

Des sondes fluorogènes innovantes pour éclairer les récepteurs couplés aux protéines G

Résumé Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont la cible de plus d'un tiers des médicaments actuellement sur le marché. Pour mieux les détecter et les suivre au niveau cellulaire mais également d'un organisme entier, les sondes fluorogènes représentent un outil d'imagerie innovant pour la chémobiologie des RCPG.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), cibles de plus de 30 % des médicaments actuellement sur le marché, représentent la plus large et la plus diverse des familles de protéines membranaires à la surface des cellules eucaryotes. Les RCPG ont de très nombreux ligands comme des peptides/protéines, des nucléotides ou encore des neurotransmetteurs qui, en se fixant à ces récepteurs, sont capables de les activer et ainsi de transmettre un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Les RCPG sont exprimés dans tous les organes du corps humain et leur implication dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques de l'organisme en font des cibles privilégiées pour la découverte de nouveaux médicaments [1].

Ces dernières années, différentes stratégies pour l'étude des RCPG basées sur l'utilisation de sondes fluorescentes [2] ont été développées afin de mieux comprendre l'architecture fonctionnelle de ces récepteurs [3], mais également pour les détecter et les visualiser à la surface de cellules vivantes [4], dans un but thérapeutique et/ou de diagnostic. Afin d'améliorer la sensibilité de détection de ces récepteurs, nous avons mis à profit les propriétés très particulières des sondes fluorescentes dites fluorogènes ou « Turn-On » (figure 1). Ces sondes, sensibles à l'environnement, présentent l'avantage majeur de s'éclairer uniquement après liaison à la cible d'intérêt, lorsqu'elles passent d'un milieu aqueux à un environnement hydrophobe comme les membranes biologiques [5]. Afin de valider l'intérêt de ces sondes moléculaires pour détecter et suivre les RCPG à la surface de cellules vivantes mais également *in vivo*, nous avons sélectionné le récepteur de l'ocytocine (figure 1A), RCPG considéré comme une cible potentielle pour le traitement de l'autisme [6]. Nous avons ainsi conçu et développé des sondes fluorogènes dérivées de la carbétocine (figure 1B), un peptide cyclique capable d'activer le récepteur

de l'ocytocine et utilisé couramment en obstétrique pour provoquer les contractions de l'utérus et l'accouchement.

Trois grandes familles de sondes fluorogènes couplées à la carbétocine pour l'étude du récepteur de l'ocytocine ont été récemment décrites par nos équipes (figure 2) :

- les sondes fluorescentes solvatochromes qui comportent un fluorophore « push-pull » à base de rouge de Nil, présentant à l'état excité un transfert intramoléculaire d'une charge : ces sondes ont permis de détecter et de quantifier les récepteurs de l'ocytocine à la surface de cellules vivantes [7], mais également d'évaluer de façon très fine leurs interactions moléculaires avec leur micro-environnement comme la membrane des cellules [8] ;
- les rotors moléculaires à base de dioxaborine exploitant des rotations intramoléculaires à l'état excité : ces sondes sont très sensibles à la viscosité et la polarité de leur environnement et représentent des outils puissants pour une meilleure compréhension des interactions ligand-RCPG à la surface des cellules [9] ;
- les dimères fluorogènes basés sur le principe d'extinction par agrégation de deux fluorophores ; en raison de leur brillance exceptionnelle, ces derniers sont particulièrement prometteurs pour l'imagerie des RCPG (figure 3).

La première génération de sondes dimères fluorogènes a été conçue à partir de la carbétocine, et d'un fluorophore dérivé d'une structure squaraine (dSQ-PEG-CBT, figure 3A), photostable et brillante [10]. La squaraine est capable de s'agréger en solution pour former des interactions de type H-agrégats. La sonde ainsi obtenue n'est pas fluorescente dans l'eau mais, après liaison au récepteur de l'ocytocine, dans un environnement hydrophobe, les fluorophores se dissocient en deux structures extrêmement brillantes (figure 3A). La sonde a ainsi

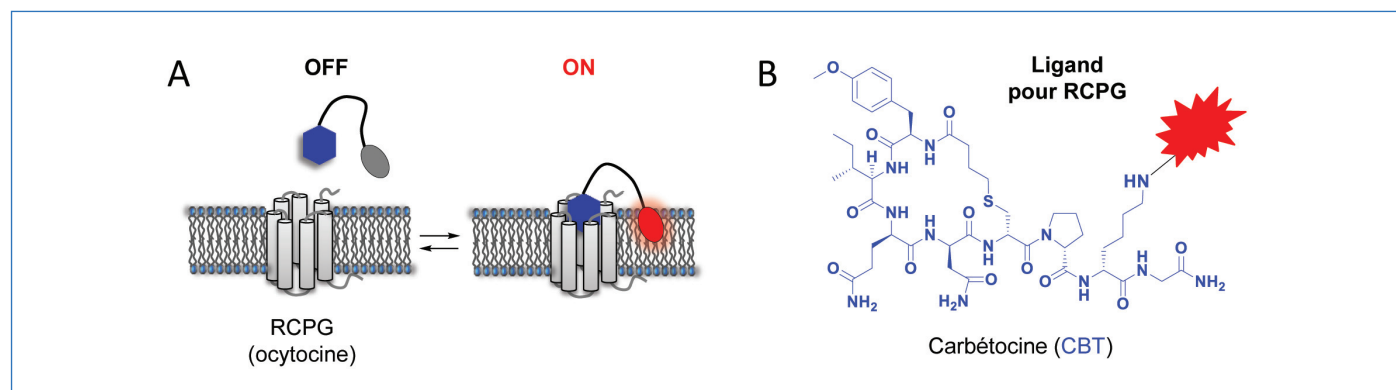


Figure 1 - Sondes fluorescentes fluorogènes pour l'imagerie des RCPG : A) principe de la détection « Turn-On » des RCPG à la surface des cellules ; B) structure chimique de la carbétocine, ligand du récepteur de l'ocytocine.

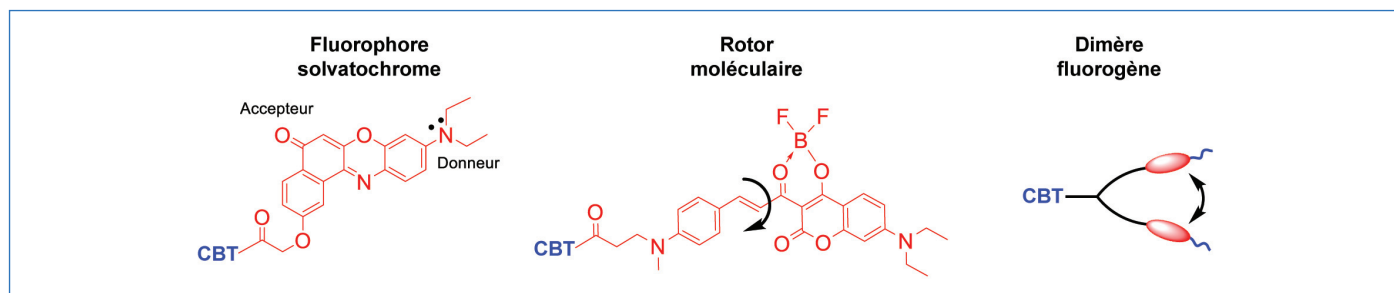


Figure 2 - Trois familles de sondes fluorogènes couplées à la carbécytocine (CBT).

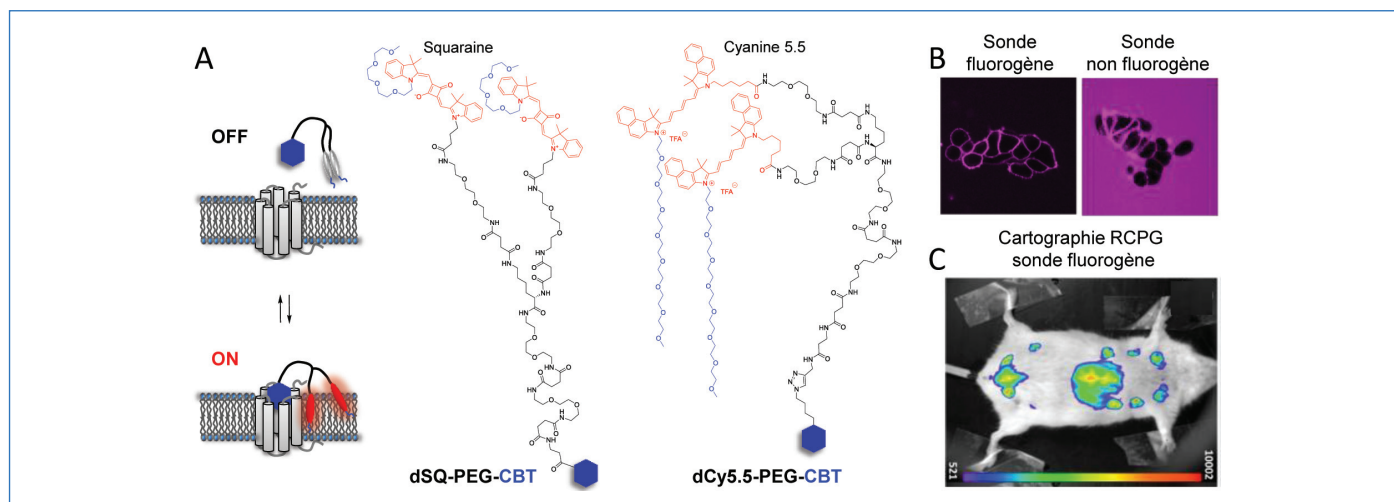


Figure 3 - A) Principe des sondes dimères fluorogènes et structures chimiques de ces sondes couplées à la carbécytocine (dSQ-PEG-CBT et dCy5.5-PEG-CBT). B-C) Exemple d'applications de la dernière génération de sondes dimères fluorogènes dans le proche infrarouge pour l'imagerie du récepteur de l'ocytocine à la surface de cellules vivantes en comparaison avec une sonde fluorescente non fluorogène B) et dans l'animal entier C).

permis de détecter de façon spécifique ce récepteur à la surface des cellules avec un excellent rapport signal/bruit [11]. Plus récemment, nous avons mis à profit ce concept pour concevoir la première sonde dimère fluorogène dCy5.5-PEG-CBT utilisable dans le proche infrarouge (700-900 nm) (figure 3A). En raison de son caractère fluorogène, cette sonde présente l'avantage majeur de permettre la visualisation d'un RCPG à la surface de cellules sans étape de lavage intermédiaire, généralement nécessaire lorsqu'une sonde non fluorogène est utilisée (figure 3B). D'autre part, sa fenêtre spectrale dans le proche infrarouge permet une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus, pour visualiser les récepteurs endogènes de l'ocytocine directement chez l'animal [12] (figure 3C).

Ainsi, ces sondes fluorescentes innovantes pour la chimobio- logie des RCPG ouvrent la voie à la cartographie de ces récep- teurs dans un organisme entier pour le diagnostic, mais égale- ment pour l'étude de l'efficacité de traitements médicaux, ou encore pour la chirurgie assistée par la lumière.

- [5] A.S. Klymchenko, Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*, p. 366-375.
- [6] M.C. Frantz, D. Bonnet *et al.*, LIT-001, The first nonpeptide oxytocin receptor agonist that improves social interaction in a mouse model of autism, *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, p. 8670-692.
- [7] I.A. Karpenko, D. Bonnet, A.S. Klymchenko *et al.*, Red fluorescent turn-on ligands for imaging and quantifying G protein-coupled receptors in living cells, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, p. 359-363.
- [8] F. Hanser, A. Klymchenko, D. Bonnet *et al.*, Nile red-based GPCR ligands as ultrasensitive probes of the local lipid microenvironment of the receptor, *ACS ChemBiol.*, **2021**, *16*, p. 651-660.
- [9] I.A. Karpenko, D. Bonnet, A.S. Klymchenko *et al.*, Push-pull dioxaborine as fluorescent molecular rotor: far-red fluorogenic probe for ligand-receptor interactions, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, *4*, p. 3002-009.
- [10] I.A. Karpenko, A.S. Klymchenko, D. Bonnet *et al.*, Squaraine as bright, stable and environment-sensitive far-red label for receptor-specific cellular imaging, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, p. 2960-963.
- [11] I.A. Karpenko, D. Bonnet, A.S. Klymchenko *et al.*, Fluorogenic squaraine dimers with polarity-sensitive folding as bright far-red probes for background-free bioimaging, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, p. 405-412.
- [12] L. Esteouille, A.S. Klymchenko, D. Bonnet *et al.*, A near-infrared fluorogenic dimer enables background-free imaging of endogenous GPCRs in living mice, *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, p. 6824-829.

- [1] A.S. Hauser, M. Attwood, M. Rask-Andersen, H.B. Schiöth, D.E. Gloriam, Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2017**, *16*, p. 829-842.
- [2] Z. Ma, L. Du, M. Li, Toward fluorescent probes for G-protein-coupled receptors, *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, p. 8187-203.
- [3] C. Hounsou, D. Bonnet *et al.*, Time-resolved FRET binding assay to investigate hetero-oligomer binding properties: proof of concept with dopamine D₁/D₃ heterodimer, *ACS Chem. Biol.*, **2015**, *10*, p. 466-474.
- [4] S. Loison, D. Bonnet *et al.*, Selective fluorescent nonpeptidic antagonists for vasopressin V₂ GPCR: application to ligand screening and oligomerization assays, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, p. 8588-602.

Dominique BONNET,

Directeur de recherche au CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie d'Ilkirch, Université de Strasbourg.

Andrey KLYMCHENKO,

Directeur de recherche au CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie d'Ilkirch, Université de Strasbourg.

* dbonnet@unistra.fr ; andrey.klymchenko@unistra.fr