 - 480 nm. The pinhole was set to 1 airy unit. The images were acquired at 1x magnification as a mean of 2 scans in 1024x1024 size. An additional 2x magnification was applied upon processing. The same brightness and contrast parameters for the Nile Red channel were applied to all the images.

# Bibliographie

---



**A**

Alhassawi, Fatemah M., Maria G. Corradini, Michael A. Rogers, et Richard D. Ludescher. 2018. « Potential Applications of Luminescent Molecular Rotors in Food Science and Engineering ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58 (11): 1902-1916.

Angers, Stephane, Ali Salahpour, et Michel Bouvier. 2002. « Dimerization: An Emerging Concept for G Protein-Coupled Receptor Ontogeny and Function ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 42 (1): 409-435.

Ashoka, Anila Hoskere, Pichandi Ashokkumar, Yuriy P. Kovtun, et Andrey S. Klymchenko. 2019. « Solvatochromic Near-Infrared Probe for Polarity Mapping of Biomembranes and Lipid Droplets in Cells under Stress ». *The Journal of Physical Chemistry Letters* 10 (10): 2414-2421.

Ast, Julia, Anastasia Arvaniti, Nicholas H. F. Fine, Daniela Nasteska, Fiona B. Ashford, Zania Stamatakis, Zsombor Koszegi, et al. 2020. « Super-Resolution Microscopy Compatible Fluorescent Probes Reveal Endogenous Glucagon-like Peptide-1 Receptor Distribution and Dynamics ». *Nature Communications* 11 (1): 467.

**B**

Bach-Rojecky, Lidija, Dalia Vadunec, Katarina Žunić, Jelena Kurija, Sara Šipicki, Ryan Gregg, Ivan Mikula, et Dragan Primorac. 2019. « Continuing War on Pain: A Personalized Approach to the Therapy with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Opioids ». *Personalized Medicine* 16 (2): 171-184.

Becher, Anja, et R. A. Jeffrey McIlhinney. 2005. « Consequences of Lipid Raft Association on G-Protein-Coupled Receptor Function. » Édité par Jeff McIlhinney et Nigel Hooper. *Biochemical Society Symposia* 72 (janvier): 151-164.

Benner, Seico, et Hidenori Yamasue. 2018. « Clinical Potential of Oxytocin in Autism Spectrum Disorder: Current Issues and Future Perspectives ». *Behavioural Pharmacology* 29 (1): 1-12.

Berque-Bestel, Isabelle, Jean-Louis Soulier, Mireille Giner, Lucie Rivail, Michel Langlois, et Sames Sicsic. 2003. « Synthesis and Characterization of the First Fluorescent Antagonists for Human 5-HT<sub>4</sub> Receptors ». *Journal of Medicinal Chemistry* 46 (13): 2606-2620.

Bischel, Heather N., Laura A. MacManus-Spencer, Chaojie Zhang, et Richard G. Luthy. 2011. « Strong Associations of Short-Chain Perfluoroalkyl Acids with Serum Albumin and Investigation of Binding Mechanisms ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (11): 2423-2430.

Black, Shannon L., Will A. Stanley, Fabian V. Filipp, Michelle Bhairo, Ashwani Verma, Oliver Wichmann, Michael Sattler, Matthias Wilmanns, et Carsten Schultz. 2008. « Probing Lipid-

and Drug-Binding Domains with Fluorescent Dyes ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (3): 1162-1173.

Blanks, Andrew, Anatoly Shmygol, et Steven Thornton. 2007. « Regulation of Oxytocin Receptors and Oxytocin Receptor Signaling ». *Seminars in Reproductive Medicine* 25 (1): 52-59.

Böhme, Ilka, et Annette G Beck-Sickinger. 2009. « Illuminating the Life of GPCRs ». *Cell Communication and Signaling* 7 (1): 16.

Bolivar, Juan H., Juan C. Muñoz-García, Tomas Castro-Dopico, Patricia M. Dijkman, Phillip J. Stansfeld, et Anthony Watts. 2016. « Interaction of Lipids with the Neurotensin Receptor 1 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858 (6): 1278-1287.

Bouzide, Abderrahim, et Gilles Sauvé. 2002. « Silver(I) Oxide Mediated Highly Selective Monotosylation of Symmetrical Diols. Application to the Synthesis of Polysubstituted Cyclic Ethers ». *Organic Letters* 4 (14): 2329-2332.

Briggs, Mark S. J., Ian Bruce, James N. Miller, Christopher J. Moody, Adrian C. Simmonds, et Elizabeth Swann. 1997. « Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids ». *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, n° 7: 1051-1058.

Brown, Alan, T. Bruce Brown, Andrew Calabrese, Dave Ellis, Nicholas Puhalo, Michael Ralph, et Lesa Watson. 2010. « Triazole Oxytocin Antagonists: Identification of an Aryloxyazetidone Replacement for a Biaryl Substituent ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2): 516-520.

Brown, D.A., et E. London. 1998. « Structure and Origin of Ordered Lipid Domains in Biological Membranes ». *Journal of Membrane Biology* 164 (2): 103-114.

Brown, Deborah A., et Erwin London. 2000. « Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-Rich Membrane Rafts ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (23): 17221-17224.

Buenaventura, Teresa, Stavroula Bitsi, William E. Laughlin, Thomas Burgoyne, Zekun Lyu, Affiong I. Oqua, Hannah Norman, et al. 2019. « Agonist-Induced Membrane Nanodomain Clustering Drives GLP-1 Receptor Responses in Pancreatic Beta Cells ». Édité par Paul Titchenell. *PLoS Biology* 17 (8): e3000097.

## C

Chen, Shih-Ju, et Huan-Tsung Chang. 2004. « Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles for Selective Determination of Thiols Based on Energy Transfer and Aggregation ». *Analytical Chemistry* 76 (13): 3727-3734.

Chen, Zhixing, Chaoran Jing, Sarah S. Gallagher, Michael P. Sheetz, et Virginia W. Cornish. 2012. « Second-Generation Covalent TMP-Tag for Live Cell Imaging ». *Journal of the American Chemical Society* 134 (33): 13692-13699.

Cheng, Zhiming, Erkin Kuru, Amit Sachdeva, et Marc Vendrell. 2020. « Fluorescent Amino Acids as Versatile Building Blocks for Chemical Biology ». *Nature Reviews Chemistry* 4 (6): 275-290.

Ciruela, Francisco, et Víctor Fernández-Dueñas. 2015. « GPCR Oligomerization Analysis by Means of BRET and DFRAP ». In *G Protein-Coupled Receptor Screening Assays*, édité par Duarte Miguel F. Prazeres et Sofia Aires M. Martins, 1272:133-141. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York.

Coleman, James L.J., Tony Ngo, et Nicola J. Smith. 2017. « The G Protein-Coupled Receptor N-Terminus and Receptor Signalling: N-Termining a New Era ». *Cellular Signalling* 33 (mai): 1-9.

Congreve, Miles, Chris de Graaf, Nigel A. Swain, et Christopher G. Tate. 2020. « Impact of GPCR Structures on Drug Discovery ». *Cell* 181 (1): 81-91.

## D

Danylchuk, Dmytro I., Seonah Moon, Ke Xu, et Andrey S. Klymchenko. 2019. « Switchable Solvatochromic Probes for Live-Cell Super-resolution Imaging of Plasma Membrane Organization ». *Angewandte Chemie International Edition* 58 (42): 14920-14924.

Demchenko, Alexander P. 2006. « Visualization and Sensing of Intermolecular Interactions with Two-Color Fluorescent Probes ». *FEBS Letters* 580 (12): 2951-2957.

Dietrich, C., L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, et E. Gratton. 2001. « Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes ». *Biophysical Journal* 80 (3): 1417-1428.

Dijkman, Patricia M., et Anthony Watts. 2015. « Lipid Modulation of Early G Protein-Coupled Receptor Signalling Events ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848 (11): 2889-2897.

## E

Esteouille, Lucie, Glenn-Marie Le Coz, Frédéric Simonin, et Dominique Bonnet. 2017. « Metabolically stable spexin peptide analogs ». International Application. WO 2017/216360 A1.

Esteouille, Lucie, François Daubeuf, Mayeul Collot, Stéphanie Riché, Thierry Durroux, David Brasse, Patrice Marchand, Iuliia A. Karpenko, Andrey S. Klymchenko, et Dominique Bonnet. 2020. « A Near-Infrared Fluorogenic Dimer Enables Background-Free Imaging of Endogenous GPCRs in Living Mice ». *Chemical Science* 11 (26): 6824-6829.



**F**

Finlay, David B., Stephen B. Duffull, et Michelle Glass. 2020. « 100 Years of Modelling Ligand–Receptor Binding and Response: A Focus on GPCRs ». *British Journal of Pharmacology* 177 (7): 1472-1484.

**G**

Gahbauer, Stefan, et Rainer A. Böckmann. 2016. « Membrane-Mediated Oligomerization of G Protein Coupled Receptors and Its Implications for GPCR Function ». *Frontiers in Physiology* 7 (octobre).

Gahbauer, Stefan, et Rainer A. Böckmann. 2020. « Comprehensive Characterization of Lipid-Guided G Protein-Coupled Receptor Dimerization ». *The Journal of Physical Chemistry B* 124 (14): 2823-2834.

Gautier, Arnaud, Alexandre Juillerat, Christian Heinis, Ivan Reis Corrêa, Maik Kindermann, Florent Beaufigli, et Kai Johnsson. 2008. « An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells ». *Chemistry & Biology* 15 (2): 128-136.

Gee, K.R., K.A. Brown, W-N.U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, et I. Johnson. 2000. « Chemical and Physiological Characterization of Fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-Indicator Dyes ». *Cell Calcium* 27 (2): 97-106.

Gimpl, Gerald, et Falk Fahrenholz. 2001. « The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation ». *Physiological Reviews* 81 (2): 629-683.

Golini, Christina M, Brian Wesley Williams, et James B Foresman. s. d. « Further Solvatochromic, Thermochemical, and Theoretical Studies on Nile Red », 10.

Greenspan, P, E P Mayer, et S D Fowler. 1985. « Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. » *The Journal of Cell Biology* 100 (3): 965-973.

Guido, Ciro A., Benedetta Mennucci, Denis Jacquemin, et Carlo Adamo. 2010. « Planar vs. Twisted Intramolecular Charge Transfer Mechanism in Nile Red: New Hints from Theory ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (28): 8016.

**H**

Haidekker, Mark A., et Emmanuel A. Theodorakis. 2007. « Molecular Rotors—Fluorescent Biosensors for Viscosity and Flow ». *Org. Biomol. Chem.* 5 (11): 1669-1678.

Hancock, W.S., et J.E. Battersby. 1976. « A New Micro-Test for the Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis Using 2,4,6-Trinitrobenzene-Sulphonic Acid ». *Analytical Biochemistry* 71 (1): 260-264.

Heimann, Andrea S., Achla Gupta, Ivone Gomes, Rahman Rayees, Avner Schlessinger, Emer S. Ferro, Ellen M. Unterwald, et Lakshmi A. Devi. 2017. « Generation of G Protein-Coupled Receptor Antibodies Differentially Sensitive to Conformational States ». Édité par Arun Shukla. *PLOS ONE* 12 (11): e0187306.

Hirako, Satoshi. 2016. « Galanin ». In *Handbook of Hormones*, 205-e24A-6. Elsevier.

Hirons, G. T., J. J. Fawcett, et H. A. Crissman. 1994. « TOTO and YOYO: New Very Bright Fluorochromes for DNA Content Analyses by Flow Cytometry ». *Cytometry* 15 (2): 129-140.

Huang, H., et D.L. Rabenstein. 1999. « A Cleavage Cocktail for Methionine-Containing Peptides: Cleavage Cocktail for Methionine-Containing Peptides ». *The Journal of Peptide Research* 53 (5): 548-553.

Hulme, Edward C., et Mike A. Trevethick. 2010. « Ligand Binding Assays at Equilibrium: Validation and Interpretation: Equilibrium Binding Assays ». *British Journal of Pharmacology* 161 (6): 1219-1237.

Hwang, Cheol Kyu, Ping-Yee Law, Li-Na Wei, et Horace H. Loh. 2011. « Regulation of the Transcription of G Protein-Coupled Receptor Genes ». In *Methods for the Discovery and Characterization of G Protein-Coupled Receptors*, édité par Craig W. Stevens, 60:49-69. Neuromethods. Totowa, NJ: Humana Press.

## I

Insel, Paul A., Andrea Wilderman, Alexander C. Zambon, Aaron N. Snead, Fiona Murray, Nakon Aroonsakool, Daniel S. McDonald, et al. 2015. « G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Expression in Native Cells: "Novel" EndoGPCRs as Physiologic Regulators and Therapeutic Targets ». *Molecular Pharmacology* 88 (1): 181-187.

Issafras, Hassan, Stéphane Angers, Sébastien Bulenger, Cédric Blanpain, Marc Parmentier, Catherine Labbé-Jullié, Michel Bouvier, et Stefano Marullo. 2002. « Constitutive Agonist-Independent CCR5 Oligomerization and Antibody-Mediated Clustering Occurring at Physiological Levels of Receptors ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (38): 34666-34673.

Iturrioz, Xavier, Dominique Bonnet, et Catherine Llorens-Cortes. 2016. « Metabolically stable apelin analogs in the treatment of disease mediated by the apelin receptor ». International Application. WO 2016/102648 A1.

## J

Jin, Lei, Andrew C. Millard, Joseph P. Wuskell, Xuemei Dong, Dianqing Wu, Heather A. Clark, et Leslie M. Loew. 2006. « Characterization and Application of a New Optical Probe for Membrane Lipid Domains ». *Biophysical Journal* 90 (7): 2563-2575.

Jose, Jiney, Aurore Loudet, Yuichiro Ueno, Rola Barhoumi, Robert C. Burghardt, et Kevin Burgess. 2010. « Intracellular Imaging of Organelles with New Water-Soluble Benzophenoxazine Dyes ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 8 (9): 2052.

Jurek, Benjamin, et Inga D. Neumann. 2018. « The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior ». *Physiological Reviews* 98 (3): 1805-1908.

## K

Karpenko, Iuliia A., Mayeul Collot, Ludovic Richert, Christel Valencia, Pascal Villa, Yves Mély, Marcel Hibert, Dominique Bonnet, et Andrey S. Klymchenko. 2015. « Fluorogenic Squaraine Dimers with Polarity-Sensitive Folding As Bright Far-Red Probes for Background-Free Bioimaging ». *Journal of the American Chemical Society* 137 (1): 405-412.

Karpenko, Iuliia A., Rémy Kreder, Christel Valencia, Pascal Villa, Christiane Mendre, Bernard Mouillac, Yves Mély, Marcel Hibert, Dominique Bonnet, et Andrey S. Klymchenko. 2014. « Red Fluorescent Turn-On Ligands for Imaging and Quantifying G Protein-Coupled Receptors in Living Cells ». *ChemBioChem* 15 (3): 359-363.

Karpenko, Iuliia A., Jean-François Margathe, Thiéric Rodriguez, Elsa Pflimlin, Elodie Dupuis, Marcel Hibert, Thierry Durroux, et Dominique Bonnet. 2015. « Selective Nonpeptidic Fluorescent Ligands for Oxytocin Receptor: Design, Synthesis, and Application to Time-Resolved FRET Binding Assay ». *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (5): 2547-2552.

Karpenko, Iuliia A., Yosuke Niko, Viktor P. Yakubovskiy, Andriy O. Gerasov, Dominique Bonnet, Yuriy P. Kovtun, et Andrey S. Klymchenko. 2016. « Push-Pull Dioxaborine as Fluorescent Molecular Rotor: Far-Red Fluorogenic Probe for Ligand-Receptor Interactions ». *Journal of Materials Chemistry C* 4 (14): 3002-3009.

Kashida, Hiromu, et Hiroyuki Asanuma. 2012. « Preparation of Supramolecular Chromophoric Assemblies Using a DNA Duplex ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 14 (20): 7196.

Keppler, A., H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, et K. Johnsson. 2004. « Labeling of Fusion Proteins with Synthetic Fluorophores in Live Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (27): 9955-9959.

Klymchenko, Andrey S. 2017. « Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications ». *Accounts of Chemical Research* 50 (2): 366-375.

Klymchenko, Andrey S., et Rémy Kreder. 2014. « Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells ». *Chemistry & Biology* 21 (1): 97-113.

Kocan, Martina. 2010. « Enhanced BRET Technology for the Monitoring of Agonist-Induced and Agonist-Independent Interactions between GPCRs and  $\beta$ -Arrestins ». *Frontiers in Endocrinology*.

Krafft, Marie Pierre, et Jean G. Riess. 2009. « Chemistry, Physical Chemistry, and Uses of Molecular Fluorocarbon-Hydrocarbon Diblocks, Triblocks, and Related Compounds Unique "Apolare" Components for Self-Assembled Colloid and Interface Engineering ». *Chemical Reviews* 109 (5): 1714-1792.

Kratz, Felix. 2008. « Albumin as a Drug Carrier: Design of Prodrugs, Drug Conjugates and Nanoparticles ». *Journal of Controlled Release* 132 (3): 171-183.

Kucherak, Oleksandr A., Sule Oncul, Zeinab Darwich, Dmytro A. Yushchenko, Youri Arntz, Pascal Didier, Yves Mély, et Andrey S. Klymchenko. 2010. « Switchable Nile Red-Based Probe for Cholesterol and Lipid Order at the Outer Leaflet of Biomembranes ». *Journal of the American Chemical Society* 132 (13): 4907-4916.

## L

Lacivita, Enza, Marcello Leopoldo, Anna Carmela Masotti, Carmela Inglese, Francesco Berardi, Roberto Perrone, Sourav Ganguly, Md Jafurulla, et Amitabha Chattopadhyay. 2009. « Synthesis and Characterization of Environment-Sensitive Fluorescent Ligands for Human 5-HT<sub>1A</sub> Receptors with 1-Arylpiperazine Structure<sup>†</sup> ». *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (23): 7892-7896.

Lampe, Jed N., Cristina Fernandez, Abhinav Nath, et William M. Atkins. 2008. « Nile Red Is a Fluorescent Allosteric Substrate of Cytochrome P450 3A4<sup>†</sup> ». *Biochemistry* 47 (2): 509-516.

Lang, Roland, Andrew L. Gundlach, Fiona E. Holmes, Sally A. Hobson, David Wynick, Tomas Hökfelt, et Barbara Kofler. 2015. « Physiology, Signaling, and Pharmacology of Galanin Peptides and Receptors: Three Decades of Emerging Diversity ». Édité par Arthur Christopoulos. *Pharmacological Reviews* 67 (1): 118-175.

Levental, Ilya, Kandice R. Levental, et Frederick A. Heberle. 2020. « Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain ». *Trends in Cell Biology* 30 (5): 341-353.

Lim, Chor Hong, Megan You Min Lee, Tomoko Soga, et Ishwar Parhar. 2019. « Evolution of Structural and Functional Diversity of Spexin in Mammalian and Non-Mammalian Vertebrate Species ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (juin): 379.

Liu, Huiping, Christian W. Gruber, Paul F. Alewood, Andreas Möller, et Markus Muttenthaler. 2020. « The Oxytocin Receptor Signalling System and Breast Cancer: A Critical Review ». *Oncogene* 39 (37): 5917-5932.

Liu, Zhenhui, Yanping Xu, Ling Wu, et Shicui Zhang. 2010. « Evolution of Galanin Receptor Genes: Insights from the Deuterostome Genomes ». *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 28 (1): 97-106.

Lohse, Martin J. 2010. « Dimerization in GPCR Mobility and Signaling ». *Current Opinion in Pharmacology* 10 (1): 53-58.

Los, Georgyi V., Lance P. Encell, Mark G. McDougall, Danette D. Hartzell, Natasha Karassina, Chad Zimprich, Monika G. Wood, et al. 2008. « HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis ». *ACS Chemical Biology* 3 (6): 373-382.

Loving, Galen, et Barbara Imperiali. 2008. « A Versatile Amino Acid Analogue of the Solvatochromic Fluorophore 4- *N,N* -Dimethylamino-1,8-Naphthalimide: A Powerful Tool for the Study of Dynamic Protein Interactions ». *Journal of the American Chemical Society* 130 (41): 13630-13638.

Lv, Shuang-Yu, Yu-Chen Zhou, Xiao-Mei Zhang, Wei-Dong Chen, et Yan-Dong Wang. 2019. « Emerging Roles of NPQ/Spexin in Physiology and Pathology ». *Frontiers in Pharmacology* 10 (mai): 457.

## M

Ma, Ani, Jin Bai, Mulan He, et Anderson O.L. Wong. 2018. « Spexin as a Neuroendocrine Signal with Emerging Functions ». *General and Comparative Endocrinology* 265 (septembre): 90-96.

Ma, Zhao, Yuxing Lin, Yanna Cheng, Wenxiao Wu, Rong Cai, Shouzhen Chen, Benkang Shi, et al. 2016. « Discovery of the First Environment-Sensitive Near-Infrared (NIR) Fluorogenic Ligand for  $\alpha_1$ -Adrenergic Receptors Imaging in Vivo ». *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (5): 2151-2162.

Martin-Brown, Skylar A., Yi Fu, Ginagunta Saroja, Maryanne M. Collinson, et Daniel A. Higgins. 2005. « Single-Molecule Studies of Diffusion by Oligomer-Bound Dyes in Organically Modified Sol-Gel-Derived Silicate Films ». *Analytical Chemistry* 77 (2): 486-494.

Martinez, Vincent, et Maged Henary. 2016. « Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues ». *Chemistry - A European Journal* 22 (39): 13764-13782.

Maurel, Damien, Laëticia Comps-Agrar, Carsten Brock, Marie-Laure Rives, Emmanuel Bourrier, Mohammed Akli Ayoub, Hervé Bazin, et al. 2008. « Cell-Surface Protein-Protein Interaction Analysis with Time-Resolved FRET and Snap-Tag Technologies: Application to GPCR Oligomerization ». *Nature Methods* 5 (6): 561-567.

Maxfield, Frederick R., et Ira Tabas. 2005. « Role of Cholesterol and Lipid Organization in Disease ». *Nature* 438 (7068): 612-621.

McVey, Mary, Douglas Ramsay, Elaine Kellett, Stephen Rees, Shelagh Wilson, Andrew J. Pope, et Graeme Milligan. 2001. « Monitoring Receptor Oligomerization Using Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer and Bioluminescence Resonance Energy Transfer: The human  $\delta$ -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (17): 14092-14099.

Mirabeau, O., E. Perlas, C. Severini, E. Audero, O. Gascuel, R. Possenti, E. Birney, N. Rosenthal, et C. Gross. 2007. « Identification of Novel Peptide Hormones in the Human Proteome by Hidden Markov Model Screening ». *Genome Research* 17 (3): 320-327.

Moazen, Parisa, Mahnaz Taherianfard, Mohammad Ahmadi Soleimani, et Mitra Norozpor. 2018. « Synergistic Effect of Spexin and Progesterone on Pain Sensitivity Attenuation in Ovariectomized Rats ». *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 45 (4): 349-354.

Mondal, Sayan, Jennifer M. Johnston, Hao Wang, George Khelashvili, Marta Filizola, et Harel Weinstein. 2013. « Membrane Driven Spatial Organization of GPCRs ». *Scientific Reports* 3 (1): 2909.

Mukherjee, Soumi, H. Raghuraman, et Amitabha Chattopadhyay. 2007. « Membrane Localization and Dynamics of Nile Red: Effect of Cholesterol ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768 (1): 59-66.

Muslinkina, Liya, Alexey S. Gavrikov, Nina G. Bozhanova, Alexander S. Mishin, Mikhail S. Baranov, Jens Meiler, Nadya V. Pletneva, Vladimir Z. Pletnev, et Sergei Pletnev. 2020. « Structure-Based Rational Design of Two Enhanced Bacterial Lipocalin *Blc* Tags for Protein-PAINT Super-Resolution Microscopy ». *ACS Chemical Biology* 15 (9): 2456-2465.

Muyldermans, Serge. 2013. « Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies ». *Annual Review of Biochemistry* 82 (1): 775-797.

## **N**

Nevins, Amanda M., et Adriano Marchese. 2018. « Detecting Cell Surface Expression of the G Protein-Coupled Receptor CXCR4 ». In *The Surfaceome*, édité par Kenneth R. Boheler et Rebekah L. Gundry, 1722:151-164. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York.

Newton, Alexandra C., Martin D. Bootman, et John D. Scott. 2016. « Second Messengers ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8): a005926.

Newton, Philip, Paula Harrison, et Stephen Clulow. 2008. « A Novel Method for Determination of the Affinity of Protein: Protein Interactions in Homogeneous Assays ». *Journal of Biomolecular Screening* 13 (7): 674-682.

Niko, Yosuke, Pascal Didier, Yves Mely, Gen-ichi Konishi, et Andrey S. Klymchenko. 2016. « Bright and Photostable Push-Pull Pyrene Dye Visualizes Lipid Order Variation between Plasma and Intracellular Membranes ». *Scientific Reports* 6 (1): 18870.

## O

Ohvo-Rekilä, H. 2002. « Cholesterol Interactions with Phospholipids in Membranes ». *Progress in Lipid Research* 41 (1): 66-97.

Ostrowska, Katarzyna, Davide Ceresoli, Katarzyna Stadnicka, Marlena Gryl, Marco Cazzaniga, Raffaella Soave, Bogdan Musielak, et al. 2018. «  $\pi$ - $\pi$ -Induced Aggregation and Single-Crystal Fluorescence Anisotropy of 5,6,10b-Triazaacephenanthrylene ». *IUCrJ* 5 (3): 335-347.

## P

Pirzeh, Lale, et M. Taherianfard 2014. « Effect of Intra Hippocampal CA1 Injection of Spexin on Pain Sensitivity in Female Rat ». *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 3 (7): 71-74.

Plouffe, Bianca, Alex R. B. Thomsen, et Roshanak Irannejad. 2020. « Emerging Role of Compartmentalized G Protein-Coupled Receptor Signaling in the Cardiovascular Field ». *ACS Pharmacology & Translational Science* 3 (2): 221-236.

Postupalenko, Viktoriia Y., Oleksandr M. Zamotaiev, Volodymyr V. Shvadchak, Aleksandr V. Strizhak, Vasyl G. Pivovarenko, Andrey S. Klymchenko, et Yves Mely. 2013. « Dual-Fluorescence L -Amino Acid Reports Insertion and Orientation of Melittin Peptide in Cell Membranes ». *Bioconjugate Chemistry* 24 (12): 1998-2007.

## R

Rafai Far, Adel, Kelly Tanaka, Evelyne Dietrich, Ranga Reddy, et Ting Kang. 2011. « Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics with improved solubility ». International Application. WO 2011/019839 A2.

Ray, Anusree, Sinjan Das, et Nitin Chattopadhyay. 2019. « Aggregation of Nile Red in Water: Prevention through Encapsulation in  $\beta$ -Cyclodextrin ». *ACS Omega* 4 (1): 15-24.

Reichardt, Christian. 1994. « Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators ». *Chemical Reviews* 94 (8): 2319-2358.

Reyes-Alcaraz, Arfaxad, Yoo-Na Lee, Gi Hoon Son, Nam Hoon Kim, Dong-Kyu Kim, Seongsik Yun, Dong-Hoon Kim, Jong-Ik Hwang, et Jae Young Seong. 2016. « Development of Spexin-Based Human Galanin Receptor Type II-Specific Agonists with Increased Stability in Serum and Anxiolytic Effect in Mice ». *Scientific Reports* 6 (1): 21453.

Rodriguez, Erik A., Robert E. Campbell, John Y. Lin, Michael Z. Lin, Atsushi Miyawaki, Amy E. Palmer, Xiaokun Shu, Jin Zhang, et Roger Y. Tsien. 2017. « The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins ». *Trends in Biochemical Sciences* 42 (2): 111-129.

Rosenbaum, Daniel M., Søren G. F. Rasmussen, et Brian K. Kobilka. 2009. « The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors ». *Nature* 459 (7245): 356-363.

## S

Sackett, Dan L., et J. Wolff. 1987. « Nile Red as a Polarity-Sensitive Fluorescent Probe of Hydrophobic Protein Surfaces ». *Analytical Biochemistry* 167 (2): 228-234.

Samsonova, L. G., N. I. Selivanov, et T. N. Kopylova. 2014. « Spectral Properties of Nile Red in Solutions and Thin Films ». *Optics and Spectroscopy* 116 (1): 72-76.

Sarin, Virender K., Stephen B.H. Kent, James P. Tam, et R.B. Merrifield. 1981. « Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction ». *Analytical Biochemistry* 117 (1): 147-157.

Sasaki, Shunsuke, Gregor P. C. Drummen, et Gen-ichi Konishi. 2016. « Recent Advances in Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Fluorescence and Related Phenomena in Materials Chemistry ». *Journal of Materials Chemistry C* 4 (14): 2731-2743.

Shen, Qian, Shuangxi Wang, Nai-Di Yang, Chengwu Zhang, Qiong Wu, et Changmin Yu. 2020. « Recent Development of Small-Molecule Organic Fluorophores for Multifunctional Bioimaging in the Second near-Infrared Window ». *Journal of Luminescence* 225 (septembre): 117338.

Simons, K. 2000. « How Cells Handle Cholesterol ». *Science* 290 (5497): 1721-1726.

Simons, Kai, et Elina Ikonen. 1997. « Functional Rafts in Cell Membranes » 387: 4.

Sinkeldam, Renatus W., Nicholas J. Greco, et Vitzhak Tor. 2010. « Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design, Properties, and Applications ». *Chemical Reviews* 110 (5): 2579-2619.

Sridharan, Rajashri, Jeffrey Zuber, Sara M. Connelly, Elizabeth Mathew, et Mark E. Dumont. 2014. « Fluorescent Approaches for Understanding Interactions of Ligands with G Protein Coupled Receptors ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838 (1): 15-33.

Sriram, Krishna, et Paul A. Insel. 2018. « G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? » *Molecular Pharmacology* 93 (4): 251-258.



Sumalekshmy, S., et K. R. Gopidas. 2004. « Photoinduced Intramolecular Charge Transfer in Donor–Acceptor Substituted Tetrahydropyrenes <sup>†</sup> ». *The Journal of Physical Chemistry B* 108 (12): 3705-3712.

## T

Tikhonova, Irina G., Veronique Gigoux, et Daniel Fourmy. 2019. « Understanding Peptide Binding in Class A G Protein-Coupled Receptors ». *Molecular Pharmacology* 96 (5): 550-561.

Toll, Lawrence, Taline V. Khroyan, Kemal Sonmez, Akihiko Ozawa, Iris Lindberg, Jay P. McLaughlin, Shainnel O. Eans, Amir A. Shahienand, et Daniel R. Kapusta. 2012. « Peptides Derived from the Prohormone ProNPQ/Spexin Are Potent Central Modulators of Cardiovascular and Renal Function and Nociception ». *The FASEB Journal* 26 (2): 947-954.

## V

Valencia, Christel, Céline Dujet, Jean-François Margathe, Xavier Iturrioz, Thomas Roux, Eric Trinquet, Pascal Villa, et al. 2017. « A Time-Resolved FRET Cell-Based Binding Assay for the Apelin Receptor ». *ChemMedChem* 12 (12): 925-931.

Villardaga, Jean-Pierre, Moritz Bünemann, Cornelius Krasel, Mariàn Castro, et Martin J Lohse. 2003. « Measurement of the Millisecond Activation Switch of G Protein–Coupled Receptors in Living Cells ». *Nature Biotechnology* 21 (7): 807-812.

## W

Wang, Lu, Mai Tran, Elisa D’Este, Julia Roberti, Birgit Koch, Lin Xue, et Kai Johnsson. 2020. « A General Strategy to Develop Cell Permeable and Fluorogenic Probes for Multicolour Nanoscopy ». *Nature Chemistry* 12 (2): 165-172.

Webling, Kristin E. B., Johan Runesson, Tamas Bartfai, et Ülo Langel. 2012. « Galanin Receptors and Ligands ». *Frontiers in Endocrinology* 3.

## Y

Yeagle, Philip L. 1985. « Cholesterol and the Cell Membrane ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 822 (3-4): 267-287.

Yoshida, Kouhei, Satoru Nagatoishi, Daisuke Kuroda, Nanao Suzuki, Takeshi Murata, et Kouhei Tsumoto. 2019. « Phospholipid Membrane Fluidity Alters Ligand Binding Activity of a G Protein-Coupled Receptor by Shifting the Conformational Equilibrium ». *Biochemistry* 58 (6): 504-508.

Young, Carissa L., Zachary T. Britton, et Anne S. Robinson. 2012. « Recombinant Protein Expression and Purification: A Comprehensive Review of Affinity Tags and Microbial Applications ». *Biotechnology Journal* 7 (5): 620-634.

## Z

Zhang, Jie, Stephen S. G. Ferguson, Larry S. Barak, Luc Ménard, et Marc G. Caron. 1996. « Dynamin and  $\beta$ -Arrestin Reveal Distinct Mechanisms for G Protein-Coupled Receptor Internalization ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (31): 18302-18305.

Zhang, Peiming, Stuart Lindsay, Saikat Manna, et Subhadip Senapati. 2015. « Linker molecule for multiplex recognition by atomic force microscopy (AFM) ». International Application. WO 2015/171930 A1.

Zhang, Ru, et Xin Xie. 2012. « Tools for GPCR Drug Discovery ». *Acta Pharmacologica Sinica* 33 (3): 372-384.

Zingg, Hans H., et Stephane A. Laporte. 2003. « The Oxytocin Receptor ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 14 (5): 222-227.





Fabien HANSER

# Conception, synthèse et évaluations de sondes fluorogènes et solvatofluorochromes pour l'étude des récepteurs couplés aux protéines G : application aux récepteurs de l'ocytocine et de la spexine

## Résumé

Des sondes fluorescentes innovantes sensibles à la polarité de l'environnement dérivées du Nile Red ont été développées pour suivre les interactions ligand-RCPG en ciblant tout particulièrement deux récepteurs d'intérêt thérapeutique, le récepteur de l'ocytocine (OTR) et celui de la galanine de type 2 (GalR2). L'antagoniste de l'OTR non peptidique fluorescent développé a permis d'étudier le microenvironnement de ce récepteur et d'obtenir des résultats très prometteurs pour la mise au point d'un test de liaison ligand-récepteur fluorogène pour le RCPG de l'ocytocine. Les ligands du GalR2 fluorescents développés dérivés de la spexine ont permis d'imager spécifiquement ce RCPG en conditions homogènes. Ils seront utilisés pour suivre la signalisation du GalR2 et mettre au point un test de liaison ligand-récepteur fluorogène pour ce RCPG. Finalement, l'acide aminé fluorescent hydrosoluble dérivé du Nile Red développé sera utilisé pour comprendre le mécanisme d'augmentation de la stabilité et de l'efficacité des peptides fluorospexines récemment développés comparés à la spexine.

**Mots clés :** OTR, GalR2, fluorogène, solvatofluorochrome, acide aminé fluorescent, microenvironnement, test de liaison.

## Abstract

Innovative fluorescent Nile Red-based probes sensitive to the polarity of the environment were developed to monitor the ligand-GPCR interactions by targeting in particular two GPCR of therapeutic interest, the oxytocin receptor (OTR) and the galanin receptor 2 (GalR2). The developed fluorescent non-peptidic OTR antagonist allowed us to study the microenvironment of this receptor and to obtain very promising results for the development of a fluorogenic receptor-ligand binding assay for the oxytocin GPCR. The developed fluorescent spexin-based GalR2 ligands allowed us to specifically image this GPCR under no-wash conditions. They will be used to monitor the signaling of the GalR2 and to develop a fluorogenic receptor-ligand binding assay for this GPCR. Finally, the developed water-soluble fluorescent Nile Red-based amino acid will be used to understand the mechanism of increase of stability and efficacy of recently developed fluorospexin peptides compared to spexin.

**Keywords:** OTR, GalR2, fluorogenic, solvatofluorochromic, fluorescent amino acid, microenvironment, binding assay.