



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de mimes de surfaces d'interaction protéine-protéine par voie d'assemblage combinatoire sur châssis spatialement adressable

Sophie Plé

► **To cite this version:**

Sophie Plé. Synthèse et caractérisation de mimes de surfaces d'interaction protéine-protéine par voie d'assemblage combinatoire sur châssis spatialement adressable. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00011547

HAL Id: tel-00011547

<https://theses.hal.science/tel-00011547>

Submitted on 6 Feb 2006

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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : **CHIMIE-BIOLOGIE**

Présentée par :

Sophie PLÉ

Soutenue publiquement le 12 Janvier 2006

**SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE MIMES DE SURFACES
D'INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE PAR VOIE D'ASSEMBLAGE
COMBINATOIRE SUR CHÂSSIS SPATIALEMENT ADRESSABLE**

Directeur de thèse : **Pr. Pascal DUMY**

Jury composé de :

Pr. Benoît JOSEPH , CNRS 5181, Université Claude Bernard – Lyon I	Rapporteur
Pr. Jean MARTINEZ , CNRS UMR 5810, LAPP, Montpellier	Rapporteur
Pr. Christiane GARBAY , CNRS FRE 2718, INSERM U648, Paris V	Examineur
Dr. Yves CHAPLEUR , CNRS UMR 7565, Université H. Poincaré, Nancy	Examineur
Pr. Pierre LABBÉ , CNRS UMR 5630, ICMG-FR2607, LEOPR, Grenoble	Examineur
Pr. Pascal DUMY , CNRS UMR 5616, ICMG-FR2607, LEDSS, Grenoble	Directeur de thèse

*Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité
(LEDSS – Grenoble)*

*A mes parents, Nelly et Gérard,
A mes grand-mères, Alice et Léonce, qui me manquent cruellement,
A mon Papy Louis,
A mon Papy René.*

REMERCIEMENTS

Je remercie, tout particulièrement **Le Professeur Pascal Dumy**, directeur du LEDSS, responsable de l'équipe d'Ingénierie Moléculaire et de Chimie des Composés Bio-organiques et directeur de cette thèse pour m'avoir permis de rejoindre son équipe de recherche en m'accueillant au sein de son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour son aide lors de l'obtention de ma dispense de DEA, me permettant alors de débiter ces travaux de thèse. Je lui exprime également toute ma gratitude pour avoir dirigé mon travail, m'avoir fait bénéficier de ses conseils, de sa confiance et de sa grande curiosité scientifique.

Je tiens également à remercier **Le Professeur Jean Martinez** et **Le Professeur Benoît Joseph** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux ; **Le Professeur Christiane Garbay**, **Le Docteur Yves Chpaleur** et **Le Professeur Pierre Labbé** pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Leurs critiques et leurs jugements furent d'un grand intérêt pour moi.

Merci aussi à **L'ACI 2003 « Molécules et Cibles Thérapeutiques »** qui a financé mes travaux durant ces trois années.

J'ai une pensée particulière pour **Mélanie Figuet** avec qui j'ai découvert le sujet en poursuivant ses travaux, qui m'a formée à la synthèse peptidique ainsi qu'aux analyses CLHP et par spectrométrie de masse et qui a fini par me léguer son bureau (!). Egalement pour **Gesa Tietjens** qui a mis au point le test ELISA pratiqué lors du ciblage de la protéine Grb2 et qui m'a appris à réaliser ces études biologiques. Et bien sûr pour **Vincent Duléry** qui a rejoint notre laboratoire alors que j'entamais ma dernière année de thèse et qui m'a fortement aidée lorsque nous avons choisi de synthétiser à nouveau certaines banques de produits. Un grand merci à tous les trois également pour leur bonne humeur, leur enthousiasme et tous les bons moments que nous avons passés ensemble au laboratoire... ou ailleurs !

Merci à **Sabine Chierici** pour son aide et ses conseils avisés au niveau des synthèses. Egalement merci pour sa relecture pointilleuse malgré sa « grossesse avancée » et toutes les discussions que nous avons eues. Merci à **Didier Boturyn** pour ses précisions subtiles pour la synthèse peptidique et l'utilisation des CLHP ou des lyoph. Merci également à **Olivier Renaudet** pour sa relecture avisée de ce manuscrit, pour son aide lors de la préparation de la soutenance ainsi que pour ses conseils au laboratoire.

Je remercie également **William Moneta** et **Cécile Jamin** pour la réalisation des spectres de masse. Merci à William pour m'avoir formée à l'utilisation de l'appareil et pour sa confiance en me laissant m'en servir des week-ends entiers ! Merci à Cécile pour les analyses de LC-MS qui nous furent d'un grand intérêt lors de la caractérisation de nos banques.

J'ai bien entendu une pensée émue pour tous les membres du LEDSS 5 qui m'ont accompagnée et supportée pendant ces trois années. A **Régine, Véronique et Elizabeth** pour leur efficacité et leurs services rendus toujours avec le sourire, pour leur bonne humeur et leur dynamisme. A **Eric, Jean-François, Julian, Muriel, Nathalie et Martine** pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci aux colocataires de la « salle des étudiants » : **Babeth** et son « sale caractère », **Laurent** qui m'a fait goûter à sa passion pour l'œnologie, **Mathilde** toujours disponible, **Walid, Nabil, Vincent, Gunnar** et les « nouvelles recrues » **Stéphanie et Myriam**. Merci à **Gesa, Jesus et Christian** pour les bons moments passés en montagne. Merci à **Martin** et ses bêtises de « danois » ! Merci à tous, du fond du cœur, pour tous les bons moments que nous avons pu partager, nos discussions et votre bonne humeur, vous allez me manquer...

Je n'oublie pas non plus nos chers voisins des LEDSS 1, 2, 3, 4 et 7 ainsi que du LIDSET avec qui j'ai pu partager quelques moments de détente entre deux manipes. Tout d'abord, merci à **Christian** pour sa gentillesse, les nombreux cinés et cours de rollers ainsi que ses jeux avec Jean-Jean ! Merci également à **Antony** pour ses encouragements et les nombreux thés que nous avons partagés. Merci aussi à **Cédric** pour nos sorties grimpatouille et nos discussions voyages et trek, merci à **Claire** pour ses thés toujours réconfortants. Je pense aussi à toute **L'équipe du LEDSS 2** pour les nombreux « cafés invités (!) » et les « séminaires du Jeudi soir ». Merci à **Amaël, Thomas, Sébastien, Mauro et Julien** pour nos discussions inter-étage et les bonnes soirées passées ensemble.

Merci tout particulièrement à **Stéphane** pour toutes ses attentions, pour son amour et sa gentillesse. Je crois que le plus difficile fut d'arriver à me supporter dans le dernier mois précédant la soutenance, merci de m'avoir facilité la vie à ce moment là et de ne pas m'en porter rigueur. Merci de m'avoir longuement écoutée et soutenue dans les « moments de moins bien » tout au long de cette dernière année. Merci enfin de m'avoir ouvert les portes des « séminaires du Jeudi soir », avec la complicité de **Fabrice et Olaf** !

Merci aussi à **Damien** qui m'a encouragée à venir étudier dans ce laboratoire de Grenoble. Egalement pour m'avoir transmis sa passion de l'escalade, de l'alpinisme et de la randonnée ; pour les expériences que nous avons pu partager, notamment notre action humanitaire au Mali et le magnifique voyage en Jordanie.

Merci enfin à tous mes amis qui m'ont supportée pendant toute cette période surtout lors des moments plus stressants et où j'étais moins disponible pour eux. Merci en particulier à **Estelle, Amélie, Morgan, Fabio, Annaelle, Elise, Brice et Florence** ainsi qu'à « l'équipe allemande » à savoir **Christian, Bernd, Eva, Alice et Björn**.

Enfin, je ne peux terminer ces remerciements sans faire un petit clin d'œil aux « *Bronzés* » qui, lorsqu'ils « *font du ski* », soignent Mme Schmidt avec de l' α -chymotrypsine !

TABLE DES MATIERES

Abréviations.....	13
Liste des Acides Aminés Naturels.....	14
Introduction.....	15
<hr/>	
<i>Avant-propos.....</i>	<i>17</i>
I. Les surfaces d'interaction protéine-protéine.....	18
A. <i>Spécificités des surfaces d'interactions protéine-protéine.....</i>	<i>20</i>
B. <i>Cas particulier de la multivalence.....</i>	<i>21</i>
<i>En résumé.....</i>	<i>22</i>
II. Différentes approches combinatoires.....	23
A. <i>Méthodes générales.....</i>	<i>23</i>
1. <i>La méthode « one-bead-one-compound ».....</i>	<i>23</i>
2. <i>Les bibliothèques itératives.....</i>	<i>26</i>
3. <i>Les bibliothèques spatialement adressables.....</i>	<i>29</i>
4. <i>Les bibliothèques issues de solutions synthétiques.....</i>	<i>36</i>
B. <i>Le « phage display ».....</i>	<i>37</i>
1. <i>Construction des banques : élaboration des OGN.....</i>	<i>37</i>
2. <i>Phages monovalents – Phages polyvalents.....</i>	<i>38</i>
3. <i>Intérêt d'une approche par rapport à l'autre.....</i>	<i>39</i>
C. <i>Approches nouvelles.....</i>	<i>39</i>
1. <i>Les bibliothèques virtuelles.....</i>	<i>39</i>
2. <i>La méthode « tethering ».....</i>	<i>43</i>
D. <i>Méthodes d'identification des produits actifs^[1].....</i>	<i>46</i>
1. <i>Au sein des bibliothèques issues de méthodes générales.....</i>	<i>46</i>
2. <i>Au sein des bibliothèques obtenues par « phage display ».....</i>	<i>50</i>
3. <i>Au sein des bibliothèques issues des approches nouvelles.....</i>	<i>51</i>
<i>En résumé.....</i>	<i>52</i>
III. Travaux réalisés sur les mimes de surfaces.....	53
A. <i>Mimes de surfaces réduites.....</i>	<i>53</i>
B. <i>Création de protéines « de novo ».....</i>	<i>56</i>
1. <i>Principe.....</i>	<i>56</i>
2. <i>Exemples de méthodes de création.....</i>	<i>57</i>
C. <i>Mimes d'anticorps.....</i>	<i>61</i>
1. <i>Description d'un anticorps.....</i>	<i>61</i>
2. <i>Exemples de mimes sur châssis.....</i>	<i>63</i>
D. <i>Mimes et inhibition de récepteurs.....</i>	<i>64</i>
1. <i>Mimes de récepteurs.....</i>	<i>64</i>
2. <i>Ciblage de récepteurs.....</i>	<i>66</i>
E. <i>Minimisation de protéines.....</i>	<i>67</i>
F. <i>Inhibition d'interactions protéine-protéine par de petites molécules.....</i>	<i>71</i>
<i>En résumé.....</i>	<i>74</i>
IV. Le projet de recherche.....	75
A. <i>Choix de la matrice RAFT.....</i>	<i>77</i>
B. <i>Objectifs de notre projet de recherche.....</i>	<i>79</i>

Chapitre I - Le châssis RAFT et la synthèse peptidique.....83

I. Le châssis RAFT et les liaisons chimiosélectives	85
A. <i>Le châssis RAFT</i>	85
1. Travaux antérieurs.....	85
2. Description des RAFTs	86
B. <i>La liaison chimiosélective</i>	91
1. La liaison oxime	91
2. Méthodes de synthèse de protéines natives.....	92
3. Autres liaisons chimiosélectives	94
a. La liaison disulfure (cf. Figure 60).....	95
b. Les liaisons thioesters (cf. Figure 60)	96
c. La liaison hydrazone (cf. Figure 60)	97
d. La liaison pseudoproline (cf. Figure 60)	97
II. La synthèse peptidique.....	98
A. <i>Principe</i>	98
B. <i>Synthèse peptidique sur phase solide</i>	101
III. Résultats	104
A. <i>Préparation des châssis RAFT</i>	104
1. RAFT à un domaine	104
2. RAFT à deux domaines : matrice présentant le colorant dabsyl.....	107
B. <i>Les motifs peptidiques</i>	110
1. Design des peptides linéaires	111
2. Synthèse des peptides linéaires	112
3. Design des peptides cycliques.....	114
4. Synthèse des peptides cycliques.....	115
<i>En résumé</i>	120

Chapitre II - Assemblage combinatoire et description des bibliothèques..123

I. Stratégie de synthèse	125
A. <i>Etudes préliminaires</i>	125
1. Conditions de réaction.....	125
2. Conditions de purification.....	126
B. <i>Résolution des problèmes</i>	127
1. Pureté des produits de départ	127
2. Problèmes de solubilité	127
3. Problèmes de purification.....	128
II. Aspect théorique de l'approche.....	129
A. <i>Nombre de produits</i>	129
1. Nombre global et sous-ensembles.....	129
2. Distribution en produits de chaque sous-groupe	130
3. Cas particulier du gabarit à un domaine.....	132
B. <i>Prévision des chromatogrammes CLHP</i>	134
1. Prévision de l'allure des chromatogrammes	134
2. Prévision des temps de rétention.....	135
III. Description de la bibliothèque à un domaine, substituants cycliques .	137
A. <i>Synthèse des RAFTs à un ligand (premier sous-ensemble)</i>	137
B. <i>Caractérisation d'une sous-bibliothèque à deux ligands</i>	138
1. La sous-bibliothèque RAFT _{1D} ([21],[22]) : prévision et analyse CLHP.....	139
2. Analyse par LC-MS	141
C. <i>Caractérisation d'une sous-bibliothèque à trois ligands</i>	143
1. La sous-bibliothèque RAFT _{1D} ([21],[22],[23]) : prévision et analyse CLHP	143
2. Analyse par LC-MS	145
D. <i>Caractérisation de la bibliothèque à quatre ligands</i>	147
1. La bibliothèque RAFT _{1D} ([21],[22],[23],[24]) : prévision et analyse CLHP.....	148
2. Analyse LC-MS.....	150
<i>En résumé</i>	151

Chapitre III - Evaluations biologiques.....	153
----------------------------------------------------	------------

I. Inhibition de l'interaction GnRH-récepteur	156
A. <i>La GnRH et son récepteur.....</i>	156
1. La GnRH.....	156
2. Le récepteur de la GnRH.....	158
3. Acides aminés impliqués dans la reconnaissance	160
B. <i>Approche et ciblage du récepteur et de l'hormone.....</i>	161
1. Travaux antérieurs.....	161
2. Elaboration d'éléments de reconnaissance.....	161
C. <i>Tests effectués.....</i>	162
1. Principe des colonnes d'affinité	162
2. Colonne d'affinité fonctionnalisée aldéhyde.....	163
3. Colonne d'affinité avidine-agarose	167
II. Etudes d'interactions avec l'avidine.....	169
A. <i>L'avidine.....</i>	169
1. Description de la structure.....	169
2. Eléments de ciblage.....	170
3. Applications	170
B. <i>Tests effectués.....</i>	171
1. Test avec l'Avidine sur une phase stationnaire d'agarose	172
2. Test avec le complexe Avidine-Biotine sur une phase stationnaire d'agarose	173
III. Ciblage du domaine SH2 de la protéine Grb2.....	176
A. <i>Généralités</i>	176
1. Famille des récepteurs de facteurs de croissance de l'épiderme	176
⇒ ErbB2	178
2. Cascades de réactions induites par les facteurs de croissance.....	178
⇒ Les récepteurs de facteurs de croissance.....	181
3. Conception d'inhibiteurs d'interactions Grb2-SHC.....	184
B. <i>Description du test</i>	188
C. <i>Résultats et conclusions</i>	190
1. Détermination de la concentration des mélanges.....	191
2. Test global à 1µM et 0,1µM.....	192
3. Test à différentes concentrations.....	193
4. Conclusions	196
IV. Perspectives : ciblage d'une enzyme, l'α-chymotrypsine	200
A. <i>L'α-chymotrypsine.....</i>	200
<i>L'importance des inhibiteurs</i>	202
<i>Mimes d'inhibiteurs connus</i>	203
B. <i>Test effectué.....</i>	205
<i>En résumé.....</i>	205
Conclusion et perspectives.....	207

Partie expérimentale.....213

I. Généralités.....	215
A. Réactifs et solvants.....	215
B. Synthétiseur automatique de peptides.....	215
C. Tests ELISA.....	215
D. Chromatographie.....	215
E. Spectrométrie de masse.....	216
F. Spectrométrie UV.....	216
G. Spectrométrie RMN.....	216
II. Protocoles standards pour la synthèse des peptides.....	217
A. Synthèse de peptides linéaires protégés par SPPS.....	217
B. Couplage des acides aminés protégés Fmoc N- α	217
1. Couplage manuel – Protocole 1	217
2. Premier couplage sur résine 2-Chlorotrityle [®] - Protocole 2	218
3. Couplage automatisé – Protocole 3	218
4. Couplage en solution – Protocole 4	218
C. Coupure des groupements protecteurs Fmoc-N- α sur support solide – Protocole 5	218
D. Blocage des sites de réaction.....	219
1. Cas de la résine 2-Chlorotrityle [®] - Protocole 6	219
2. Blocage des amines libres (« capping ») – Protocole 7	219
E. Suivi de la réaction de couplage peptidique.....	220
1. Le test de Kaiser.....	220
2. Le test TNBS.....	220
3. Préparation d'échantillon pour l'analyse CLHP.....	221
F. Cyclisation des peptides en solution – Protocole 8	221
G. Formation de ponts disulfure sur phase solide – Protocole 9	221
H. Formation de ponts disulfure en solution.....	222
1. A l'air – Protocole 10	222
2. Avec du DMSO – Protocole 11	222
I. Détection des fonctions thiol libres – Test d'Ellman	222
J. Coupure des groupements protecteurs des chaînes latérales.....	223
1. Coupure des groupements Boc en solution – Protocole 12	223
2. Coupure d'autres groupements que le Boc – Protocole 13	223
3. Coupure du groupement N- ϵ Alloc en solution – Protocole 14	223
4. Coupure du groupement N- ϵ Alloc sur support solide – Protocole 15	223
K. Coupure de la résine – Protocole 16	224
L. Formation de l'aldéhyde glyoxylique – Protocole 17	225
M. Couplage chimiosélectif – Protocole 18	225
III. Synthèses des RAFTs	226
A. RAFT à un domaine.....	226
1. Fmoc-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Résine : 1 226	
2. NH ₂ -Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-COOH : 2 226	
3. c[Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly] : 3.....	226

4.	c[Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Ala-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Ala-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly] : 4	227
5.	c[Lys(<i>Ser</i>)-Ala-Lys(<i>Ser</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>Ser</i>)-Ala-Lys(<i>Ser</i>)-Pro-Gly] : 5	227
6.	c[Lys(<i>COCHO</i>)-Ala-Lys(<i>COCHO</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>COCHO</i>)-Ala-Lys(<i>COCHO</i>)-Pro-Gly] : 6	228
B.	<i>RAFTs à deux domaines</i>	228
1.	Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-Lys(<i>Alloc</i>)-Lys(<i>Boc</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>Boc</i>)-Ala-Lys(<i>Boc</i>)-Pro-Gly-Résine : 7	228
2.	c[Lys(<i>Boc</i>)-Lys(<i>Alloc</i>)-Lys(<i>Boc</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>Boc</i>)-Ala-Lys(<i>Boc</i>)-Pro-Gly] : 8	229
3.	c[Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Lys(<i>Alloc</i>)-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Ala-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly] : 9	229
4.	c[Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Lys-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Ala-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly] : 10	230
5.	c[Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Lys(<i>Dabsyl</i>)-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Ala-Lys(<i>Boc-Ser(-OtBu)</i>)-Pro-Gly] : 11	230
6.	c[Lys(<i>COCHO</i>)-Lys-Lys(<i>COCHO</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>COCHO</i>)-Ala-Lys(<i>COCHO</i>)-Pro-Gly] : 12	231
7.	c[Lys(<i>COCHO</i>)-Lys(<i>Dabsyl</i>)-Lys(<i>COCHO</i>)-Pro-Gly-Lys(<i>COCHO</i>)-Ala-Lys(<i>COCHO</i>)-Pro-Gly] : 13	232
IV.	Synthèse des synthons peptidiques	233
A.	<i>Synthèse des peptides linéaires</i>	233
1.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Leu-Ser-Asp-Phe-Asn-OH : 14	233
2.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Leu-Asp-Trp-Met-Asn-Leu-OH : 15	234
3.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Leu-Ser-Asp-Val-Gly-OH : 16	235
4.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Arg-Leu-Ser-Asp-Phe-Asn-Phe-Arg-NH ₂ : 17	235
5.	6- _D Lys-GnRH-Oxyamine : 18	236
6.	6- _D Lys-GnRH-Biotine : 19	237
B.	<i>Synthèses des peptides cycliques</i>	237
1.	Boucle EC3 du récepteur de la GnRH : 20	237
2.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Gly-Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Cys-NH ₂ : 21	238
3.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Gly-Cys-Asp-Gly-Asp-Gly-Cys-NH ₂ : 22	239
4.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Gly-Cys-Phe-Gly-Phe-Gly-Cys-NH ₂ : 23	242
5.	H ₂ NO-CH ₂ -CO-Gly-Gly-Cys-Ser-Gly-Ser-Gly-Cys-NH ₂ : 24	243
V.	Synthèse de bibliothèques de molécules	244
A.	<i>Protocoles standards de synthèse</i>	244
1.	En présence d'eau et d'acétonitrile – Protocole 19	244
2.	En présence de DMSO – Protocole 20	244
3.	Mode de purification – Protocole 21	244
B.	<i>Bibliothèques de molécules à partir de peptides linéaires</i>	245
1.	Bibliothèques à un domaine	245
2.	Bibliothèques à deux domaines.....	253
C.	<i>Bibliothèques de molécules à partir de peptides cycliques – RAFTs à un domaine</i> ..	261
1.	RAFT à un ligand : RAFT _{1D} ([21]).....	261
2.	RAFT à un ligand : RAFT _{1D} ([22]).....	261
3.	RAFT à un ligand : RAFT _{1D} ([23]).....	262
4.	RAFT à un ligand : RAFT _{1D} ([24]).....	262
5.	Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT _{1D} ([21],[22]).....	262
6.	Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT _{1D} ([21],[23]).....	263
7.	Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT _{1D} ([21],[24]).....	263
8.	Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT _{1D} ([22],[23]).....	264

9.	Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT _{1D} ([22],[24]).....	264
10.	Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT _{1D} ([23],[24]).....	264
11.	Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT _{1D} ([21],[22],[23]).....	265
12.	Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT _{1D} ([21],[22],[24]).....	265
13.	Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT _{1D} ([21],[23],[24]).....	266
14.	Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT _{1D} ([22],[23],[24]).....	267
15.	Bibliothèque « mère » à quatre ligands : RAFT _{1D} ([21],[22],[23],[24]).....	267
VI.	Synthèse de réactifs	269
A.	<i>Synthèse de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique</i> : 25	269
B.	<i>Synthèse de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique</i> : 26	269
VII.	Réalisation de tests.....	270
A.	<i>Réalisation de solutions tampon</i>	270
1.	Tampons pour la synthèse peptidique	270
2.	Tampon pour les tests d'affinité sur colonne	270
3.	Tampons pour le test ELISA de l'ACI.....	271
4.	Tampons pour le test ELISA avec l' α -chymotrypsine	273
B.	<i>Test d'affinité sur colonne</i>	274
1.	Test sur Agarose.....	274
2.	Test sur résine Avidine-Agarose [®]	275
3.	Test sur résine Biotine-Avidine-Agarose.....	276
4.	Test sur résine GnRH-Biotine-Avidine-Agarose	277
C.	<i>Test ELISA de l'ACI</i>	278
1.	Incubation du peptide SHC317 biotinylé	278
2.	Rinçage des puits.....	278
3.	Blocage des sites de liaison non spécifiques.....	279
4.	Incubation de la protéine GST-Grb2 et des bibliothèques de produits	279
D.	<i>Test ELISA avec l'α-chymotrypsine</i>	283
1.	Test effectué avec le substrat SI.....	283
2.	Test effectué avec le substrat SII.....	284

Annexes.....285

Annexe I – Informations complémentaires se rapportant à l’introduction.....287

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]).....305**

Annexe III – Représentation des sous-bibliothèques.....333

Annexe IV – Informations complémentaires se rapportant au Chapitre III.....341

Annexe V – Valorisation des compétences, Un nouveau chapitre de la thèse.....357

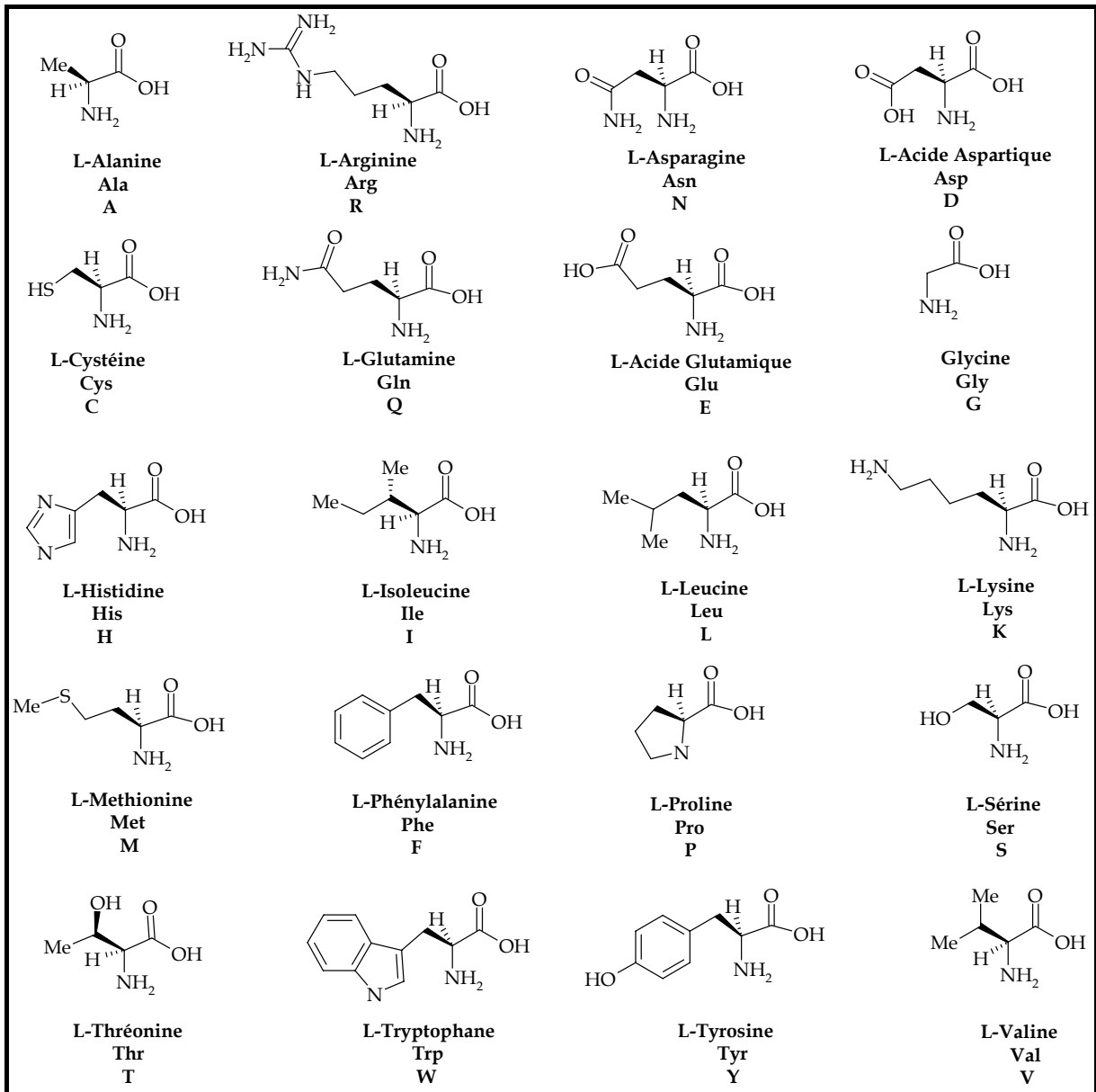
Annexe VI – Publication.....369

Annexe VII – Guide d’utilisation du synthétiseur automatique de peptides.....379

ABREVIATIONS

A	Solvant A : 99,9% H ₂ O ; 0,1% TFA	NPys	3-Nitro-2-pyridinesulfényl
Ac	Acétyl	NaIO₄	Periodate de Sodium 2,2,6,7-
Acm	Acétamidométhyl	Pbf	Pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl
AcOEt	Acétate d'éthyle	PBS	Phosphate Buffer Saline
AcOH	Acide acétique	Pd^oP(Ph₃)₄	Palladium Tetralis [®] Triphénylphosphine
AcONa	Acétate de sodium	PhSiH₃	Phenylsilane
AcONH₄	Acétate d'ammonium	Pmc	2,2,5,7,8-Pentaméthylchroman-6-sulfonyl
Alloc	Allyloxy-carbonyl	pNZ	Para-nitrobenzyloxy-carbonyl
B	Solvant B : 99% CH ₃ CN ; 0,9% H ₂ O ; 0,1% TFA	PyAOP	(7-azabenzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium (Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
BSA	Bovine Serum Albumine	PyBOP[®]	2-Pyridinesulfényl
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxy-carbonyl	Pyr	Regioselectively Addressable Functionalized Template
tBu	<i>Tertio</i> -butyl	RAFT	Résonance Magnétique Nucléaire
Bz	Benzoyle	RMN	<u>Super Acid Sensitive Resin</u>
CH₃CN	Acétonitrile	SASRIN	Méthoxy-carbonylsulfényl
(CH₃)₂SiCl₂	Dichlorodiméthylsilane	Scm	Spectrométrie de Masse
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance	SM	
Dabsyl	4'-chlorure de sulfonyl du diméthylaminoazobenzène	SPPS	Synthèse Peptidique sur Phase Solide
DCC	N,N-Dicyclohexylcarbodiimide	Succ	Succinimide
DCM	Dichlorométhane	TASP	Template Assembled Synthetic Protein
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle	TBS	Tris Buffer Saline
DIEA	N,N-Diisopropyléthylamine	TFA	Acide Trifluorocétique
DMF	N,N-Diméthylformamide	Tmob	Triméthoxybenzyl
DMSO	Diméthylsulfoxyde	TNBS	Acide Trinitrobenzènesulfonique
DO	Densité Optique	t_R	Temps de Rétention
DTNB	Acide 5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)	Trt	Triphénylméthyl (ou Trityl)
EDT	Ethanedithiol		
ELISA	Enzyme-Like ImmunoSorban Assay		
ESI	Electrospray Ionisation		
Et₂O	Ether diéthylique		
EtOH	Ethanol		
Fm	9-Fluorénylméthyl		
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl		
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole		
HF	Acide Fluorhydrique		
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole		
cHx	Cyclohexyle		
I₂	Diode		
MeOH	Méthanol		
Mtt	Méthoxytrityle		

LISTE DES ACIDES AMINÉS NATURELS



INTRODUCTION

Avant-propos

Depuis quinze ou vingt ans, la recherche concernant les molécules à visée biologique bénéficie d'un essor exponentiel produisant ainsi chaque année des composés aux activités toujours plus puissantes et sélectives.

D'une façon générale, la majorité des interactions qui gouvernent les phénomènes biologiques sont de nature d'interactions de surfaces. En effet, les interactions entre deux biomolécules comme les interactions protéine-peptide, protéine-oligosaccharide ou protéine-protéine sont régulées par des phénomènes de reconnaissance de surface extrêmement complexes. Ces processus ont lieu au niveau d'interfaces de contact qui sont particulièrement difficiles à caractériser et impliquant diverses types de protéines comme les enzymes, les hormones, les récepteurs cellulaires ou les protéines impliquées dans les signaux de transduction.

Ainsi, la conception de molécules affines et sélectives de ces surfaces de reconnaissance présente-t-elle un intérêt biologique considérable^[1]. C'est la raison pour laquelle les chercheurs tentent depuis quelques années de trouver de nouvelles approches visant non plus des régions très localisées des protéines mais plutôt de plus grandes surfaces continues ou mêmes discontinues^[2] en utilisant de nouvelles techniques comme la formation combinatoire de banques de produits par exemple.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la logique des avancées de la recherche de ces dernières années dans ce domaine. Il s'intéresse en effet à la création de surfaces complémentaires à une cible, ces mimes de surfaces pouvant être continus ou discontinus.

Par ailleurs, cette thèse a fait l'objet d'une collaboration entre le Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Chimie Bio-organiques (UJF-CNRS UMR 5616 ; Pr. P. Dumy) et le Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire et Structurale (INSERM U266, UMR CNRS 8600 ; Pr. C. Garbay). Elle a été réalisée dans le cadre de l'ACI 2003 « Molécules et cibles thérapeutiques ».

¹ M. W. Pecuh, A. D. Hamilton. " Peptide and protein recognition by designed molecules. " *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 2479-2494.

² L. Regan, J. Wells. " Engineering and design. Recent adventures in molecular design. " *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1998**, *8*, 441-442.

I. Les surfaces d'interaction protéine-protéine

Les interactions protéine-protéine sont à la base du fonctionnement d'un grand nombre de procédés au sein des cellules. Par exemple, la formation de complexes de protéines est cruciale pour la création des sites actifs des enzymes oligomériques et le maintien de leur conformation active. Ces interactions protéine-protéine sont également cruciales pour les phénomènes de régulation incluant la transduction de signaux, les contacts cellule-cellule, les systèmes de transport d'électrons, les interactions anticorps-antigène, la synthèse d'ADN ou la formation de structures intracellulaires, etc... Au contraire, la formation de complexes protéiques pathogène peut être responsable du développement de certains composés des maladies d'Alzheimer ou du prion, des dérèglements engendrant des cancers, etc... C'est la raison pour laquelle les chercheurs tentent d'étudier et de comprendre depuis plusieurs décennies les mécanismes qui gouvernent les interactions entre les protéines et le mode de transmission des signaux qu'elles engendrent.

Pour cela, ils ont développé différentes méthodes pour étudier la conformation spatiale des protéines (spectroscopie RMN, cristallographie aux rayons X), leurs séquences (phage display, criblage par mutation génétique ou « mutagenic screening », mutation dirigée d'acides aminés ou « site-directed mutagenesis », modifications chimiques) ou pour évaluer la force des interactions entre deux protéines (filtration sur gel, analyse calorimétrique, spectrométrie de fluorescence, biacore®...). De nouvelles méthodes utilisant des réactifs de coupures spécifiques de certains sites ou bien la liaison de groupements chimiques aux protéines pour évaluer leurs modes d'interactions entre elles ont été développées^[3]. Une autre méthode largement utilisée fut celle assistée par ordinateur. Elle permet par exemple de faire des estimations quant aux sites de liaison des protéines. Une autre application est la création de protéines chimères présentant les propriétés de deux protéines distinctes réunies en une seule. Un exemple est la fusion de deux protéines comportant chacune une moitié de chaîne reconnaissant spécifiquement l'ADN. Elles furent rassemblées et fusionnées en modifiant une séquence de 14 positions avec les 20 acides aminés mis à part la cystéine. Les chercheurs

³ M. A. Trakselis, S. C. Alley, F. T. Ishmael. "Identification and mapping of protein-protein interactions by a combination of cross-linking, cleavage, and proteomics." *Bioconj. Chem.*, **2005**, *16*, 741-750.

obtiennent ainsi une nouvelles protéine présentant une interface stable de 1400 Å² et ayant une nouvelle activité catalytique vis-à-vis de l'ADN (cf. Figure 1)^[4].

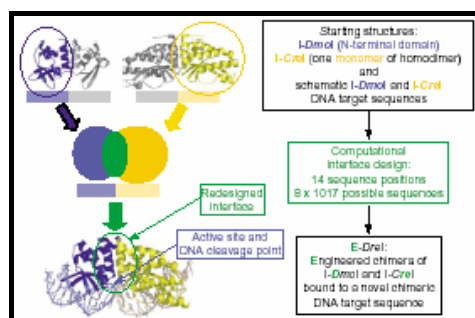


Figure 1 : Méthode de formation d'une protéine chimère par design à l'ordinateur.

Grâce à ces différentes méthodes, les chercheurs ont pu ainsi identifier certaines parties des protéines comme étant des domaines de reconnaissance comme par exemple les domaines Scr-homology 2 (SH2), Src-homology 3 (SH3) et le domaine phosphotyrosine-binding (PTB) qui se lie préférentiellement aux séquences présentant des résidus tyrosine phosphorylés. Les domaines Forkhead-associated (FHA) observés dans plusieurs variétés de protéines signal qui se lie à des peptides présentant des phosphoserines et/ou des phosphothreonines. La famille des domaines PDZ qui reconnaît et se lie à l'extrémité C-terminale de son partenaire ou encore les familles de domaines reconnaissant des peptides riches en prolines (PRMs) comme les domaines SH3, WW, EVH1, GYF ou UEV^[5]. Par ailleurs, il a été montré qu'une protéine présentant un domaine SH3 par exemple pouvait se lier à plusieurs protéines ou qu'une protéine pouvait présenter plusieurs de ces domaines.

D'une manière générale, les interactions protéine-protéine doivent être de haute affinité afin de garantir une interaction hautement spécifique entre les deux partenaires. D'autre part, cette interaction doit impérativement être réversible pour permettre au complexe de se dissocier de nouveau dès que le stimulus est parti. Ainsi, les affinités requises sont-elles de l'ordre du micro- voire du picomolaire. Les surfaces d'interactions entre les protéines varient entre 550 et 4900 Å² mais sont en moyenne de l'ordre de 800 Å²^[6] et constituent les « hot spots »^[7]. Les surfaces d'interaction présentent différentes caractéristiques qui leur sont propres. D'autre part, certaines interactions multivalentes ont lieu, elles sont particulières dans le sens où elles impliquent plusieurs ligands ou plusieurs récepteurs afin d'augmenter la force

⁴ T. Kortemme, D. Baker. "Computational design of protein-protein interactions." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 8, 91-97.

⁵ L. J. Ball, R. Kühne, J. Schneider-Mergener, H. Oshkinat. "Recognition of praline-rich motifs by protein-protein-interaction domains." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2005**, 44, 2852-2869.

⁶ W. L. DeLano, "Unraveling Hot spots in binding interfaces: progress and challenges." *Curr. Opin Struct. Biol.*, **2002**, 12, 14-20.

⁷ B. Ma, H. J. Wolfson, R. Nussinov. "Protein functional epitopes : hot spots, dynamic and combinatorial libraries." *Curr. Opin Struct. Biol.*, **2002**, 11, 364-369.

d'interaction ou la spécificité de la reconnaissance. Ce sont ces deux points que nous développons par la suite.

A. Spécificités des surfaces d'interactions protéine-protéine

J. Janin et coll. ont réalisé une étude sur 75 complexes protéiques dont 25 inhibiteurs de protéases, 19 complexes anticorps-antigènes et 32 autres types dont 11 impliqués dans la transduction de signal^[8]. A partir de cette étude, ils ont pu faire les observations suivantes sur les interfaces :

- ⇒ Présence d'interactions de Van der Waals entre les atomes ;
- ⇒ Surfaces à 53 % non polaires c'est-à-dire :
- ⇒ Richesse en résidus aromatiques : His, Phe, Tyr, Trp par rapport à la surface de la protéine exposée au solvant : 21% de ces résidus contre 8% en surface ;
- ⇒ Richesse en résidus aliphatiques : Leu, Ile, Val, Met (17% contre 11% en surface).
- ⇒ Surfaces appauvries en résidus chargés Asp, Glu et Lys mais extrêmement riches en résidus arginine qui constituent 10% des surfaces d'interaction.

Par ailleurs, ils ont montré que les interfaces d'inhibiteurs de protéases étaient riches en cystéines pour la formation de ponts disulfure. Les interfaces antigène-anticorps sont quant à elles constituées au 1/6^{ème} de résidus tyrosine.

Par ailleurs, les facteurs principaux qui gouvernent les interactions protéine-protéine sont leurs complémentarités stériques, leur capacité à changer de conformation, les interactions hydrophobes et les forces électrostatiques. Les formations de liaisons hydrogène sont elles aussi très importantes, en moyenne une liaison hydrogène par surface de 100 à 200 Å² ; la présence de molécules d'eau a aussi son importance avec une à 50 molécules d'eau par interface. Enfin, ces surfaces d'interaction sont influencées par la température, la force ionique et le pH du milieu^[9].

⁸ L. Lo Conte, C. Chothia, J. Janin. "The atomic structure of protein-protein recognition sites." *J. Mol. Biol.*, **1999**, 285, 2177-2198.

⁹ A. V. Veselovsky, Y. D. Ivanov, A. S. Ivanov, A. I. Archakov, P. Lewi, P. Janssen. "Protein-protein interactions : mechanisms and modification by drugs." *J. Mol. Recogn.*, **2002**, 15, 405-422.

B. Cas particulier de la multivalence

Les interactions multivalentes sont caractérisées par la liaison simultanée de plusieurs ligands à une entité biologique, comme une surface ou une molécule, ou de plusieurs récepteurs entre eux. Ces interactions représentent un concept fondamental en biologie et présentent des caractéristiques que les interactions monovalentes n'ont pas. En particulier, les interactions polyvalentes peuvent être plus fortes collectivement que ne le seraient des interactions monovalentes correspondantes. D'autre part, elles peuvent avoir des effets agonistes/antagonistes fondamentalement différents de ceux observés avec des systèmes monovalents.

On définit la valence d'une particule, qu'elle soit une petite molécule, une protéine, un oligosaccharide, un virus ou une cellule comme le nombre de connections séparée et de même ordre qu'elle peut former avec d'autres particules à travers des interactions ligand-récepteur^[10]. Il est à noter que lors d'interactions multivalentes, on ne parle plus d'affinité qui définit la force d'interaction entre un récepteur et un ligand monovalent mais d'avidité qui concerne les processus polyvalents.

L'efficacité de la reconnaissance moléculaire entre deux particules multivalentes repose essentiellement sur un effet de synergie entre les interactions simultanées et coopératives de plusieurs ligands (peptides, sucres...) sur un ou plusieurs récepteurs membranaires. Des interactions polyvalentes requièrent donc deux partenaires : un ligands multivalent et une protéine possédant des sites de reconnaissance adéquats à la surface d'une cellule. Plusieurs événements peuvent favoriser ce type d'interactions : la cellule peut, soit utiliser un récepteur oligomérique possédant plusieurs CRD ou plus fréquemment, elle peut provoquer un regroupement de plusieurs récepteurs monovalents membranaires à un endroit précis de sa surface, améliorant ainsi l'efficacité de la liaison.

Plus que la complémentarité ligand/récepteur elle-même, ces phénomènes coopératifs nécessitent un arrangement spatial précis du récepteur, une présentation des ligands dans la bonne orientation et un espacement adéquat leur permettant d'accéder à plusieurs sites de liaison.

La Figure 2 présente, à gauche, les différentes interactions monovalentes que l'on peut rencontrer. Ainsi est-il possible de rencontrer une simple interaction récepteur-ligand ou bien une interaction induisant une hétérodimérisation dudit récepteur. A droite sont représentées les différentes interactions polyvalentes que l'on peut observer. Les interactions multivalentes

¹⁰ M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides. "Polyvalent interactions in biological systems : implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, 37, 2754-2794.

peuvent donc avoir lieu avec de multiples sites de liaison (Figure 2-a, droite) ; induire le « clustering » des récepteurs à la surface de la cellule et parfois induire l'activation d'une cascade de signalisation (Figure 2-b, droite) ; avoir lieu au niveau des sites de liaison primaires et secondaires des récepteurs (Figure 2-c) et enfin posséder une haute concentration locale en ligands induisant ainsi une augmentation de l'affinité du récepteur pour le ligand (Figure 2-d)^[11].

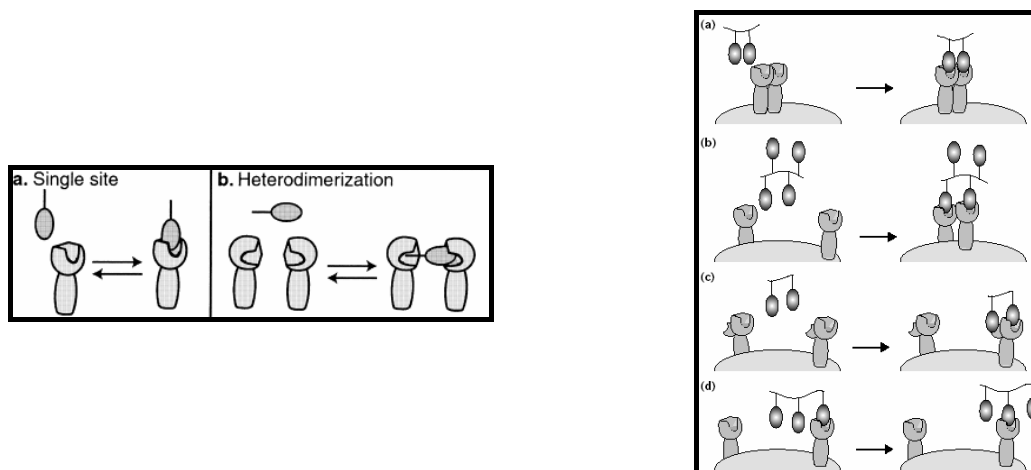


Figure 2 : Interactions monovalentes (à gauche) et polyvalentes (à droite).

Une description plus approfondie des interactions multivalentes se trouve en Annexe I-I.

En résumé...

Les interactions protéine-protéine sont fondamentales car à la base de la majorité des processus biologiques. Elles ont lieu au niveau de surfaces et sont en moyenne de 800 Å². Elles présentent des propriétés particulières d'hydrophobicité ainsi que des résidus majoritairement aliphatiques et aromatiques. Certaines séquences d'acides aminés, communes à diverses protéines et ayant des propriétés de reconnaissances spécifiques, sont définies comme étant des « domaines » aux définitions particulières. Enfin, il existe des interactions simultanées et coopératives plus fortes collectivement que ne le seraient des interactions monovalentes correspondantes, ce sont les interactions multivalentes.

Dans un but thérapeutique, une approche efficace de ciblage de ces surfaces est la technique de chimie combinatoire qui peut couvrir une large gamme de possibilités dans un court délai. Ce sont les principales techniques développées pour cette méthode de synthèse que nous décrivons dans le paragraphe suivant.

¹¹ L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong. "Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 696-703.

II. Différentes approches combinatoires

D'une façon générale, la chimie combinatoire est basée sur le concept du parallélisme. Elle consiste donc en la réalisation de plusieurs réactions chimiques entre différents composés au même instant. Ceci permet à l'expérimentateur de synthétiser beaucoup plus de composés au sein d'une banque qu'il n'y a d'étapes pour la réaliser.

Cette méthode ne se base plus sur la synthèse d'un produit unique sur lequel on aura auparavant passé beaucoup de temps en étude par modélisation ou en analyse rétrosynthétique. Au contraire, la chimie combinatoire se base sur un assemblage aléatoire de plusieurs composés. Historiquement, cette méthode s'est tout d'abord appliquée à la synthèse peptidique et d'oligonucléotides. En utilisant les 20 acides aminés ou les 4 bases de nucléotides comme « blocs » d'assemblage, il était possible de synthétiser de très larges banques totalement aléatoires (chaque position de la séquence pouvant présenter chaque « bloc ») ou dirigée (quelques positions de la séquence étant prédéfinies). Par la suite, cette méthode de synthèse fut élargie à l'utilisation biologique, à la fois pour des tests *in vitro* et *in vivo* avec la technique du « phage display ». Plus tard, la chimie combinatoire a fini par être utilisée dans divers domaines et notamment la chimie combinatoire dynamique s'est développée à partir de travaux de Jean-Marie Lehn pour lesquels il reçut le prix Nobel en 1987 (création et développement de la chimie supramoléculaire).

Ce sont ces différentes techniques que nous décrivons dans ce paragraphe.

A. Méthodes générales

1. La méthode « one-bead-one-compound »

Les différentes caractéristiques de cette méthode peuvent se résumer en quatre points. Tout d'abord, cette méthode permet d'obtenir rapidement une grande variété de produits. Ensuite les produits sont séparables spatialement, ainsi chaque produit peut-il être testé en parallèle et indépendamment. De plus, la structure chimique d'un produit d'intérêt présenté par une bille de résine peut être déterminée directement ou par une stratégie d'encodage. Enfin, il est possible de tester les produits directement sur les billes de résine^[12].

¹² K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak. "The "One-bead-one-compound" combinatorial library method." *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 411-448.

Le concept du « one-bead-one-compound » ou « split-and-mix » fut reconnu pour la première fois par K. S. Lam *et al.*^[13] en 1991. Le principe repose sur l'élaboration d'une bibliothèque de peptides *via* une synthèse parallèle sur des lots égaux en quantité de résine^[14]. Cette méthode de synthèse s'effectue sur support solide dont la technique fut découverte par R. B. Merrifield en 1963^[15]. Ainsi, l'ensemble des billes de résine est tout d'abord divisé en n fractions égales ; on effectue ensuite un cycle de couplage peptidique/déprotection ; l'ensemble des billes de résine est alors mélangé puis re-divisé en n fractions égales. Ces cycles de couplage/division peuvent être répétés autant de fois que l'on veut, la longueur de la séquence correspondant au nombre d'étapes, l , effectuées et le nombre de séquences différentes étant égales à n^l .

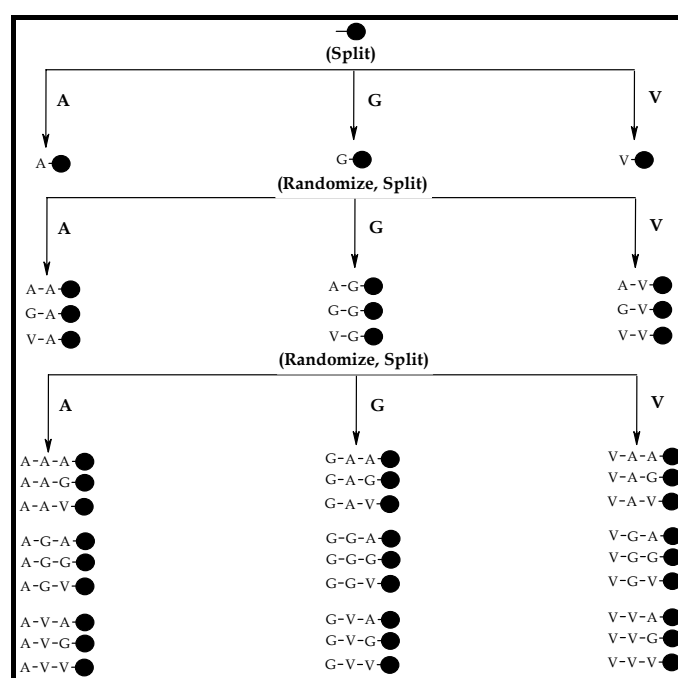


Figure 3 : Principe de la méthode «one-bead-one-compound».

Une alternative à cette méthode de synthèse est la stratégie « one-particle-one-compound » ou « bibliothèque orthogonale » que nous décrivons plus loin dans le paragraphe 2 : *les bibliothèques itératives*.

Il est à noter que chaque bille de résine présente un seul type de séquence peptidique avec de l'ordre de 10^{13} copies de chaque séquence au sein d'une bille d'environ 100 μm de diamètre. Lors de la création de ce type de bibliothèque, le choix de la résine est prépondérant

¹³ K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp. "A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity." *Nature*, **1991**, *354*, 82-84.

¹⁴ R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo. "Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery." *Nature*, **1991**, *354*, 84-86.

¹⁵ R. B. Merrifield. "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide" *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.

pour créer des bibliothèques homogènes. En effet, si l'on envisage de tester ces bibliothèques de produits par la suite, celles-ci doivent être produites de façon comparable. D'autre part, la résistance à la formation de clusters a son importance dans le sens où la distribution statistique en serait biaisée.

Lors de la réalisation de telles bibliothèques, il est important de pouvoir suivre la réaction au sein de chaque bille de façon individuelle afin de ne pas favoriser le couplage d'un monomère au sein d'une séquence. En effet, il paraît important de tenir compte de la diversité des séquences qui peut induire des difficultés de couplage au sein de certaines d'entre elles. Dans ce but, le test non destructeur au bleu de bromophenol peut être effectué^[16]. Les billes colorées sont celles n'ayant pas encore effectué le couplage, comme le montre la figure ci-dessous. D'autre part, le test à la ninhydrine peut aussi être employé^[17].

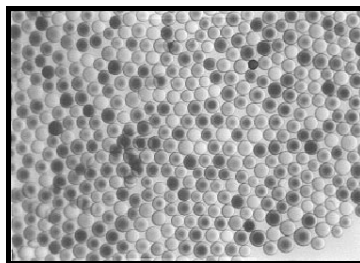


Figure 4 : Test au bleu de bromophenol : la majorité de billes a déjà effectué le couplage.

La synthèse de ces bibliothèques peut s'effectuer manuellement ou bien à l'aide d'un synthétiseur automatique. La séparation des billes de résine s'effectue alors soit par séparation d'une suspension homogène de billes soit par une séparation des billes d'une suspension agitée en continu^[18].

De plus, statistiquement parlant, des études ont montré que dans le but de couvrir 95% de l'ensemble des permutations possibles avec un niveau de confiance de 99%, le nombre total de billes de résine doit être trois fois supérieur au nombre total de toutes les permutations. Par exemple, pour une bibliothèque de pentapeptides, il y a 20^5 permutations possibles, soit $3,2 \times 10^6$, il faudra donc utiliser $9,6 \times 10^6$ billes de résine. Ce grand nombre peut constituer un facteur limitant pour cette méthode.

Enfin, il est à noter que cette méthode n'est pas adaptée à la synthèse de peptides dont un résidu est fixe au sein de la séquence. En effet, la synthèse d'une bibliothèque de peptides contenant 20 acides aminés à la position fixées et 20 acides aminés sur les positions

¹⁶ V. Krchnak, J. Vagner, P. Safar, M. Lebl. "Collect. Czech. Chem. Commun.", **1988**, 53, 2542.

¹⁷ E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook. "Anal. Biochem.", **1969**, 34, 595.

¹⁸ R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, M. A. Siani, S. C. Banville. "Design, construction and application of a fully automated equimolar peptide mixture synthesizer." *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1992**, 40, 497.

nécessitant l'incorporation équimolaire d'acides aminés, nécessiterait l'utilisation de 400 pots de réaction...

2. Les bibliothèques itératives

a. Bibliothèque itérative possédant des positions fixées

C. T. Dooley *et al.*^[19] ont synthétisé une bibliothèque composée de 400 mélanges chacun composé de 19^4 hexapeptides. La formule générale des peptides composant cette bibliothèque est la suivante : $O_1O_2X_3X_4X_5X_6-NH_2$, où O représente un acide aminé défini tandis que X représente un mélange stoechiométrique de 19 acides aminés, la cystéine étant omise. La méthode consiste alors en une première synthèse de 400 bibliothèques de produits où les deux premières positions de la séquence peptidique sont connues et leur affinité testée. A l'issue de cette première sélection, on fixe les deux premières positions de la séquence. On synthétise puis teste ensuite 20 bibliothèques de produits dont la troisième position est connue puis fixée. On réitère ces dernières étapes jusqu'à connaître la séquence exacte du peptide ayant une plus grande affinité pour la cible choisie.

b. Bibliothèques orthogonales ou « One-particle-one-compound »

A. Tartar *et coll.*^[20] ont développé une technique pour synthétiser deux bibliothèques distinctes de tripeptides en utilisant 25 monomères différents. Cette technique repose sur une stratégie de synthèse « split » classique sur support solide. La synthèse débute en séparant les billes de résine en n parties égales que l'on couple à n monomères différents. Ensuite, chacun des n groupes de résine sont divisés en m sous-groupes que l'on met à coupler et ainsi de suite jusqu'à obtention de la longueur peptidique souhaitée. On obtient ainsi une bibliothèque de $n*m*...=X$ produits, de séquence connue, sur X billes de résine. Ici, pour les bibliothèques A et B, les monomères sont subdivisés en cinq groupes : A₁-A₅ et B₁-B₅. Ainsi, pour un quelconque nombre de groupe, les bibliothèques A et B contiennent un seul monomère commun (cf. Tableau 1).

	A1	A2	A3	A4	A5
B1	D-Leucine	D-Proline	D-Serine	(4-nitro)-D-Phenylalanine	D-Isoglutamic acid
B2	D-Arginine	D-Isoleucine	Glycine	D-Threonine	D-Isoglutamine

¹⁹ C. T. Dooley, N. N. Chung, P. W. Schiller, R. A. Houghten. "Acetalins : opioid receptor antagonists determined through the use of synthetic peptide combinatorial libraries." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, 10811-10815.

²⁰ B. Déprez, X. Williard, L. Bourel, H. Coste, F. Hyafil, A. Tartar. "Orthogonal combinatorial chemical libraries" *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5405-5406.

B3	D-Glutamine	D-Tyrosine	D-Valine	D-ε-nicotinoyl-lysine	D-Histidine
B4	D-Tryptophane	D-Asparagine	D-Glutamic acid	D-Methionine sulfoxide	D-Alanine
B5	Isonipecotic acid	D-Lysine	D-tetrahydro-isoquinoleic acid	D-Aspartic acid	D-Phenylalanine

Tableau 1 : Subdivision des monomères constituant les bibliothèques A et B.

Ainsi la construction d'une librairie se fait-elle comme suit : la quantité totale de résine est tout d'abord divisée en cinq parties égales puis la première partie est couplée à A₁, la seconde partie est couplée à A₂, ...etc. On divise ensuite chaque partie en cinq sous parties, soit un total de 25 parties égales. Cinq parties seront couplées à A₁, cinq autres à A₂, ...etc. Enfin, on partage encore chaque sous partie en 5, soit au total en 125 parties égales dont 25 seront couplées à A₁, 25 autres à A₂, ...etc. On coupe enfin les produits de la résine afin de les tester pour leur activité biologique.

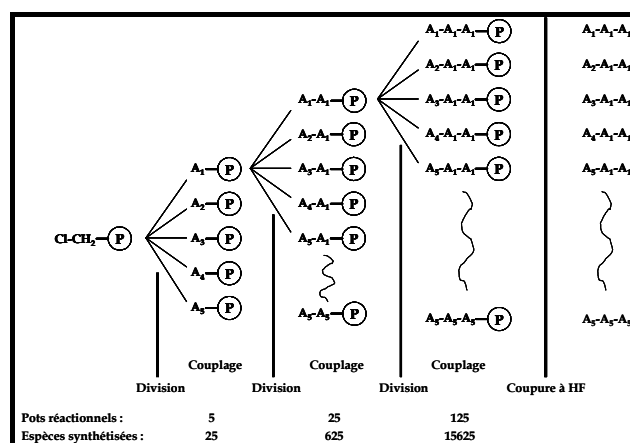


Figure 5 : Elaboration d'une bibliothèque orthogonale.

Un autre exemple de bibliothèque orthogonale réside en la méthode utilisée par Pirrung et Chen^[21]. Ils ont ainsi utilisé une matrice à N dimensions, dont chaque axe est composé d'autant d'éléments. Prenons l'exemple d'une bibliothèque de molécules composée de deux sous-structures, A et B, chacune composée de 10 éléments, soit a = b = 10. Il est alors possible de construire une grille composée de 100 cases, constituée de 100 produits purs.

On peut ensuite choisir arbitrairement une colonne et tester les dix produits qu'elle contient. Dans le cas où une des dix cases donnerait des résultats intéressants, on peut alors trouver le produit le plus performant en testant le reste de la ligne concernée.

²¹ M. C. Pirrung, J. Chen. "Preparation and screening against acetylcholinesterase of a non-peptide "indexed" combinatorial chemistry." *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1240-1245.

c. Bibliothèques récursives

Une méthode de déconvolution récursive a été développée par Brenner *et coll.* [22] La méthode consiste en la synthèse partielle d'une bibliothèque de produits sur support solide. Prenons l'exemple d'une bibliothèque de trimères obtenue à partir de quatre composés A, B, C et D. La méthode utilisée est une synthèse en "split" classique, il y a donc quatre pots de réaction en parallèle. Après le premier couplage, une partie de chaque pot est conservée intacte tandis que le reste du support solide est mélangé puis divisé de nouveau en quatre parties pour un nouveau couplage.

On teste alors les quatre lots de produits finalement obtenus. Si l'un des lots montre une activité biologique, par exemple le lot NNA, il est alors possible de reprendre les lots NA, NB, NC et ND précédemment conservés et de les coupler à A pour effectuer de nouveaux tests. Si par exemple, le lot NBA s'avère être concluant, on peut reprendre les lots A, B, C et D et leur coupler BA afin d'identifier la séquence exacte du produit actif. La Figure 6 illustre cette méthode.

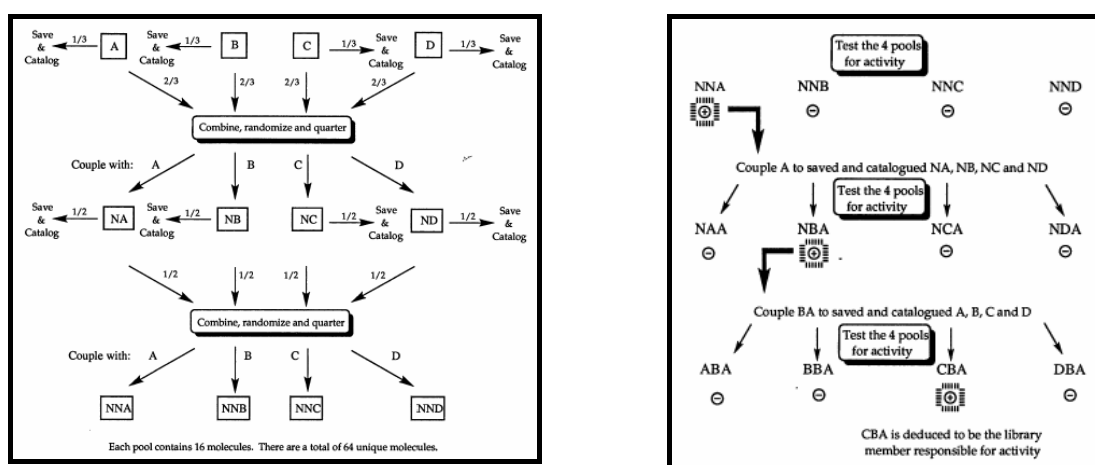


Figure 6 : A gauche : synthèse d'une bibliothèque récursive ; à droite : méthode d'identification d'un produit d'intérêt.

d. La synthèse systématique de peptides

Cette dernière méthode de synthèse de bibliothèques itératives a été développée par Dooley et Houghten [23]. Par exemple, pour un hexapeptide, il est possible de synthétiser six bibliothèques de produits de formules générale $X_{[1]}N_{[2]}N_{[3]}N_{[4]}N_{[5]}N_{[6]}$, $N_{[1]}X_{[2]}N_{[3]}N_{[4]}N_{[5]}N_{[6]}$, ..., $N_{[1]}N_{[2]}N_{[3]}N_{[4]}N_{[5]}X_{[6]}$, où X est un acide aminé défini tandis que N provient d'une

²² E. Erb, K. D. Janda, S. Brenner. "Recursive deconvolution of combinatorial chemical libraries." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, *91*, 11422-11426.

²³ C. T. Dooley, R. A. Houghten. "The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands." *Life Sci.*, **1993**, *52*, 1509-1517.

solution équimolaire des 20 acides aminés naturels. Il est alors possible de tester ces bibliothèques et d'identifier chacun des six résidus présentant la meilleure activité biologique.

3. Les bibliothèques spatialement adressables

Dans sa revue entièrement consacrée à ce genre de bibliothèques, M. C. Pirrung décrit les cinq méthodes principalement utilisées pour obtenir des bibliothèques spatialement adressables^[24]. Le principe repose sur la production de bibliothèques de produits sur un même support. Ces supports sont essentiellement des plaques (verre, papier, métal...) modifiées en surface permettant ainsi de lier les bibliothèques de produits. Par différentes méthodes de protections/déprotections (utilisation de caches par exemple), il est ainsi possible d'obtenir une variété de produits disposés spatialement les uns par rapport aux autres et testables de façon simultanée.

Les premières bibliothèques sur support ainsi obtenues furent constituées de peptides. Mais à présent, il est aussi possible de construire des bibliothèques spatialement adressables d'oligonucléotides ou inorganiques.

a. Les "peptides sur épingles"

Cette méthode fut développée en Australie, aux Pays-Bas puis par H. M. Geysen *et al.*^[25,26] à partir de 1984, où cette équipe de chercheurs s'est intéressée à plusieurs virus de la maladie « foot-and-mouth » ou « fièvre aphteuse ». Ils ont ainsi produit des centaines de peptides sur support solide et les ont testés au cours d'un test immunoabsorbant sans les détacher de leur support.

Cette méthode est basée sur le même principe que les tests ELISA dans le sens où la synthèse s'effectue sur une plaque présentant 8*12 emplacements d'élongation différents. Afin d'expliquer le principe de cette méthode, prenons l'exemple des travaux de H. M. Geysen.

Il s'est intéressé à l'étude d'une protéine et a cherché à connaître les différents épitopes de celle-ci à l'aide d'hexapeptides. Chacun de ces peptides fut basé sur la séquence protéique : un peptide présente une séquence de six acides aminés de la protéine tandis que son voisin direct dans la bibliothèque présente la même séquence décalée d'un acide aminé dans la séquence protéique, comme le décrit la figure ci-dessous.

²⁴ M. C. Pirrung. "Spatially addressable combinatorial libraries." *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 473-488.

²⁵ H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling. "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid." *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **1984**, *81*, 3998-4002.

²⁶ H. M. Geysen, S. J. Barteling, R. H. Meloen. "Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein." *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **1985**, *82*, 178-182.

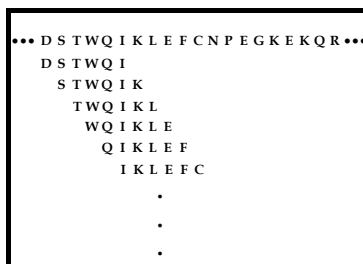


Figure 7 : Principe de l'étude d'épitope.

Afin de réaliser une bibliothèque de l'ordre de plusieurs milliers de peptides, H. M. Geysen a choisi d'attacher les peptides en élévation sur des épingle solides comportant des espaceurs polyéthylènes aux groupements fonctionnels adéquats. Lors des couplages, ces épingle sont plongées dans les trous d'un bloc plastique façon plaque ELISA tandis que lors des déprotections, l'ensemble de la surface présentant les peptides est plongée dans un bain, comme le montre la Figure 8. Cette méthode permet ainsi de produire différentes séquences peptidiques en parallèle en plaçant des réactifs différents dans chacun des puits de la plaque. Chaque épingle portant un seul type de séquence peptidique.

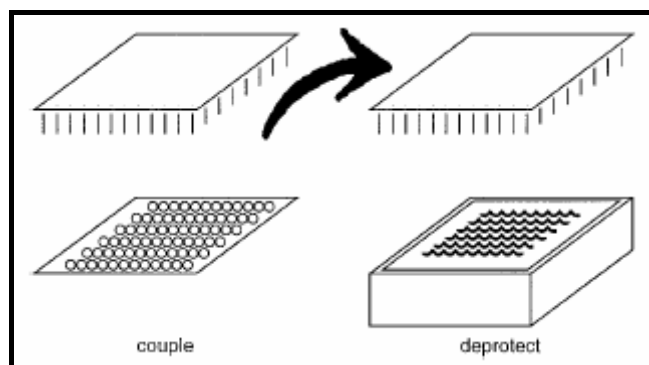


Figure 8 : Principe de la synthèse parallèle de « peptides sur épingle ».

Une fois la synthèse des peptides effectuée, il est alors possible de les tester séparément sur le support solide ou bien de les récupérer en les coupant du support, mais cette fois, on obtient un mélange de différents peptides. Dans cette dernière optique, H. M. Geysen a développé plusieurs méthodes. L'une d'entre elles implique la liaison de tous les peptides au support solide via un enchaînement Lys-Pro. L'élévation des peptides a ensuite lieu à partir du résidu lysine ; on enlève ensuite les groupements protecteurs des chaînes latérales. Les réactifs restants sont ensuite détruits par sonication et lavages à l'acide. Enfin, on place le support des épingle à pH 7 ce qui induit alors la cyclisation de l'amine portée par la lysine

avec l'ester de la proline pour former une diketopiperazine présentée par tous les peptides de la bibliothèque^[27,28], comme le décrit la Figure 9.

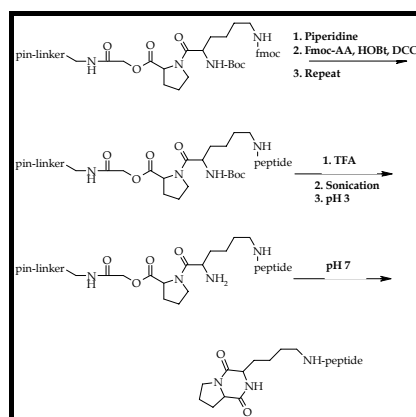


Figure 9 : Principe de coupe des peptides du support.

Le problème majeur rencontré par H. M. Geysen au cours de cette étude, fut que les bibliothèques obtenues n'ont pas montré de réelle affinité pour l'anticorps suggérant ainsi que l'anticorps reconnaît des épitopes discontinus.

Par la suite, H. M. Geysen améliora la méthode « peptides sur épingles » en effectuant la synthèse d'un « pool » de peptides sur chaque épingle^[29]. En effet, pour chaque peptide de la bibliothèque, certains des résidus sont fixes tandis que d'autres viennent d'un mélange des 20 acides aminés naturels. Ainsi, pour des peptides de forme générale XX*XX où * représente les acides aminés prédéfinis et X un mélange équimolaire des 20 acides aminés, on obtient un « pool » de 160000 (20 x 20 x 1 x 1 x 20 x 20) peptides sur chaque épingle. Pour cette expérience, deux résidus sont fixes, ce qui fait donc 400 possibilités si on envisage les 20 acides aminés pour ces deux positions, 400 épingles seront donc mises en jeu. Après une première sélection, on peut fixer deux premiers résidus parmi les six et recommencer une nouvelle bibliothèque de 400 épingles présentant chacune 400 peptides. Une seconde sélection permet de fixer deux autres résidus et une troisième sélection permet de connaître les séquences peptidiques optimales, nommées mimotopes, nécessaires pour mimer les épitopes de la protéine.

²⁷ A. M. Bray, N. J. Maeji, H. M. Geysen. "The simultaneous multiple production of solution phase peptides; assessment of the geysen method of simultaneous peptide synthesis" *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5811-5814.

²⁸ A. M. Bray, N. J. Maeji, R. M. Valerio, R. A. Campbell, H. M. Geysen. "Direct cleavage of peptides from a solid support into aqueous buffer. Application in simultaneous multiple peptide synthesis." *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 6659-6666.

²⁹ H. M. Geysen, T. J. Mason. "Screening chemically synthesized peptide libraries for biologically-relevant molecules." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3, 397-404.

b. Le greffage d'oligonucléotides sur plaques

L'intérêt grandissant porté à l'analyse et la comparaison des séquences d'acides nucléiques étudiées par hybridation a poussé U. Maskos et E. M. Southern^[30] à développer une méthode pour préparer un grand nombre d'oligonucléotides fixés sur une plaque en verre.

Il faut tout d'abord modifier la plaque afin qu'elle présente un groupement hydroxy au bout d'un bras espaceur, stable pour plus de 50 cycles d'hybridation/déprotection.

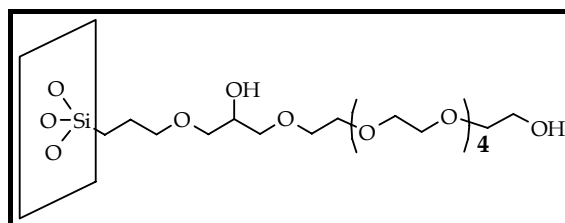


Figure 10 : Fonctionnalisation d'une plaque de verre.

Une fois fonctionnalisée, la plaque est mise à réagir avec ce que Maskos et Southern nomment des « caches physiques » qui présentent des rayures de réactifs. En effet, ces caches sont formés d'une plaque de verre sur laquelle sont collées des lignes siliconées de 1,2 mm et espacées de 1 à 10 mm sur la plaque. Chacune de ces lignes présente une des quatre bases de désoxyribonucléotide. Les deux plaques de verre sont alors collées l'une à l'autre et mises à réagir par migration capillaire des réactifs conventionnels pour phosphoramidites sur chacune des lignes. Dans leurs études, les chercheurs ont utilisé des caches présentant jusqu'à 64 lignes de réactifs. Ainsi le parallélisme, clef de voûte de la construction de bibliothèques, est-il respecté dans le sens où le couplage chimique des différents monomères a lieu de façon simultanée dans les rayures adjacentes. A l'aide de cette méthode, tous les sites de la plaque réagissent lors de la même étape. On obtient ainsi 4^l séquences où l représente le nombre d'étapes et la longueur de chaque oligonucléotide.

Southern et *et al.*^[31] ont ensuite amélioré cette dernière méthode de production d'oligonucléotides sur support en utilisant des « caches physiques » de forme géométrique. Après avoir effectué un cycle de couplage, le cache est translaté linéairement de façon à ce qu'il se superpose partiellement sur la région précédemment couplée tout en se superposant dans le même temps sur une région encore vierge. On peut ainsi produire une large gamme d'oligonucléotides différents et le nombre d'étapes effectuées correspond au nombre de nucléotides de la séquence. La Figure 11 représente cette méthode.

³⁰ U. Maskos, E. M. Southern. "Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation." *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 1675-1678.

³¹ E. M. Southern, S. C. Case-Green, J. K. Elder, M. Johnson, K. U. Mir, L. Wang, J. C. Williams. "Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids." *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 1368-1373.

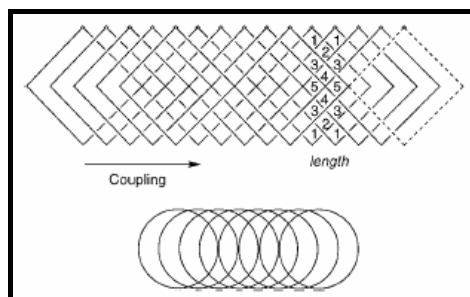


Figure 11 : Synthèse d'oligonucléotides à l'aide de caches de géométries différentes.

c. Synthèse dirigée par la lumière

Cette méthode de préparation d'un grand nombre de molécules est basée sur des techniques photolithographiques appliquées à la microélectronique et permet la synthèse de milliers d'oligomères de séquences différentes sur une petite surface^[32].

Le principe consiste en l'illumination d'une partie de la surface à l'aide d'un cache dans le but de déprotéger une zone de façon sélective. Ensuite, toute la surface est exposée aux réactifs de couplage mais seule la région déprotégée pourra réagir. On répète ainsi les cycles d'irradiation/couplage afin de synthétiser différentes séquences d'oligomères.

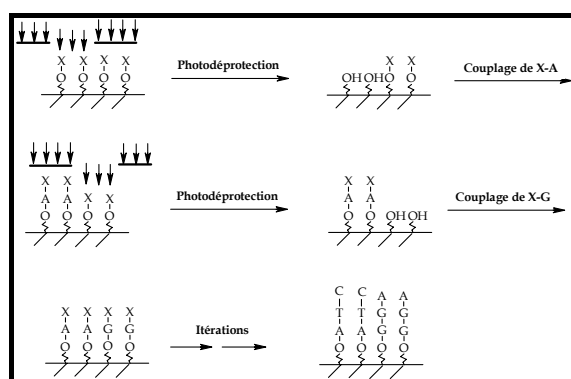


Figure 12 : Principe de la synthèse dirigée par la lumière.

La séquence finale des oligomères est ici définie à la fois par les différents réactifs mis en contact avec la surface mais aussi par la forme des caches utilisés. Etant donné que chaque site est accessible pour des interactions avec d'autres molécules, on peut ainsi utiliser cette méthode pour effectuer des tests de liaison avec un large principe de parallélisme. Cette méthode se distingue de celle de Southern dans le sens où l'on peut déprotéger sélectivement seulement certaines régions de la surface qui est ensuite entièrement exposée aux réactifs ne nécessitant ainsi qu'un seul cycle d'irradiation/couplage pour chaque monomère supplémentaire. De plus, la forme des caches offre une grande flexibilité en comparaison avec l'utilisation des caches physiques qui impliquent l'adressage de toute une région contiguë

³² S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Liu, D. Solas. "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." *Science*, **1991**, 251, 767-773.

avec le même réactif. Ici, au contraire, la lumière joue le rôle d'un réactif à « l'accès aléatoire ». C'est la raison pour laquelle deux types de caches ont été développés.

Le premier est similaire à celui développé par Southern mis à part le fait que chaque monomère doit être couplé de façon individuelle. Ainsi peut-on obtenir n^l molécules différentes, où n est le nombre de monomères et l la longueur des oligomères, ceci pour $n \cdot l$ opérations.

La seconde est une méthode binaire. A chaque cycle, la moitié de la surface est exposée puis couplée, il est alors possible de produire $2n$ produits où n représente le nombre d'étapes. Il est à noter, par ailleurs, que les molécules produites peuvent avoir différentes longueurs. Par exemple, la Figure 13 décrit une synthèse binaire en quatre étapes à l'aide de quatre monomères généraux.

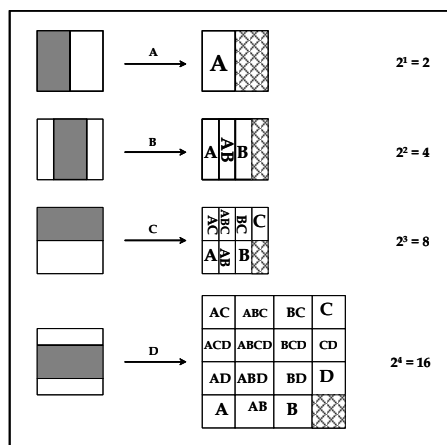


Figure 13 : Exemple de méthode binaire.

L'essentiel des bibliothèques produites ainsi sont des bibliothèques de peptides et d'oligonucléotides obtenues par voie de synthèse permutatonnelle où le nombre de séquences différentes est une fonction exponentielle de la longueur (méthode en "rayures"). De plus, le nombre d'étapes est le produit du nombre de monomères avec la longueur de la séquence. En comparant alors la formation de bibliothèques de peptides et d'oligonucléotides, il apparaît que cette méthode est beaucoup mieux adaptée à la synthèse d'oligonucléotides. En effet, il existe 20 acides aminés différents, ainsi, dans le cas de tetrapeptides, il faudra effectuer 80 étapes pour n'obtenir que 160000 composés différents. Au contraire, comme il existe 4 bases nucléiques, en effectuant 80 étapes, on obtiendra des oligonucléotides présentant 20 résidus avec 4^{20} séquences différentes soit plus d'un billion de composés différents !

d. Des peptides sur papier

R. Frank a développé une méthode différente dans le but de créer des bibliothèques peptidiques^[33]. Pour cela, il a utilisé un simple papier cellulose qu'il a tout d'abord entièrement estérifié à l'aide d'une β -alanine. Il a ensuite couplé un second résidu β -alanine sur des régions, nommées SPOT, où la synthèse peptidique s'effectuera par la suite. Ces régions ont un diamètre de 3 mm et sont espacées de 4 mm de façon à ce que la surface présente 17 x 25 sites de réaction soit 425 lots de peptides différents. De cette façon, il est possible d'obtenir chaque séquence peptidique en quantité de l'ordre de 5 à 10 nmol en utilisant la stratégie Fmoc/tBu.

A l'aide de cette méthode, il est alors possible d'effectuer une étude peptidique systématique inspirée des travaux de Geysen. Par exemple, l'étude pourra porter sur un octapeptide dont deux résidus sont fixes (\star) tandis que les six autres sont couplés de manière aléatoire à partir d'une solution stoechiométrique contenant les 20 acides aminés naturels (XXX \star \star XXX). Après quatre générations de bibliothèques de peptides, la séquence est complètement optimisée. Une autre méthode consiste en l'utilisation de sous bibliothèques où une position est fixe tandis que les autres sont mutées (\star XXX + X \star XX + XX \star X + XXX \star).

e. Bibliothèques inorganiques

Une dernière méthode d'élaboration de bibliothèques spatialement adressables fut développée par P. G. Schultz *et coll.*^[34] C'est dans le but de découvrir de nouveaux matériaux possédant des propriétés de superconducteurs, magnétorésistants, luminescentes, catalytiques ou d'optique non linéaire qu'ils se sont penchés sur l'étude de méthodes de fabrication de banques de composés inorganiques. Ainsi ont-ils effectué des dépôts simultanés d'une variété de films de natures et d'épaisseurs différentes sur une surface possédant CuO comme précurseur superconducteur. Pour cela, ils ont utilisé la méthode précédemment décrite des caches binaires, où la moitié de la surface des bibliothèques est exposée à une réaction, et dans le cas présent à un dépôt. En utilisant une variété de couches comprenant BaCO₃, Bi₂CO₃, CaO, CuO, PbO, SrCO₃ et Y₂O₃, ils ont alors pu obtenir une bibliothèque composée de 128 membres différents. Ceux-ci ont ensuite été traités thermiquement puis leurs résistivités testées pour enfin mettre en évidence la présence de deux superconducteurs pour de hautes températures.

³³ R. Frank. "Spot-synthesis : an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support." *Tetrahedron*, **1992**, 48, 9217-9232.

³⁴ L. C. Hsieh-Wilson, X. D. Xiang, P. G. Schultz. "Lessons from the immune system : from catalysis to material science." *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 164-170.

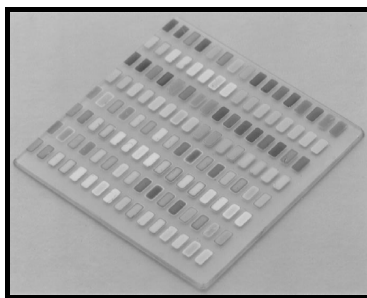


Figure 14 : Représentation de la bibliothèque ainsi obtenue.

4. Les bibliothèques issues de solutions synthétiques

Une méthode de sélection de bibliothèques en solution est l'utilisation d'électrophorèse capillaire comme l'ont décrit G. M. Whitesides *et coll.*^[35] Le principe de l'électrophorèse capillaire repose sur la mobilité de produits chargés dans un environnement soumis à un gradient de champ électrique. Ainsi la surface intérieure du capillaire est-elle chargée négativement tandis que la couche de tampon en contact avec la surface interne du capillaire est chargée positivement. Enfin, en se plaçant à un pH supérieur à 6, il est possible de faire migrer les produits pour analyses, ceci sans tenir compte de la charge de ceux-ci. G. M. Whitesides *et coll.* ont ainsi cherché de nouveaux ligands à la vancomycine. Un ligand étant déjà connu, il a servi d'étalon interne à l'expérience étant donné que son temps de migration est différent selon qu'il est lié ou non à la vancomycine. Cette méthode est donc basée sur une compétition entre ce ligand L et les composés de la banque.

Lors du premier cycle d'analyse, ils ont ainsi pu déterminer s'il y avait un composé capable d'être mis en compétition avec L au sein de la banque de 32 peptides. La différence de temps de migration de L a ainsi montré qu'un ou plusieurs composés se liaient à la vancomycine. Afin de les identifier, une série de tests a alors été effectuée en divisant la banque de composés en deux parties égales. Après chaque test, une moitié de banque pouvant ainsi être supprimée lorsqu'elle n'avait pas d'influence sur le temps de migration de L. Finalement, un unique peptide fut identifié.

Il apparaît alors que cette méthode est très efficace pour les petites bibliothèques de l'ordre de 100 à 1000 produits, car elle ne requiert que peu de quantité de protéine cible ou de bibliothèque.

³⁵ Y. H. Chu, L. Z. Avila, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides. "Using affinity capillary electrophoresis to identify the peptide in a peptide library that binds most tightly to vancomycin." *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 648-652.

B. Le « phage display »

Cette méthode est à part des méthodes précédemment décrites dans le sens où elle trouve ses applications à la fois *in vitro* et *in vivo* et où son mode de formation s'effectue grâce à la modification génétique ou clonage de bactériophages^[36]. Son originalité vient du fait que le produit d'expression de la séquence d'ADN insérée dans le génome viral est exposé à la surface du phage. Outre la construction et le criblage aisés et rapides de banques de ligands par cette méthode, sa mise en œuvre ne requiert pas d'autres connaissances que les bases de la microbiologie et de la biologie moléculaire.

Il existe différents types de phages dont deux sont principalement utilisés pour le « phage display » à savoir le phage λ et le phage M13.

C'est la capsid du phage M13 qui sert à l'expression des peptides d'intérêt. Pour cela, on détourne le génome pour exprimer les protéines PVIII et PIII à notre profit. Ces deux protéines sont présentes respectivement à 2700 et 5 exemplaires en surface. Pour plus de détails, voir Annexe I-II.

1. Construction des banques : élaboration des OGN

Les protéines PIII et PVIII, exprimées à 5 et 2700 reprises, sont composées de 50 et 470 acides aminés respectivement. Il est à noter par ailleurs que ces phages sont très bien tolérés par les bactéries lors de leur insertion et sont stables aux conditions utilisées lors des tests de sélection.

Dans le but de détourner l'infection de bactéries par des phages à notre profit et de faire exprimer des peptides d'intérêt à la surface de ces derniers, on utilise des séquences aléatoires d'oligonucléotides. Ces séquences sont synthétisées en utilisant des codons de type général NNK où N représente l'une des quatre bases (G, C, T ou A) et K seulement G ou T. Ceci a pour premier avantage d'éviter une surexpression de certains acides aminés due à la dégénérescence du code génétique. Comme la sérine qui peut être codée par six codons. Mais aussi, cela limite l'apparition de codons stop (TAA, TAG ou TGA), seul TAG peut ainsi être représenté. Les différentes séquences sont ensuite insérées dans l'ADN viral puis transcrites dans le but de constituer une bibliothèque de phages présentant une unique protéine modifiée exprimée en un à plusieurs exemplaires. Il existe deux méthodes distinctes de production de

³⁶ G. P. Smith. "Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science*, **1985**, 228, 1315-1317.

phages génétiquement modifiés. Celles-ci donnent lieu à la production de phages monovalents ou polyvalents^[37].

2. Phages monovalents – Phages polyvalents

La production de phages monovalents se fait par l'intermédiaire d'un unique phagemide présentant seulement un gène codant pour la protéine de surface désirée (PIII ou PVIII). Une fois la séquence d'ADN modifiée, on introduit le phagemide dans la bactérie hôte par électroporation. Etant donné que ce phagemide ne présente que le gène codant pour la protéine d'intérêt, il est donc nécessaire d'introduire simultanément dans la bactérie un phage auxiliaire permettant l'encapsulation des virions. Le phage auxiliaire a préalablement été modifié de façon à ce qu'il exprime ses protéines de surface de façon restreinte. Malgré tout, les phages produits présenteront à la fois la protéine de surface génétiquement modifiée mais aussi les protéines de surface du phage auxiliaire (Figure 15-A).

En ce qui concerne la production de phages polyvalents, on utilise le plasmide viral simple ou double brin présent dans les bactéries ayant déjà subi une infection par un phage. Ce plasmide est amplifié puis on y insère la séquence du peptide d'intérêt. Le plasmide est ensuite réintroduit dans la bactérie hôte par électroporation. Etant donné qu'une seule sorte de plasmide a été introduite dans la bactérie, toutes les protéines exprimées à la surface des virions produits comportent la séquence peptidique attendue (Figure 15-B).

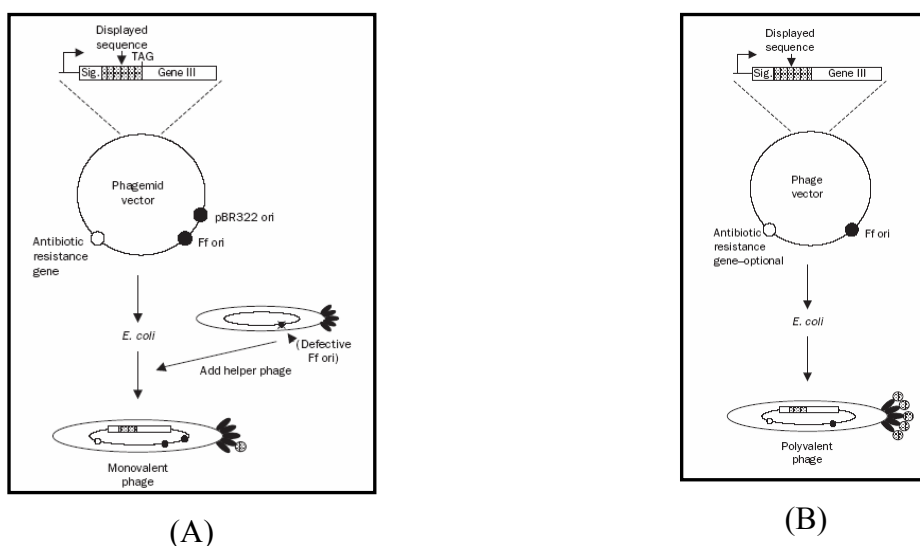


Figure 15 : A gauche : Phage monovalent ; à droite : phage polyvalent.

³⁷ J. Hinfray. "Le phage display." *Biofutur*, 1998, 182, 1-11.

3. Intérêt d'une approche par rapport à l'autre

Tout d'abord, il est nécessaire d'adapter la méthode à la taille des peptides produits. En effet, si l'on souhaite que le phage présente un long peptide encombrant en sa surface, il sera préférable de produire des phages monovalents.

L'intérêt de produire des phages polyvalents est la grande quantité de peptides d'intérêts produite à la surface d'un même phage. Ceci permet, dans un premier temps, une meilleure sélection des bibliothèques ainsi obtenues. Par la suite, et afin de réaliser une sélection plus fine de peptides de plus forte affinité pour la cible, la méthode mettant en jeu des phages monovalents sera préférée.

Enfin, pour la production de petits peptides, l'utilisation de la protéine PVIII sera préférable tandis que la synthèse de longs peptides encombrés se fera mieux au sein de la protéine PIII car elle est exprimée en moins grand nombre à la surface des phages.

D'autre part, de nombreuses équipes de chercheurs ont utilisé des séquences de peptides contraints au cours de leurs travaux de recherche portant sur de nouveaux ligands pour des protéines cibles données. Il est à noter qu'en utilisant la méthode du « phage display », il est également possible de synthétiser des peptides contraints par des ponts disulfure. Pour cela, les séquences d'acides aminés aléatoires sont entourées par des résidus cystéine qui entraînent la formation de liaisons disulfure et la cyclisation du peptide^[38]. C'est lors de l'assemblage du phage que la formation de ponts disulfures est la plus efficace.

C. Approches nouvelles

Ces méthodes présentent l'avantage de produire des composés aux affinités et aux sélectivités supérieures à ceux obtenus à partir des méthodes combinatoires classiques. En effet, la reconnaissance ne repose plus sur des interactions localisées mais sur des surfaces de contact complémentaires.

1. Les bibliothèques virtuelles

Alors que les bibliothèques issues de chimie combinatoire classique reposent sur la formation d'un grand nombre de molécules provenant de quelques éléments connectés entre eux via une succession d'opérations itératives, l'élaboration de bibliothèques virtuelles repose sur un procédé de connections réversibles. Ainsi ces bibliothèques sont-elles formées à partir d'un petit nombre d'éléments dont l'auto assemblage dépend uniquement de paramètres

³⁸ L. B. Giebel, R. T. Cass, D. L. Milligan, D. C. Young, R. Arze, C. R. Johnson. "Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities." *Biochemistry*, **1995**, *34*, 15430-15435.

cinétiques et/ou thermodynamiques imposés par la nature de ces éléments, de leurs interactions et de l'environnement. A la différence des bibliothèques combinatoires classiques, les bibliothèques virtuelles se forment à partir de peu d'éléments voire même à partir d'un seul, ce qui implique une facilité supplémentaire dans l'identification structurale des composés d'intérêt finalement trouvés. Enfin, à la différence des bibliothèques traditionnelles comportant un plus grand nombre de produits dans l'espoir d'en posséder un actif, les bibliothèques virtuelles sont plus adaptatives. En effet, les éléments de départ s'associent et se dissocient à volonté jusqu'à ce qu'une structure soit stabilisée *via* des interactions avec la cible.

Dans l'élaboration de bibliothèques virtuelles, deux approches sont envisageables. Le « casting » qui consiste en un assemblage de substrats induit par le récepteur cible et le « molding » qui, au contraire, résulte d'un assemblage de récepteurs autour d'un substrat cible^[39].

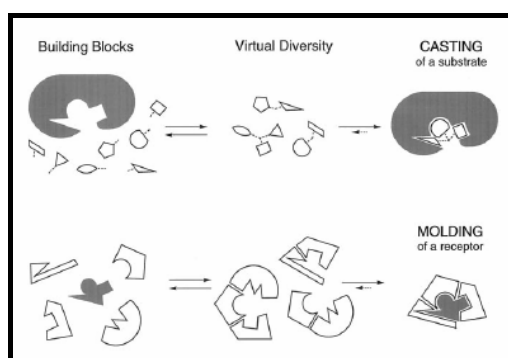


Figure 16 : Représentation du principe de réalisation de bibliothèques combinatoires virtuelles.

Quels que soient les composés actifs recherchés, il est indispensable de disposer de différents sous-éléments d'assemblage ainsi que d'une réaction de liaison réversible. Il sera alors possible de générer une grande diversité de produits. Cette technique de formation de bibliothèques en présence de la cible présente l'intérêt de pouvoir, à terme, enrichir spontanément ladite bibliothèque en composés actifs. En effet, dans le cas où des sous-éléments assemblés sont reconnus par la cible, celle-ci aura le rôle de les stabiliser dans leur conformation optimale *via* plusieurs interactions. Au contraire, si des sous-éléments assemblés ne sont pas reconnus par la cible, la réaction réversible induira leur séparation. Ce dernier processus d'assemblage/séparation des sous-éléments aura lieu jusqu'à ce que tous ceux-ci se soient assemblés sous une conformation optimale et soient stabilisés par la cible entraînant alors un enrichissement du milieu en composés actifs.

³⁹ I. Huc, J. M. Lehn. "Virtual combinatorial libraries : dynamic generation of molecular and supramolecular diversity by self-assembly." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, *94*, 2106-2110.

On peut citer trois méthodes de formation de ces bibliothèques dynamiques comme l'ont récemment décrit R. J. Kazlauskas *et coll.*^[40]

a. La chimie combinatoire dynamique : une méthode thermodynamique

Le principe de cette méthode fut démontré I. Huc et J. M. Lehn en 1997. Il repose donc sur la création réversible de bibliothèques en milieu aqueux et en présence du récepteur cible. Cela a pour effet un déplacement d'équilibre notable vers la formation de composés d'intérêt. Ceux-ci sont ensuite analysés après ajout d'un réactif bloquant l'équilibre.

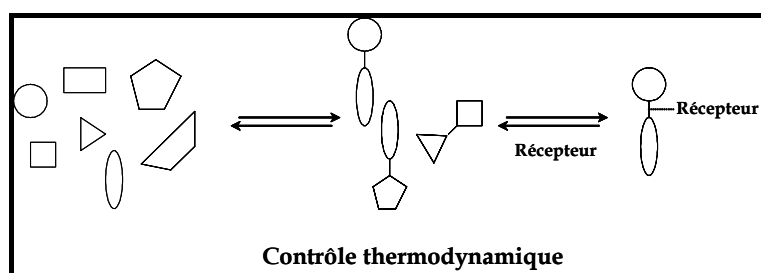


Figure 17 : Obtention de bibliothèque combinatoire dynamique.

Comme exemple illustrant cette méthode, on peut citer la méthode « tethering » développée par J. A. Wells *et coll.* et décrite dans le paragraphe suivant^[41].

Un autre exemple d'application de cette méthode repose dans les travaux effectués par O. Ramström et J. M. Lehn^[42] pour découvrir de nouveaux ligands à la concanavalin A. Cette protéine fait partie de la famille des lectines qui réagissent avec des résidus sucre spécifiques. Elle est impliquée dans une activité mitogène avec les lymphocytes et il a été montré qu'elle forme des agrégats avec les cellules cancéreuses. Son ligands naturel est une unité trimannoside dont l'essentiel des interactions avec le site actif de la protéine s'effectue en périphérie des résidus mannose. Ils ont donc imaginé de mimer ces interactions à l'aide d'une structure comportant deux groupements carbohydrate principaux, liés par un espaceur et contenant une liaison covalente réversible. Ainsi une bibliothèque dynamique de produits pourrait-elle être produite en interchangeant les sous-éléments constitués de différents groupements carbohydrate et différents espaceurs. L'échange thiol-disulfure fut utilisé comme liaison covalente réversible. En effet, les ponts disulfure peuvent faire des échanges rapides avec les thiols à $\text{pH} \geq 7$ tandis que la liaison formée peut être stabilisée à des pH inférieurs à

⁴⁰ J. D. Cheeseman, A. D. Corbett, J. L. Gleason, R. J. Kazlauskas. "Receptor-assisted combinatorial chemistry : thermodynamics and kinetics in drug discovery." *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 1708-1716.

⁴¹ D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells. "Site-directed ligand discovery" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 9367-9372.

⁴² O. Ramström, J. M. Lehn. "In situ generation and screening of a dynamic combinatorial carbohydrate library against concanavalin A." *ChemBioChem*, **2000**, *1*, 41-48.

5. Il est ainsi possible de contrôler facilement la réaction en basifiant ou acidifiant le milieu réactionnel. D'autre part, l'échange peut être effectué en milieu aqueux sous des conditions douces. Enfin, cette réaction d'échange est hautement chimiosélective, c'est-à-dire qu'elle implique uniquement un échange thiol-disulfure, même en présence d'autres groupements fonctionnels.

b. Synthèse accélérée via des récepteurs : une méthode cinétique

Le principe de cette méthode repose sur la mise en présence d'un récepteur avec une bibliothèque de produits. Lors de cette première étape, certains de ces sous-éléments se lient au récepteur. Il en résulte ainsi une mise à proximité des produits de départ grâce au récepteur qui accélère alors la réaction de liaison entre les différents sous-éléments qui n'aurait pas eu lieu en solution.

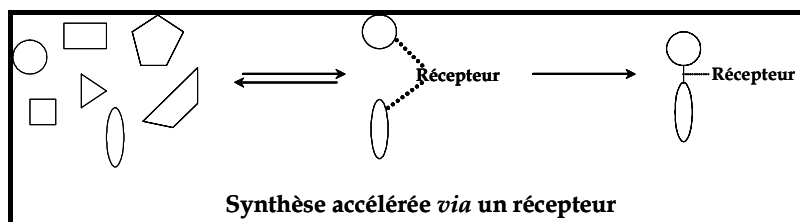


Figure 18 : Obtention de ligands spécifiques à un récepteur via une synthèse accélérée.

W. G. Lewis et al.^[43] ont cherché par cette méthode à améliorer les capacités de liaison de deux inhibiteurs connus de l'acétylcholine estérase, les IC_{50} de ces inhibiteurs étant de l'ordre du micro- et du nanomolaire. Ainsi, grâce à cette méthode d'obtention accélérée d'inhibiteurs en utilisant le récepteur cible et en s'appuyant sur les structures des deux inhibiteurs connus, l'équipe de chercheurs a obtenu une nouvelle molécule inhibitrice dans des concentrations de l'ordre du femtomolaire.

c. La chimie combinatoire pseudo-dynamique

. Le principe de cette méthode repose une synthèse irréversible puis la dégradation de membres de la bibliothèque en présence d'un récepteur. La première étape consiste en l'association des sous-éléments entre eux puis avec le récepteur cible, ce qui constitue un procédé thermodynamique. La seconde étape consiste en la dégradation des produits formés. La destruction des produits non liés est rapide tandis que celle des produits ayant une faible affinité pour la cible sont détruits plus lentement. Les derniers produits détruits sont ceux ayant une bonne affinité pour le récepteur. Après plusieurs cycles de réaction, on obtient alors des produits ayant une forte affinité pour le récepteur.

⁴³ W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless. "Click chemistry in situ : acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1053-1057.

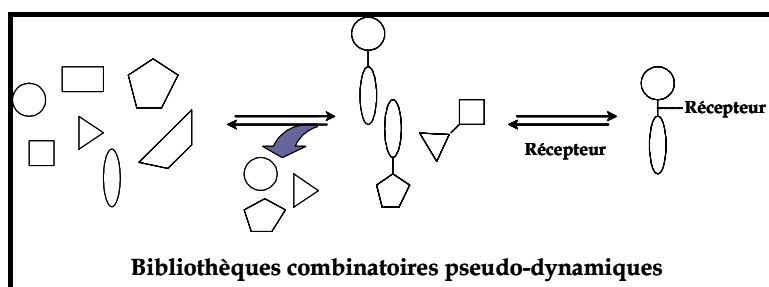


Figure 19 : Obtention de ligands spécifiques par voie combinatoire pseudo-dynamique.

A. D. Corbett et J. L. Gleason ont tout d'abord décrit une approche d'assemblage en 2002^[44] puis la technique de création de bibliothèque combinatoire pseudo-dynamique en 2004^[45]. Cette dernière méthode repose sur le couplage entre une résine ester-activée de quatre acides aminés et deux nucléophiles donnant ainsi une bibliothèque de huit composés. On met ensuite en présence la cible, l'anhydrase carbonique, ainsi qu'une protéase non sélective hydrolysant les dipeptides non liés à la cible. La réaction est ensuite réitérée après une dialyse séparant la résine de la cible et de la protéase pour obtenir une amplification en l'espèce se liant le plus fortement à la cible.

Bien qu'étant efficaces pour l'obtention rapide de bibliothèques de produits performants pour une cible donnée, ces trois méthodes présentent l'obligation d'utiliser des solvants aqueux afin de ne pas dénaturer la cible, ce qui limite le nombre de réactions possibles.

2. La méthode « tethering »

Cette méthode est une stratégie développée pour identifier rapidement et de façon indubitable de petits fragments (~ 250 Da) solubles se liant avec une faible affinité à un site spécifique d'une protéine ou d'une macromolécule. Cette méthode, élaborée par J. A. Wells et son équipe, repose sur la formation d'un pont disulfure entre le ligand et un résidu cystéine sur la protéine d'intérêt. Le résidu cystéine doit alors se trouver à une distance de l'ordre de 5 à 10 Å du site actif de la protéine et exposé à la surface pour faciliter les échanges entre thiols. Ainsi laisse-t-on réagir une bibliothèque de molécules, présentant des ponts disulfures, avec la protéine cible modifiée sous des conditions partiellement réductrices, favorisant de rapides échanges de thiols (tampon à 2% de DMSO) comme le montre la figure ci-dessous.

⁴⁴ A. D. Corbett, J. L. Gleason. "Preparation of active esters on solid support for aqueous-phase peptides couplings." *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 1369-1372.

⁴⁵ A. D. Corbett, J. D. Cheeseman, R. J. Kazlauskas, J. L. Gleason. "Pseudodynamic combinatorial libraries : a receptor-assisted approach for drug discovery." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 2432-2436.

L'ensemble des produits de la bibliothèque possède une partie spécifique avec des groupements fonctionnels différents et une partie commune présentant des groupements facilitant la solubilisation des composés.

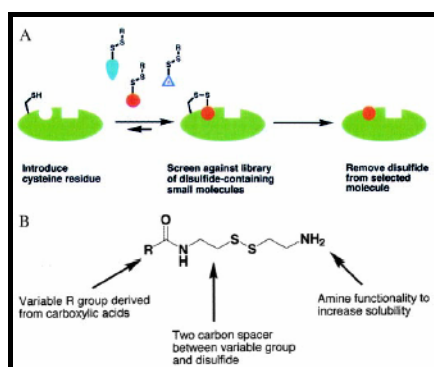


Figure 20 : Représentation schématique de la méthode “tethering”. A : illustration schématique de la méthode ; B : représentation générale des bibliothèques élaborées.

De cette façon, si le produit de la banque ne présente pas d'affinité particulière pour la protéine cible, le pont disulfure formé sera réduit facilement. En revanche, si une molécule présente une quelconque affinité, même faible, pour la protéine d'intérêt, le pont disulfure sera stabilisé et la molécule sera sélectionnée puis identifiée par spectroscopie de masse. On peut ainsi parler de sélection des ligands par la protéine cible elle-même. L'utilisation d'une telle méthode peut se faire pour la sélection de bibliothèques composées jusqu'à une centaine de produits de masses différentes. Au-delà de cette quantité de produits, on atteint les limites de la détermination massive et l'identification des ligands n'est plus indubitable. D'autre part, il est également possible d'analyser les cristaux des complexes aux rayons X. Ainsi peut-on améliorer la structure des composés reconnus pour augmenter leur affinité pour la protéine. D'autre part, une étude comparative des complexes protéine-ligand et protéine-ligand *via* un pont disulfure a montré que la présence d'un pont disulfure n'affectait que peu la structure générale du complexe.

A. C. Braisted *et coll.*^[46] ont étendu leur étude à une méthode utilisant des extenseurs clivables ou se liant avec une forte affinité à la surface de la protéine.

a. Extenseur pour screening

L'équipe s'est pour cela intéressée à l'étude des protéines tyrosine phosphatases ou PTP. Ces enzymes qui enlèvent le groupement phosphate aux résidus tyrosine au sein de peptides ou protéines sont reconnues comme étant de bonnes cibles thérapeutiques. L'ensemble des PTP possède un résidu cystéine conservé au sein de son site actif, résidu

⁴⁶ D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted. “Tethering : fragment-based drug discovery.” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2004**, 33, 199-223.

hautement réactif vis-à-vis des électrophiles. Néanmoins, celui-ci ne pourrait constituer un point d'ancrage pour d'éventuels ligands car le site étant petit, ces ligands interagiraient avec les résidus situés en dehors du site. De plus, intégrer une mutation au sein même du site actif pourrait résulter en une modification de sa surface et un changement de la réactivité.

C'est pour pallier à cette difficulté que l'équipe a amélioré la méthode « *tethering* » en créant un bras extenseur clivable permettant ainsi d'accéder au site actif sans le modifier^[47]. Ils ont donc tout d'abord introduit une cystéine en dehors du site actif. Ce résidu est ensuite modifié avec un extenseur clivable, qui, une fois enlevé, positionne une fonction thiol à proximité du site actif. Il est alors possible de sélectionner une bibliothèque de ligands.

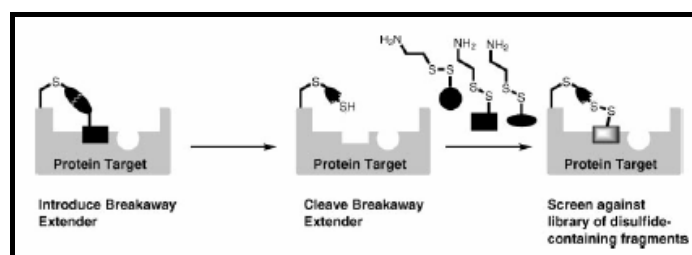


Figure 21 : Principe du *tethering* avec bras extenseur.

Pour valider ce concept, ils ont utilisé une protéine connue, la PTP-1B cible antidiabétique, dont quelques ligands sont connus. Ils ont alors intégré les groupements fondamentaux de ces ligands au sein de la structure du bras extenseur. Deux structures furent utilisées et plusieurs ligands reconnus.

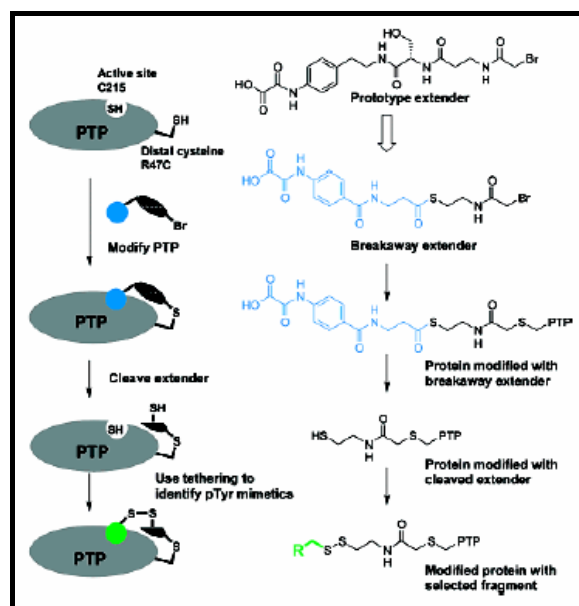


Figure 22 : Structure des bras extenseurs clivables.

⁴⁷ D. A. Erlanson, R. S. McDowell, M. M. He, M. Randal, R. L. Simmons, J. Kung, A. Waight, S. K. Hansen. "Discovery of a new phosphotyrosine mimetic for PTP1B using breakaway tethering." *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 5602-5603.

b. Extenseur avec forte affinité pour la cible

L'équipe a ensuite souhaité élargir son étude en élaborant des inhibiteurs de haute affinité, ce qu'ils n'avaient pas réalisé jusqu'à ce jour.

Dans le but de valider leur approche, les chercheurs ont utilisé l'enzyme caspase-3, membre de la famille des cystéine aspartyl protéases. Des études antérieures ont mis en évidence la structure d'inhibiteurs performants présentant un résidu acide aspartique et dont la séquence peptidique fut utilisée pour élaborer le bras extenseur. Une première sélection mit en évidence la haute affinité de l'acide salicylique pour la cible. L'équipe a alors synthétisé un nouveau composé dont le pont disulfure fut remplacé par un simple enchaînement alcane. D'autres modifications locales de la séquence, suivies de tests de liaison, ont alors conduit à l'élaboration d'un produit de haute affinité pour la cible^[48].

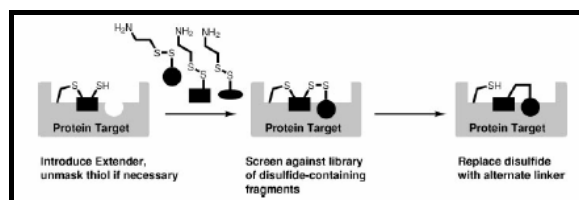


Figure 23 : Représentation schématique de la méthode.

D. Méthodes d'identification des produits actifs^[49]

1. Au sein des bibliothèques issues de méthodes générales

a. Criblage sur résine

Ce test s'effectue sur les bibliothèques de composés encore liés aux billes de résine, cela implique donc un choix judicieux du support solide qui, idéalement, doit être uniforme en taille et en taux de substitution pour chacune des billes de résine. De plus, la plupart des tests biologiques s'effectuant dans des milieux aqueux, il est important que la résine ainsi que les produits qu'elle présente ne soient pas hydrophobes. Il existe ainsi deux supports solides classiques, TentaGel[®] et PepSynGel[®], majoritairement utilisés pour ce type de synthèse et de test. Malgré tout, le premier ne possède pas un taux de substitution uniforme tandis que le second n'a pas une taille de billes régulière...

⁴⁸ D. A. Erlanson, J. W. Lam, C. Wiesmann, T. N. Luong, R. L. Simmons, W. L. DeLano, I. C. Choong, M. T. Burdett, W. M. Flanagan, D. Lee, E. M. Gordon, T. O'Brien. "In situ assembly of enzyme inhibitors using extended tethering." *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 308-314.

⁴⁹ K.-Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara. "Protein-detecting microarrays : current accomplishments and requirements." *ChemBioChem*, **2005**, 6, 783-799.

Deux approches distinctes existent pour ce type de test

La première approche consiste à mettre en présence uniquement le ligand et la cible et à détecter une éventuelle reconnaissance. La détection se fait alors soit par visualisation directe à l'aide d'un colorant soit par détection indirecte en utilisant la fluorescence par exemple.

Ainsi Lam *et al.* ont-ils utilisé des substrats chromophores en présence de leur cible couplée à une alcaline phosphatase. L'action de l'enzyme sur les deux substrats (NBT et BCIP) entraîne la formation d'une couleur bleu-violette qui se dépose à la surface des billes positives comme le montre la Figure 24.

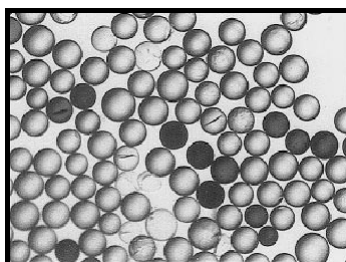


Figure 24 : Tests colorimétriques induits par l'action d'enzyme.

Une autre approche fut envisagée par Chen *et al.*^[50] qui ont greffé une molécule fluorescente à un domaine SH3 et ont testé les billes de résine sous un microscope fluorescent. D'autre part, Lam *et al.*^[51] ont directement testé les bibliothèques de composés avec des colorants.

Enfin, dans le but de tester des macromolécules comme des anticorps ou des enzymes, il est aussi possible d'utiliser des cellules intactes pour sélectionner les composés présentés sur les billes de résine. Ainsi, les cellules possédant un diamètre compris entre 6 et 10 μm , peuvent ainsi être observées directement au microscope lorsqu'elles se lient aux billes de 100 μm de diamètre.

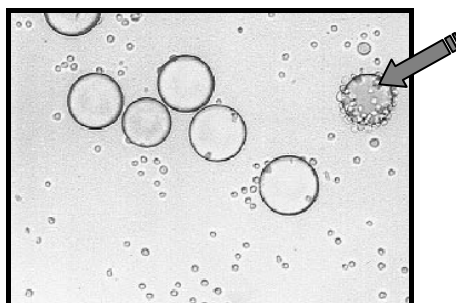


Figure 25 : Cellules se liant à une bille de résine, observation au microscope.

⁵⁰ J. K. Chen, W. S. Lane, A. W. Brauer, A. Tanaka, S. L. Schreiber. "Biased combinatorial libraries : novel ligands for the SH3 domain of phosphatidylinositol 3-kinase." *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 12591-12592.

⁵¹ K. S. Lam, Z. G. Zhao, S. Wade, V. Kretnak, M. Lebl. "Identification of small peptides that interact specifically with a small organic dye." *Drug Dev. Res.*, **1994**, *33*, 157-160.

En ce qui concerne la seconde méthode, nous pouvons citer tout d'abord l'exemple de Lam et Wu^[52] qui ont laissé incuber une bibliothèque de peptides sur résine en présence d'une protéine kinase et d'ATP marqué au ³²P. Après incubation, les billes sont lavées et chauffées à 100°C afin d'hydrolyser les interactions non-spécifiques entre l'ATP marqué et les billes positives. Celles-ci sont ensuite immobilisées sur une plaque à 0,5% d'agarose fondu et observées aux rayons X après refroidissement du gel. On peut alors observer par radio la position des billes positives. Le test est réitéré afin d'avoir une identification plus précise de la position des billes positives afin de les isoler et de déterminer la structure des composés sélectionnés.

D'autre part, Meldal *et al.*^[53] ont décrit un test de quenching de fluorescence dans le but d'identifier de nouveaux substrats protéolytiques à partir d'une bibliothèque de peptides sur résine. Ce test consiste en l'introduction d'une molécule fluorescente à l'extrémité C-terminale du substrat tandis qu'une molécule inhibitrice de fluorescence est introduite à son extrémité N-terminale. Dans le cas d'une reconnaissance entre un peptide et l'enzyme, cette dernière coupera le peptide près d'un résidu Pro, introduit dans ce but. Ainsi, après incubation de la bibliothèque de composés avec la protéase cible, les peptides présentant une séquence appropriée sont clivés de la bille de résine entraînant ainsi le retrait de la molécule inhibitrice de fluorescence et une fluorescence accrue en surface de la bille positive. Celle-ci est alors récupérée afin d'identifier la séquence peptidique reconnue.

b. Criblage en solution

Dans ce cas, les peptides sont liés aux billes de résine via un ligand clivable, et sont ensuite libérés de chaque bille dans une solution où le test biologique aura lieu. Pour ce type de sélection, il existe deux approches principales.

La première approche implique l'incorporation de deux ligands clivables orthogonalement lors de la synthèse des bibliothèques. Felder *et coll.*^[54] ont décrit cette méthode intéressante. Ils ont ainsi utilisé une plaque filtrable de 96 puits dans chacun desquels ils ont introduit entre 100 et 500 billes de résine. La neutralisation de la solution contenant les billes induit la formation d'une diketopiperazine entraînant la libération d'un premier peptide. Après une nuit d'incubation, la plaque de 96 puits est filtrée et les filtrats collectés dans une

⁵² K. S. Lam, J. Wu. *Methods*, **1994**, *6*, 401.

⁵³ M. Meldal, I. Svendsen, K. Breddam, F. I. Auzanneau. "Portion-mixing peptide libraries of quenched fluorogenic substrates for complete subsite mapping of endoprotease specificity." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, *91*, 3314-3318.

⁵⁴ S. E. Salmon, K. S. Lam, M. Lebl, A. Kandola, P. S. Khattri, S. Wade, M. Patek, P. Kocis, V. Krchnak, D. Thorpe, S. Felder. "Discovery of biologically active peptides in random libraries : solution-phase testing after staget orthogonal release from resin beads." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, *90*, 11708-11712.

nouvelle plaque à 96 puits où les composés sont testés pour leur activité biologique. Les billes présentes dans les puits ayant donné une réponse positive sont alors redistribuées dans une plaque filtrable à 96 puits pour une nouvelle série de test, avec une bille par puits. Cette fois-ci, la libération du peptide en solution se fait par traitement alcalin, à l'aide de vapeurs d'ammoniaque. Enfin, le troisième peptide des billes appartenant aux puits ayant donné une réponse positive est utilisé pour le séquençage.

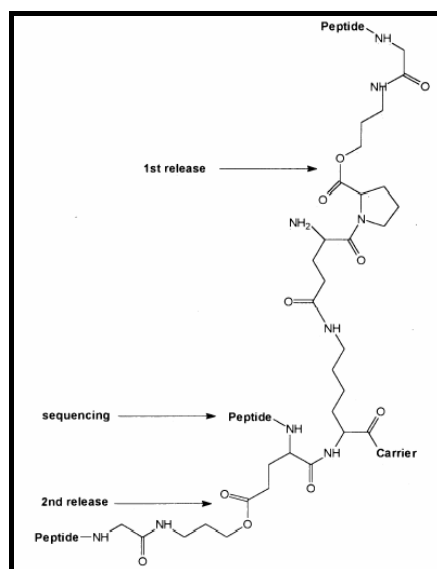


Figure 26 : Structure chimique des ligands clivables orthogonalement.

La seconde approche consiste en l'immobilisation de la résine sur un support avant d'effectuer le test. Jayawickreme *et al.*^[55] ont, par exemple, testé des bibliothèques de ligands du récepteur MSH. Pour cela, ils ont tout d'abord immobilisé les billes de résine sur un film de polyéthylène puis ont exposé la bibliothèque à des vapeurs de TFA pendant 10h. Après neutralisation à l'aide de vapeurs d'ammoniaque, le film fut placé sur des cultures de mélanocytes, impliquant la diffusion des peptides vers les cellules. Résultant d'une pigmentation, les cellules situées sous ou à proximité des billes de résines positives, se colorèrent en noir après 15 min.

c. Identification des molécules d'intérêt

Il est possible d'utiliser différentes méthodes de séquençage couplées à la spectrométrie de masse, la CLHP ou la RMN. Il est à noter que la spectrométrie de masse peut aussi être utilisée seule. Pour cela, il est possible d'utiliser la méthode MALDI-TOF MS où les peptides sont clivés chimiquement mais non physiquement ou bien la méthode ES-MS qui

⁵⁵ C. K. Jayawickreme, H. Sauls, N. Bolio, J. Ruan, M. Moyer, W. Burkhart, B. Marron, T. Rimele, J. Shaffer. "Use of a cell-based, lawn format assay to rapidly screen a 442,368 bead-based peptide library." *J. Pharmacological and Toxicological Methods*, **1999**, 42, 189-197.

nécessite par contre que les produits soient totalement séparés du support solide. Une autre méthode a été décrite par Youngquist *et al.*^[56] et est basée sur un piégeage partiel, de l'ordre de 10%, du peptide en élongation à chaque étape de la synthèse. Ainsi chaque bille de résine comporte-t-elle toutes les séquences intermédiaires du peptide final et l'on peut déterminer sa structure par différence des masses observées. Malgré tout, les méthodes les plus répandues sont les méthodes de séquençage de Sanger et de dégradation d'Edman (cf. Annexe I-III).

2. Au sein des bibliothèques obtenues par « *phage display* »

En règle générale, la méthode du « phage display » est utilisée pour élaborer des bibliothèques de peptides présentant une séquence qui sera reconnue par un récepteur ou une protéine cible. Une fois que les phages d'intérêt sont isolés, leur ADN sera séquencée afin de connaître la séquence du peptide actif^[57,58].

a. Tests d'affinité *in vitro*

Pour effectuer ces tests de sélection, les cibles sont immobilisées sur différents supports solides tels que des surfaces en plastique, des microbilles magnétiques ou des colonnes de chromatographie d'affinité. D'une façon générale, les cibles utilisées sont des anticorps, des protéines recombinantes ou bien de l'ADN simple brin. La première étape consiste en l'incubation des phages avec les protéines immobilisées. Il est important de faire succéder à cette étape un lavage qui éluera les phages liés aux protéines de façon non spécifique. Par la suite, on effectue une élution des phages immobilisés en utilisant pour cela des conditions dénaturantes ou des éluions compétitives par exemple. On amplifie alors les phages sélectionnés par infection de cellules bactériennes. Lors cette étape impliquant la machinerie cellulaire de réplication et transcription, des mutations peuvent intervenir, mais elles ne peuvent être que bénéfiques dans le sens où elles apportent une diversité supplémentaire à la bibliothèque de peptides initialement produite. On effectue alors une nouvelle sélection et réitère ces cycles jusqu'à obtention de molécules de haute affinité pour la cible. Finalement, on isole ces phages d'intérêt et séquence leur ADN afin d'identifier la séquence des peptides présentés à leur surface.

⁵⁶ R. S. Youngquist, G. R. Fuentes, M. P. Lacey, T. Keough. "Generation and screening of combinatorial peptide libraries designed for rapid sequencing by mass spectroscopy" *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 3900-3906.

⁵⁷ G. P. Smith, V. A. Petrenko. "Phage display." *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 391-410.

⁵⁸ H. B. Lowman. "Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1997**, *26*, 401-424.

b. Sélection *in vivo* sur cellules entières en culture

Cette technique met en jeu des cultures cellulaires sur support solide ou en solution. On fait incuber les phages en présence de ces cellules. Afin d'évaluer le taux de liaisons non spécifique. Un blanc est effectué avec des phages en présence de cellules ne présentant pas le récepteur cible. Ensuite, après incubation, les phages liés aux cellules sont sélectionnés en utilisant la technique de cytométrie en flux plus amplement décrite dans l'Annexe I-II.

c. Sélection *ex vivo* sur des organes isolés

C'est la méthode qu'ont utilisé R. Pasqualini et E. Ruoslathi^[59] afin de sélectionner des ligands se liant spécifiquement sur certains organes. Ils ont pour cela travaillé avec des souris en leur injectant dans la queue, par intraveineuse, des phages exposant des peptides d'intérêt. Après quelques minutes, les animaux sont sacrifiés par immersion dans l'azote liquide et différents organes récupérés. Les phages qui leur sont liés furent ensuite multipliés par culture bactérienne et de nouveaux cycles de sélection furent effectués chez l'animal.

3. Au sein des bibliothèques issues des approches nouvelles

Le criblage des produits d'intérêt s'effectue directement en même temps que la bibliothèque se forme. L'identification des produits actifs se fait ensuite la plupart du temps par spectrométrie de masse où l'on analyse le récepteur en présence de son ligand. En fonction de la différence de masse observée, on pourra ainsi identifier le composé actif. Cette méthode d'identification implique simplement que les composés de la banque aient une différence de masse suffisante entre eux afin de pouvoir les identifier sans hésitation. D'autre part, la banque ne doit pas présenter trop de composés pour faciliter l'identification par la suite.

⁵⁹ R. Pasqualini, E. Ruoslathi. "Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries." *Nature*, **1996**, 380, 364-366.

En résumé...

La technique de synthèse par voie combinatoire est basée sur le concept du parallélisme en réalisant un assemblage aléatoire de plusieurs composés. Ainsi obtient-on un maximum de produits dans un minimum de temps et d'étapes.

Les premières bibliothèques furent réalisées avec des acides aminés ou des bases de nucléotides sur supports (résine ou surface) en utilisant soit des techniques comme le « split-and-mix » soit les techniques employant les caches et se servant de réactifs ou même de la lumière.

Par la suite, l'outil biologique fut mis à profit avec le « phage display » dans la présentation de banques de peptides à la surface de phages et directement testables in vivo.

Enfin plus récemment s'est développée une nouvelle technique de formation de bibliothèques dites « dynamiques » où l'assemblage des produits s'effectue en présence et en fonction de la cible. C'est cette dernière qui induit l'enrichissement en composés les plus actifs. Ces banques présentent ainsi un avantage supplémentaire en matière de gain de temps car la formation des produits, leur évaluation biologique et l'amplification des composés actifs se fait de façon simultanée.

Notre approche dans la création de banques de peptides se trouve à la frontière entre ces différentes méthodes. En effet, nous avons choisi la séquence de quatre peptides linéaires. Par ailleurs, nous avons aussi synthétisé quatre séquences peptidiques conformationnellement contraintes (peptides cycliques) et avons modifié deux positions de ces peptides avec quatre acides aminés distincts. Par la suite, nous avons assemblé ces séquences de manière combinatoire sur un châssis décapeptidique. De cette manière, nous pensons obtenir des banques de produits variées pouvant cibler une large gamme de cibles tout en n'étant pas trop grandes pour éviter les problèmes d'identification des composés.

III. Travaux réalisés sur les mimes de surfaces

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les surfaces de contact entre les protéines sont de l'ordre de 800 Å², majoritairement hydrophobes et elles peuvent s'adapter entre elles pour obtenir un maximum d'interactions. Mimer ces surfaces de contact a donc longtemps constitué un challenge pour les chercheurs du monde entier. Ils se sont donc tout d'abord intéressés à l'inhibition d'enzymes car leur site actif n'est formé que par de petites poches. Par la suite, une nouvelle méthode pour la création de mimes fut de recréer les protéines. Parallèlement, les chercheurs ont trouvé différentes techniques afin de mimer des surfaces aussi variées que des anticorps ou des récepteurs par exemple^[60,61].

A. Mimes de surfaces réduites

L'inhibition de surfaces d'interaction protéine-protéine a tout d'abord été réalisé par de petites molécules organiques issues de produits naturels. Comme exemple, on peut citer l'action des agents taxane comme le paclitaxel ou Taxol^[62,63,64,65], isolé d'un arbre le *Taxus brevifolia*, et son dérivé semisynthétique le docetaxel ou Taxotère^[66,67] dans le traitement de nombreux cancers. Leur action se traduit par une liaison à la sous-unité β de l'hétérodimère de tubuline et stabilise ainsi les interactions entre les hétérodimères de tubuline. Il s'en suit alors une polymérisation accélérée de la tubuline en microtubules. Ces microtubules devant se dépolymériser lors de la mitose, leur stabilisation sous leur forme polymérisée conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et finalement à l'apoptose de la cellule cancéreuse.

⁶⁰ L. Regan, J. Wells. "Engineering and design. Recent adventures in molecular design." *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1998**, 8, 441-442.

⁶¹ M. W. Peczuł, A. D. Hamilton. "Peptide and protein recognition by designed molecules." *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 2479-2494.

⁶² J.-N. Denis, A. E. Greene. "A highly efficient, practical approach to natural taxol." *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 5917-5919.

⁶³ J.-N. Denis, A. Correa, A. E. Greene. "Direct, highly efficient synthesis from (S)-(+)-Phenylglycine of the taxol and taxotere side chains." *J. Org. Soc.*, **1991**, 56, 6939-6942.

⁶⁴ J.-N. Denis, A. E. Greene. *Fr. Appl. (Rhône-Poulenc Rorer S.A.)* 91/10, 398, Aug 19, 1991.

⁶⁵ D. Guénard, F. Guéritte-Voegelein, P. Potier. "Taxol and taxotere : discovery, chemistry, and structure-activity relationships." *Acc. Chem. Res.*, **1993**, 26, 160-167.

⁶⁶ A. M. Kanazawa, A. Correa, J.-N. Denis, M.-J. Luche, A. E. Greene. "A short synthesis of the taxotere side chain through dilithiation of Boc-benzulamine." *J. Org. Soc.*, **1993**, 58, 255-257.

⁶⁷ A. M. Kanazawa, J.-N. Denis, A. E. Greene. "Highly stereocontrolled and efficient preparation of the protected, esterification-ready docetaxel (Taxotere) side chain." *J. Org. Soc.*, **1994**, 59, 1238-1240.

On peut également citer la cyclosporine A^[68]. Ce cyclopeptide fongique de onze acides aminés fut isolé de *Tolypocladium inflatum* Gams et reconnu comme étant le premier suppresseur immunitaire à agir de façon sélective sur les cellules T du système immunitaire. Il est utilisé dans le traitement de certains cancers (lymphomes, peau), de maladies auto-immunes (*arthrite rhumatoïde*), de maladies des poumons, du psoriasis ou encore de l'hépatite C. A cause de son action sur le système immunitaire, la cyclosporine A est également administrée lors de traitements post-transplantation afin d'éviter les phénomènes de rejet^[69]. Un autre exemple est celui de la Cassine. Cet alcaloïde pipéridinique fut extrait des feuilles de *Cassia excelsa* et reconnu comme ayant une activité antimicrobienne sur le *Staphylococcus aureus*^[70].

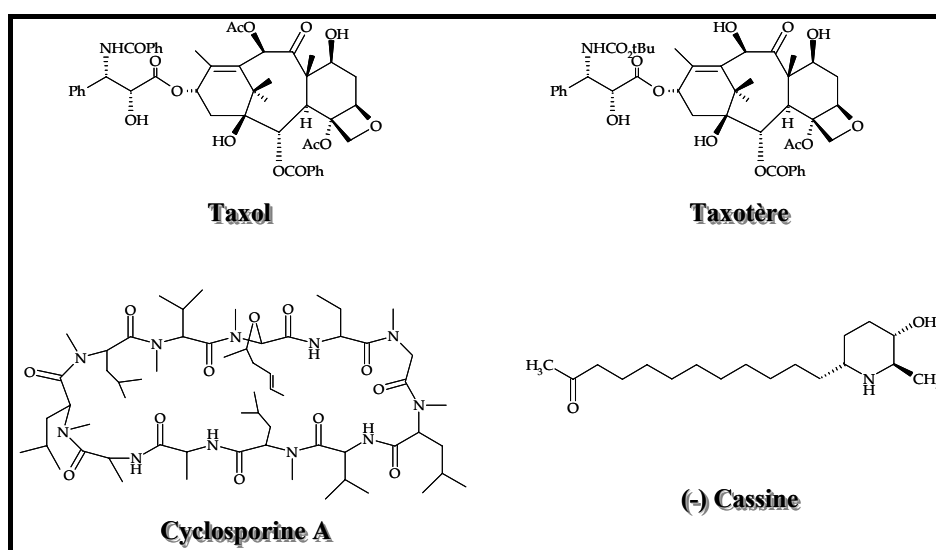


Figure 27 : Structures du Taxol, Taxotère, de la Cyclosporine A et de la (-)Cassine.

On peut citer aussi l'exemple de la synthèse d'inhibiteurs de la farnesyltransférase^[71]. C'est une enzyme agissant sur la protéine Ras impliquée dans plusieurs cascades de réactions agissant sur les facteurs de croissance. Une mutation de cette protéine Ras aux endroits clés entraînerait une croissance incontrôlée des cellules et à terme un cancer (colon et pancréas en particulier). C'est à partir du substrat de l'enzyme, le tetrapeptide Cys-Val-Ile-Met, qu'une série d'inhibiteurs non peptidiques a été synthétisée en utilisant le châssis terphenyl et en lui greffant des chaînes latérales hydrophobes, carboxylates et des groupements liant le zinc.

⁶⁸ H.-L. Lin, W.-Y. Lui, T.-Y. Liu, C.-W. Chi. "Reversal of taxol resistance in hepatoma by cyclosporin A : involvement of the PI-3 kinase-AKT I pathway." *British J. Cancer*, **2003**, 88, 973-980.

⁶⁹ http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Medical/Harriet_Upton/Harriet_Upton.htm

⁷⁰ C. Herdeis, P. Küpper, S. Plé. "An expeditious stereoselective synthesis of natural (-)-Cassine via cascade HWE [2+3]-cycloaddition process." *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 524-529.

⁷¹ J. Ohkanda, J. W. Lockman, M. A. Kothare, Y. Qian, M. A. Blaskovich, S. M. Sebt, A. D. Hamilton. "Design and synthesis of potent nonpeptidic farnesyltransferase inhibitors based on a terphenyl scaffold." *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 177-188.

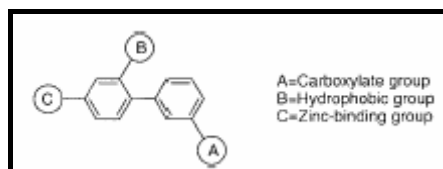


Figure 28 : Schéma des inhibiteurs non peptidiques de la farnéphenyltransferase.

Une technique intéressante pour l'obtention de mimes d'enzymes^[72] a été développée par G. Wulff il y a une dizaine d'années, et dénommée empreinte moléculaire ou « Molecular Imprinting »^[73]. Cette méthode consiste en la réalisation d'un réseau polymérique tridimensionnel autour d'une molécule d'intérêt. On lie tout d'abord un châssis à des groupements fonctionnels spécifiques (cf. Figure 29-haut) que l'on copolymérise de façon à obtenir des polymères présentant des chaînes fixes dans l'espace. Après élimination du châssis, on obtient ainsi des polymères avec une cavité dont la structure et l'arrangement des groupements fonctionnels sont prédéfinis par la nature chimique du châssis initialement présent.

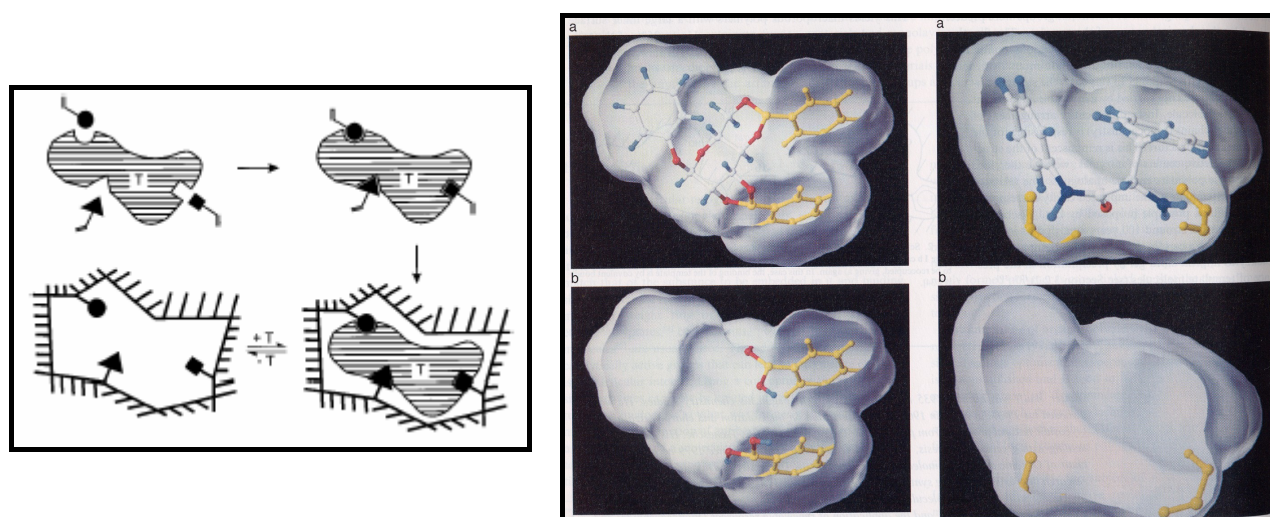


Figure 29 : Représentation schématique (à gauche) et graphique (à droite) du principe.

G. Wulff a étudié la formation de ces cavités à la fois à l'aide de polymères, mais aussi à l'aide de gels de silice, de couches inorganiques sur support solide et de biopolymères (protéines, carbohydrates). Quant aux groupements fonctionnels, ils doivent se lier fortement au châssis afin de garder leur orientation lors de la polymérisation. D'autre part, il doit être possible d'enlever complètement le châssis une fois la polymérisation terminée... Dans ce but, G. Wulff a utilisé des interactions covalentes, non covalentes ainsi que des interactions *via* des complexes métalliques. Outre la création de mimes de sites actifs enzymatiques, la

⁷² G. Wulff. "Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers." *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1-27.

⁷³ G. Wulff. "Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates – A way towards artificial antibodies." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 1812-1832.

cavité obtenue peut être utilisée pour la chromatographie ; pour des tests de radio-immunologie, comme membrane ou capteur ou encore pour effectuer des réactions sélectives.

B. Création de protéines « de novo »

1. Principe

De nombreuses maladies proviennent de mauvais repliements de protéines, par conséquent, l'étude, la compréhension et la synthèse de protéines *de novo* comportant des structures et des fonctions adéquates seraient d'une grande avancée pour la recherche du point de vue thérapeutique.

J. Nilsson et coll.^[74] ont décrit certains principes décrits par la suite.

Ils se sont tout d'abord intéressés aux enroulements à quatre et trois hélices en se basant sur un concept d'agréations entre les hélices, dues à la présence d'interactions hydrophobes. Ces interactions confèrent une énergie de liaison donnée ($\sim 50 \text{ cal}/\text{Å}^2$) à la protéine, lui permettant de passer d'un état de repliement partiel ou intermédiaire à son état de repliement final. L'état de repliement partiel de la protéine ou "*Molten globule-like folds*" possède des propriétés différentes de celles de la protéine native et est intéressant à étudier pour la conception de châssis dans la synthèse de mimes de catalyseurs protéiniques par exemple. Le problème majeur rencontré lors de l'élaboration de protéines *de novo* est l'obtention d'un repliement unique. En effet, avec la séquence hélice-boucle-hélice par exemple, il est possible d'obtenir six repliements différents dont cinq ne sont pas adaptés... Il existe différentes méthodes pour parvenir à la structure désirée.

La première, que l'on appelle "*negative design*", consiste en l'introduction de résidus dont les liaisons sont hautement sélectives et spécifiques pour conduire à l'unique conformation désirée, ceci en "déstabilisant" les états intermédiaires.

La seconde consiste à incorporer des résidus aux chaînes latérales exclusivement aliphatiques donnant ainsi des repliements d'hélices extrêmement symétriques. D'autre part, il est possible de former des ponts salins donnant l'unique structure désirée en se plaçant au pH où le pont salin a le plus de chances de se former.

Enfin, l'utilisation des interactions charge-charge peut être déterminant dans la sélection d'un repliement parmi plusieurs.

⁷⁴ L. Baltzer, H. Nilsson, J. Nilsson. "De novo design of proteins – What are the rules ?" *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3153-3163.

Quant à la boucle séparant deux hélices, elle influence aussi les propriétés de repliement de la protéine. En effet, l'augmentation de la longueur peut diminuer la stabilité de la protéine face à une dénaturation thermique par exemple^[75].

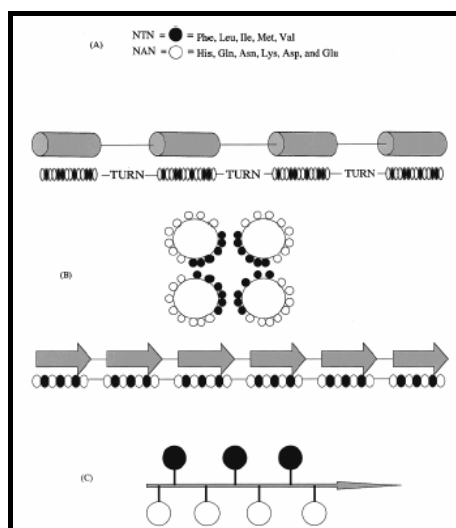
2. Exemples de méthodes de création

a. Création d'hélices α

Pour cela, D. A. Moffet et M. H. Hecht^[76] se sont intéressés à l'élaboration de séquences de la taille des domaines globulaires protéiniques naturels. Ceux-ci possèdent deux tendances majoritaires :

- ⇒ les protéines naturelles présentent des résidus hydrophobes dans leur partie centrale et des résidus hydrophiles tournés vers le solvant ;
- ⇒ les protéines naturelles possèdent de nombreuses liaisons hydrogène dans leurs structures secondaires i.e. des hélices α ainsi que des feuillets β .

En se basant sur ces deux informations, ils ont développé une nouvelle méthode d'élaboration de bibliothèques de nouvelles protéines nommée "*binary patterning*" basée sur l'incorporation d'acides aminés polaires (P) et non polaires (N). En utilisant ce concept ainsi que le fait que les hélices α ont une période de 3,6 résidus par tour, ils utilisèrent la répétition P-N-P-P-N-N-P-P-N pour leur création d'une part, et d'autre part, le fait que les feuillets β ont une période alternée (dessus-dessous-dessus-dessous-...), ils utilisèrent la répétition P-N-P-N-P pour les élaborer, comme le montre la Figure 30.



Les éléments en noir sont les acides aminés non polaires (N); ceux en blanc, les acides aminés polaires (P). (A) et (B) représentent les bibliothèques d'hélices α obtenues tandis que (C) représente les bibliothèques de feuillets β .

Figure 30 : Elaboration de bibliothèques combinatoires basées sur le concept du "*binary patterning*".

⁷⁵ A. D. Nagi, L. Regan. "An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein" *Folding Des.*, **1997**, 2, 67-75.

⁷⁶ D. A. Moffet, M. H. Hecht. "De novo proteins from combinatorial libraries" *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3191-3203.

La première banque de protéines obtenue de cette façon avait pour but de former des séquences présentant des hélices α ^[77]. Elle fut synthétisée à l'aide d'une collection de gènes synthétiques exprimés dans les bactéries dont la diversité combinatoire fut obtenue par organisation du code génétique. Ainsi les acides aminés non polaires furent-ils obtenus à l'aide du codon dégénéré NTN où N peut être remplacé par les quatre bases de nucléotide et code pour : Phe, Leu, Ile, Met et Val ; tandis que les acides aminés polaires furent obtenus à l'aide du codon dégénéré VAN où V représente les bases C, A et G, il code alors pour : His, Gln, Asn, Lys, Asp et Glu. A l'aide de cette banque, 50 protéines ont pu être purifiées et caractérisées, mais alors que quelques-unes présentent les caractéristiques d'une protéine native, l'essentiel des protéines obtenues étaient similaires à des protéines du type "molten globule".

Ceci peut s'expliquer par le fait que la plupart des protéines sont composées de plus de 100 acides aminés dans leurs parties de séquences enroulées à quatre hélices. Chaque hélice est constituée de plus de 20 acides aminés alors que dans le cas présent, seulement 74 acides aminés constituent l'enroulement à quatre hélices avec seulement 14 acides aminés par hélice. Une solution à ce problème fut d'ajouter six résidus de façon combinatoire à chacune des quatre hélices, tout en continuant d'appliquer le principe du "binary patterning". Cinq séquences furent choisies de façon aléatoire pour de plus amples études et chacune d'entre elles a donné des résultats satisfaisants.

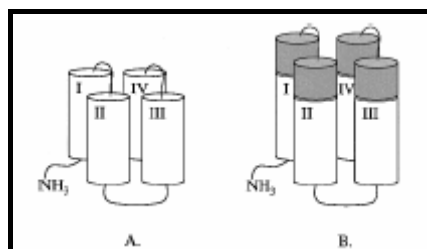


Figure 31 : (A) Représentation de la banque originale ; (B) Représentation de la banque comportant un ajout de six résidus pour chaque hélice (partie sombre).

b. Création de feuillets β

En utilisant la méthode citée précédemment, la période P-N-P-N- fut utilisée pour former une banque de gènes synthétiques exprimés dans les bactéries *E. coli* pour donner des protéines présentant six brins de feuillets β ^[78]. Dans ce cas, les protéines s'auto assemblent

⁷⁷ S. Kamtekar, J. M. Schiffer, H. Xiong, J. M. Babik, M. H. Hecht. "Protein design by binary patterning of polar and non polar amino acids" *Science*, **1993**, 262, 1680-1685.

⁷⁸ M. W. West, W. Wang, J. Patterson, J. D. Mancias, J. R. Beasley, M. H. Hecht. "De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 11211-11216.

pour donner de grands fibrilles ressemblant à des fibrilles amyloïdes que l'on trouve dans plusieurs maladies neurodégénératives

Par ailleurs, J. Nilsson et *coll.*^[22] se sont aussi intéressés à l'élaboration des feuillets β . Ceci comportait de prime abord de grandes difficultés dues à des problèmes d'agrégations qui ont été résolues par l'introduction d'un grand nombre de résidus de charges identiques au sein de la séquence peptidique. De plus, les enchaînements Asn-Gly forment des coudes et favorisent la formation de séquences en épingle à cheveux. Ainsi a-t-il été montré que des séquences peptidiques comportant les deux résidus Asn-Gly en deux positions se repliaient et formaient des feuillets β monomériques à trois brins plus stables que la séquence modèle en épingle à cheveux.

c. Amélioration de la partie hydrophobe centrale

Parmi différentes équipes de chercheurs, Case et McLendon ont utilisé une approche intéressante^[79]. Ils ont construit une banque peptidique reposant sur des procédés d'auto assemblage dans le but de trouver les meilleures séquences d'enroulement à trois hélices. Dans ce but, trois peptides différents composés de 20 acides aminés ont été synthétisés. Chaque peptide présente les mêmes résidus hydrophiles tournés vers le solvant tandis que les résidus conçus pour lier dans la partie centrale furent variés. Ainsi les peptides α pL, α pA et α pLA sont-ils composés de quatre résidus Leu, Ala ou Ala-Leu-Ala-Leu respectivement, tous liant dans la partie centrale. Enfin, à chaque peptide fut greffé un groupement Bpy (2,2'-bipyridyl-5-carboxylic amide) dans sa partie N-terminale, groupement formant des liaisons avec des métaux comme Ru(II) ou Fe(II) à raison de trois groupements pour un atome métallique. Ils formèrent ainsi une bibliothèque de 11 protéines présentant des enroulements à trois hélices comme le montre la Figure 32.

⁷⁹ A. M. Case, G. L. McLendon, "A virtual library approach to investigate protein folding and internal packing." *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 8089-8090.

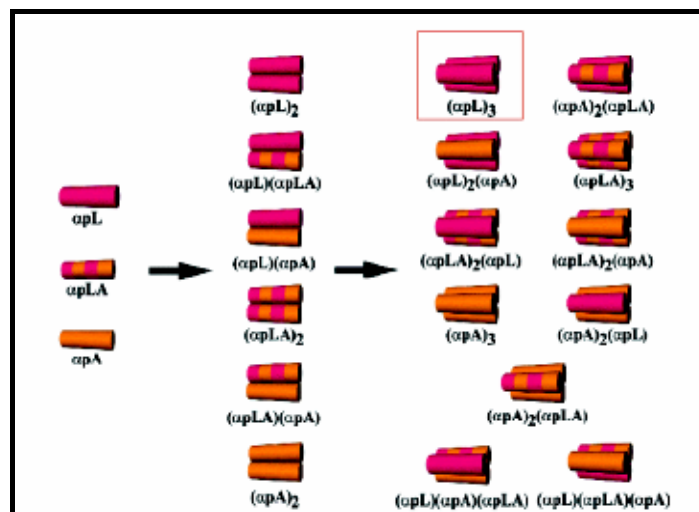


Figure 32 : Représentation de la formation de la banque de protéines présentant des enroulements à trois hélices.

Le peptide $(\alpha L)_3$ fut trouvé en plus grande abondance, montrant que cette protéine *de novo* est la plus stable parmi celles synthétisées. D'autre part, des tests de dénaturation ont confirmé cette tendance.

d. Le concept TASP

Depuis une 20aine d'année, le concept de protéines synthétiques assemblées sur châssis ("Template-assembled synthetic proteins" ou TASP) a été introduit par M. Mutter^[80] (Figure 33). Afin de constituer des protéines *de novo*, son équipe a synthétisé d'une part des peptides présentant des hélices α ou des feuilletts β et d'autre part un large châssis nommé RAFT ("Regioselectively Addressable Functionalized Template"). La description des RAFTs est plus largement développée dans le Chapitre I.

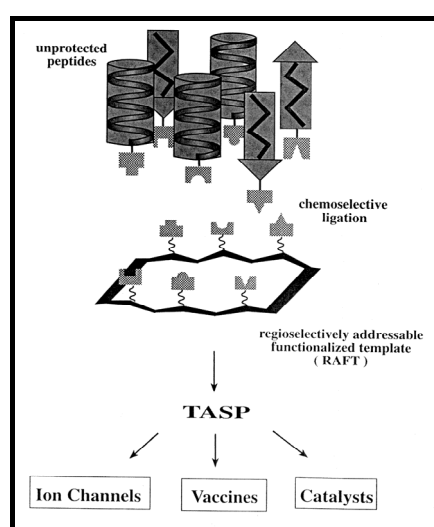


Figure 33 : Principe du concept TASP.

⁸⁰ G. Tuchscherer, P. Dumy, M. Mutter. "Protein *de novo* design" *Chimia*, 1996, 50, 644-648.

Ce châssis est apte à lier des peptides de façon sélective grâce à différents groupements protecteurs situés sur les chaînes latérales ou bien grâce à des réactions chimiosélectives que nous décrirons par la suite.

Le châssis RAFT a été utilisé par Haehnel et *coll.*^[81] sur lequel ils ont greffé des hélices α de manière covalente pour cibler les groupements prosthétiques ou hème. Pour cela, deux bibliothèques peptidiques hélicoïdales ont été synthétisées. La première, A_i , est constituée d'un peptide long de 15 résidus dont cinq positions ont été variées entre les acides aminés suivants : Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr et Gln. Ces cinq positions ont pour but de lier la partie centrale. La seconde, B_j , est constituée d'un peptide long de 16 résidus dont quatre positions liant la partie centrale ont été variées à l'aide des mêmes acides aminés que pour la bibliothèque A_i . D'autre part, un cinquième résidu, His⁹, est aussi utilisé pour lier la partie centrale. Enfin, dans le but de donner une configuration antiparallèle aux bibliothèques, les peptides provenant de A_i sont liés au châssis via leur partie N-terminale tandis que ceux provenant de B_j sont liés via leur partie C-terminale. Chaque châssis présente deux peptides identiques de chaque bibliothèque ainsi que deux histidines. Pour le criblage de ces banques, les châssis ont été attachés à une membrane en cellulose.

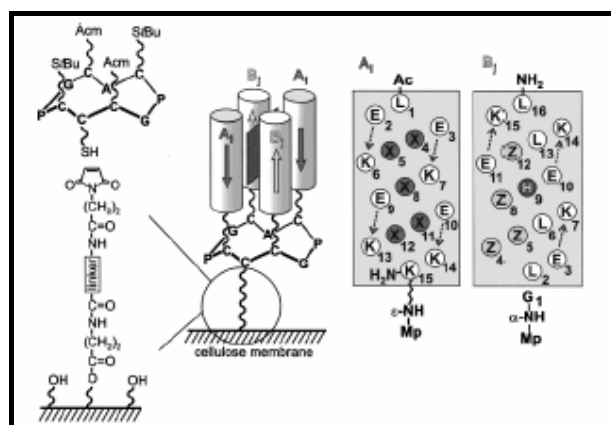


Figure 34 : Représentation des banques hélicoïdales, X_k sont les résidus variés dans la bibliothèque A_i tandis que ceux variés dans la bibliothèque B_j sont nommés Z_i .

C. Mimes d'anticorps

1. Description d'un anticorps

L'unité structurale de base d'un anticorps consiste en quatre chaînes polypeptidiques. Deux chaînes légères (L) identiques (~ 220 acides aminés) et deux chaînes lourdes (H) identiques (~ 440 acides aminés). Ces quatre chaînes sont liées entre elles par une

⁸¹ H. K. Rau, N. DeJonge, W. Haehnel. "Combinatorial synthesis of four-helix bundle hemoproteins for tuning of cofactor properties." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, 39, 250-253.

combinaison de liaisons non covalentes et de ponts disulfures. De plus, chaque chaîne lourde renferme une ou plusieurs chaînes polysaccharidique (cf. Figure 35).

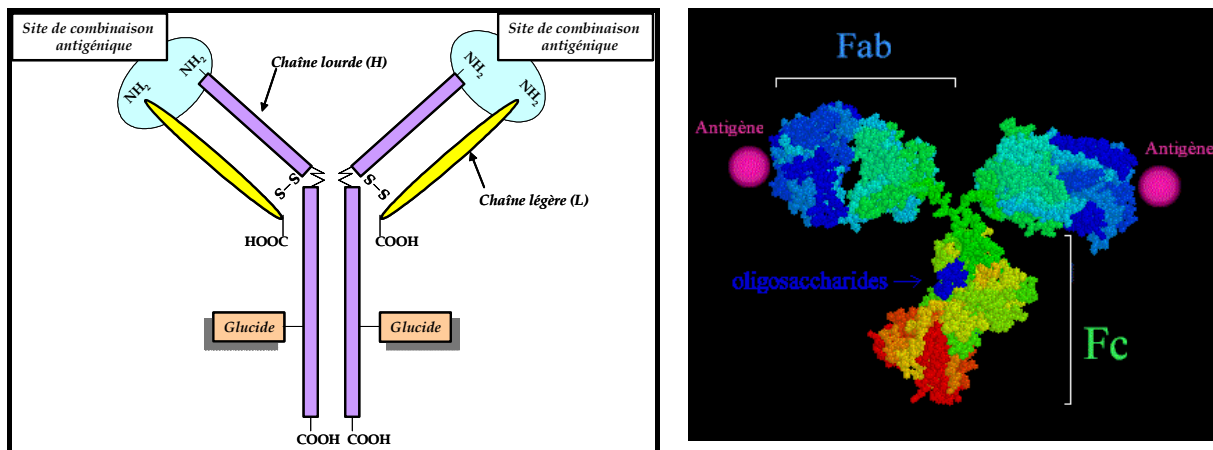


Figure 35 : Descriptions d'un anticorps.

Il y a cinq classes différentes d'anticorps ou immunoglobulines : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, chacune avec sa propre classe de chaîne H, respectivement : α , δ , ϵ , γ et μ conférant à chacune des propriétés biologiques différentes. Ces entités ont une double compétence. Elles sont tout d'abord capables de se fixer spécifiquement et avec une très forte affinité à l'antigène qui en a stimulé la production. D'autre part, les anticorps favorisent l'élimination de l'antigène soit par des cellules spécialisées (mastocytes et phagocytes possédant des récepteurs au F_C) soit *via* l'activation du système du complément.

L'hypervariabilité rencontrée au niveau du site de reconnaissance de l'antigène s'oppose clairement à la relative constance du site impliqué dans la réponse cellulaire (F_C). Quelle que soit la nature de l'antigène, son élimination par les cellules effectrices est dû à leur activation par les régions constantes de l'anticorps.

Cette double compétence relève donc de la coexistence au sein d'une Ig de deux régions de reconnaissance et de liaison à l'antigène dites F_{AB} pour "antigen binding fragment" et d'une région effectrice appelée F_C pour "crystalline fragment".

Les connections entre les coudes β et les feuillets β antiparallèles sont souvent impliquées dans la reconnaissance protéine-protéine. En particulier, elles ont lieu au niveau des six boucles hypervariables des anticorps, parmi lesquelles trois dans les chaînes légères et trois dans les chaînes lourdes.

2. Exemples de mimes sur châssis

J. A. Robinson^[82] a montré que l'on peut mimer les boucles évoquées plus haut en utilisant des peptides cycliques présentant un coude β grâce à l'utilisation d'un châssis dipeptidique D-Pro-L-Pro. Par la suite, il a étendu cette approche à la synthèse de mimes d'anticorps dirigés contre la protéine CS (pour CircumSporozoïte) et empêchant une infection par les sporozoïtes responsables de la malaria^[83]. Lors d'infection, la réponse immunitaire dominante est dirigée contre une région centrale de la protéine CS comprenant un motif Asn-Pro-Asn-Ala qui est répété une quarantaine de fois. J. A. Robinson a ainsi synthétisé un hexapeptide cyclique semi-rigide contenant ce motif qu'il a greffé sur la face supérieure de reconnaissance d'un châssis présentant quatre sites de fixation. Sur la face inférieure du châssis a été accroché un peptide de 19 acides aminés dont la séquence dérive de celle d'une toxine. De cette manière, cette équipe de chercheurs a réalisé un vaccin synthétique.

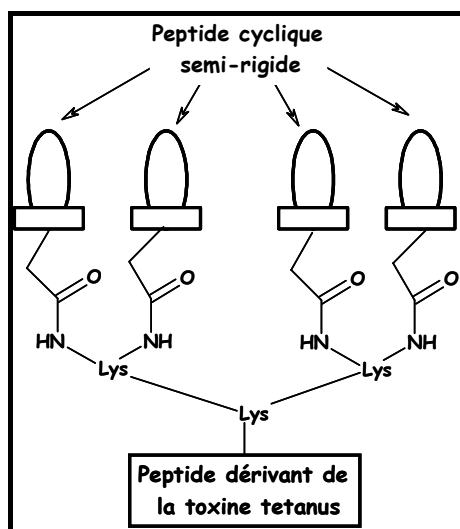


Figure 36 : Représentation schématique du mime d'anticorps synthétisé.

Une approche semblable a été décrite par A. D. Hamilton^[84] via l'utilisation d'un châssis calix[4]arène lié à des unités de peptides cycliques dans le but de mimer les fragments F_{AB} des anticorps (Figure 37). Cette association de molécules confère un arrangement semi-rigide aux boucles peptidiques mimant les boucles hypervariables des anticorps comme le montre la figure ci-dessous.

⁸² M. Favre, K. Moehle, L. Jiang, B. Pfeiffer, J. A. Robinson. "Structural mimicry of canonical conformations in antibody hypervariable loops using cyclic peptides containing a heterochiral diproline template." *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 2679-2685.

⁸³ C. Bisang, L. Jiang, E. Freund, F. Emery, C. Bauch, H. Matile, G. Pluschke, J. A. Robinson. "Synthesis, conformational properties, and immunogenicity of a cyclic template-bound peptide mimetic containing an NPNA motif from the Circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*." *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 7439-7449.

⁸⁴ Y. Hamuro, M. C. Calama, H. S. Park, A. D. Hamilton. "A calixarene with four peptide loops : an antibody mimic for recognition of protein surfaces." *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 2680-2683.

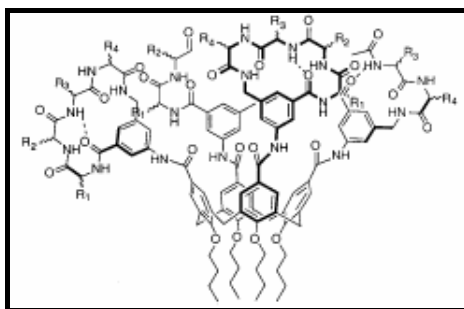


Figure 37 : Structure générale d'un mime d'anticorps comportant un motif calix[4]arène.

L'intérêt de cette approche consiste en la possibilité d'utiliser une large diversité des peptides naturels ou non dans les boucles peptidiques pour mimer une large gamme d'anticorps. D'autre part, ces mimes sont capables de se lier à de larges surfaces ($> 600 \text{ \AA}^2$) et de former différents types de surfaces dus à leur séquence peptidique leur conférant un large champ de cibles éventuelles.

Par ailleurs, W. Dall'Acqua et P. Carter^[85] décrivent la possibilité d'adapter les propriétés pharmacocinétiques des anticorps aux besoins cliniques en modifiant leurs domaines F_C .

D. Mimes et inhibition de récepteurs

La capacité d'une cellule à répondre à un signal chimique extracellulaire précis dépend de protéines spécifiques qui fixent la molécule avec une forte affinité et que l'on définit comme étant des récepteurs. Etant donné la haute spécificité ligand-récepteur, il suffit d'une faible concentration en signal chimique (de l'ordre du nanomolaire) pour qu'il y ait une réponse cellulaire. Il existe un grand nombre de récepteurs parmi lesquels les récepteurs intracellulaires, transmembranaires, extracellulaire, hormonaux etc...

1. Mimes de récepteurs

Un premier exemple est celui de C. Still qui a synthétisé des récepteurs marqués à l'aide d'un colorant. Ces récepteurs lui ont ainsi permis de tester une banque de peptides obtenus de manière combinatoire sur des billes de résine^[86]. Ainsi, lors du test du mélange des ligands potentiels, les billes de résine colorées possèdent-elles à leur surface les composés

⁸⁵ W. Dall'Acqua, P. Carter. "Antibody engineering." *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, 8, 443-450.

⁸⁶ W. C. Still. "Discovery of sequence-selective peptide binding by synthetic receptors using encoded combinatorial libraries." *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 155-163.

liant le récepteur. Il a ensuite étendu cette stratégie à la synthèse de banques de mimes de récepteurs de peptides opioïdes^[87].

A. D. Hamilton a quant à lui étudié une famille de récepteurs synthétiques de l' α -chymotrypsine, enzyme du suc pancréatique^[88,89].

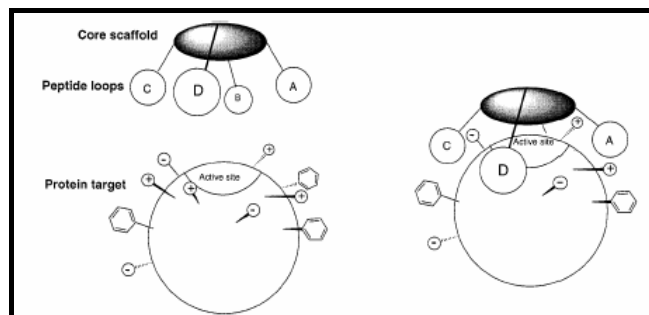


Figure 38 : Mimes synthétiques de l' α -chymotrypsine.

Pour cela, quatre boucles peptidiques identiques ont été fixées sur un châssis calix[4]arène. Dans le but de cibler le voisinage du site actif de l' α -chymotrypsine essentiellement cationique, ils ont synthétisés des boucles peptidiques présentant deux résidus anioniques (GDGD) ou bien un résidu anionique accompagné d'un résidu hydrophobe (GDGY) de façon à ce que ces inhibiteurs établissent des contacts multiples avec les résidus basiques à travers la surface de l'enzyme. Ces interactions hydrophobes et électrostatiques permettent une grande sélectivité et affinité des composés synthétisés (Figure 38).

A cause des difficultés de synthèse ainsi que la tendance à l'agrégation engendrées par les motifs calix[4]arène, ils ont étendu leur étude aux châssis porphyrines. En effet, les porphyrines sont intéressantes de par leur grande taille, leur rigidité ainsi que leurs propriétés photophysiques et ont ainsi été utilisées pour la synthèse de nombreux récepteurs artificiels ou modèles en bioorganique ainsi qu'en bioinorganique^[90]. Dans leurs travaux, A. D. Hamilton *et al.*^[91] décrivent la synthèse de plusieurs tetraphenylporphyrines liant la surface du cytochrome c lié à son groupement prosthétique. La présence de motifs acides et hydrophobes en périphérie ajoutent à la reconnaissance de la surface hydrophobe et cationique entourant ledit groupement prosthétique.

⁸⁷ R. Boyce, G. Li, H. P. Nestler, T. Suenaga, W. C. Still. "Peptidosteroidal receptors for opioid peptides. Sequence-selective binding using a synthetic receptor library." *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 7955-7956.

⁸⁸ H. S. Park, Q. Lin, A. D. Hamilton. "Protein surface recognition by synthetic receptors : a route to novel submicromolar inhibitors for α -chymotrypsin." *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8-13.

⁸⁹ H. S. Park, Q. Lin, A. D. Hamilton. "Modulation of protein-protein interactions by synthetic receptors : design of molecules that disrupt serine protease-proteinaceous inhibitor interaction." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, *99*, 5105-5109.

⁹⁰ H. Ogoshi, T. Mizutani. "Novel approaches to molecular recognition using porphyrins." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, *3*, 736-739.

⁹¹ R. K. Jain, A. D. Hamilton. "Protein surface recognition by synthetic receptors based on a tetraphenylporphyrin scaffold." *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 1721-1723.

Enfin, A. D. Hamilton et son équipe se sont intéressés à la synthèse d'une nouvelle classe de récepteurs anioniques rigides présentant une large cavité centrale^[92]. Trois groupements amide protonés sont tournés vers ladite cavité permettant ainsi au macrocycle de se lier à différents anions avec une bonne sélectivité de taille et de forme. De plus, de par cette cavité, la sélection des ligands n'est pas gênée par les anions ni par la polarité du solvant dans lequel s'effectue l'expérience.

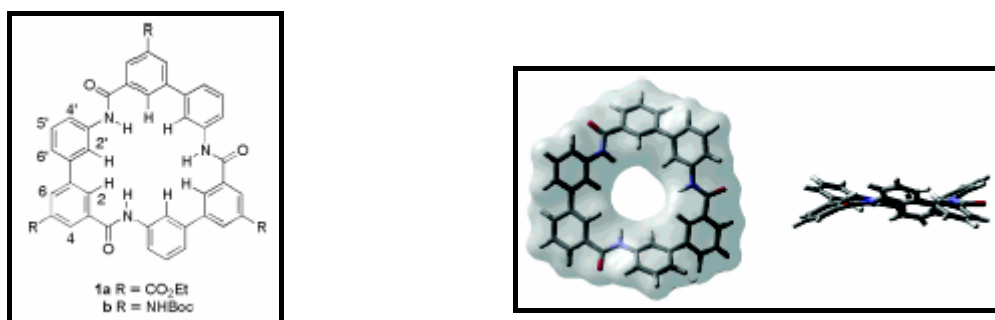


Figure 39 : Structure générale des macrocycles.

2. Ciblage de récepteurs

Dans le but de cibler des récepteurs, un bon point de départ est de se baser sur la structure de leurs ligands naturels spécifiques. En effet, le rapport structure/activité est directement lié au ligand naturel et à ses analogues. On peut ainsi obtenir différents modèles de pharmacophores que l'on peut sélectionner virtuellement puis synthétiser afin de tester leur activité. D'autre part, il est intéressant de rechercher des ligands non peptidiques afin d'éviter les problèmes pharmacocinétiques liés à l'instabilité métabolique des produits aux structures majoritairement peptidiques. Plusieurs approches ont été développées, la plupart mettant en jeu une partie de voie de synthèse combinatoire.

Des chercheurs de chez Merck[®] ont utilisé cette méthode pour trouver des inhibiteurs du récepteur de la somatostatine (hormone impliquée dans la régulation des sécrétions digestives endocrines, exocrines...)^[93]. L'optimisation de peptides dérivés de la somatostatine a conduit à la structure de l'hexapeptide suivant : c[-Pro-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-] comme étant un agoniste de la somatostatine. L'utilisation des chaînes latérales furent utilisées pour rechercher d'autres structures présentant des conformations tridimensionnelles similaires ; un produit possédant une constante d'inhibition de 100 nM pour le récepteur humain sst2 fut trouvé après avoir testé biologiquement seulement 75 produits. Enfin, ce produit étant

⁹² K. Choi, A. D. Hamilton. "Rigid macrocyclic triamides as anion receptors : anion-dependent binding stoichiometries and ¹H chemical shift changes." *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 10241-10249.

⁹³ D. F. Veber in *Peptides, Chemistry and Biology : Proceedings of the 12th American Peptide Symposium* (Eds. : J. A. Smith, J. E. Rivier) ESCOM, Leiden, the Netherlands, pp. 3-14.

composé structurellement de trois parties distinctes, il fut possible d'effectuer la synthèse de différentes bibliothèques de produits qui conduirent à l'obtention d'agonistes très actifs pour le récepteur sst2 ainsi qu'à de bons agonistes de la somatostatine.

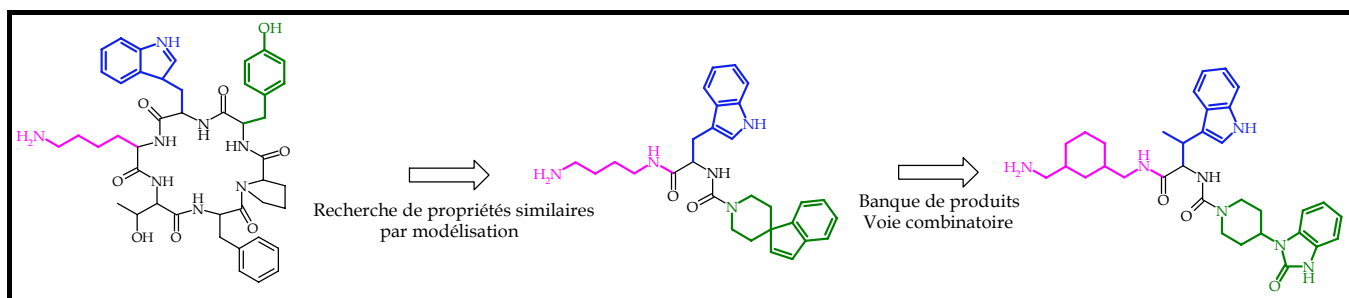


Figure 40 : Méthode de recherche de mimes du récepteur de la somatostatine.

D'autres chercheurs de chez Aventis® ont utilisé une méthode similaire pour l'identification d'antagonistes non peptidiques du récepteur de l'urotensine II (récepteur impliqué dans la régulation de l'homéostasie et de maladies cardiovasculaires)^[94]. Ils ont effectué la synthèse de différents peptides tronqués dérivants de l'urotensine II, peptide cyclique comportant onze résidus. Ceci afin de déterminer la séquence minimale requise pour observer une activité biologique. Le motif Trp-Lys-Trp fut reconnu comme étant le pharmacophore le plus important de la séquence. Ils ont ensuite étudié la conformation spatiale de la séquence par RMN ainsi que de celle d'un analogue comportant un pont disulfure. Les résultats ainsi obtenus ont permis d'établir des modèles de pharmacophores sous forme tridimensionnelle qui furent utilisés pour sélectionner les produits provenant à la fois de la banque obtenue à partir de l'analogue de l'urotensine II ainsi que de celle obtenue à partir de l'urotensine II humaine. Pour la première, un seul produit sur 418 présente une activité biologique tandis que pour la seconde, 2% des produits (10 produits sur 500) présente une activité avec une IC_{50} de 400 nM pour la meilleure touche.

E. Minimisation de protéines

L'essentiel de l'élaboration des médicaments réside en la synthèse d'un très grand nombre de molécules sélectionnées en fonction de leurs capacités à reconnaître et inhiber un récepteur particulier ou à avoir une réponse particulière. Cette approche donne des résultats mais est extrêmement laborieuse dans le sens où un grand nombre de ces molécules n'auront pas l'activité attendue et auront été vainement synthétisées.

⁹⁴ S. Flohr, M.Kurz, E. Kostenis, A. Brkovich, A. Fournier, T. Klabunde. "Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II." *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1799-1805.

La minimisation des protéines consiste à réduire la séquence peptidique d'une hormone ou d'un site actif tout en gardant des constantes d'affinités comparables à celles des protéines naturelles. Ceci dans le but d'être en mesure de synthétiser ces peptides ou polypeptides en laboratoire par la suite afin de les utiliser comme moyen thérapeutique.

D'une façon générale, les domaines protéiques sont considérés comme étant les plus petites entités fonctionnelles présentes au sein des protéines et servent de modules indépendants créant ainsi une grande diversité concernant les interactions protéine-protéine.

Dans ce domaine de recherche, J. A. Wells a montré qu'il était possible de réduire presque de moitié la taille de ces domaines protéiniques, même lorsque les résidus impliqués dans la reconnaissance se trouvent à de fortes distances dans la séquence protéique, impliquant un repliement stable et précis de la protéine^[95].

Ainsi décrit-il la méthode utilisée pour minimiser le domaine Z de la protéine A^[96,97]. Ce domaine est constitué de trois hélices comprenant 59 résidus reconnaissant une partie du domaine F_C des immunoglobulines IgG avec une bonne affinité (~ 10-50 nM). Après des études de mutagenèse dirigée, aux rayons X ainsi qu'en RMN, il est apparu que les résidus de liaison sont portés par les hélices 1 (résidus 7-18) et 2 (résidus 20-38) du domaine protéique. Néanmoins, si l'on retire l'hélice 3 du domaine Z, celui-ci perd sa conformation hélicoïdale et l'affinité de liaison est réduite de l'ordre de 10⁵ fois.

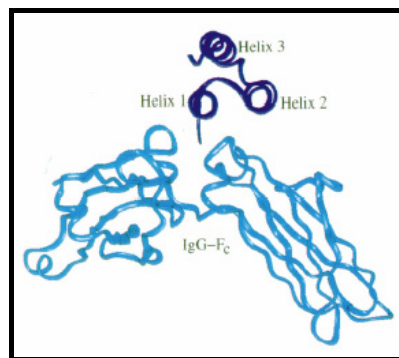


Figure 41 : Représentation du domaine Z de la protéine A (bleu foncé) complexant un fragment d'une IgG (bleu clair).

J. A. Wells et son équipe ont donc entrepris d'optimiser ce peptide en travaillant sur trois régions distinctes : la région hydrophobe des hélices 1 et 2 se liant à l'hélice 3 (l' « exoface ») ; la région de contact entre les hélices 1 et 2 (l' « intraface ») et la région

⁹⁵ B. C. Cunningham, J. A. Wells. "Minimized proteins" *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1997**, 7, 457-462.

⁹⁶ A. C. Braisted, J. A. Wells. "Minimizing a binding domain from protein A" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**, 93, 5688-5692.

⁹⁷ M. A. Starovasnik, A. C. Braisted, J. A. Wells. "Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, 94, 10080-10085.

reconnaissant l'IgG (l'« interface »). Pour chacune de ces régions, des banques peptidiques furent synthétisées en utilisant le « phage display ».

Ainsi, au sein de la première région, quatre résidus furent variés, deux résidus sont restés inchangés tandis que la Leu²⁰ fut modifiée au profit de l'Asp²⁰ et la Phe³¹ au profit de la Lys³¹ (Figure 42-A). Dans la seconde région, cinq résidus furent variés parmi lesquels deux ont été conservés tandis qu'aux résidus Ala¹³, Ile¹⁷ et Leu³⁵ furent préférés les résidus Arg¹³, Ala¹⁷ et Ile³⁵ (Figure 42-B). Enfin, pour la dernière région, cinq banques peptidiques furent synthétisées mutant au total 19 résidus donnant lieu finalement à la modification de cinq résidus : les Lys⁸, Glu⁹, Asn¹², Gln³³ et Lys³⁶ ont été modifiés au profit de Met⁸, Gln⁹, Arg¹², Lys³³ et Arg³⁶ (Figure 42-C).

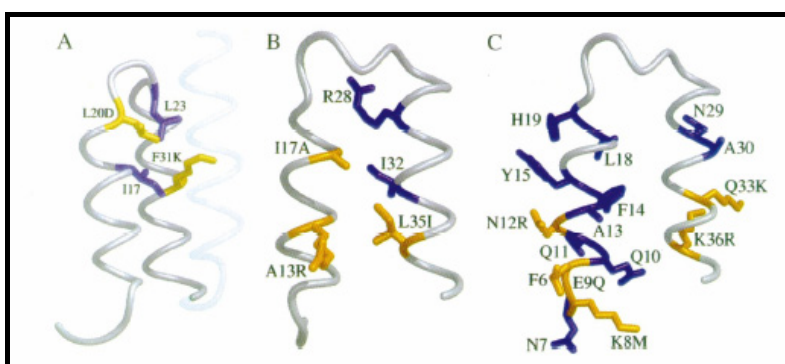


Figure 42 : Représentation des trois régions avec les résidus d'origine (bleu) et modifiés (jaune) ; l'hélice transparente représente l'hélice 3 qui a été éliminée. (A) « exoface » ; (B) « intraface » ; (C) « interface ».

Il est à noter que la sélection des résidus de la banque de l'« intraface » se fait en fonction des résidus sélectionnés dans l'« exoface » et que les résidus sélectionnés finalement parmi les bibliothèques de l'« interface » sont fonction des séquences optimisées obtenues à l'aide des bibliothèques de l'« exoface » et de l'« intraface ». Enfin, la combinaison des séquences des trois régions optimisées a donné un peptide comportant 38 résidus possédant des propriétés comparables à celles du domaine Z de la protéine A et dont la structure RMN est présentée ci-dessous.

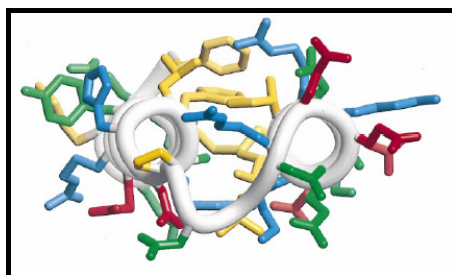


Figure 43 : Représentation RMN de la réduction du domaine Z de la protéine A.

Une autre étude a conduit J. A. Wells à réduire la séquence polypeptidique d'une hormone, l'ANP, impliquée dans la régulation de la pression sanguine ainsi que l'équilibre en sels^[98]. Dans des travaux antérieurs, cette hormone a déjà été mimée par de plus petits peptides, mais ces analogues avaient une affinité pour le récepteur réduite d'au moins 500 fois... J. A. Wells a commencé par déterminer les résidus de l'hormone impliqués dans la reconnaissance avec son récepteur en effectuant une mutagenèse systématique de chacun des 28 résidus que comporte la séquence. Il a donc remplacé chaque résidu par une alanine (ceci mis à part les résidus Cys⁷ et Cys²³ formant un pont disulfure) et a étudié les baisses d'affinité pour le récepteur après chaque mutation. Il en a résulté que sept positions ont montré une baisse d'affinité de facteur supérieur à 10 (Figure 44-Etape1). Parmi les sept résidus impliqués dans la reconnaissance, cinq sont à des positions rapprochées et forment un épitope fonctionnel sur une partie de l'hormone. Ainsi a-t-il poursuivi ses recherches en améliorant cette partie de la séquence. Dans un premier temps, il a modifié la position du pont disulfure (Figure 44-Etape2). Puis, il a optimisé la séquence peptidique à l'intérieur de la boucle ainsi formée en utilisant la méthode du « phage display » (Figure 44-Etape3). Il a ensuite réduit la partie C-terminale de la séquence (Figure 44-Etape4) et a réalisé de nouvelles banques peptidiques pour optimiser le nouveau peptide de 19 résidus. Enfin, il élimina les quatre résidus de la séquence N-terminale pour obtenir un peptide final de 15 résidus (Figure 44-Etape5) présentant une affinité pour le récepteur de seulement six fois plus faible que l'hormone de départ.

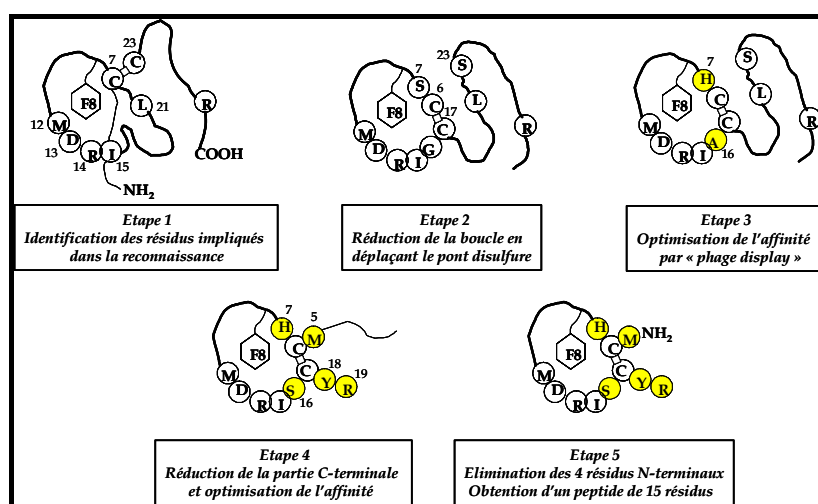


Figure 44 : Représentation de la séquence hormonale au cours des différentes étapes de minimisation.

⁹⁸ B. Li, Y. K. Tom, D. Oare, R. Yen, W. J. Fairbrother, J. A. Wells, B. C. Cunningham. "Minimization of a polypeptide hormone" *Science*, **1995**, 270, 1657-1660.

F. Inhibition d'interactions protéine-protéine par de petites molécules

Les interactions protéine-protéine se font généralement sur une grande surface de l'ordre de 600-800 Å². Néanmoins, et contrairement aux idées reçues, des interactions de haute affinité impliquant peu de résidus sont préférables à un grand nombre de faibles interactions. Par exemple, dans le cas de l'hormone hGH et de son récepteur, seulement 8 résidus sur 31 pour l'hormone et 9 résidus sur 33 pour le récepteur sont impliqués dans l'essentiel de la reconnaissance entre les deux surfaces. C'est la raison pour laquelle plusieurs équipes de recherche se sont tournées vers la création de petites molécules reconnaissant les interfaces protéine-protéine et inhibant leurs interactions. Dans ce but, différentes approches ont été développées. En effet, plusieurs tests ont été mis au point afin de sélectionner les meilleurs ligands pour des cibles données : utilisation de protéines marquées, test d'activité enzymatique plus ou moins atténuée, test de fluorescence plus ou moins élevée^[99]...

Par exemple, l'équipe d'A. D. Hamilton^[100] s'est intéressée aux interactions entre une protéine et son ligand à la conformation hélicoïdale. A cause de la périodicité de l'hélice, les résidus impliqués dans la reconnaissance se trouvent sur une longue séquence peptidique et l'élaboration de mimes paraît laborieuse. Leur approche innovante réside en la synthèse d'un motif terphenyl trisubstitué. La forme hélicoïdale du ligand est recrée par les angles séparant deux groupements phenyl tandis que les chaînes latérales sont approximées par des groupements placés en *ortho* sur les cycles.

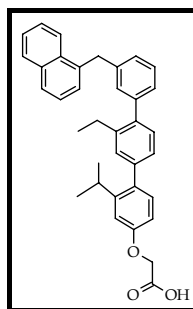


Figure 45 : Structure du motif terphenyl trisubstitué.

M. R. Arkin et *coll.* ont quant à eux tourné leurs recherches vers l'optimisation d'une petite molécule reconnaissant l'interleukine IL-2^[101]. Celle-ci joue un rôle important dans la croissance des cellules T activées. Elle stimule leur prolifération en se liant à un récepteur

⁹⁹ P. L. Toogood. "Inhibition of protein-protein association by small molecules : approaches and progress" *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1543-1558.

¹⁰⁰ B. P. Orner, J. T. Ernst, A. D. Hamilton. . "Toward proteomimetics : terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an α -helix" *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5382-5383.

¹⁰¹ M. R. Arkin, M. Randal, W. L. DeLano, J. Hyde, T. N. Luong, J. D. Oslob, D. R. Raphael, L. Taylor, J. Wang, R. S. McDowell, J. A. Wells, A. C. Braisted. "Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, *100*, 1603-1608.

hétérotrimérique présent à la surface des cellules T avec une affinité de l'ordre du picomolaire. Cette petite molécule, nommée arbitrairement @, fut tout d'abord découverte de façon empirique par l'équipe de recherche de G. Ju^[102].

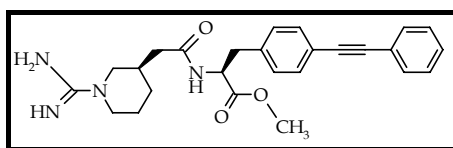


Figure 46 : Structure de la molécule @.

A partir de ces résultats, l'équipe de A. C. Braisted a réalisé des comparaisons de conformations de la protéine en fonction de la position de la molécule @ dans le site de liaison.

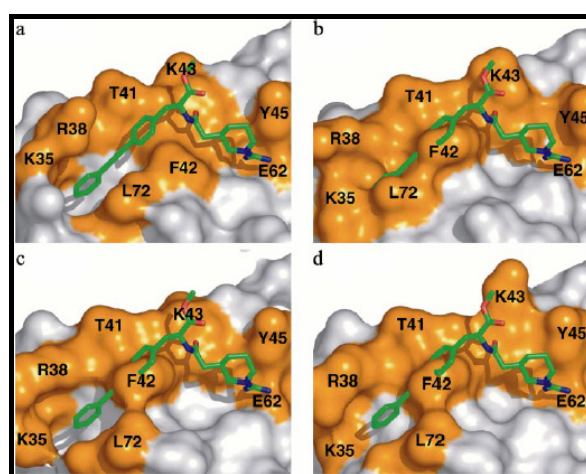


Figure 47 : Représentation aux rayons X de la conformation de IL-2 en fonction de la position de @. a : bon positionnement de @ dans le site de fixation de IL-2 ; b, c, d : mauvais positionnements et différentes structures du site de fixation de IL-2.

Il apparaît alors que la surface de IL-2 est dynamique et capable d'adopter de multiples conformations. De plus, pour se lier à la molécule @, la surface de IL-2 présente des canaux hydrophobes qui n'étaient pas apparents sur les conformations de IL-2 non complexée^[103].

Un dernier exemple réside en l'étude réalisée par J. A. Wells et son équipe^[104]. Ils se sont intéressés à un fragment constant de l'immunoglobuline G. Ce fragment charnière interagit avec au moins quatre protéines naturelles différentes se liant à un site commun situé

¹⁰² J. W. Tilley, L. Chen, D. C. Fry, S. D. Emerson, G. D. Powers, D. Biondi, T. Varnell, R. Trilles, R. Guthrie, F. Mennona, G. Kaplan, R. A. LeMathieu, M. Carson, R.-J. Han, C.-M. Liu, R. Palermo, G. Ju. "Identification of a small molecule inhibitor of the IL-2/IL-2R α receptor interaction which binds to IL-2" *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 7589-7590.

¹⁰³ C. D. Thanos, M. Randal, J. A. Wells. "Potent small-molecule binding to a dynamic hot spot on IL-2" *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15280-15281.

¹⁰⁴ W. L. DeLano, M. H. Ultsch, A. M. de Vos, J. A. Wells. "Convergent solutions to binding at a protein-protein interface" *Science*, **2000**, *287*, 1279-1283.

entre les domaines C_{H2} et C_{H3}. Ils se sont alors interrogés sur la raison pour laquelle tant de protéines reconnaissent cet endroit précis : est-il situé à une position optimale pour les fonctions biologiques ou bien possède-t-il des propriétés physiques intrinsèques lui permettant d'interagir avec de multiples protéines ? C'est ainsi qu'ils ont élaboré une banque de peptides cycliques composée de 4×10^9 peptides de la forme X_iCX_jCX_k (où $i+j+k = 18$) exprimés à la surface de bactériophages. A la suite de plusieurs cycles de sélection, deux peptides ont été trouvés, Fc-I et Fc-II, liant avec plus d'affinité la surface du fragment F_C et possédant une séquence interne commune. En particulier, ces peptides étaient de bons compétiteurs du domaine Z de la protéine A. En d'autres termes, ces peptides se liaient à une partie de la surface du fragment F_C coïncidant avec la surface de liaison du domaine Z avec la protéine A. C'est la raison pour laquelle six nouvelles bibliothèques ont été exprimées à la surface de phages afin de muter les 18 positions de peptides cycliques. Il en a résulté la découverte d'un peptide constitué de 13 résidus inhibant l'interaction de la protéine A avec le fragment F_C étudié. Ces résultats ont poussé l'équipe à comparer les structures du peptides et des protéines liant le fragment F_C. Il apparaît alors qu'ils n'ont aucune similarités structurales mais que le peptide est capable de mimer entre deux et six interactions polaires, un grand nombre de liaisons apolaires, des interactions charge-charge et des liaisons hydrogène. Ainsi ont-ils pu démontrer d'une part que le site de liaison du fragment F_C est adaptable, exposé, apolaire, facilitant donc les interactions avec une grande variété de molécules distinctes. D'autre part, le peptide sélectionné peut cibler ce site de liaison en mimant des interactions spécifiques du domaine de liaison naturel tout en présentant des groupements d'interaction de nature différente.

En résumé...

Depuis ces dernières années, divers types de mimes de surfaces d'interactions protéine-protéine furent développés par les chercheurs.

Les premiers inhibiteurs d'interactions furent obtenus à partir de produits naturels, extraits des plantes comme le Taxol ou la Cyclosporine qui agissent sur certaines cibles protéiques telles que la tubuline ou les cellules T du système immunitaire.

Les avancées dans les domaines des protéines (structures, conformations...) conduisirent les recherches vers la formation de mimes de protéines. Par la technique « de novo », des mimes protéiques purent ainsi être créés en ne prenant plus en compte que les parties essentielles pour la reconnaissance entre les protéines : les hélices α , les feuillets β et leurs parties hydrophobes centrales.

Parallèlement, d'autres études conduisirent à la minimisation directe de protéines à partir de leurs formes naturelles. Par la technique de mutagenèse dirigée, les acides aminés essentiels à la reconnaissance purent être identifiés. Ainsi, seules les parties fondamentales des protéines furent recrées pour obtenir des interactions de haute affinité.

Plus récemment, la notion de châssis s'est développée. Elle se définit par un assemblage d'unités sur une plateforme dans un arrangement spatial spécifique induisant une stabilisation entre ces unités via des interactions intramoléculaires. Par cette technique, les chercheurs purent former leurs composés mimes sur un squelette leur conférant une rigidité et une structure de base. L'assemblage de diverses molécules à ces gabarits a permis des reconnaissances de haute affinité avec des cibles de différentes natures (anticorps, récepteurs, enzymes...).

Ici encore notre approche se place à l'interface entre les différentes stratégies décrites plus haut. Notre technique de synthèse est l'assemblage combinatoire de différentes séquences peptidiques sur un châssis RAFT. Par cette méthode, nous pensons réaliser à la fois des mimes de protéines (récepteurs ou anticorps) mais aussi des mimes de ligands ciblant des hormones ou visant à l'inhibition enzymatique.

Notre objectif est de former des surfaces d'interactions pouvant mener à la liaison de nos composés dans les sites d'interaction ou dans leur voisinage pour en bloquer l'accès au ligand. L'effet obtenu sera le même que si nous avons synthétisé des molécules dirigées spécifiquement vers la cible choisie, mais notre approche permet de travailler sur un plus grand nombre de cibles.

IV. Le projet de recherche

Comme nous l'avons évoqué dans les paragraphes précédents, ce projet d'étude s'inscrit à l'interface des différentes approches combinatoires décrites plus haut ainsi que des techniques de synthèses de mimes de surface.

En effet, notre approche de synthèse fut à la fois dirigée et combinatoire. Nous avons tout d'abord commencé par choisir les séquences peptidiques des huit substituants avec lesquels nous souhaitions par la suite former des mimes de surface. C'est seulement ensuite que nous avons utilisé la technique d'assemblage combinatoire sur un châssis peptidique que nous avons préalablement choisi et synthétisé. Cette approche nous a donc permis de bénéficier à la fois de la rapidité de la technique de chimie combinatoire qui permet d'explorer toutes les possibilités d'assemblage dans un temps restreint et de garder le contrôle des séquences de départ. Celles-ci furent assemblées de manière classique pour ne pas avoir trop de diversités dans les produits finaux ni de difficulté à les identifier.

Par ailleurs, notre approche de synthèse de mimes de surface est nouvelle dans le sens où elle est extrêmement adaptable puisque les produits peuvent reconnaître différentes surfaces. Nous ne cibons plus un site actif, son voisinage ou bien les ligands d'une protéine de façon précise comme dans les exemples cités plus haut mais plutôt une surface sur laquelle nous pensons reconnaître plusieurs points d'ancrage qu'ils soient regroupés ou dispersés. De cette façon, nous pensons pouvoir inhiber de manière stérique certaines interactions protéine-protéine par reconnaissance d'un site actif, de son voisinage, de certains acides aminés de plusieurs boucles extracellulaires de récepteurs ou encore la surface externe de deux protéines en interaction (cf. Figure 48).

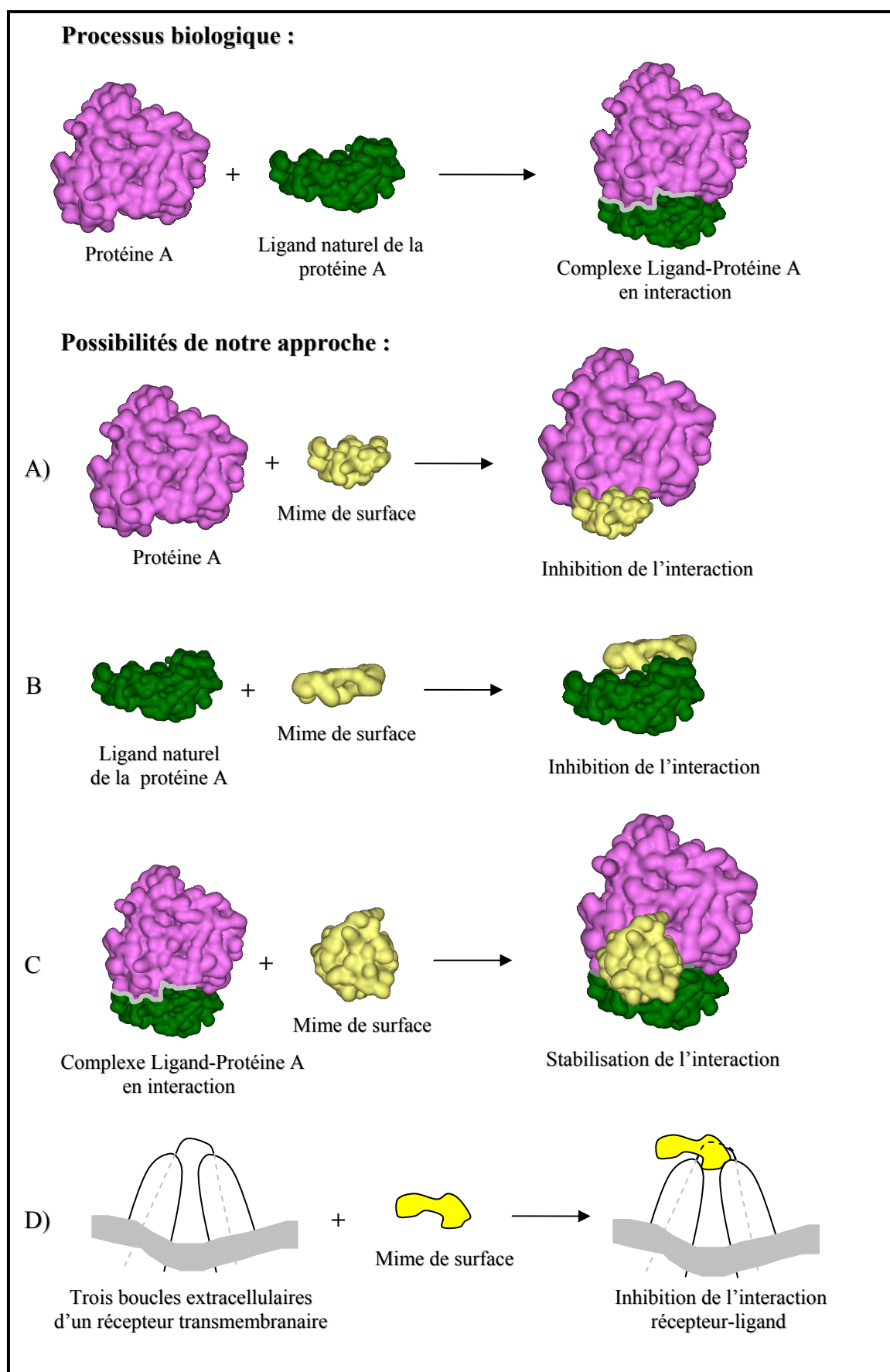


Figure 48 : Différents modes d'action de nos mimes de surface avec notre approche.

A. Choix de la matrice RAFT

Il y a plusieurs raisons pour lesquelles nous avons choisi d'utiliser ce gabarit. Tout d'abord parce qu'il est composé d'une séquence décapeptidique dont la synthèse au laboratoire est bien au point chimiquement.

D'autre part, parce que ce châssis est facilement modulable. Comme on le verra par la suite (Chapitre I), on peut distinguer jusqu'à deux surfaces d'ancrage sur les matrices RAFT grâce à l'orientation des chaînes latérales des lysines. Il est possible de modifier le squelette peptidique en fonction de l'effet escompté. Ainsi est-il possible de créer uniquement une surface d'interactions en n'adressant qu'une face de la matrice ou bien d'utiliser les deux faces de la matrice en fonctionnalisant également la face inférieure avec des molécules marquées (colorant, agent fluorescent, agent d'ancrage comme la biotine) ou pour vectoriser des drogues (comme le peptide apoptotique (KLAKLAK)₂).

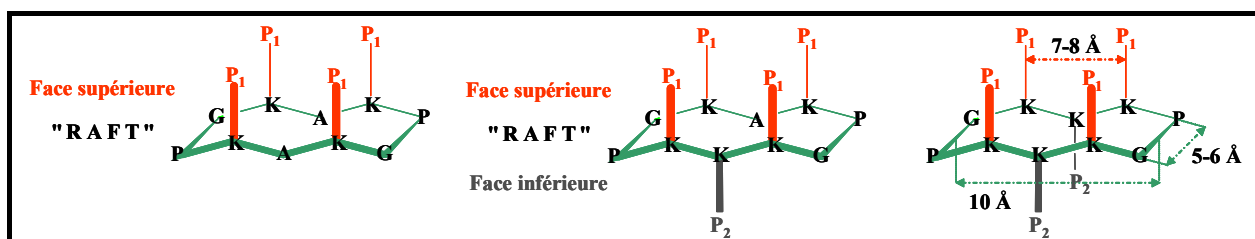


Figure 49 : Représentations schématiques des matrices RAFT.

Par ailleurs, nous avons choisi d'utiliser un lien chimiosélectif, le lien éther d'oxime, pour greffer différentes séquences peptidiques sur le RAFT. En effet, cette méthode, qui est utilisée depuis plusieurs années au laboratoire, constitue un avantage synthétique dans cette approche. Elle permet d'assembler différentes molécules, sans présence de groupements protecteurs ou de réactifs supplémentaires, nous permettant d'envisager l'utilisation d'une méthode combinatoire.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'idée de notre approche est de créer une surface par juxtaposition de « petites surfaces » dans le ciblage de surfaces discontinues. Cette reconnaissance de surfaces discontinues se retrouve dans les processus biologiques d'interactions protéine-protéine puisque les interfaces sont dépendantes du repliement des protéines.

Au sein de notre projet de recherche, ces « petites surfaces » seront formées par différents « blocs d'assemblages » que nous grefferons sur les quatre sites d'ancrage de la matrice.

Dans notre objectif d'obtenir des mimes de surfaces complémentaires aux surfaces cibles, nous varierons ces « blocs d'assemblages ». Ils pourront être formés de différentes séquences peptidiques dans un premier temps puis nous varierons également la nature chimique de ces blocs en utilisant des motifs saccharidiques, des hétérocycles ou des oligonucléotides. Afin de construire ces surfaces au plus vite, nous utiliserons une stratégie combinatoire étant donné qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode type et à cause du fait que ces surfaces d'interaction sont encore difficiles à caractériser. Par cette méthode, il est donc possible de prévoir plusieurs solutions, la formation de différents types de mimes de surfaces pour une même cible étant donné que la nature chimique des éléments présentés par le RAFT importe peu au contraire de leurs propriétés de complémentarité.

En nous basant sur le savoir-faire du laboratoire concernant l'utilisation de la formation du lien oxime, la synthèse du RAFT ainsi que la multiprésentation en sa surface, notre projet d'étude nous a semblé très réalisable.

Néanmoins, ceci constitue un nouvel axe de recherche au sein du laboratoire. En effet, jusqu'à présent, seuls des assemblages simultanés de mêmes substituants (peptides ou sucres) ont été réalisés dans le but d'augmenter l'affinité et la sélectivité de ces composés grâce à des interactions multivalentes. Notre approche n'est plus vraiment d'utiliser ces interactions multivalentes mais plutôt l'assemblage de différents peptides sur un même gabarit pour former de nouveaux mimes de surfaces, stabilisés entre eux par des interactions intramoléculaires et d'accéder ainsi à de nouvelles interfaces.

La matrice que nous utilisons semble donc être relativement bien adaptée à notre approche et laisse envisager des perspectives variées quant aux applications qu'elle pourrait nous apporter : obtention de vaccins synthétiques, de sondes pour la détection d'anomalies et de vecteur pour le traitement thérapeutique comme le résume la Figure 50.

A partir des acquis présentés plus haut, notre projet de recherche se base sur plusieurs objectifs que nous nous sommes par la suite efforcés d'atteindre, c'est ce que présente le paragraphe suivant.

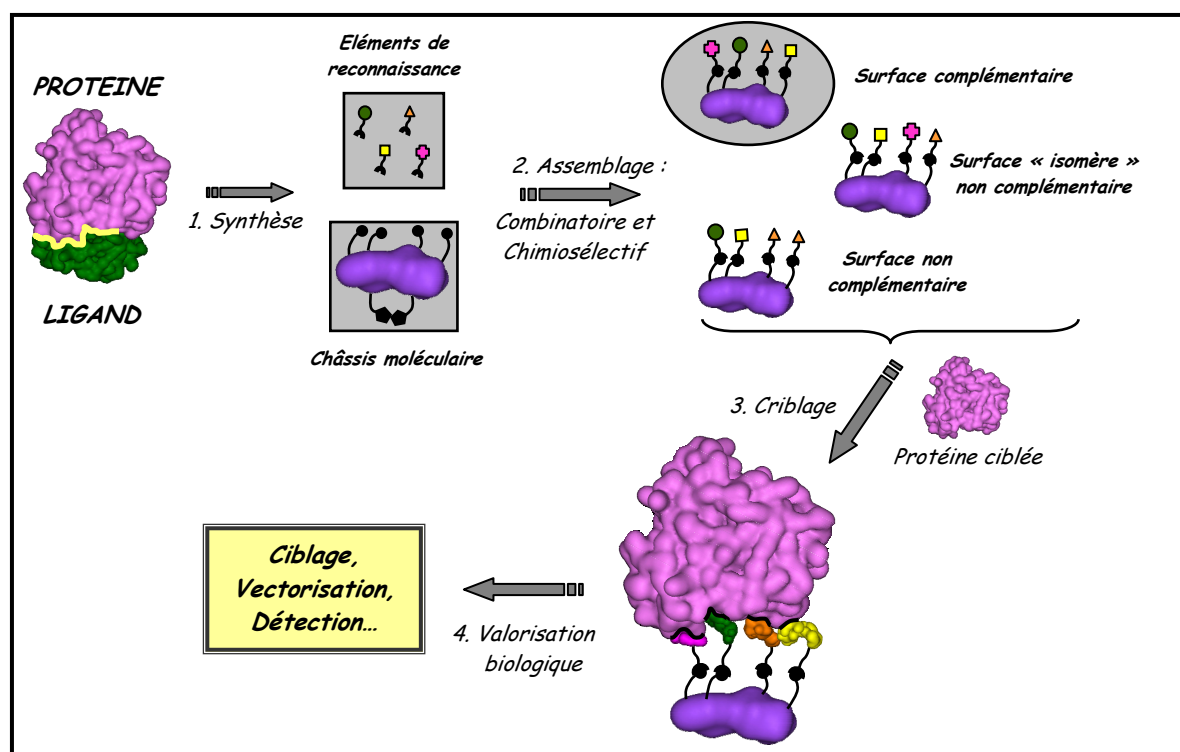


Figure 50 : Principe de l'assemblage combinatoire de surfaces sur le châssis RAFT.

B. Objectifs de notre projet de recherche

Le premier de nos objectifs dans ce projet de recherche est de valider notre approche d'assemblage combinatoire. Comme nous l'avons dit plus haut, cela n'a jamais été réalisé auparavant au sein de notre laboratoire. Il nous faut donc tout d'abord évaluer la formation des banques de produits par la création d'un lien oxime. Ce dernier devra être obtenu de la même manière, quelle que soit le substituant que l'on greffe à la matrice. Dans notre cas, le substituant est uniquement de nature peptidique et les banques de produits obtenues devront suivre la distribution statistique attendue ce qui nous permettrait de penser qu'il n'y a pas de différence de réactivité des substituants vis-à-vis du RAFT et que les banques ne sont pas biaisées. A terme, il sera envisageable d'appliquer cette méthode de formation de banques de produits entre des RAFTs et d'autres types de composés comme les sucres, les oligonucléotides ou des hétérocycles.

Une fois les banques de composés obtenues, il nous faudra évaluer les méthodes d'analyses des mélanges que nous avons à disposition à savoir majoritairement l'analyse CLHP ainsi que l'analyse par spectrométrie de masse en ionisation par injection directe ou LC-MS. Etant donné que nous réaliserons des caractérisations de produits avec des mélanges complexes, il nous faudra impérativement améliorer la résolution de nos banques de composés avant de les analyser.

Une fois que la synthèse et l'analyse des banques auront été mises au point, il nous faudra valider la pertinence de notre approche par des évaluations biologiques sur une voire plusieurs cibles accessibles. Pour cela, il nous faudra mettre au point une technique de déconvolution des banques afin de pouvoir évaluer voire identifier les produits qui auront une activité. Dans ce but, nous avons pensé à la synthèse d'une banque « mère » contenant l'ensemble des produits qu'il est possible d'obtenir et de ses sous-bibliothèques. La banque « mère » résulte de l'assemblage combinatoire du RAFT avec quatre substituants peptidiques différents, c'est-à-dire ici de tous les substituants. Elle contient donc à la fois des matrices présentant quatre ligands différents mais aussi tous les sous-ensembles que l'on peut synthétiser indépendamment avec trois, deux et un ligand. Par cette méthode, on synthétise au sein des sous-bibliothèques tous les produits constituant la banque « mère » mis à part les matrices présentant quatre substituants différents.

A présent, si l'on teste la banque « mère » face à une cible, nous aurons des premières indications quant à l'activité de nos conjugués sur la cible. Pour identifier ces produits, il nous faut effectuer le test des sous-ensembles constituant la banque « mère ». En fonction des résultats obtenus à l'issue du test des sous-ensembles à trois ligands, il existe différentes interprétations possibles :

⇒ Aucune des banques n'est positive :

Il n'y a pas de produit actif dans les sous-ensembles formant la banque « mère », on en conclut donc que ***les produits ayant une activité sur la cible sont les matrices présentant quatre substituants différents du type RAFT([a],[b],[c],[d]).***

⇒ Seule une banque à trois ligands est positive :

Le ou les produits actifs sont uniquement contenus dans cette banque et dans aucune autre. Ainsi, comme pour le cas précédent, ***les matrices ayant une activité sont celles présentant ces trois substituants différents du type RAFT([a],[b],[c]).***

⇒ Deux banques à trois ligands sont actives :

Il existe une intersection entre ces deux banques. Par exemple, elles sont du type RAFT([a],[b],[c]) et RAFT([a],[c],[d]), ***l'intersection est donc un sous-ensemble à deux ligands du type RAFT([a],[c]) qu'il faudra tester.*** Il n'est pas nécessaire de tester les quatre autres sous-ensembles car ils sont prévus pour ne pas être actifs. De la même façon, il ne sera pas nécessaire de tester les deux matrices RAFT([a]₄) et RAFT([c]₄) car elles sont présentes au sein d'autres mélanges non actifs, RAFT([a],[b],[d]) et RAFT([b],[c],[d]). La Figure 51 représente cet exemple.

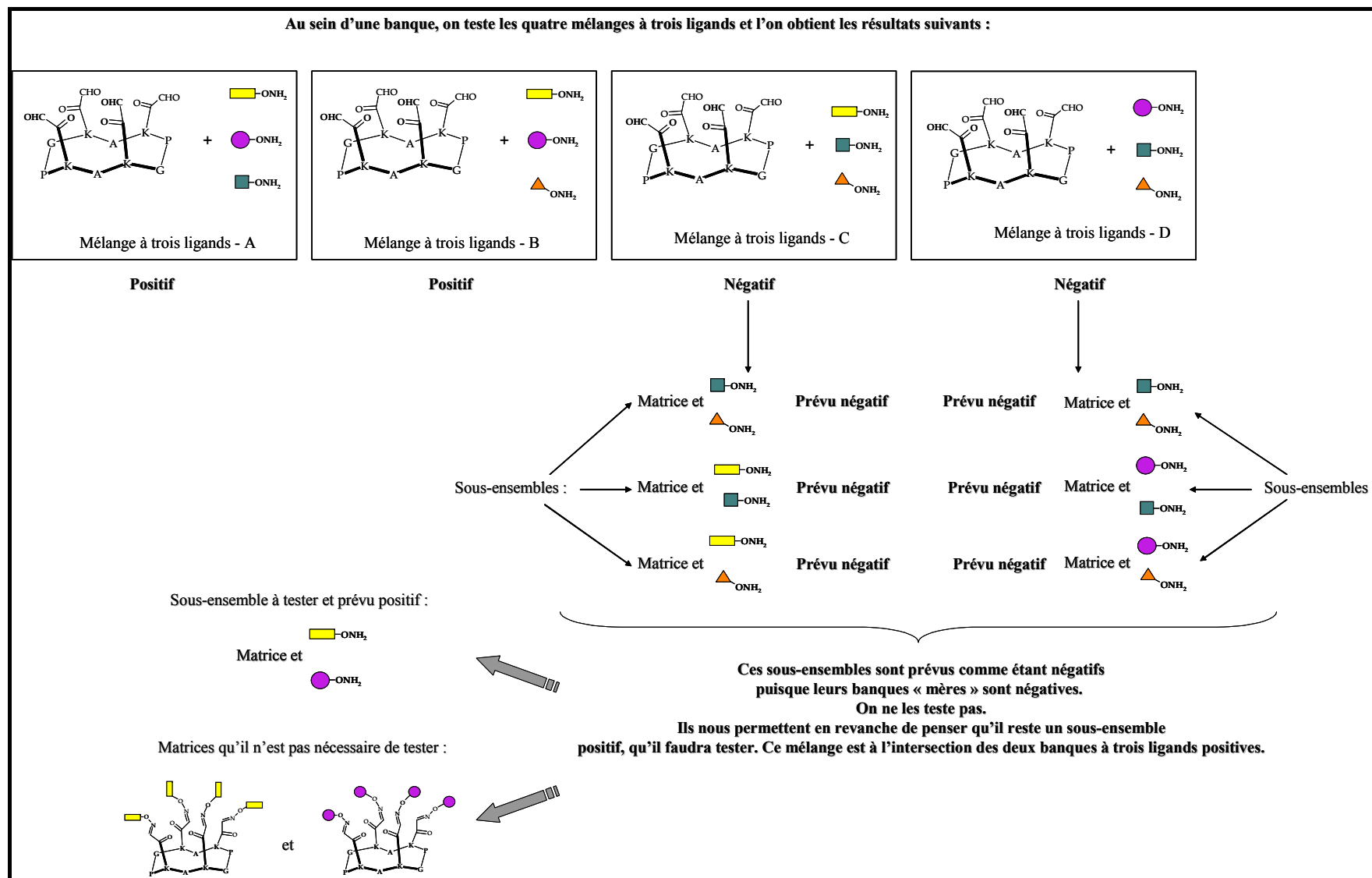


Figure 51 : Exemple fictif de déconvolution.

⇒ Trois banques à trois ligands sont actives :

Il existe cette fois trois intersections entre les banques. Si elles sont du type RAFT([a],[b],[c]), RAFT([a],[b],[d]) et RAFT([a],[c],[d]), **les intersections seront du type RAFT([a],[b]), RAFT([a],[c]) et RAFT([a],[d]). Il faudra donc tester ces trois sous-éléments ainsi que la matrice RAFT([a]₄)**, car elle est présente au sein de ces six sous-bibliothèques et absente de la bibliothèque RAFT([b],[c],[d]) qui a été observée comme étant inactive. La tendance observée ici est qu'il semble que a soit prépondérant.

⇒ Quatre banques à trois ligands sont actives :

Dans ce cas, il faudra **tester tous les sous-ensembles à deux substituants** et chercher à ce niveau des intersections communes entre les banques actives.

D'une manière générale, il faut procéder par ordre d'importance en quantité de substituants. On teste tout d'abord la banque « mère » puis, si celle-ci est active, on testera les quatre sous-éléments à trois ligands. En fonction des résultats observés, on ne testera que quelques sous-bibliothèques à deux ligands et *in fine*, s'il y a un grand nombre de mélanges actifs, on testera les matrices présentant quatre fois le même motif.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de l'ACI 2003 « Molécules et Cibles Thérapeutiques » pour laquelle une cible thérapeutique a été choisie à savoir le domaine SH2 de la protéine Grb2. Elle constituera donc l'une des cibles sur laquelle nous évaluerons nos molécules *via* un test ELISA qui aura été mis au point par un autre laboratoire.

CHAPITRE I

-

LE CHASSIS RAFT ET LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

I. Le châssis RAFT et les liaisons chimiosélectives

A. Le châssis RAFT

1. Travaux antérieurs

L'origine des cyclodécapeptides dénommés « RAFT » (Regioselectively Addressable Functionalized Template) date de 1989. Cet outil fut introduit par M. Mutter et *al.*^[105,106] qui s'intéressait alors à la construction de molécules d'architecture réduite, capables de mimer les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines.

L'activité d'une protéine est principalement contrôlée par sa structure tridimensionnelle. L'enchaînement des motifs structuraux comme les hélices α , les coudes ou les feuillets β , définit les structures tertiaires et quaternaires de la protéine lui conférant alors la conformation adéquate pour son activité. Une des principales difficultés dans la conception de structures minimisées mimant les protéines est de conserver la conformation des motifs impliqués dans les interactions. Dans ce contexte, M. Mutter a développé un nouveau concept désigné par l'acronyme « TASP » (Template Assembled Synthetic Protein) utilisant une matrice sur laquelle des éléments sont greffés et peuvent se stabiliser mutuellement. Cette matrice fut élaborée à partir de la structure cyclique de la gramicidine S, isolée en 1944 (Figure 52). C'est un antibactérien et antifongique produit par une lignée de *Bacillus brevis*. Ce cyclodécapeptide était soluble dans l'alcool mais pratiquement insoluble dans l'eau et fut donc optimisé par la suite.

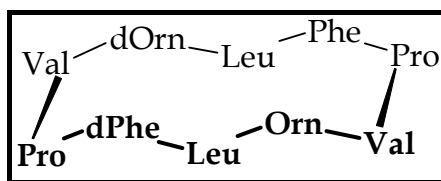


Figure 52. : Structure de la gramicidine S.

Dans cette approche, les motifs structuraux ne sont plus reliés linéairement comme dans la structure protéique primaire parente mais se trouvent rapprochés dans l'espace artificiellement une fois fixés orthogonalement à la matrice. La stabilisation entre les différents motifs, obtenue par coopération intramoléculaire sur le gabarit, permet alors de

¹⁰⁵ M. Mutter, S. Vuilleumier. "A chemical approach to protein design – Template-assembled synthetic proteins (TASP)." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 535-554.

¹⁰⁶ G. Tuscherer, P. Dumy, M. Mutter. "Protein De Novo design." *Chimia.*, **1996**, 50, 644-648.

s'affranchir en partie des problèmes liés au repliement des protéines. Ainsi, l'aptitude du produit obtenu à mimer les protéines sera fonction du nombre, du type, de la conformation spatiale ainsi que des interactions intramoléculaires des différents peptides greffés sur le châssis comme le montre la Figure 53.

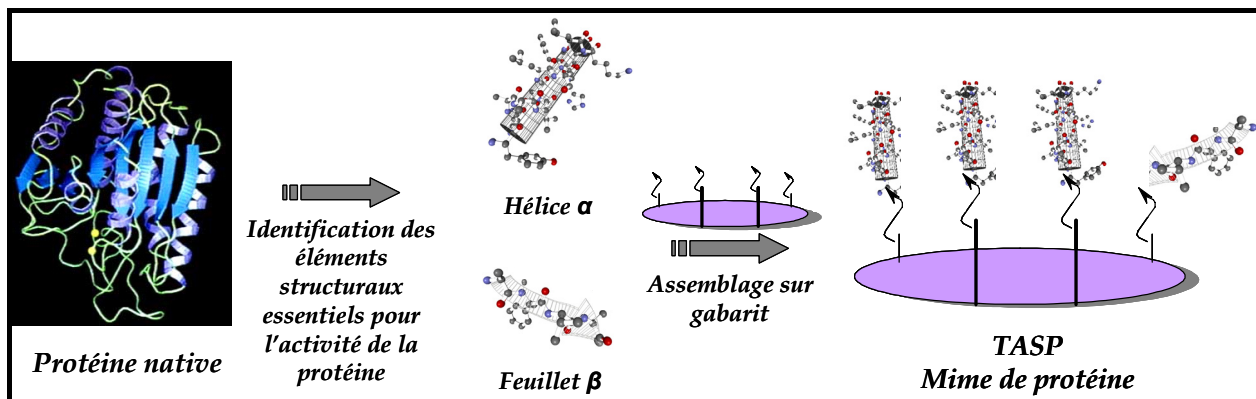


Figure 53 : Représentation schématique de l'élaboration d'un TASP.

2. Description des RAFTs

a. Structure

Le squelette des châssis RAFTs est formé d'un cyclodécapéptide. Il est important de noter que l'analyse RMN ($^1\text{H} - 2\text{D}$), confirmée par des structures cristallines des gabarits observées aux rayons X^[107], a révélé que le cyclopeptide adopte une conformation présentant deux feuillets β antiparallèles. Ces feuillets β sont entourés de deux coudes β , centrés aux résidus -Pro-Gly- de série L, comme le montre la Figure 54. D'autre part, ces feuillets β antiparallèles peuvent être formés par différentes séquences, comme -Lys-Ala-Lys- ou Lys-Lys-Lys-.

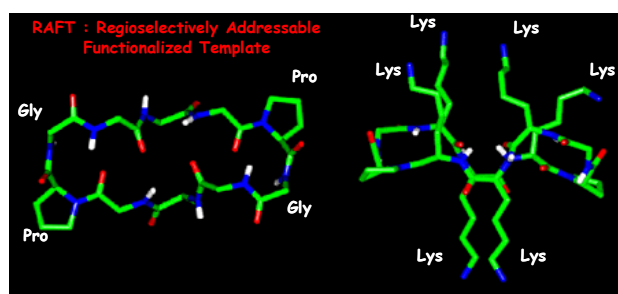
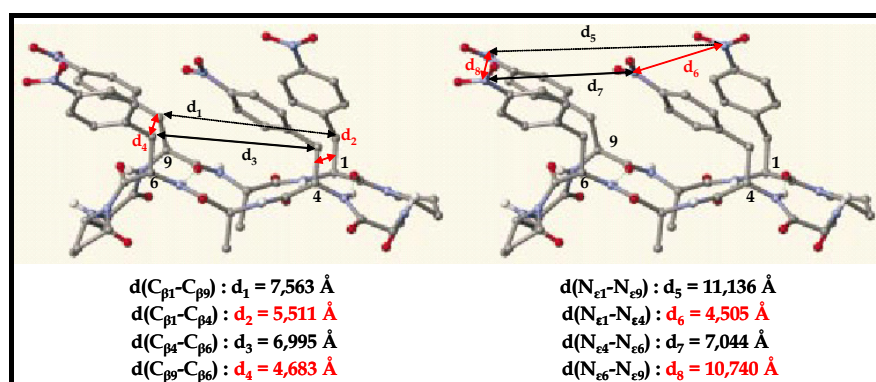


Figure 54 : Représentation aux rayons X de RAFTs.

¹⁰⁷ P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula, M. Mutter. "Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates : an NMR and restrained molecular dynamics investigation." *Biopolymers*, 1996, 39, 297-308.

D'autre part, des études de diffractions aux rayons X, réalisées sur un gabarit de type $c[-p-G-F(p-NO_2)-A-F(p-NO_2)-]_2$, ont permis d'obtenir les paramètres de taille du châssis^[108]. Pour cela, les auteurs ont choisi un gabarit présentant quatre résidus *para*-nitrophenylalanine afin d'obtenir des cristaux plus facilement. La chaîne latérale d'une phénylalanine étant peu flexible, les distances ainsi mesurées seront plus représentatives que s'ils avaient réalisé l'expérience avec des résidus lysine (cf. Figure 55). En plus de ces paramètres, les auteurs ont pu accéder à l'observation de liaisons hydrogènes N-H...O=C intramoléculaires stabilisant ainsi la conformation antiparallèle de la matrice.



**Figure 55 : Représentation des distances caractérisant un châssis RAFT de type :
 $c[-p-G-F(p-NO_2)-A-F(p-NO_2)-]_2$.**

Grâce à leur séquence conformationnelle stable (sur une échelle de temps, les chaînes latérales des acides aminés gardent globalement toujours la même orientation), les châssis RAFT ont la propriété de posséder deux faces d'adressage distinctes. En effet, les chaînes latérales des six résidus lysines de la partie centrale se trouvent orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle. Les quatre résidus lysine encadrant les coudes Pro-Gly- ont leur chaîne latérale qui pointe du même côté du cycle (face supérieure du RAFT) tandis que les résidus centraux ont leur chaîne latérale pointant vers le côté opposé (face inférieure) comme le montre bien la représentation droite de la Figure 54. Les RAFTs peuvent donc présenter deux faces d'adressage et jusqu'à six sites d'ancrage de motifs structuraux (ϵ NH₂ des chaînes latérales des résidus lysine). Il est donc possible de greffer différentes molécules en contrôlant exactement leur position les unes par rapport aux autres ainsi que sur les faces du gabarit. La synthèse de tels châssis est ainsi extrêmement modulable comme nous allons le voir par la suite.

¹⁰⁸ S. Peluso, T. Ruckle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma. . "Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design." *ChemBioChem*, **2001**, 2, 432-437.

b. Synthèse

Il est donc possible de synthétiser des RAFTs possédant un seul ou deux domaines d'adressage.

Les premiers sont constitués de quatre résidus lysine aux chaînes latérales pointant du même côté du cycle et de deux résidus alanine centraux. En conséquence, cette matrice ne présente qu'une seule face fonctionnalisable.

Les chaînes latérales des lysines peuvent être protégées par un seul type de groupements (Figure 56 – Type I) ou bien par des groupements orthogonaux pour greffer 2 à 4 motifs différents (Figure 56 - Type II)^[109]. Ces derniers ont notamment été utilisés pour l'assemblage de boucles peptidiques sur une matrice pour la construction de mimes de récepteurs ou de métalloprotéines^[110].

Quant aux RAFTs à deux domaines, ils sont constitués de cinq ou six résidus lysines et jusqu'à cinq groupements protecteurs différents^[111] (Figure 56 – Type IV). La présence de ces différents groupements orthogonaux sur les chaînes latérales des lysines permet de déprotéger de façon sélective les sites de réaction pour contrôler l'adressage. D'autre part, l'assemblage de deux modules fonctionnels différents est alors possible (Figure 56 - Type III ou V).

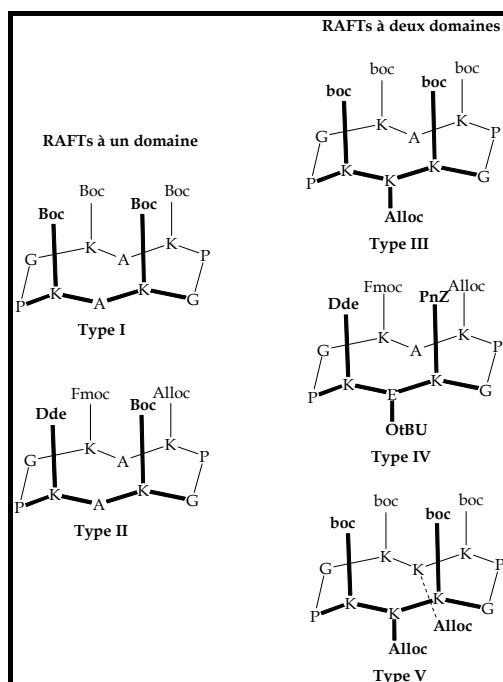


Figure 56 : Représentation des cinq grands types de RAFT en fonction de leurs groupements protecteurs.

¹⁰⁹ P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter. "A convenient synthesis of cyclic peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT)." *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 1255-1258.

¹¹⁰ M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, G. Razaname, G. Tuscherer. "Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as functional mimetics for proteins." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1482-1485.

¹¹¹ P. Dumy. "Cyclic peptides as topological templates in biomimetic chemistry." *Chimia*, **1996**, 50, 640-641.

Les applications qui ont été trouvées pour l'utilisation de ces châssis sont nombreuses. Parmi celles-ci, nous pouvons citer l'élaboration de mimes de surfaces ou de récepteurs dont la synthèse fut affinée afin d'obtenir un châssis fonctionnalisé, lié à une phase solide permettant par exemple de tester ces molécules de façon simple^[112]. Un autre exemple est l'utilisation d'un RAFT à deux domaines fonctionnalisés de façon à pouvoir lier des molécules d'intérêt sur une face et adsorber une surface d'or de l'autre. Par cette méthode, il est possible d'obtenir une interface organique sur un support métallique dont les propriétés sont contrôlées par les groupes terminaux présents à la surface du RAFT^[113]. On peut ainsi obtenir une nouvelle méthode de chromatographie d'affinité pour les métaux, Ni²⁺ et Zn(II)^[114], ou bien un film antigénique utilisable pour des tests à visée biologique ou « biosensor »^[115].

c. Travaux de l'équipe

Au sein du laboratoire, les RAFTs ont notamment été développés pour construire diverses architectures multivalentes. Ils ont été employés pour présenter plusieurs copies de motifs saccharidiques impliqués dans les phénomènes de reconnaissance (motifs galactose ou mannose) permettant ainsi d'étudier plus facilement les interactions protéine-carbohydate^[116]. Par la suite, la synthèse d'un RAFT présentant quatre motifs β -D-Gal(1→3)- α -D-GalNac ou antigène T a été réalisée^[117]. Ce dernier composé mime l'antigène T, surexprimé à la surface des cellules tumorales des cancers du colon et de la prostate, qui est reconnu par les mucines. L'étude de ce composé pourrait nous informer quant au rôle de la multivalence au sein du système immunitaire. On a poursuivi l'étude en synthétisant de nouveaux RAFT présentant deux molécules de biotine ou de fluorescéine sur leur domaine effecteur ainsi que différents motifs saccharidiques sur le domaine de reconnaissance afin de cibler des mucines mais aussi des lectines^[118]. La présence de biotines permettra de réaliser des tests d'interaction. Ceci soit en immobilisant le RAFT sur des surfaces de streptavidine ou d'avidine soit en révélant le complexe ligand-récepteur en le liant par la suite à de la

¹¹² S. Peluso, P. Dumy, C. Nkubana, Y. Yokokawa, M. Mutter. "Solid-phase strategies for the assembly of template-based protein mimetics." *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 7114-7120.

¹¹³ L. Scheibber, P. Dumy, D. Stamou, C. Duschl, H. Vogel, M. Mutter. "Self-assembling functionalized templates in biosensor technology." *Polymer Bull.*, **1998**, *40*, 151-157.

¹¹⁴ L. Scheibber, P. Dumy, D. Stamou, C. Duschl, H. Vogel, M. Mutter. "Functionalisation of gold surfaces via topological templates." *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3725-3734.

¹¹⁵ L. Scheibber, P. Dumy, M. Boncheva, K. Leufgen, H.-J. Mathieu, M. Mutter, H. Vogel. "Functional molecular thin films : topological templates for the chemoselective ligation of antigenic peptides to self-assembled monolayers." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1999**, *38*, 696-699.

¹¹⁶ O. Renaudet, P. Dumy. "Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates." *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 243-246.

¹¹⁷ O. Renaudet, P. Dumy. "Chemoselectively template-assembled glycopeptide presenting clustered cancer related T-antigen." *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 65-68.

¹¹⁸ O. Renaudet, P. Dumy. "Synthesis of multitopic neoglycopeptides displaying recognition and detection motifs." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 3619-3622.

streptavidine couplée à une peroxidase ou une alcaline phosphatase. De façon complémentaire, la présence de fluorescéine permettra de disposer de composés fluorescents lors de tests en solution. Ces composés peuvent avoir des propriétés à la fois diagnostiques et thérapeutiques. Enfin plus récemment, on a utilisé un RAFT à deux domaines présentant quatre lactoses sur son domaine de reconnaissance, spécifiques à une lectine, et un oligonucléotide sur son domaine effecteur, devant inhiber spécifiquement l'expression d'un gène un fois internalisé dans la cellule^[119]. On a ici montré que la multivalence augmentait d'un facteur de 5 la reconnaissance du RAFT pour la protéine cible par rapport au ligand monovalent.

D'autre part, l'équipe a montré que le greffage de quatre motifs cRGD sur un châssis RAFT donnait de meilleurs résultats biologiques que le simple motif cRGD à dose égale en valeur absolue. Il est à noter que ce dernier motif peptidique est actuellement testé en clinique. L'équipe a donc montré qu'un RAFT[cRGD₄] avait une meilleure réponse vis-à-vis de la diminution de la taille de tumeurs cancéreuses dans les cas où les cellules malignes surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ chez la souris^[120]. De plus amples tests d'activité biologique ont par la suite été réalisés en utilisant un RAFT à deux domaines présentant quatre motifs cRGD, spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sur son domaine de reconnaissance et une molécule de cyanine 5 sur son domaine effecteur. Cette dernière permettra d'obtenir des molécules marquées et détectables par fluorescence. On a donc pu suivre les effets de ce composé sur les cellules exprimant l'intégrine^[121]. Ainsi, le RAFT, présentant quatre motifs cRGD inhibe l'adhésion des cellules à la vitronectine, est en partie internalisé dans les endosomes et cible les métastases ovariennes après une administration par intraveineuse. D'autre part, on a montré que son injection intratumorale répétée à faible dose ralentissait la progression tumorale.

Par ailleurs, les RAFTs ont également été utilisés pour conjuguer des épitopes saccharidiques tumoraux (épitopes Tn et Tf) avec un peptide antigénique pour la conception de vaccins synthétiques antitumoraux^[122].

¹¹⁹ Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy. "Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate." *Org. Lett.*, **2005**, 7, 1359-1362.

¹²⁰ D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy. "Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis." *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 5730-5739.

¹²¹ E. Garanger, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M.-C. Favrot, J.-L. Coll. "New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumor." *Mol. Therapy*, **2005**, in press.

¹²² S. Grigalvicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Dériaud, C. Leclerc, P. Dumy. "Chemoselective assembly and immunological evaluation of multiepitopic glycoconjugates bearing clustered Tn antigen as synthetic anticancer vaccine." *Bioconjug. Chem.*, **2005**, 16, 1149-1159.

B. La liaison chimiosélective

Les liaisons chimiosélectives sont hautement efficaces dans le sens où elles sont compatibles avec une large variété de fonctions chimiques et permettent la formation de liaisons entre fragments déprotégés sans réactif de couplage.

1. La liaison oxime

K. Rose^[123] a étudié pour la première fois la formation d'éther d'oxime pour réaliser la synthèse de protéines artificielles. La réaction met en jeu une fonction électrophile (aldéhyde) qui réagit avec des groupes nucléophiles (fonction oxyamine) dans un tampon aqueux (pH 4-6). (cf. Figure 57)

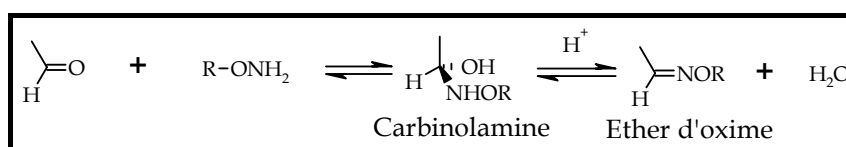


Figure 57 : Mécanisme de formation d'une liaison éther d'oxime.

Au sein de notre laboratoire, cette méthode de formation de liaison est très utilisée depuis 4 ou 5 ans et appliquée à des fragments de type peptidique, saccharidique ou oligonucléotidique fonctionnalisés oxyamine.

Elle présente de nombreux avantages. Le risque de réaction secondaire est très limité puisque les réactifs sont parfaitement chimiosélectifs. Ainsi les groupes nucléophiles comme les amines ne réagiront-ils pas avec les fonctions aldéhydes car ils se trouvent protonés dans les conditions opératoires. Cette réaction est donc réalisable sans la présence de groupements protecteurs ou de réactifs supplémentaires. D'autre part, il est possible de former des conjugués de différentes natures par cette méthode en liant des sucres avec des oligonucléotides ou des peptides avec des sucres par exemple. D'une façon générale, cette méthode performante chimiquement est aussi complètement indépendante de la stratégie de synthèse employée, la formation de ce type de liaison pouvant s'effectuer à n'importe quel endroit de la séquence.

Ce lien éther d'oxime constituait un choix prépondérant pour notre approche dans le sens où la méthode de liaison chimique des différentes séquences entre elles devait être réalisable dans tous les cas rencontrés, quelle que fut la séquence peptidique concernée. *De manière à valider cette approche, nous avons réalisé différentes banques formées de manière combinatoire à partir de peptides oxyamines et d'un châssis RAFT fonctionnalisé aldéhyde.*

¹²³ K. Rose. "Facile synthesis of homogeneous artificial proteins." *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 30-33.

Parallèlement, le mode de préparation de « blocs » d'assemblage saccharidique ou oligonucléotidique présentant une fonction oxyamine a été développée au laboratoire. Il est envisageable de leur appliquer par la suite cette méthode d'assemblage combinatoire.

En application dans la chimie des sucres, cette méthode permet l'assemblage de glycopeptides. Les fonctions oxyamines ou aldéhydes pouvant être introduites par des stratégies variées, à la fois sur le sucre ou le peptide, diverses possibilités peuvent être envisageables. L'équipe de M. Mutter^[124] a décrit la conjugaison entre un peptide présentant une fonction éther d'oxime sur la chaîne latérale d'une lysine et l'extrémité réductrice aldéhyde d'une variété de molécules comme des sucres libres ou des lipides.

2. Méthodes de synthèse de protéines natives

La synthèse peptidique classique sur phase solide de peptides contenant plus de 50 résidus est rendue difficile par l'accumulation de produits secondaires sur la résine, entraînant une purification fastidieuse du peptide souhaité^[125].

Ainsi l'introduction récente de stratégies de liaisons chimiosélectives a-t-elle créé une nouvelle alternative pour la construction de peptides ou protéines de haut poids moléculaires^[126]. La protéine désirée est divisée en segments peptidiques de plus petites tailles qui peuvent être construits indépendamment par synthèse peptidique sur phase solide. Ces différents fragments multifonctionnels non protégés sont ensuite assemblés par synthèse convergente à l'aide de deux fonctions chimiques de réactivité mutuelle (notées A et B sur la Figure 58).

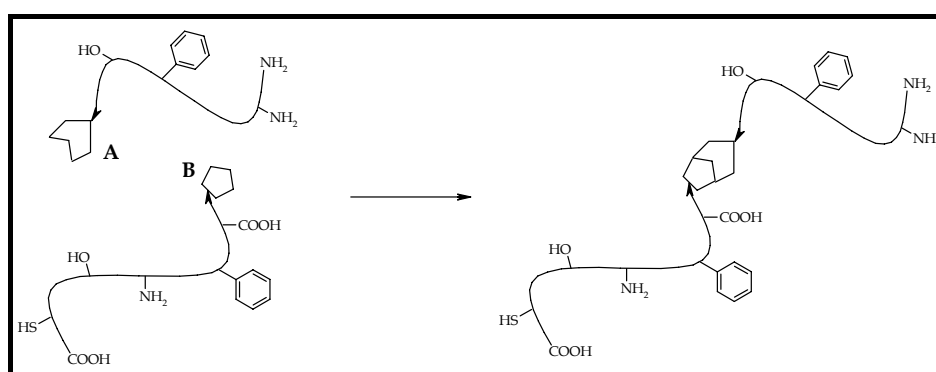


Figure 58 : Liaison chimiosélective entre deux fragments peptidiques.

¹²⁴ S. E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter. "Synthesis of glycopeptides and lipopeptides by chemoselective ligation." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1230-1232.

¹²⁵ L. P. Miranda, P. F. Alewood. "Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 1181-1186.

¹²⁶ L. E. Canne, P. Botti, R. J. Simon, Y. Chen, E. A. Dennis, S. B. H. Kent. "Chemical protein synthesis by solid phase liaison of unprotected peptide segments." *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 8720-8727.

Cette réaction est très efficace et sélective, et permet de s'affranchir de groupements protecteurs ou activateurs qui limiteraient grandement le choix des séquences peptidiques. En effet, lors de ces couplages chimiosélectifs, les conditions de réaction (en particulier le pH) et la très haute réactivité des deux fonctions complémentaires permettent d'éviter d'éventuelles réactions secondaires entre les chaînes latérales.

Un autre avantage de cette méthode est l'incorporation possible d'acides aminés non naturels^[127].

D'autre part, le site de liaison doit être judicieusement choisi afin d'éviter de perturber le repliement ou de modifier les propriétés biologiques de la protéine. La méthode élaborée par S. B. H. Kent^[128,129] s'inscrit dans cette optique puisqu'elle permet de reproduire le lien amide au niveau des deux fragments de manière à mimer scrupuleusement le squelette peptidique natif.

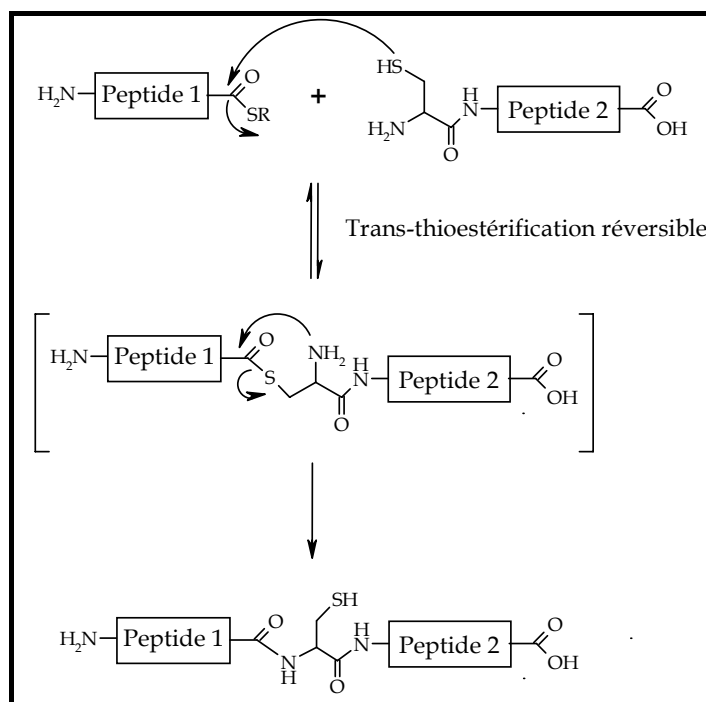


Figure 59 : Elaboration de protéines natives par liaisons chimiosélectives.

Cette stratégie implique l'utilisation d'un premier fragment peptidique présentant une cystéine à son extrémité N-terminale et un second fragment peptidique portant un groupe α -thioester à son extrémité C-terminale. La formation de la liaison amide native entre ces deux

¹²⁷ G. J. Cotton, B. Ayers, R. Xu, T. W. Muir. "Insertion of a synthetic peptide into a recombinant protein framework : a protein biosensor." *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 1100-1101.

¹²⁸ P. E. Dawson, T. W. Muir, M. Schnölzer, S. B. H. Kent. "Synthesis of proteins by native chemical liaison." *Science*, **1994**, *266*, 766-779.

¹²⁹ M. Baca, T. W. Muir, M. Schnölzer, S. B. H. Kent. "Chemical liaison of cysteine-containing peptides : synthesis of a 22 kDa tethered dimer of HIV-1 protease." *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1881-1887.

fragments s'effectue à la suite d'une réaction de trans-thioesterification réversible à pH physiologique, suivi d'un réarrangement irréversible et spontané par migration du groupement acyle de l'atome de soufre vers l'atome d'azote.

Alors que la synthèse chimique de protéines par SPPS permet difficilement de dépasser 80 résidus, cette technique de couplage convergente a permis l'assemblage homogène de protéines natives de plus d'une centaine de résidus. Cette approche a également été suivie avec succès par C. R. Bertozzi pour la synthèse de plusieurs glycoprotéines natives comme la diptericine, protéine antibactérienne O-glycosylée de 82 résidus^[130], ou la lymphotactine, chemokine glycosylée de 93 résidus^[131].

3. Autres liaisons chimiosélectives

D'autres approches sont à notre disposition pour permettre la réalisation de liaisons chimiosélectives et ainsi effectuer la synthèse de biomolécules, par exemple : les liaisons disulfure, thioester^[132], hydrazone^[133], thioéther^[134] ou le cycle thiazolidine^[135].

¹³⁰ K. A. Winans, D. S. King, V. R. Rao, C. R. Bertozzi. "A chemically synthesized version of the insect antibacterial glycopeptide, Diptericin, disrupts bacterial membrane integrity." *Biochemistry*, **1999**, *38*, 11700-11710.

¹³¹ L. A. Marcaurrelle, L. S. Miouze, J. Wilken, L. Aldham, S. D. H. Kent, T. M. Handel, C. R. Bertozzi. "Chemical synthesis of Lymphatactin : a glycosylated chemokine with a C-terminal mucin-like domain." *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 1129-1132.

¹³² P. E. Dawson, S. B. H. Kent. "Convenient total synthesis of a 4-helix TASP molecule by chemoselective ligation." *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 7263-7266.

¹³³ H. F. Gaertner, R. E. Offord, R. Cotton, D. Timms, R. Camble. "Chemo-enzymatic backbone engineering of proteins." *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 7224-7230.

¹³⁴ R. Eritja, A. Pons, M. Escarceller, E. Giralt, F. Albericio. "Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence." *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 4113-4120.

¹³⁵ L. Zhang, J. P. Tam. "Thiazolidine formation as a general and site-specific conjugation method for synthetic peptides and proteins." *Anal. Biochem.*, **1996**, *233*, 87-93.

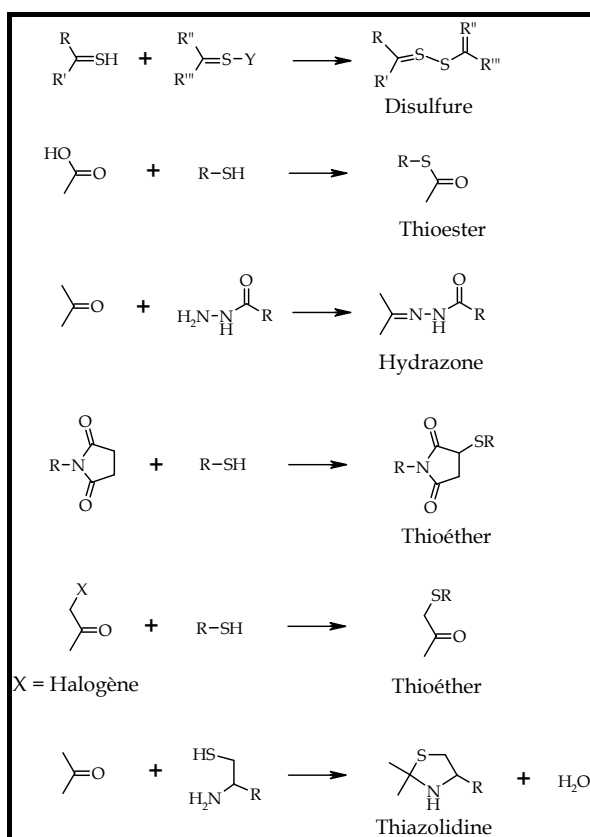


Figure 60 : Exemples de liaisons chimiosélectives^[136].

Grâce à ces méthodes, il est donc possible de réaliser la synthèse de divers conjugués.

a. La liaison disulfure (cf. Figure 60)

Ce type de liaison sera plus amplement développé dans le paragraphe **B.2** de la partie traitant des résultats.

Les méthodes chimiosélectives basées sur la formation de ponts disulfures ont été largement développées dans le cadre des synthèses de peptides naturels contenant des liaisons disulfures intramoléculaires. Trois principales approches synthétiques ont émergé^[137] :

- ⇒ L'oxydation à l'air de fonctions thiols libres, déprotégées (principalement dans le cas de la formation de disulfures intramoléculaires ou de couplages homodimériques) ;
- ⇒ La déprotection et l'oxydation simultanées à l'iode de fonctions thiols protégées par des groupements de type Trt, Acn ou Tmob (cas des disulfures intramoléculaires ou homodimériques) ;

¹³⁶ G. A. Lemieux, C. R. Bertozzi. "Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells." *Tibtech.*, **1998**, 16, 506-513.

¹³⁷ P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt. "Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins." Editor : C. W. Rees, CRC Press, Boca Raton, New York, **1997**.

⇒ L'attaque nucléophile d'une fonction thiol libre sur une fonction thiol activée, porteuse d'un groupe partant du type Scm, Nps ou Pyr (réaction de déplacement du disulfure, cas de la formation de disulfures intermoléculaires hétérodimériques).

La combinaison de ces stratégies a notamment permis une synthèse élégante et judicieuse de l'insuline par le groupe de Ciba-Geigy^[138]. La troisième approche a par ailleurs conduit à l'utilisation des groupements pyridinesulfényles, comme le groupement NPys (3-nitro-2-pyridinesulfényl) qui ont permis d'améliorer considérablement l'efficacité de la formation des disulfures. L'intérêt majeur du groupement NPys réside dans la dualité de son caractère à la fois protecteur et activateur de la fonction thiol.

b. Les liaisons thioesters (cf. Figure 60)

Ces liaisons constituent véritablement les premières approches chimiosélectives décrites dans la littérature. Elles ont été utilisées par S. B. H. Kent pour la synthèse des protéines afin de résoudre les problèmes de solubilité et de taille liées aux méthodes de condensation conventionnelles^[139]. La démarche synthétique est alors considérablement simplifiée. La macromolécule cible, une protéase de HIV-1, est divisée en fragments peptidiques de plus petites tailles, facilement accessibles par SPPS et portant des fonctions chimiques réactives adéquates : fonction thioacide à l'extrémité C-terminale ou groupe α -bromoacétyle à l'extrémité N-terminale. La réaction de thioestérification chimiosélective entre les deux fragments est effectuée en milieu aqueux tamponné (pH 5-6). La présence des chaînes latérales déprotégées et potentiellement réactives des autres résidus acides aminés sur chacun des fragments, en particulier celle des résidus cystéines, n'influent pas sur l'efficacité de la réaction en raison de la différence de pKa entre les fonctions thioacide (pKa \approx 3) et thiol (pKa \approx 8). Au pH où la réaction a lieu, l'anion thiocarboxylate, plus nucléophile, réagit plus rapidement avec le dérivé α -bromé et limite les risques de réactions parasites avec les cystéines. L'efficacité de cette méthode est tout à fait remarquable : la protéase obtenue possède une activité catalytique similaire à celle de l'enzyme native.

¹³⁸ P. Sieber, B. Kamber, K. Eisler, A. Hartmann, B. Riniker, W. Rittel. "Synthesis of human insulin. II. Preparation of the A(1-13) fragment." *Helv. Chim. Acta.*, **1976**, *59*, 1489-1497; B. Kamber, B. Riniker, P. Sieber, W. Rittel. "Synthesis of human insulin. III. Preparation of the A(14-21) – B(17-30) fragment." *Helv. Chim. Acta.*, **1976**, *59*, 2830-2840.

¹³⁹ M. Schnölzer, S. B. H. Kent. "Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides : backbone-engineered HIV protease." *Science*, **1992**, *256*, 221-225.

c. La liaison hydrazone (cf. Figure 60)

Les aldéhydes et les cétones sont des fonctions chimiques électrophiles particulièrement appropriées pour les approches chimiosélectives. Ils réagissent sélectivement dans un tampon aqueux (pH 4-6) avec des composés nucléophiles comme les hydrazones, les thiosemicarbazides ou les oxyamines pour former respectivement les liaisons hydrazones, thiosemicarbazones ou éther d'oxime. Contrairement aux stratégies qui requièrent la présence d'un résidu cystéine en position N-terminale (e.g. les liaisons amides natives ou pseudoprolines), la formation de ce type de liaison peut s'effectuer à n'importe quel endroit de la séquence peptidique, à partir de fragments convenablement fonctionnalisés. L'assemblage de dendrimères contenant plusieurs copies d'un peptide de 20 résidus (peptide VA20 dérivé de la protéine de surface du virus d'immunodéficience des félins) autour d'un cœur polylysine a été développé par J. P. Tam selon ce principe^[140].

Ces types de liaisons présentent l'énorme avantage de limiter les risques de réactions secondaires puisque les différents partenaires sont parfaitement chimiosélectifs : les groupes nucléophiles des chaînes latérales des acides aminés (comme les thiols ou les amines), protonés dans les conditions du couplage, ne réagissent pas avec la cétone ou l'aldéhyde.

d. La liaison pseudoproline (cf. Figure 60)

Les protéines peuvent également être assemblées par conjugaison entre un aldéhyde et des fonctions β -aminothiols ou β -aminoalcools (e.g. cystéine, sérine ou thréonine en position N-terminale) pour former respectivement des liens thiazolidines ou oxazolidines. J. P. Tam a utilisé ce type de réaction pour condenser un peptide fonctionnalisé par un aldéhyde sur son extrémité C-terminale et un second fragment présentant une cystéine, une sérine ou une thréonine en position N-terminale^[141]. La réaction conduit à la formation d'une imine instable qui se cyclise spontanément avec la fonction thiol ou alcool pour conduire à un intermédiaire thiazo- ou oxazolidine.

¹⁴⁰ J. Shao, J. P. Tam. "Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone and thiazolidine linkages." *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 3893-3899.

¹⁴¹ J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao. "Orthogonal ligation strategies for peptide and protein." *Peptide Science*, **1999**, *51*, 311-332.

II. La synthèse peptidique

Les peptides et leurs dérivés font l'objet d'une attention considérable depuis une quarantaine d'années. La meilleure compréhension de leurs divers rôles physiologiques, associée à leur production plus efficace par synthèse et voie biotechnologique a stimulé un intérêt croissant pour leurs applications pharmacologiques potentielles. Ainsi de nombreux peptides biologiquement actifs ont-ils été découverts à ce jour et une multitude de leurs analogues synthétiques ont été testés. Les approches conventionnelles de synthèse peptidique ont connu un énorme succès grâce aux progrès réalisés dans le domaine des réactifs de couplage plus efficaces et moins racémisants, ainsi que dans le développement de groupements protecteurs, de nouvelles résines de synthèse et de robots synthétiseurs. Ce succès et ces innovations sont à l'origine du développement de méthodes combinatoires pour l'obtention de bibliothèques peptidiques.

A. Principe

Contrairement aux processus de biosynthèse, la synthèse chimique de peptides s'effectue de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Néanmoins, les chimistes ne disposant ni de l'efficacité, ni de la sélectivité de la machinerie génétique ont dû développer des méthodes spécifiques pour résoudre les difficultés intrinsèques à la synthèse peptidique.

La première est la formation de la liaison peptidique entre acides aminés dans des conditions suffisamment douces pour garantir l'intégrité du produit, tout en évitant la formation de produits secondaires issus de réactions de racémisation. Pour cela, de nombreuses méthodes ont été développées^[142] permettant l'activation de la fonction acide afin de faciliter son attaque nucléophile par la fonction amine de l'acide aminé suivant^[143].

¹⁴² P. Llyold-Williams, F. Albericio, E. Giralt. "Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins." CRC Press LLC eds., Boca Raton New York, **1997**.

¹⁴³ F. Albericio, L. A. Carpino. "Coupling reagents and activation." *Methods Enzymol.*, **1997**, 289, 104-126.

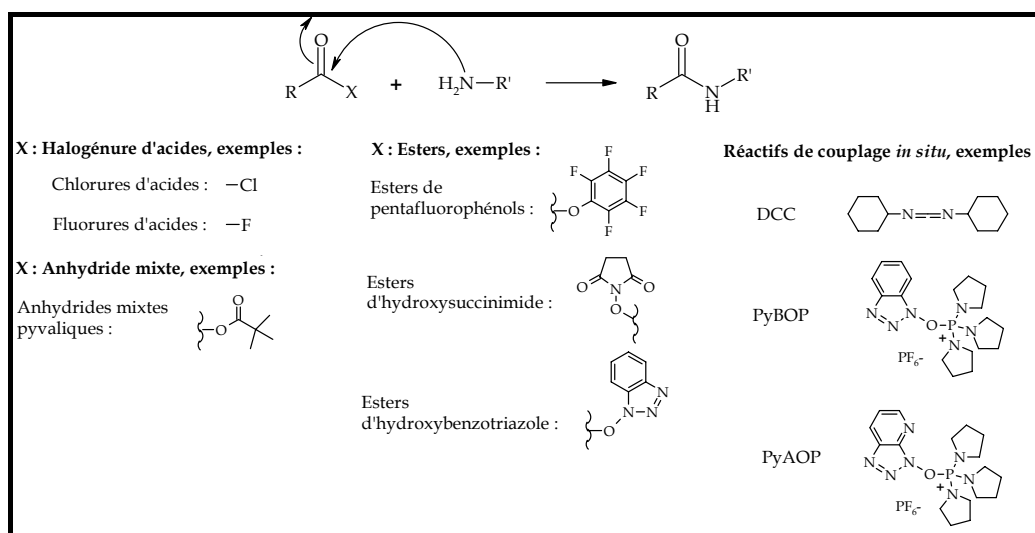


Figure 61. : Différentes stratégies d'activation de la fonction acide

Parmi ces méthodes, nous pouvons citer l'activation par les halogénures d'acides aminés, les anhydrides mixtes et les esters^[144]. Ces dernières années, l'utilisation de réactifs de couplage comme le PyBOP[®][145] et HOAT^[146], permettant de former ces dérivés directement *in situ*, s'est largement développée au point de devenir vraisemblablement la méthode la plus employée^[147].

Le contrôle de la formation de la liaison peptidique souhaitée, par réaction de la fonction acide d'un premier acide aminé avec la fonction amine d'un second, nécessite que toutes les fonctions n'intervenant pas dans la réaction soient protégées. Dans cette optique, de nombreux groupements protecteurs ont été développés^[148].

L'élargissement de la séquence demande ensuite que la fonction N-terminale du peptide puisse être déprotégée sélectivement de manière à pouvoir réagir avec l'acide aminé suivant. Les groupes protecteurs utilisés et destinés à être retirés en cours de synthèse de façon répétitive, sont qualifiés de « groupes temporaires » (groupement Fmoc^[149] ou Boc^[150] selon la stratégie d'assemblage). En général les chaînes latérales des acides aminés restent protégées tout au long de l'élargissement de la séquence pour n'être libérées qu'en fin de synthèse. Nous

¹⁴⁴ M. Bodansky. "Peptide chemistry. A practical text book." Springer Verlag eds., Berlin Heidelberg, **1993**.

¹⁴⁵ J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro. "PyBOP[®] : a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product." *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 205-208.

¹⁴⁶ L.A. Carpino. "1-hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive." *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 4397-4398.

¹⁴⁷ J.M. Humphrey, A.R. Chamberlin. "Chemical synthesis of natural product peptides : coupling methods for the incorporation of noncoded amino acids into peptides." *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 2243-2266.

¹⁴⁸ T.W. Greene, P.G.M. Wuts. "Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach." Oxford university press, **2000**.

¹⁴⁹ W.C. Chan, P.D. White. "Protective groups in organic synthesis." John Wiley and Sons eds., New York, **1991**.

¹⁵⁰ M. Schnölzer, P. Alewood, A. Jones, D. Alewood, S.B.H. Kent. "In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis." *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1992**, *40*, 180-193.

employons pour cela des groupements protecteurs dits « permanents ». Cependant, certaines synthèses nécessitent la fonctionnalisation sélective de la chaîne latérale d'un acide aminé de la séquence. Dans ce cas précis, nous avons alors recours à des groupements protecteurs dits « semi-permanents » (cf. Figure 62).

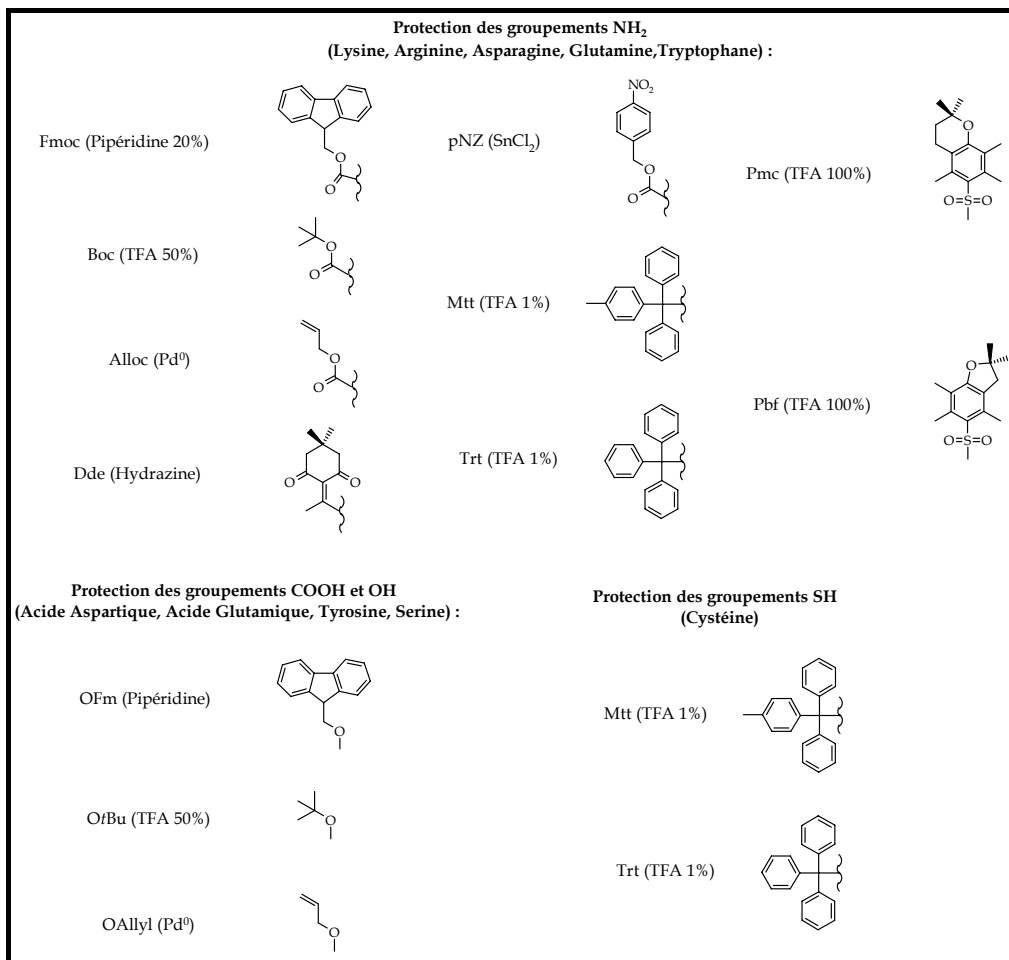


Figure 62 : Exemples de groupes protecteurs permanents ou semi-permanents utilisés en stratégies Fmoc. (Conditions de déprotection).

Tous ces groupements protecteurs doivent pouvoir être couplés de façon sélective. Deux groupes protecteurs sont dits orthogonaux si les conditions d'élimination de l'un n'affecte pas la stabilité de l'autre. Le développement de stratégies de déprotection est donc un aspect extrêmement important de la synthèse peptidique^[151] qui conditionne fortement sa réussite. Cela passe notamment par la maîtrise de nombreux groupes protecteurs pouvant être introduits ou éliminés avec le maximum d'efficacité, dans des conditions assez douces pour garantir l'intégrité du produit.

¹⁵¹ M. Schelhaas, H. Waldmann. "Protecting group strategies in organic synthesis." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 2056-2083.

L'essor des réactifs de couplage, ainsi que le développement de nombreuses résines de synthèse, a permis le développement exceptionnel des méthodes de synthèse sur phase solide.

B. Synthèse peptidique sur phase solide

La synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) fut introduite par R. Bruce Merrifield en 1963^[152], puis développée et perfectionnée de telle sorte qu'il est aujourd'hui possible d'assembler des chaînes polypeptidiques comportant plus de cent acides aminés^[153]. L'assemblage d'une chaîne polypeptidique est une procédure itérative, alternant cycles de couplage et de déprotection permettant ainsi son automatisation.

En SPPS, les peptides ne sont pas assemblés en solution mais sur un support insoluble. Ce support est une résine polymère (le plus souvent du polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène^[154]) qui gonfle dans les solvants utilisés et au sein de laquelle a lieu la synthèse peptidique. Le principe de la SPPS est relativement simple comme le décrit la Figure 63.

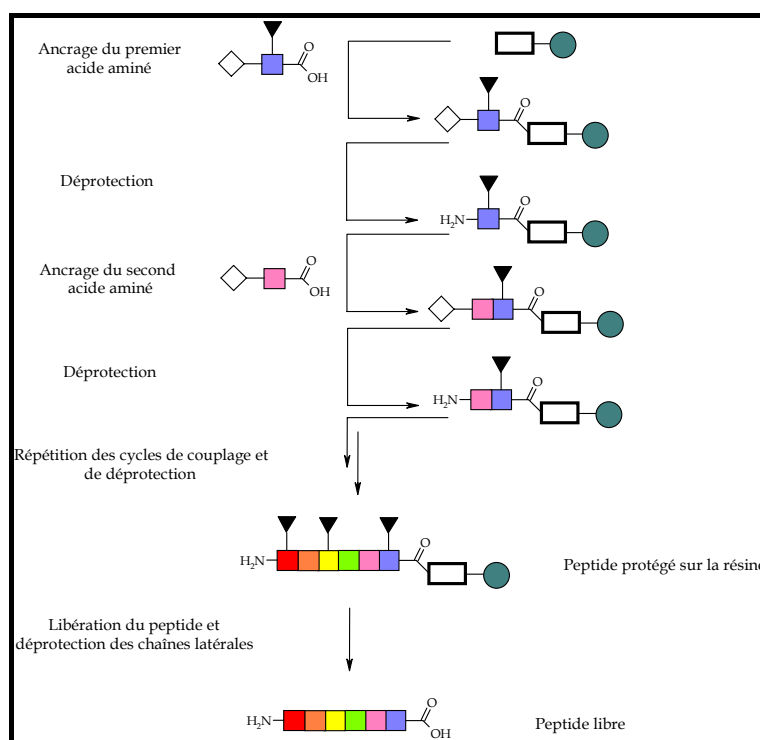


Figure 63 : Principe de la synthèse peptidique sur phase solide. Les acides aminés sont représentés par des carrés, les groupes protecteurs temporaires N-α par des losanges, ceux des chaînes latérales par des triangles, le linker par un rectangle et la résine par un cercle (selon F. Albericio).

¹⁵² R. B. Merrifield. "Solid phase synthesis. The synthesis of a tetrapeptide." *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2049-2054.

¹⁵³ R. B. Merrifield. "Solid phase synthesis (Nobel lecture)." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, 24, 799-810.

¹⁵⁴ D. C. Sherrington. "Preparation, structure and morphology of a polymer support." *J. Chem. Comm.*, **1998**, 20, 2275-2286.

L'acide C-terminal de la séquence à synthétiser, protégé sur sa fonction N- α et si besoin sur sa chaîne latérale, est accroché chimiquement sur le support solide. Cela s'effectue le plus souvent par l'intermédiaire d'une molécule qui sert de lien entre le peptide et la résine (le linker) et qui pourra être éliminée en fin de synthèse, généralement par traitement à l'acide, pour libérer le peptide. La stabilité chimique de ce bras espaceur conditionne la libération du peptide en fin de synthèse.

L'élongation du peptide est alors effectuée par des cycles itératifs d'élimination du groupe protecteur N- α , puis couplage de l'acide aminé protégé suivant. De plus, il est possible de réaliser des étapes d'acétylation, « masquage » ou « capping » à la suite d'une étape de couplage afin de bloquer les sites amines n'ayant pas réagi.

Lors de la synthèse, l'utilisation d'un support insoluble où le peptide en construction est fixé, permet l'emploi d'excès de réactifs, nécessaire pour que chaque réaction de couplage ou de déprotection soit rapide et complète. Par la suite, ces réactifs sont facilement éliminés par simples filtrations à l'air et lavages.

Les étapes de purification et d'isolement des intermédiaires deviennent ainsi superflues et il est alors possible d'assembler une séquence peptidique beaucoup plus rapidement que par synthèse en solution. A la fin de l'élongation de la séquence, le peptide est décroché de la résine et les chaînes latérales déprotégées. Il peut alors être purifié et caractérisé.

Il existe deux stratégies de synthèse en SPPS : la stratégie Boc/Bzl et Fmoc/tBu.

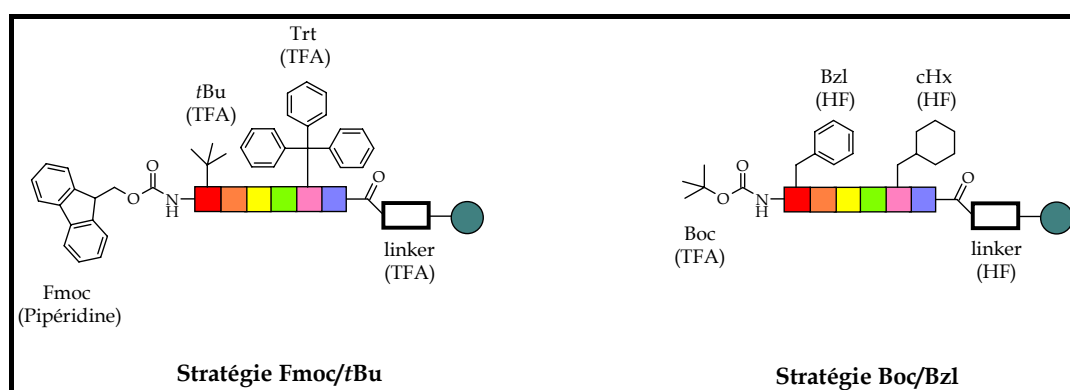


Figure 64 : Stratégies de synthèse en SPPS. (Conditions de coupure)

La stratégie Boc/Bzl utilise le groupement Boc (tertiobutyloxycarbonyl) comme groupe protecteur temporaire de la partie N- α et des groupes protecteurs de type benzyle ou cyclohexyle sur les chaînes latérales. Dans cette approche, le groupement Boc est coupé par acidolyse à l'acide trifluoroacétique et le peptide est coupé de la résine et déprotégé par acidolyse à l'acide fluorhydrique. La stratégie Fmoc/tBu quant à elle, utilise le groupement

Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbonyl) comme groupe protecteur temporaire et les groupements *tert*butyle ou trityle pour les chaînes latérales des acides aminés. Dans cette stratégie, le groupement Fmoc est coupé en milieu basique (par une amine secondaire comme la pipéridine) et le peptide est libéré de la résine et déprotégé par acidolyse à l'acide trifluoroacétique (cf. Figure 64).

L'itérativité et l'efficacité de la méthode ont permis son automatisation et de ce fait, ont contribué au développement de la chimie combinatoire sur peptides^[155].

Néanmoins, il est à noter que la synthèse peptidique sur phase solide présente certaines limites. Tout d'abord, étant donné que le peptide reste lié à la résine pendant toute la durée de la synthèse, il est difficile de suivre l'évolution des réactions. De plus, les intermédiaires ne peuvent ni être purifiés ni caractérisés, ce qui limite tout contrôle de la synthèse. Il existe toutefois des méthodes de suivi des cycles de déprotection et de couplages qui sont décrites ci-après.

Par ailleurs, si les réactions de couplage ou de déprotection ne sont pas quantitatives, des séquences peptidiques différentes de celle attendue (séquences incomplètes) vont s'accumuler sur la résine et donner un mélange en fin de synthèse dont il sera difficile d'isoler la séquence désirée...

¹⁵⁵ E. M. Gordon, R. W. Barret, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, M. A. Gallop. "Applications of combinatorial technologies to drug discovery. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies and future directions." *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 1385-1401.

III. Résultats

A. Préparation des châssis RAFT

La matrice cyclodécapeptidique est obtenue par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS). Le peptide linéaire est assemblé en utilisant la stratégie Fmoc/*t*Bu puis cyclisé. L'élongation se déroule de manière classique de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale et débute le plus souvent par un résidu glycine. Ce dernier permet en effet d'éviter les problèmes de racémisation qui pourraient se produire lors de l'étape de cyclisation.

La différenciation régiosélective des deux faces dites de « reconnaissance » et « effectrice » ainsi que celle des sites d'ancrage de la matrice nécessite l'utilisation d'acides aminés orthogonalement protégés. Nous employons pour cela principalement les chaînes latérales des résidus lysine comme point d'ancrage afin de bénéficier de la grande diversité des groupements protecteurs de la fonction amine ϵ .

1. RAFT à un domaine

Ce type de gabarit fut utilisé pour l'élaboration des bibliothèques de produits linéaires et cycliques, leur étude et leur caractérisation.

a. Synthèse du peptide linéaire

Le décapeptide linéaire **1** est assemblé sur la résine Gly-Sasrin[®], résine acidosensible, par synthèse manuelle en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu. La résine est tout d'abord gonflée, à l'aide de DCM et de DMF, pour que les sites de fixation du premier acide aminé soient accessibles.

La synthèse est ensuite réalisée *via* une succession de cycles de déprotections et de couplages classiques en SPPS. La déprotection du groupe protecteur N- α Fmoc terminal est effectuée par traitement de la résine avec une solution de pipéridine à 20% dans du DMF. La mesure de l'absorbance en UV de l'adduit dibenzofulvène-pipéridine à 299 nm, produit lors de cette déprotection, permet d'évaluer le taux de substitution du peptide au cours de la synthèse. D'autre part, les couplages peptidiques sont réalisés en utilisant deux équivalents d'acide aminé et deux équivalents de PyBOP[®] comme réactif de couplage, par rapport au taux de substitution de la résine. On ajoute ensuite 3 à 4 équivalents de DIEA comme base et la réaction s'effectue à pH 8-9 pendant 30 minutes dans du DMF dégazé. Après chaque couplage, la résine est lavée plusieurs fois avec du DMF puis du DCM et on évalue si la

réaction s'est effectuée de manière quantitative à l'aide de tests colorimétriques, de Kaiser^[156] ou du TNBS^[157], réalisés sur quelques grains de résine après chaque couplage.

D'autre part, on effectue une analyse CLHP au milieu de la synthèse afin d'évaluer la qualité de la synthèse. Ce contrôle s'effectue préférentiellement après un couplage et avant la déprotection des groupements Fmoc afin de pouvoir visualiser spécifiquement le peptide en élongation (et éventuellement les peptides tronqués secondaires) à la longueur d'onde de 299 nm. Pour cela, la résine est tout d'abord rincée avec du DCM puis quelques billes sont prélevées et transférées dans un tube à calciner. Elles sont alors traitées avec la solution de coupure adéquate (ici, TFA 1% dans le DCM) pendant le temps requis (ici 5 à 10 minutes). La solution est ensuite filtrée puis évaporé à l'air comprimé avant d'être précipité à l'éther^[158] et repris dans quelques gouttes du solvant A ou B. Le produit est ensuite analysé par chromatographie liquide haute performance.

b. Cyclisation

Après déprotection du dernier groupement Fmoc terminal, le peptide linéaire est décroché de la résine en traitant celle-ci de manière répétée avec une solution de TFA à 1% dans le DCM. Un grand soin est apporté lors de l'évaporation sous pression réduite à froid des solutions de coupure, afin d'éviter toute perte prématurée des groupements N- ϵ Boc. En effet, ceci engendrerait, lors de la cyclisation, la formation de produits secondaires entre les lysines déprotégées (polymérisations intermoléculaires). Le produit est ensuite obtenu sous la forme d'une poudre blanche après précipitation et lavages à l'éther.

La réaction de cyclisation est réalisée dans du DMF sous conditions de haute dilution ($0,5 \cdot 10^{-3}$ M) en utilisant un équivalent de PyBOP[®] comme réactif de couplage et en présence de DIEA comme base.

Nous pouvons noter qu'aucune réaction intermoléculaire n'est observée : ceci est dû à la conformation quasi-cyclique adoptée par le peptide linéaire, induite par les deux coudes β .

Après une heure de réaction à température ambiante, la cyclisation est complète. Le peptide **3** est obtenu après précipitation et lavages à l'éther. Il est obtenu sans plus de purification avec un rendement de 96% (cf. Figure 65).

¹⁵⁶ E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook. "Color test for detection of free terminal amino group in the solid-phase synthesis of peptides." *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595-598.

¹⁵⁷ W. S. Hancock, J. E. Battersby. "A new micro-test for the detection of incomplete coupling reaction in solid-phase synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid." *Anal. Biochem.*, **1976**, *71*, 261-264.

¹⁵⁸ E. Crusi, J. M. Huerta, D. Andreu, E. Giralt. "GLY/LYS-containing peptide macrocycles : synthesis and cyclisation studies." *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 4191-4194.

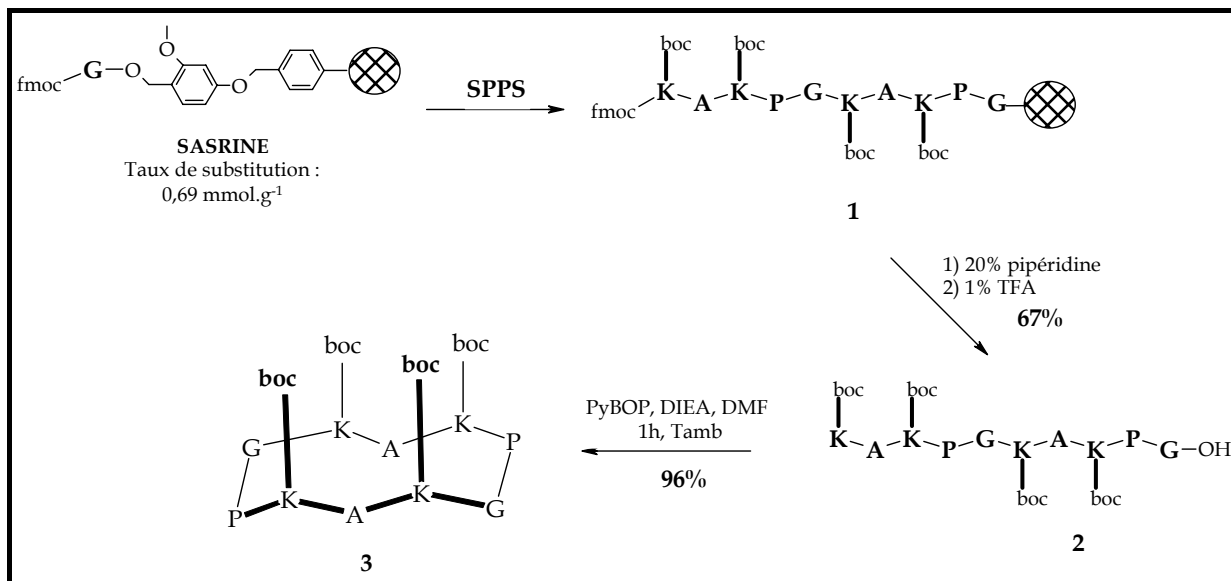


Figure 65 : Cyclisation du châssis

c. Incorporation des résidus sérine

Les groupements N-ε Boc sont éliminés par acidolyse au TFA^[159] pendant 30 minutes à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec et le peptide est précipité à l'éther et utilisé sans autre purification.

L'incorporation des résidus Boc-Ser(-OtBu) sur les chaînes latérales des lysines s'effectue selon une procédure classique de couplage peptidique en solution (1 équivalent d'acide aminé protégé et 1 équivalent de PyBOP par site de réaction ; 3 à 4 équivalents de DIEA comme base, dans du DMF).

La réaction est suivie par CLHP analytique. Après 30 minutes de réaction, nous observons la disparition du réactif de départ au profit des différents intermédiaires réactionnels possédant un à quatre résidus Boc-Ser(-OtBu).

Après précipitation et lavage à l'éther, le composé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche. Sa pureté est alors contrôlée par CLHP analytique, puis il est placé dans 95 % de TFA pendant 30 minutes à température ambiante pour effectuer la déprotection des groupements -Boc et -tBu. Les 5 % restants de la solution sont constitués de piègeurs de carbocations (« scavengers ») à savoir 2,5 % d'eau et 2,5 % de TIS.

La matrice **5**, possédant quatre résidus sérine libres, est obtenue avec un rendement de 90%.

¹⁵⁹ G. W. Anderson, A. C. McGregor. "t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis." *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 6180-6183.

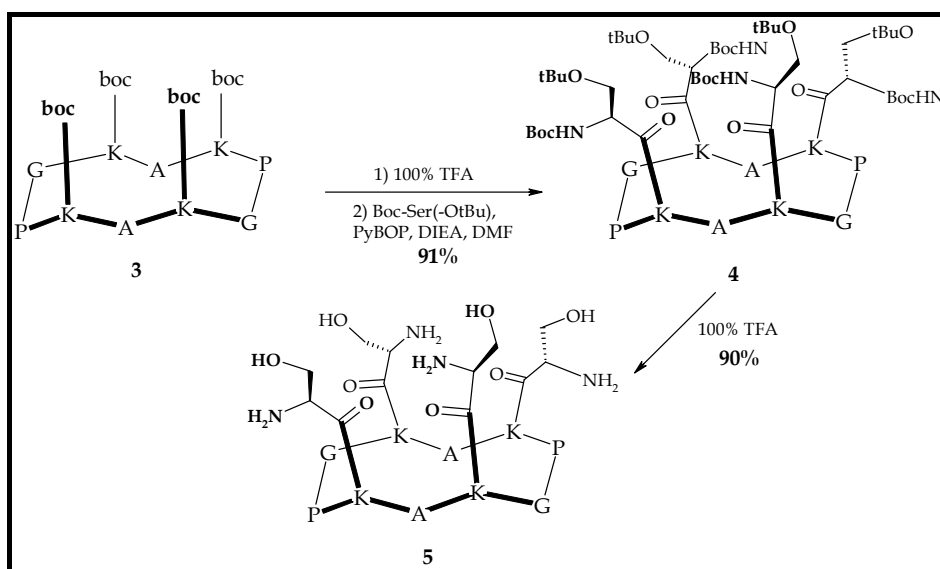


Figure 66 : Incorporation des résidus sérine libres.

d. Oxydation

L'oxydation des fonctions 1,2-aminoéthanol des quatre résidus sérine libres est effectuée en présence de deux équivalents de périodate de sodium^[160] (NaIO₄) par site de réaction dans de l'eau millipore à une concentration de 10⁻² mol.L⁻¹. La réaction est laissée à température ambiante pendant une heure. L'aldéhyde glyoxylique **6** est obtenu avec un rendement de 83% après purification par CLHP semi-préparative pour éliminer les sels d'iode résiduels et le formaldéhyde formé lors de la réaction. Le rendement global sur l'ensemble de la synthèse est de 43%.

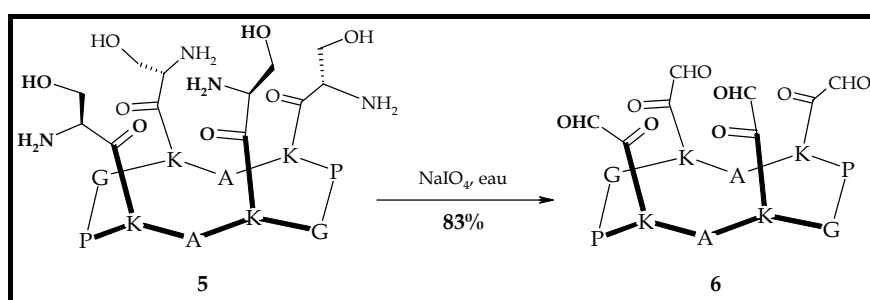


Figure 67 : Formation des aldéhydes glyoxyliques.

2. RAFT à deux domaines : matrice présentant le colorant dabsyl

Afin de pouvoir détecter visuellement, certaines banques de produits, nous avons choisi de marquer la matrice RAFT à l'aide d'un colorant possédant un large spectre dans le visible : le 4'-chlorure de sulfonyl du diméthylaminoazobenzène (Dabsyl ; ε = 33000 à 466

¹⁶⁰ K. F. Geoghegan, J. G. Stroh. "Self-directed conjugation of non-peptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine." *Bioconjugate Chem.*, **1992**, 3, 138-146.

nm ; cf. Figure 68). En effet, c'est un agent de détection couramment utilisé pour marquer les fonctions amines de protéines ou de peptides. Par la suite, ces gabarits utilisés comme sonde pour évaluer des propriétés biologiques face à différentes cibles biologiques et en particulier *via* des colonnes d'affinité.

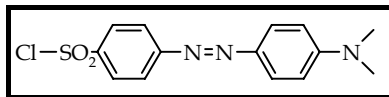


Figure 68 : Marqueur Dabsyl.

a. Synthèse du peptide linéaire

La synthèse du gabarit, possédant deux domaines d'adressage, nécessite l'emploi de résidus lysine protégés par différents groupements orthogonaux. Nous avons donc choisi les groupements N- ϵ Boc et N- ϵ Alloc qui peuvent être déprotégés de manière sélective.

Le décapeptide linéaire est assemblé par SPPS sur la résine Gly-Sasrin[®] par synthèse manuelle en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu.

Après déprotection du dernier groupement Fmoc, le peptide linéaire convenablement protégé est décroché de la résine par un traitement acide doux à l'aide d'une solution à 1% de TFA dans le DCM. Après précipitation dans l'éther, le peptide linéaire **7** est obtenu avec un rendement de 95% (cf. Figure 69).

b. Cyclisation

Le peptide linéaire est cyclisé en présence de PyBOP[®] et de DIEA dans les conditions précédemment décrites. De plus, comme pour le châssis à un domaine, la cyclisation s'effectue au niveau d'un résidu glycine afin d'éviter toute réaction d'épimérisation.

Après évaporation du solvant, précipitation et lavage à l'éther, le châssis **8** est obtenu avec un rendement de 96% (cf. Figure 69).

c. Incorporation des résidus sérine

Les quatre lysines de la face supérieure de la matrice cyclodécapeptidique possédant des groupements protecteurs N- ϵ Boc sur leur chaîne latérale sont déprotégées par acidolyse. Puis, les résidus Boc-Ser(-*Ot*Bu) sont introduits par couplage peptidique classique en solution en présence de PyBOP[®] et de DIEA.

Après évaporation du solvant, précipitation et lavage à l'éther, la matrice **9** est obtenue avec un rendement de 88%.

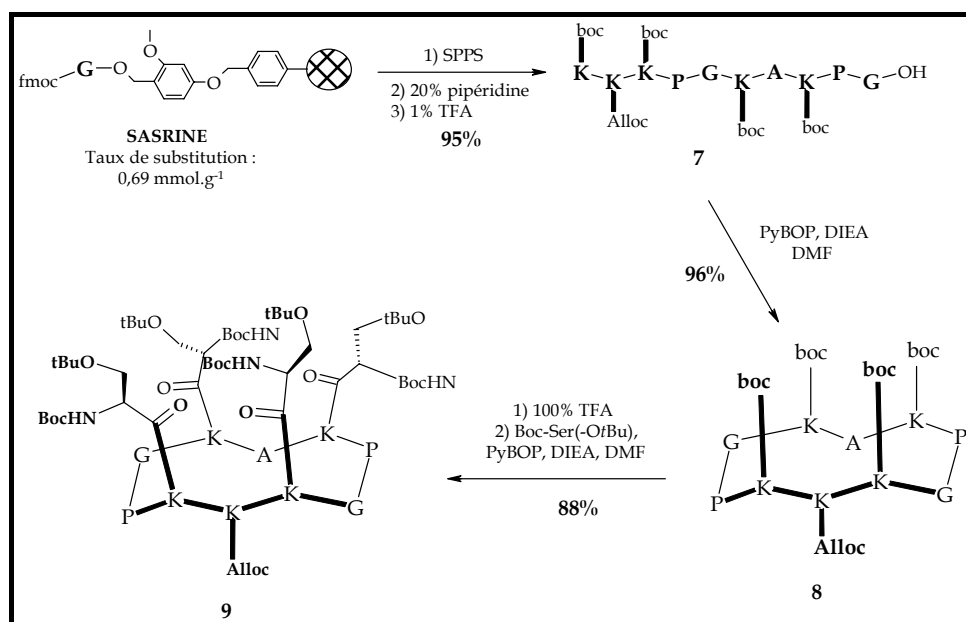


Figure 69 : Elongation, cyclisation et incorporation des résidus sérine protégés sur le composé 9.

d. Fonctionnalisation du domaine effecteur

Le groupement N- ϵ Alloc présenté par la lysine de la face inférieure est ensuite déprotégé selon la méthode classique de déprotection en solution^[161,162,163] en présence de PhSiH₃ et de PdP(Ph₃)₄ dans le DCM anhydre, aboutissant ainsi au peptide **10** avec un rendement de 76% après précipitation et lavage à l'éther.

Le colorant dabsyl est alors introduit par une réaction de substitution nucléophile dans du DMF et en présence de DIEA (pH 8-9). La réaction est suivie par CLHP analytique et après une heure d'agitation à température ambiante, le composé est purifié par CLHP semi-préparative.

Après lyophilisation, le composé **11** est obtenu avec un rendement de 70% sous forme d'une poudre rouge.

¹⁶¹ N. Thieriet, J. Alsina, E. Giralt, F. Guibé, F. Albericio. "Use of Alloc-amino acids in solid phase peptide synthesis : tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions." *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 7275-7278.

¹⁶² M. Dessolin, M. G. Guillerez, N. Thieriet, F. Guibé, A. Loffet. "New allyl group acceptors for palladium catalysed removal of allylic protections and transacylation of allylcarbamates." *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 5741-5744.

¹⁶³ O. Dangles, F. Guibé, G. Balavoine, S. Lavielle, A. Marquet. "Selective cleavage of the ally and (allyloxy)carbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride. Application to the selective protection-deprotection of amino acids derivatives and in peptide synthesis." *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 4984-4993.

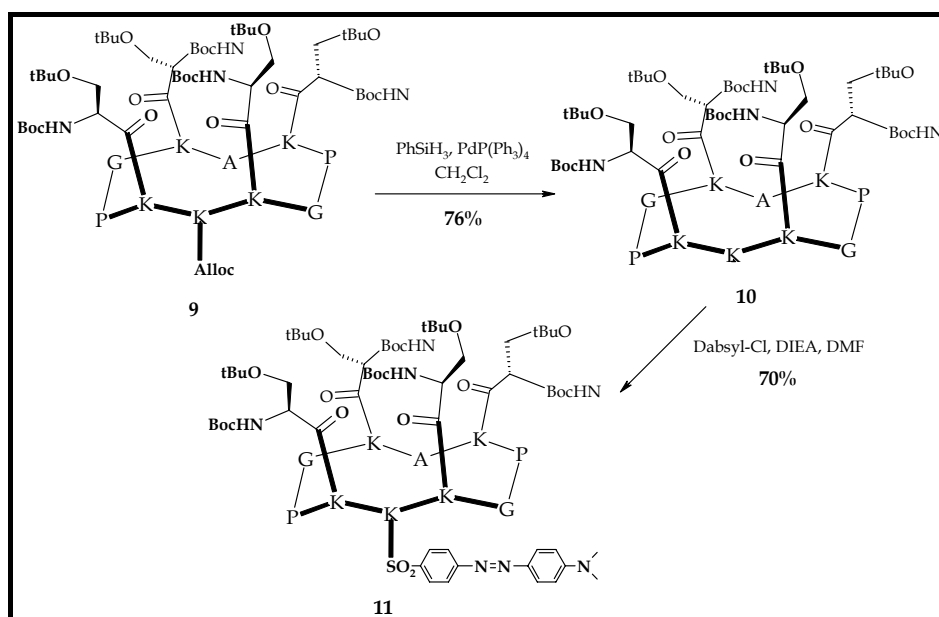


Figure 70 : Fonctionnalisation du domaine effecteur.

e. Oxydation

Les groupements protecteurs –Boc et –tBu présents sur les quatre résidus sérine de la face supérieure du châssis sont éliminés par acidolyse à l'aide d'une solution à 95 % de TFA (en présence de piègeurs de carbocations, l'eau et le TIS, à hauteur de 2,5 %). Puis, l'oxydation des fonctions 1,2-aminoéthanol des quatre résidus sérine libres s'effectue en présence de périodate de sodium dans de l'eau millipore pendant une heure à température ambiante. Le peptide **12** est alors purifié par CLHP semi-préparative et obtenu sous forme d'une poudre rouge avec un rendement de 83%. Le rendement global pour cette synthèse est de 35%.

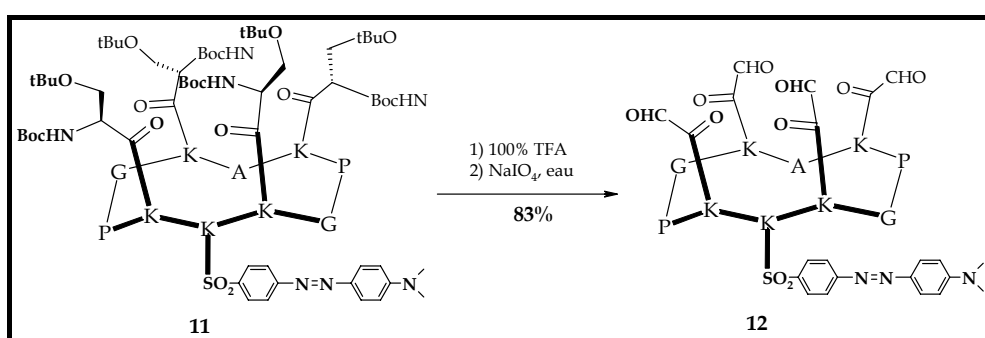


Figure 71 : Formation des aldéhydes glyoxyliques.

B. Les motifs peptidiques

L'ensemble des fragments peptidiques décrits ci-après, et nécessaires à la formation des différentes banques de produits, a été synthétisé par SPPS classique de stratégie

Fmoc/*t*Bu, manuelle ou automatisée puis fonctionnalisé par le Boc-aminoxysuccinimide sur leur extrémité N-terminale.

1. Design des peptides linéaires

Les quatre séquences des peptides linéaires ont été élaborées dans le but de former par la suite, à l'aide des banques de peptides, des mimes de récepteur. Plus particulièrement, notre objectif était de mimer le récepteur G-couplé de l'hormone GnRH. Ce projet de recherche constitue le prolongement de travaux effectués au sein du laboratoire^[164] et en collaboration avec l'équipe du professeur R. P. Millar, M.R.C. Unit for Molecular Endocrinology à Edinburgh, Ecosse.

L'hormone peptidique de la GnRH (GonadotropinR-Releasing Hormon) est sécrétée par les neurones au niveau de l'hypothalamus. Elle est responsable de la libération d'hormones de la reproduction par l'hypophyse, les gonadotrophines LH et FSH. D'autre part, sa structure décapeptidique est partagée par l'ensemble du monde animal et est représentée dans la Figure 72.

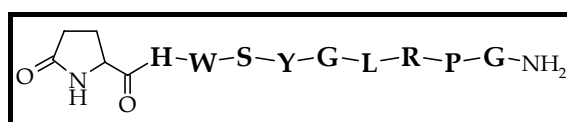


Figure 72 : Séquence peptidique de la GnRH.

La GnRH agit sur les cellules cibles par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G. En se fixant sur la face externe de son récepteur, la GnRH active ce dernier après avoir été reconnue spécifiquement au niveau de son site de liaison. Cette reconnaissance est basée sur le principe de complémentarité de forme. Diverses études, concernant le récepteur de cette hormone, a conduit à l'identification de différents acides aminés clef dans la reconnaissance entre la GnRH et son récepteur. En particulier, les résidus Asp⁹⁸, Asn¹⁰², Lys¹²¹ ou Asp³⁰², présents sur les boucles EC1 et EC3 du récepteur, sont fortement impliqués dans la reconnaissance entre le récepteur et son ligand. La description de la GnRH et de son récepteur est plus largement développée dans le premier paragraphe du chapitre III.

C'est donc à partir de ces acides aminés clef et de leur environnement que nous avons décidé de la séquence des quatre peptides linéaires décrits ci-après. Notamment, les séquences

¹⁶⁴ Thèse de Mélanie Figuet. . "Conception et construction sur châssis cyclopeptidique de molécules reconnaissant le GnRH ou son récepteur G-couplé – Nouvelles méthodes d'incorporation de thiazolidines, mimes de la proline." *Université Joseph Fourier – Grenoble I*, **05/12/04**, LEDSS.

–Lys-Ser-Asp- et –Lys-Ser-Asp-Phe-Asn- nous sont apparues comme étant si importantes dans la reconnaissance que nous les avons utilisées 3 et 2 fois respectivement.

Par ailleurs, toutes les séquences présentent le résidu Glycine, fonctionnalisé oxyamine, en fin de chaîne, ceci pour deux raisons. La première est que ce résidu agit comme espaceur entre la matrice RAFT et les peptides. La seconde est que l'on peut ainsi envisager que les quatre séquences formeront le lien éther d'oxime de façon comparable avec la matrice lors de la réalisation des banques. De cette manière, nous pensons obtenir des mélanges de produits non biaisés car issus de précurseurs aux réactivités comparables. L'adressage d'une séquence ne devrait donc pas être privilégiée par rapport à une autre.

Enfin, ces séquences ont été choisies pour posséder des longueurs, masses et temps de rétention en CLHP différents. Ceci devrait par la suite faciliter la caractérisation des banques de produits formées.

2. Synthèse des peptides linéaires

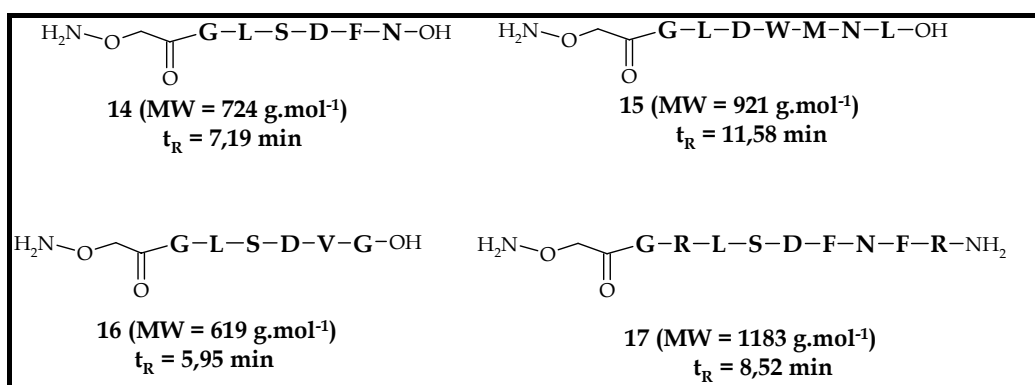


Figure 73 : Séquences, masses moléculaires et temps de rétention des peptides 14, 15, 16 et 17 (C₁₈, Nucleosil, 30/4, 120 Å, 204 et 250 nm, gradient 5 à 60% B en 15 minutes).

La fonctionnalisation N-terminale de ces quatre peptides s'effectue sur phase solide, après déprotection du groupement Fmoc terminal, en présence d'un équivalent de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique et 3 à 4 éq. de DIEA (pH 8-9). La réaction s'effectue dans du DMF durant 30 minutes à température ambiante.

Nous avons effectué une première synthèse lors de laquelle les peptides 14 et 15 furent obtenus en présence de produits secondaires présentant deux motifs oxyamines. C'est lors de la fonctionnalisation du peptide par le Boc-aminoxysuccinimide qu'il est possible d'obtenir deux motifs oxyamine sur le même peptide. Lors de cette étape, le pH doit être contrôlé souvent et de façon précise, ce qui peut engendrer des erreurs de synthèse. D'autre part, pour des raisons d'encombrement stérique, cette dernière fonctionnalisation est laborieuse et doit souvent être répétée. Il est donc possible qu'une réaction secondaire de bisfonctionnalisation

ait lieu avant que l'ensemble des peptides en élancement ait pu être fonctionnalisé une fois, comme l'explique la Figure 74.

Nous avons choisi d'utiliser l'acide tertbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique **25** commercial comme précurseur du réactif **13**. Ce dernier est facilement préparé en présence de DCC et de N-Hydroxysuccinimide dans le mélange Acétate d'éthyle/Dioxane 50:50. Après 5 heures d'agitation à température ambiante, le DCU formé est éliminé par filtration et l'ester activé **13** est obtenu après extraction avec un rendement de 74 %.

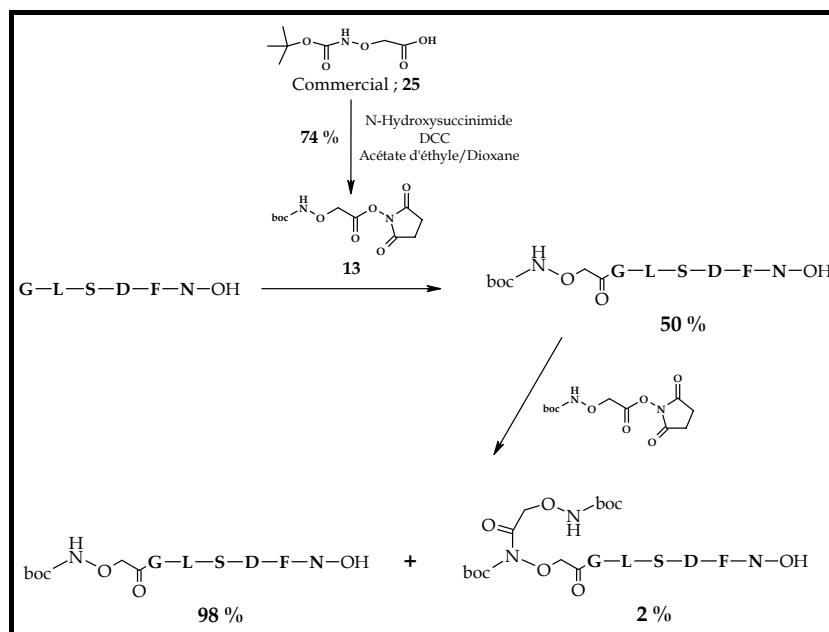


Figure 74 : Formation des produits secondaires observés en masse par la suite.

Il est à noter que l'avancement de cette réaction est suivi par CLHP, mais ces produits secondaires ayant des temps de rétention similaires aux produits attendus, il était impossible d'en observer leur formation puis de les séparer des produits attendus. La synthèse a donc été réitérée.

Les peptides sont ensuite décrochés de la résine et déprotégés sur leurs chaînes latérales par traitement répété à l'acide avec une solution de TFA et des « scavengers » appropriés. Les séquences **14** et **16** ne présentent pas de résidus à problème lors du traitement à l'acide, on utilise donc une solution à 95 % de TFA en présence de 2,5 % d'eau et 2,5 % de TIS. En revanche, les séquences **15** et **17** présentent des résidus Trp, Met et Arg, on utilisera donc pour les décrocher une solution à 81,5 % de TFA en présence de 5 % de Thioanisole, 5 % de Phénol, 5 % d'eau, 2,5 % d'EDT et 1 % de TIS.

Après précipitation et lavages à l'éther puis purifications par CLHP semi-préparative, les produits furent caractérisés par spectrométrie de masse et obtenus sous forme de poudres blanches avec des rendements globaux de 58% à 78%.

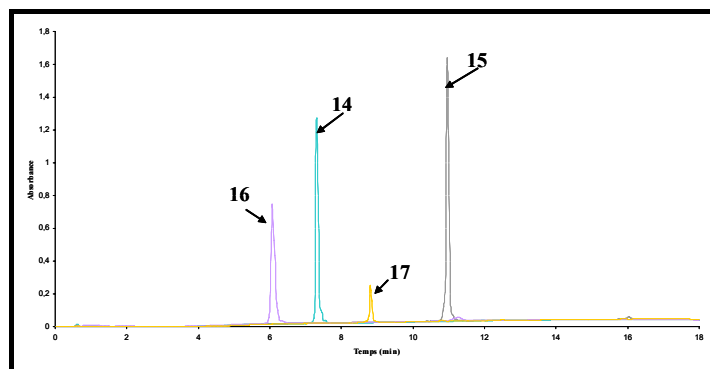


Figure 75 : Profil CLHP analytique observé à 214 nm des quatre séquences (C₁₈, Nucleosil, 30/4, 120 Å, 214 et 250 nm, gradient de 5 à 60 % de B en 15 minutes).

3. Design des peptides cycliques

Notre idée était donc de réaliser quatre séquences peptidiques aux propriétés diverses (charges, hydrophobicité...) mais conformationnellement contraintes, ce qui a impliqué la synthèse de peptides cycliques. Les quatre séquences des peptides ont été élaborées dans le but de former d'une façon générale des mimes de surface (récepteur ou anticorps par exemple) à l'aide des banques de peptides.

Nous nous sommes pour cela inspirés des travaux de Hamilton *et coll.*^[165] sur la synthèse d'inhibiteurs de l' α -chymotrypsine. Lors de leur étude, ils ont synthétisé trois peptides contraints qu'ils ont greffés sur un châssis calix[4]arène. Le premier de ces peptides était chargé positivement (lysines), le second négativement (acides aspartiques) et le troisième présentait un résidu cationique et un autre anionique.

Nous avons ainsi repris les deux premières séquences et avons élargi l'étude en synthétisant également une séquence aux propriétés hydrophobes (phénylalanines) et une quatrième séquence présentant des résidus sérine, formant des liaisons H. La diversité des propriétés de ces séquences devrait ainsi nous permettre d'obtenir des banques de produits aux propriétés combinées élargissant ainsi les cibles biologiques sur lesquelles nous pourrions travailler par la suite.

Par ailleurs, nous avons introduit deux résidus Glycine en bout de chaîne pour les mêmes raisons que lors de la synthèse des peptides linéaires à savoir leur fonction d'espaceur et une réactivité que nous souhaitons comparable.

Enfin, la cyclisation s'effectuera par formation d'un pont disulfure entre les deux résidus cystéine de chaque séquence. C'est une méthode intéressante pour plusieurs raisons :

¹⁶⁵ H. S. Park, Q. Lin, A. D. Hamilton. "Protein surface recognition by synthetic receptors : a route to novel submicromolar inhibitors for α -chymotrypsin." *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 120, 8-13.

c'est une méthode connue qui est réalisable à la fois en solution et sur support solide. Ceci présente l'avantage de trouver différents modes opératoires dans la littérature et de les adapter à nos séquences. D'autre part, nous prévoyons de synthétiser des banques de peptides cycliques dont nous changerions aléatoirement les quatre acides aminés à l'intérieur du cycle. Ainsi, une cyclisation sur support solide du peptide linéaire devrait nous permettre d'obtenir, après décrochage de la résine, des produits directement utilisables pour des couplages sur châssis et la formation de nouvelles banques de composés.

4. Synthèse des peptides cycliques

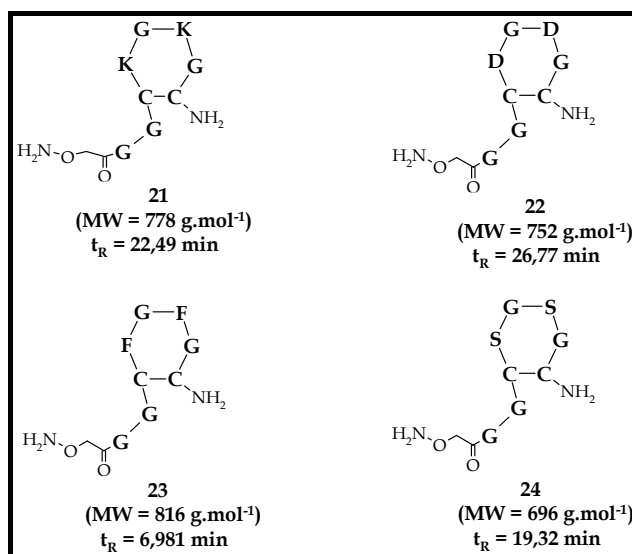


Figure 76 : Séquences, masses moléculaires et temps de rétention des peptides 21, 22, 23 et 24

(C₁₈, Nucleosil, 250/4.6, 100 Å, 204 et 250 nm, gradient 0% B pendant 5 min puis 0 à 10%B en 30 minutes pour 21, 22 et 24 ; gradient 5 à 100 %B en 15 minutes pour 23).

a. Formation des ponts disulfure

Il existe deux stratégies de formation de liaisons disulfure sans utilisation de groupements spécifiques comme le NPys par exemple, à savoir les stratégies en solution et sur phase solide.

⇒ Stratégie en solution

Tout d'abord, il est important de noter qu'il faut se placer dans un milieu très dilué afin de minimiser la formation de dimères ou d'oligomères.

Il existe différentes méthodes de formation de ponts disulfures en solution *via* l'utilisation de différents agents d'oxydation^[166,167]. Nous nous sommes plus particulièrement penchés sur l'oxydation par l'air ou en présence de DMSO.

¹⁶⁶ H. Shih. "New approaches to the synthesis of cystine peptides using *N*-iodosuccinimide in the construction of disulfide bridges." *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 3003-3008.

Il est décrit dans la littérature^[168] que la façon la plus simple d'obtenir une liaison disulfure est de se placer dans l'eau, à pH légèrement basique, et de faire buller de l'air dans la solution, la réaction se produisant alors comme dans la Figure 77. Malgré tout, cette méthode simple ne donne que de faibles rendements par rapport à une oxydation en présence de DMSO. Les auteurs attribuent cela à l'effet de solvant du DMSO. En effet, en absence de DMSO, la formation de feuilletts β est favorisée dans certains peptides, ce qui conduit à des agrégations... Après différentes études de pH et de teneur en DMSO sur plusieurs peptides, l'équipe a conclut que la teneur optimale en DMSO était de 20% pour un pH de 6 et une concentration en peptide de 0,5 à 1 mg.mL⁻¹. Dans ces conditions, le temps de réaction varie entre 30 minutes et 4 heures à 25°C tandis qu'avec une solution ne contenant que 1% de DMSO, le temps de réaction à 25°C est de 7 heures^[169]. La Figure 77 montre le mécanisme de la réaction en présence de DMSO.

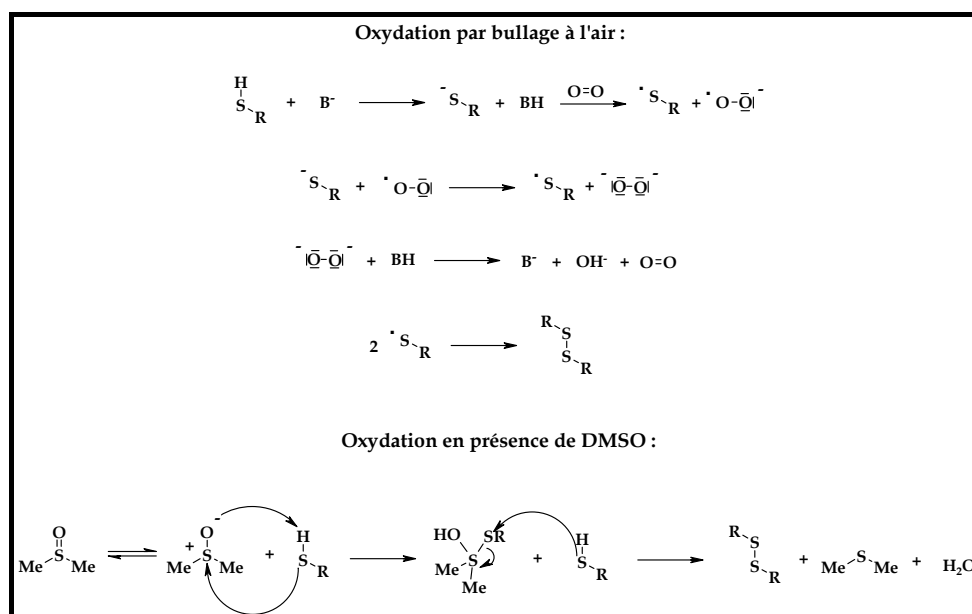


Figure 77 : Mécanismes d'oxydation des thiols en solution, à l'air et en présence de DMSO.

⇒ Stratégie sur phase solide

Une premier exemple de stratégie sur phase solide est de se placer dans des conditions comparables à celles utilisées en solution en présence d'air. Dans ce cas, les cystéines doivent comporter des groupements protecteurs comme l'acétamidométhyle (Acm) ou le

¹⁶⁷ A. Adeva, J. A. Camarero, E. Giralt, D. Andreu. "Boc-S-methylbenzyl-(S)-2-amino-6-mercaptohexanoic acid : preparation and application to the synthesis of a large cyclic disulfide peptide." *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 3885-3888.

¹⁶⁸ J. P. Tam, C.-R. Wu, W. Liu, J.-W. Zhang. "Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications." *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6657-6662.

¹⁶⁹ M. C. Munson, G. Barany. "Synthesis of α -Conotoxin SI, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges : illustration of novel protection schemes and oxidation strategies." *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10203-10210.

fluorenylméthyle (Fm). On se place alors à température ambiante dans le DMF en présence de pipéridine à 20 % pendant 2 heures puis à 2% pendant la nuit avec de l'air comprimé bullant dans la solution^[170].

Un autre exemple est d'utiliser 5 à 15 éq. de I₂ dans le DMF ou CHCl₃ ou Méthanol pendant une heure. La résine doit ensuite être rincée plusieurs fois avec du DCM, du DMF et une solution contenant de l'eau à 20 %^[171].

La Figure 78 présente les mécanismes des deux méthodes citées ci-dessus.

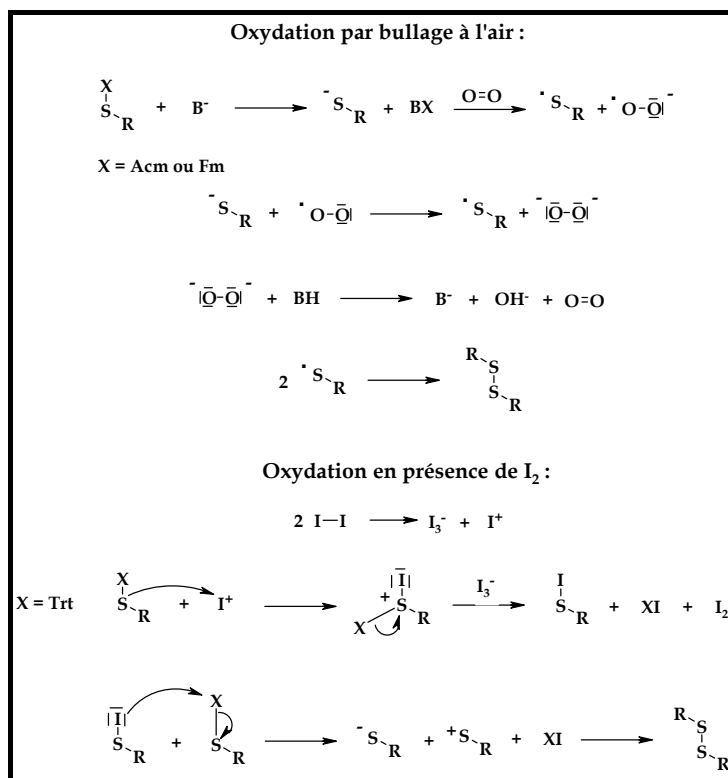


Figure 78 : Mécanismes d'oxydation des thiols sur phase solide, à l'air et en présence d'iode.

b. Problèmes rencontrés lors des synthèses

⇒ Synthèse sur résine Rink Amide MBHA[®]

Les peptides furent synthétisés par synthèse SPPS manuelle ou automatisée classique en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu.

La fonctionnalisation N-terminale des peptides s'effectue, après déprotection du groupement Fmoc terminal, en présence d'un équivalent de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique et 3 à 4 éq. de DIEA (pH 8-9). La réaction s'effectue dans du DMF durant 30 minutes à température ambiante.

¹⁷⁰ J. A. Camarero, E. Giralt, D. Andreu. "Cyclization of a large disulfide peptide in the solid phase." *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 1137-1140.

¹⁷¹ M. C. Munson, C. Garcia-Echeverria, F. Albericio, G. Barany. "S-2,4,6-Trimethoxybenzyl (Tmob) : a novel cysteine protecting group for the N^ε-9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy of peptide synthesis." *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 3013-3018.

La cyclisation à l'iode sur phase solide étant infructueuse, les peptides sont décrochés de la résine et déprotégés sur leurs chaînes latérales par traitement répété à l'acide avec une solution à 95% de TFA et des « scavengers » appropriés (TIS et H₂O). Après précipitation et lavages à l'éther, les peptides sont purifiés par CLHP semi-préparative.

On effectue alors la cyclisation des produits en solution dans l'eau à une concentration de $1,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.mL}^{-1}$.

Pour le produit **21**, nous avons utilisé la simple technique d'oxydation des thiols à l'air en laissant buller de l'air comprimé dans la solution d'eau basifiée à pH 8-9 avec de la DIEA. Après une nuit de réaction, la solution est lyophilisée pour donner le peptide sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 69%.

En ce qui concerne le peptide **22**, la cyclisation par oxydation à l'air fut problématique car après une nuit de réaction, nous avons observé un produit majoritaire possédant une masse supérieure de 67 à celle attendue. Ce phénomène pourrait être attribué à la condensation d'un produit de masse 86 g.mol^{-1} présent dans l'air que nous avons mis à buller dans le mélange réactionnel, un aldéhyde par exemple.

Nous avons donc réitéré la synthèse du peptide **22** et effectué sa cyclisation en utilisant de l'eau contenant 20% de DMSO, évitant ainsi l'utilisation d'air comprimé. Le mélange réactionnel est tamponné à pH 6 à l'aide d'ammoniaque et d'acide acétique. Après une nuit d'agitation à température ambiante, la réaction est terminée. La solution est alors lyophilisée, mais la présence de DMSO en grandes quantités empêche une lyophilisation complète, le produit est alors purifié par CLHP semi-préparative pour donner une poudre blanche avec un rendement global de 3%. Ce faible rendement peut être attribué à une précipitation du peptide sur la colonne lors de la purification.

Face à ces difficultés de synthèse, nous avons développé une nouvelle stratégie que nous avons appliquée aux quatre séquences.

⇒ Synthèse sur résine Sieber amide[®]

Cette résine permet d'obtenir des peptides présentant une fonction amide en leur extrémité N-terminale d'une part et d'autre part, le peptide se décroche avec une solution contenant 1% de TFA. Ceci présente le gros avantage de pouvoir décrocher le peptide tout en le laissant protégé en solution.

Nous avons donc tout d'abord effectué une élongation classique des quatre séquences sur support solide. Par la suite, nous avons réalisé la cyclisation des peptides via la formation

d'un pont disulfure entre les deux cystéines de la séquence en présence de I₂ dans le DMF après avoir effectué une déprotection Fmoc de la dernière glycine. Par la suite, le peptide est coupé de la résine avec une solution à 1% de TFA dans le dichlorométhane puis fonctionnalisé dans le DMF en présence de Bocaminooxysuccinimide.

Cette dernière réaction s'effectuant de manière très laborieuse pour le peptide **23**, nous avons alors décidé d'utiliser la stratégie inverse qui consiste à fonctionnaliser le peptide immédiatement après la déprotection du groupement Fmoc puis le cycliser pour enfin le couper de la résine. On obtient ainsi par cette méthode les quatre peptides sous forme de poudre blanche avec des rendements corrects de l'ordre de 35%. La Figure 79 résume les différentes stratégies de synthèses utilisées.

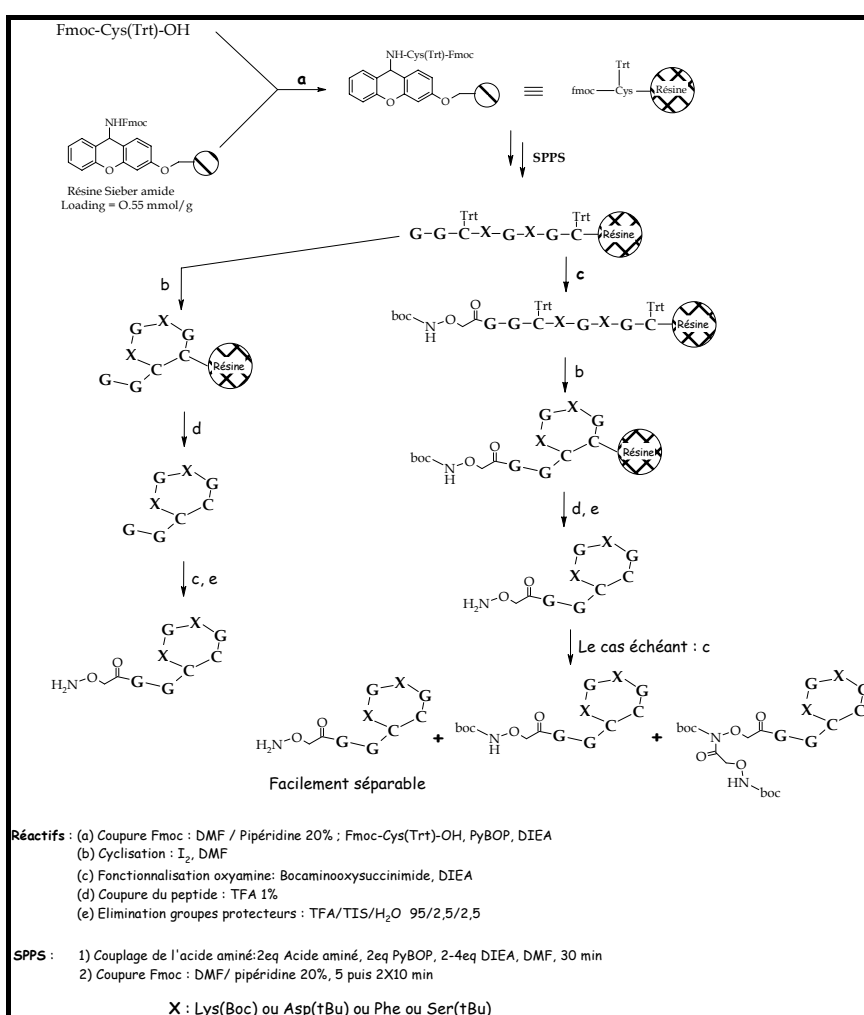


Figure 79 : Synthèse des quatre peptides cycliques 21, 22, 23 et 24.

D'autre part, la Figure 80 montre les chromatogrammes CLHP des quatre peptides. A gauche, il s'agit d'une co-injection des peptides **21**, **22** et **24** dans un gradient de 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10 % B pendant 30 minutes. A droite, il s'agit du peptide **23** injecté de 5 à 100 %B en 15 minutes.

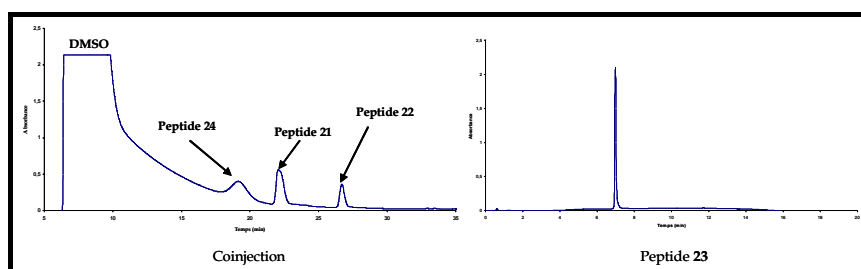


Figure 80 : Profils CLHP analytique des quatre séquences, observé à 214 nm (C₁₈, Nucleosil, 250/4.6, 100 Å, 214 et 250 nm).

La synthèse des différents peptides doit pouvoir s'effectuer de façon à obtenir des produits extrêmement purs étant donné qu'ils serviront par la suite à la formation de banques de produits. En considérant ce dernier point, il apparaît logique que si les banques sont formées à partir de mélanges de produits non purs à 100%, ces dernières seront bien différentes de ce que nous attendons. Ceci justifie donc pourquoi nous avons pris un tel soin à la synthèse des huit peptides décrits plus haut.

En résumé...

L'accès chimique à des macromolécules homogènes de haut poids moléculaire est relativement difficile et requiert des stratégies d'assemblage élaborées. En particulier, les méthodes d'assemblages de plusieurs peptides sont rendues compliquées par l'utilisation de groupements protecteurs orthogonaux. Les techniques de conjugaisons chimiosélectives offrent une alternative de synthèse intéressante car elles reposent sur l'assemblage convergent de fragments portant deux fonctions chimiques complémentaires et donnant lieu à une réaction spécifique (pas de réactifs supplémentaires, pas de groupements protecteurs, peu de réactions secondaires). Plus particulièrement, la formation de liens oximes présente, outre une excellente chimiosélectivité, une flexibilité (possibilité d'assembler des motifs de diverses natures) adaptée à notre approche.

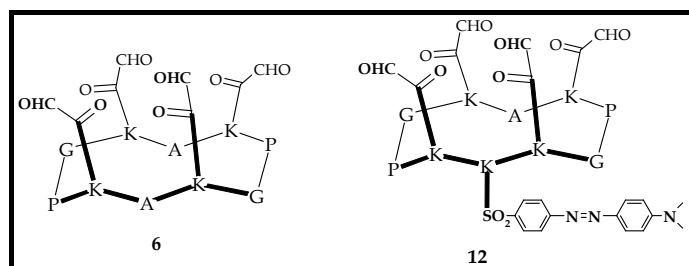
Celle-ci repose sur une méthodologie convergente permettant la formation d'édifices moléculaires à présentation multiple, à partir de :

- ✿ L'utilisation de matrices cyclodécapeptidiques orthogonalement protégées (RAFT) pour l'assemblage indépendant et régiosélectif de motifs peptidiques de reconnaissance ;*
- ✿ La synthèse de divers synthons peptidiques purs ou « blocs d'assemblages » en vue d'un assemblage combinatoire sur châssis ;*
- ✿ La formation de liaisons oximes entre la matrice et les synthons.*

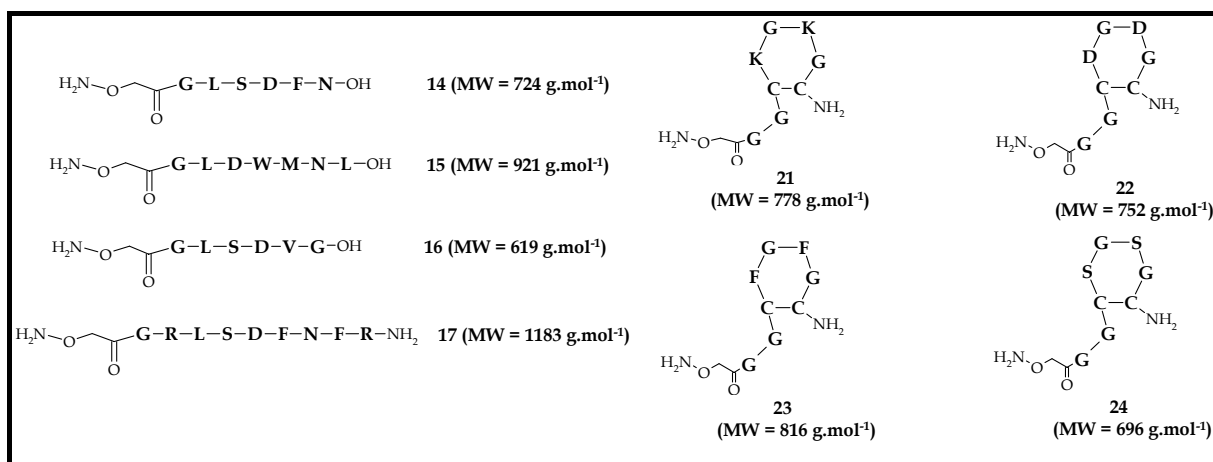
Nous avons donc réalisé la synthèse de plusieurs matrices (monofaces ou chromophores).

D'autre part, nous avons développé et optimisé la synthèse de quatre peptides linéaires aux séquences choisies initialement pour cibler un récepteur hormonal. Ces synthons furent assemblés de manière à obtenir des « blocs d'assemblages » de différentes longueurs et poids moléculaires afin de faciliter leur identification par spectrométrie de masse une fois assemblés sur la matrice. Enfin, nous avons mis au point la synthèse de quatre autres peptides conformationnellement contraints aux propriétés de charges et d'hydrophobicité diverses. Leur cyclisation s'est faite sur support solide via la formation d'un pont disulfure. Chacune de ces huit séquences présente un ou deux résidus glycine en bout de chaîne. C'est ce dernier qui portera la fonction oxyamine. Ce résidu présente le double avantage de constituer un bras espaceur pour la présentation des motifs de reconnaissance ainsi que de conférer aux huit séquences des propriétés de réactivité comparables lors de la formation du lien oxime chimiosélectif.

✿ Les matrices :



✿ Les huit séquences d'assemblage :



CHAPITRE II

-

ASSEMBLAGE COMBINATOIRE ET DESCRIPTION DES BIBLIOTHEQUES

I. Stratégie de synthèse

Lors de cette étude, nous avons assemblé de façon aléatoire quatre séquences peptidiques différentes sur les matrices. Dans ce but, nous avons donc réalisé différents mélanges réactionnels contenant un à quatre peptides que nous avons assemblés sur la face supérieure du RAFT.

Ainsi, pour chaque bibliothèque réalisée, nous avons utilisé 1 équivalent en RAFT que nous avons mis en présence avec une totalité de 12 équivalents en substituants. C'est-à-dire que pour la banque « mère », nous avons préparé une solution contenant trois équivalents de chaque peptide que nous avons ajouté à la matrice RAFT. Par la suite, nous avons réalisé l'assemblage combinatoire des sous-éléments de la bibliothèque « mère » en omettant un substituant de façon permutatonnelle à chaque nouvelle réaction. Nous avons ainsi synthétisé 11 banques de produits en plus des quatre assemblages de motifs identiques sur les quatre sites de fixation de la matrice, réalisant ainsi 15 ensembles définis.

A. Etudes préliminaires

Les études préliminaires se sont effectuées sur l'assemblage des peptides linéaires sur la matrice RAFT à deux domaines présentant le colorant dabsyl.

1. Conditions de réaction

Les premières conditions de réactions se sont réalisées de façon classique c'est-à-dire que les réactifs ont été solubilisés dans une solution tampon acétate de sodium afin de se placer à pH = 4,6. La réaction étant relativement lente à température ambiante (~ 30 heures), nous avons réalisé la même réaction dans un tampon acétate d'ammonium afin d'en accélérer la réaction. En effet, comme le montre la Figure 81-A, le contre-ion NH_4^+ , présent dans le tampon acétate d'ammonium, est une source de protons supplémentaire par rapport à l'acétate de sodium. Ceci qui pourrait accélérer la réaction d'élimination, étape limitante de la formation d'éther d'oxime. En effet, le mécanisme de formation d'une liaison éther d'oxime à partir d'un dérivé carbonyle et d'un éther d'oxyamine fait intervenir deux étapes^[172] (cf. Figure 81-B). L'addition du composé nucléophile sur le carbonyle conduit à la formation

¹⁷² W. P. Jencks. "Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation." *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 475-481.

d'un intermédiaire carbinolamide qui se déshydrate pour donner l'éther d'oxime. Cette seconde étape est favorisée à pH acide. De manière générale, des études ont montré que le pH optimum de la formation de l'éther d'oxime est voisin de 4.

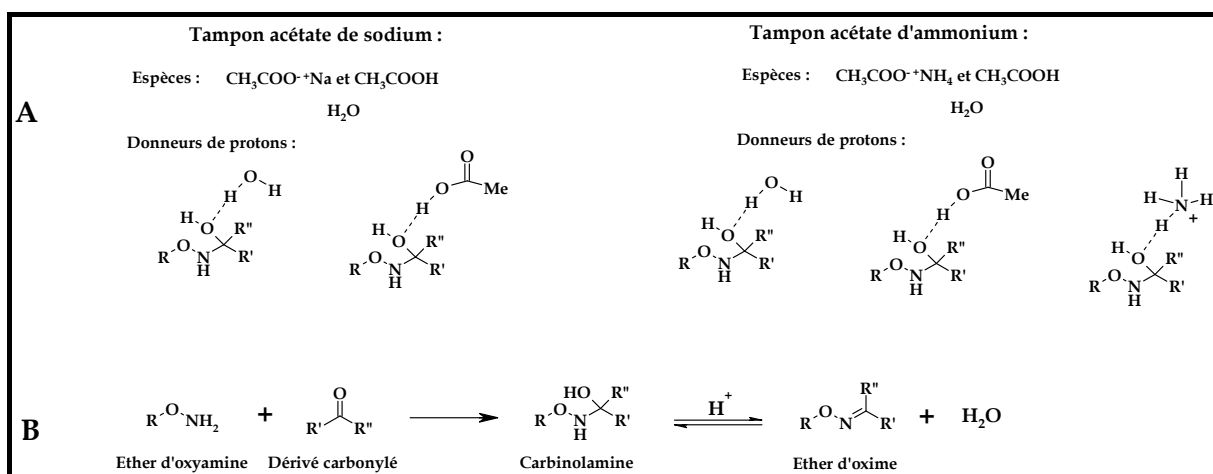


Figure 81 : Comparaison de réactivité des tampons acétate de sodium et d'ammonium (A) ; Mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime.

Avec cette méthode, nous avons sensiblement amélioré les temps de réaction qui sont passés d'environ 30 heures à 24 heures. Nous avons alors songé à chauffer le mélange réactionnel à 45 °C. La réaction a été encore accélérée pour ne plus durer que 10 heures.

Dans tous les cas, nous avons été confrontés à des problèmes de solubilité lors de la réaction. Malgré des efforts de dilution ou d'essais de réaction en présence d'acétonitrile, nous ne sommes pas parvenus à réaliser les banques de produits sans qu'il y ait de précipitation dans le milieu. Ceci pourrait porter préjudice à la distribution de la bibliothèque, aussi bien lors de sa synthèse que lors de sa caractérisation...

2. Conditions de purification

Etant donné que la réaction s'effectue avec un large excès en substituant (12 équivalents par rapport à la matrice), le mélange doit donc être purifié une fois que le profil CLHP n'évolue plus.

La première méthode que nous avons utilisée fut la purification sur colonne CLHP. Cette approche est simple et facile à mettre en œuvre étant donné qu'il s'agit de la méthode de purification la plus employée au sein de l'équipe. Néanmoins, elle présente plusieurs désavantages.

Tout d'abord, elle était applicable dans ce cas précis étant donné qu'il y avait une grande différence de temps de rétention entre le substituant le moins polaire et la matrice présentant les quatre motifs les plus polaires. Il apparaît logique que dans le cas où il y aurait

un chevauchement ou des inversions entre les matrices du mélange et les produits de départ, une telle méthode de purification ne serait pas envisageable...

Ensuite, cette méthode présente le risque de biaiser la distribution du mélange final. En effet, la concentration des produits au sein des mélanges n'est pas la même puisqu'elle est fonction du nombre d'isomères de position pour chaque espèce. D'autre part, les coefficients d'extinction molaire des substituants peuvent engendrer des produits difficilement détectables en UV. La combinaison de ces deux paramètres peut donc donner des produits, présents au sein du mélange, mais à peine détectables en UV à la dilution requise lors de la purification. Il est donc possible de perdre des produits des bibliothèques...

Par ailleurs, après avoir effectué la purification des quinze ensembles, ceux-ci ne présentaient pas toujours des profils CLHP analytique satisfaisants (pieds de pics). C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de changer de stratégie de synthèse.

B. Résolution des problèmes

1. Pureté des produits de départ

Nous avons tout d'abord réalisé la synthèse des quatre séquences peptidiques linéaires. En effet, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, les quatre substituants à l'origine des banques de produits doivent être d'une extrême pureté afin d'obtenir des mélanges caractérisables et utilisables par la suite.

Ces travaux ont été réalisés avec l'aide de V. Duléry lors de sa première année de thèse au sein de notre laboratoire.

2. Problèmes de solubilité

Dans le but de régler les problèmes de solubilité des produits formés lors des réactions de couplage, nous avons décidé de nous placer dans le DMSO tout en gardant un pH voisin de 4. Pour cela, chacun des quatre peptides de départ fut solubilisé dans 100 % de DMSO, à une concentration de 10 mg.mL⁻¹. La matrice quant à elle fut solubilisée dans 100 % de solvant A, à une concentration de 10 mg.mL⁻¹.

Cette méthode fut concluante dans le sens où nous n'avons plus observé de précipitation des produits lors de la formation des mélanges et les temps de rétention furent réduits à environ 3 heures à température ambiante. Ceci peut s'expliquer par le fait que la précipitation des produits dans le milieu pouvait ralentir la réaction ou bien par la présence du DMSO.

D'autre part, les produits ayant été minutieusement contrôlés pour leur pureté, les bibliothèques obtenues présentent des profils CLHP satisfaisants.

3. Problèmes de purification

Nous avons aussi souhaité améliorer les conditions de purifications des bibliothèques afin d'avoir une méthode générale, applicable à tous types de bibliothèques de produits formés. Nous disposions d'une résine fonctionnalisée avec un groupement aldéhyde terminal, soluble dans les solvants aqueux. Etant donné que nous nous trouvions dans de bonnes conditions pour effectuer une liaison éther d'oxime, nous avons utilisé cette résine pour piéger les peptides oxyamine en excès. Pour cela, nous avons rincé plusieurs fois cette résine en la mettant en suspension avec de l'eau puis avons ajouté 400 μ L de cette suspension à chaque mélange. La résine ne supportant pas d'agitation magnétique, nous avons utilisé une méthode mécanique et avons contrôlé la disparition des peptides en excès par CLHP analytique. Cette réaction étant relativement lente, nous avons laissé réagir les mélanges pendant la nuit à température ambiante. Après une dernière injection contrôle en CLHP analytique pour nous assurer que la réaction était terminée, nous avons filtré la suspension sur coton puis avons mis nos produits à lyophiliser. La Figure 82 représente la « bibliothèque mère » ayant été purifiée par cette méthode.

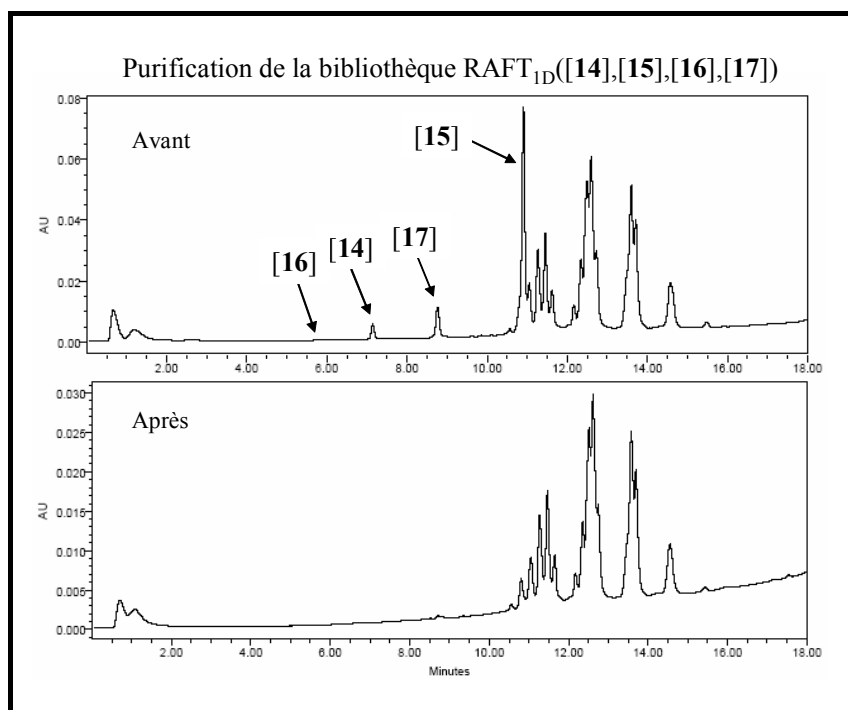


Figure 82 : Représentation de deux chromatogrammes de la même banque avant et après purification avec la résine fonctionnalisée.

II. Aspect théorique de l'approche

Pour réaliser nos banques de produits lors de notre étude, nous avons assemblé jusqu'à quatre séquences peptidiques différentes sur un gabarit présentant quatre sites d'adressage. Les paragraphes suivants décrivent les calculs de distribution des différentes banques et sous-ensembles ainsi que ce que nous prévoyons d'observer lors de l'analyse des mélanges.

A. Nombre de produits

1. Nombre global et sous-ensembles

Si l'on prend en considération l'ensemble des produits qu'il est possible d'obtenir, le nombre total de produits formés au sein de chaque bibliothèque sera égal au nombre de séquences peptidiques mises en jeu, p , exposant le nombre de sites d'ancrage, n , soit p^n . Ici, au plus nous aurons $n = 4$ et $p = 4$ soit un nombre total de produits de 4^4 soit 256.

Au sein de la banque « mère » formée de 256 conjugués, nous avons par exemple différents sous-ensembles constitués de deux substituants. Pour calculer le nombre de sous-ensembles à deux substituants, on peut utiliser les combinaisons.

Rappel : Définition d'une combinaison

E étant un ensemble à n éléments, on appelle combinaison de p éléments de E toute collection non ordonnée de p éléments distincts de E soit toute partie de E à p éléments.

Dans l'exemple présent, l'ensemble E de produits est constitué à partir de $n = 4$ éléments et de $p = 2$, ce qui constitue les sous-éléments à deux ligands. Le nombre de sous-éléments à deux ligands est alors de :

$$C_p^n = \frac{n!}{p!(n-p)!} \quad \text{Ainsi :} \quad C_4^2 = \frac{4!}{2!(4-2)!} = 6$$

Figure 83 : Calcul des combinaisons de produits

Si l'on élargit à présent, de manière fictive, le nombre de substituants à 12 (n), le nombre de sites d'ancrage sur la matrice reste le même, nous aurons donc des combinaisons de sous-éléments à quatre substituants. Soit 495 combinaisons de sous-ensembles formés de 4 substituants donnant un total de produits de 12^4 soit 20736 composés.

Cela montre l'intérêt de maîtriser l'analyse des ensembles formés de quatre substituants. En effet, la matrice ne présentant que quatre sites d'ancrages, c'est vraisemblablement l'analyse d'un ensemble à quatre ligands différents qui sera la plus compliquée. Dans le cas où l'on forme un ensemble à n ligands différents ($n > 4$), on obtiendra un ensemble de n^4 produits. L'ensemble des produits formés correspondra alors à (n-1) combinaisons de banques à quatre ligands différents. Cette méthode présente donc deux intérêts : celui de former tous les produits possibles au sein d'une même banque ainsi que celui de pouvoir identifier ces produits en analysant les (n-1) mélanges formés de quatre ligands différents.

Le Tableau 2 présente le nombre total de produits obtenus au sein de chaque sous-élément :

Banque à :	1 substituant	2 substituants	3 substituants	4 substituants
Nombre de produits formés	1	16	64	256

Tableau 2 : Nombre total de produits dans chaque sous-groupe.

2. Distribution en produits de chaque sous-groupe

L'assemblage combinatoire de quatre séquences peptidiques sur le RAFT forme la banque « mère » constituée de 256 produits différents.

Au sein de ce mélange global, les molécules peuvent être subdivisées en quatre sous-ensembles selon les distributions peptidiques suivantes :

- ⇒ un sous-ensemble comprenant 4 conjugués présentant un seul peptide de type $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}])$;
- ⇒ un sous-ensemble comprenant 84 conjugués présentant deux peptides différents de type $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}],[\mathbf{b}])$;
- ⇒ un sous-ensemble comprenant 144 conjugués présentant trois peptides différents de type $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}],[\mathbf{b}],[\mathbf{c}])$;
- ⇒ un sous-ensemble comprenant 24 conjugués présentant quatre peptides différents de type $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}],[\mathbf{b}],[\mathbf{c}],[\mathbf{d}])$,

donnant ainsi un total de 256 produits différents. Ces quatre sous-ensembles sont représentés dans la Figure 84.

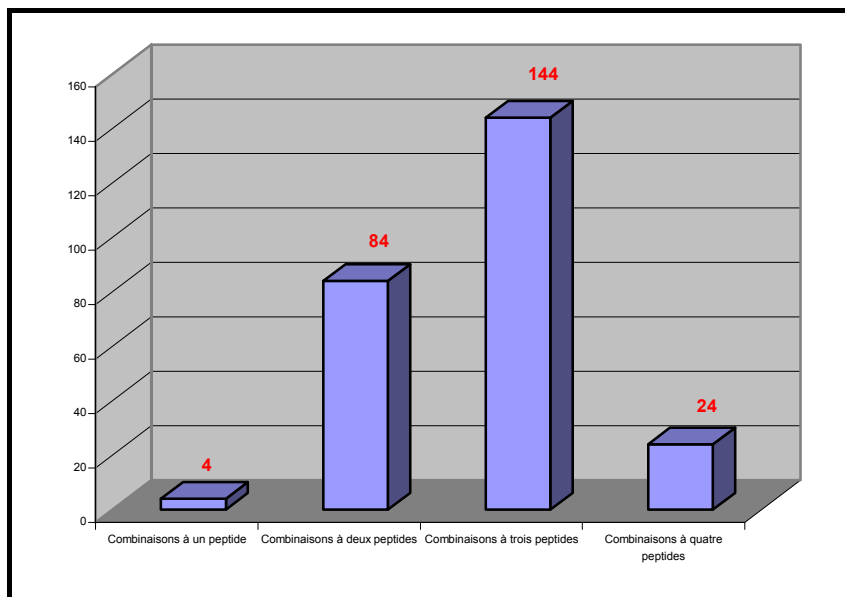


Figure 84 : Nombre total de produits formés avec 1, 2, 3 ou 4 ligands au sein de la banque « mère ».

En effet :

- ⇒ si l'on considère le mélange du RAFT avec une seule des quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** ou **d**, on n'obtiendra qu'un seul produit : celui des quatre ligands identiques greffés sur les quatre sites de fixation du gabarit ;
- ⇒ si l'on considère le mélange du RAFT avec deux des quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** ou **d**, on obtiendra 16 produits constitués de : 2 produits aux quatre ligands identiques ; 6 produits aux ligands disposés de façon 2+2 sur le châssis et 8 produits aux ligands disposés de façon 1+3 sur le châssis ;
- ⇒ si l'on considère le mélange du RAFT avec trois des quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** ou **d**, on obtiendra un ensemble de 81 produits constitués : des matrices appartenant aux trois sous-ensembles résultant de l'assemblage de deux ligands (45 produits) et 36 matrices présentant trois ligands différents. Pour ce dernier type de produits, nous obtenons des matrices aux substituants de type $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}]_2, [\mathbf{b}], [\mathbf{c}])$, $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}], [\mathbf{b}]_2, [\mathbf{c}])$, et $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}], [\mathbf{b}], [\mathbf{c}]_2)$. Chaque type de matrice possédant 12 isomères de position différenciables, cela nous donne donc un total de 36 produits ;
- ⇒ enfin, si l'on considère le mélange du RAFT avec les quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** et **d**, on obtiendra 256 produits constitués des 14 sous-ensembles et de 24 matrices isomères de position présentant les quatre substituants, de type $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{a}], [\mathbf{b}], [\mathbf{c}], [\mathbf{d}])$.

La Figure 85 représente une représentation schématique de la banque « mère » et de la répartition de celle-ci.

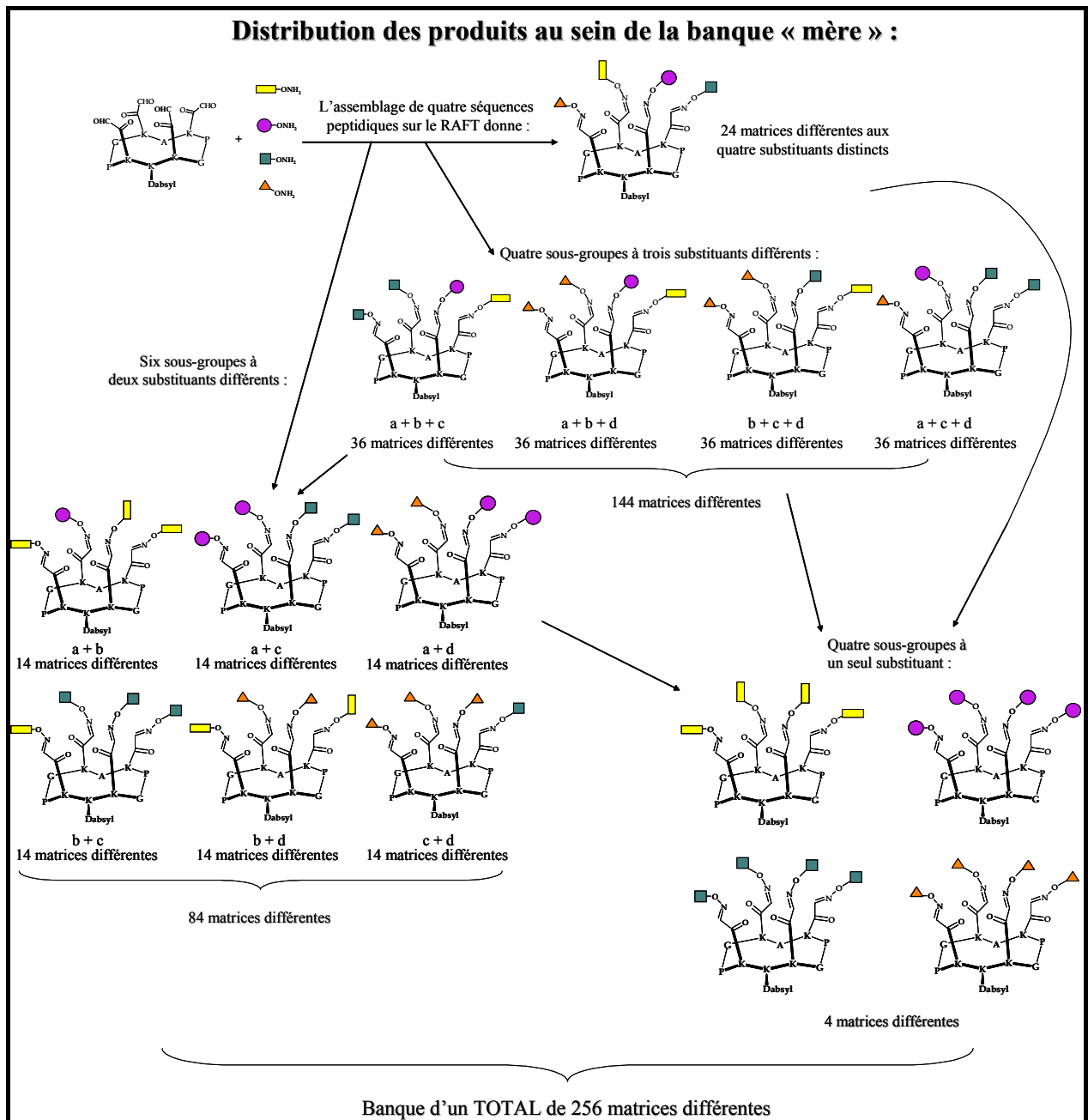


Figure 85 : Représentation de la banque « mère » et de ses sous-ensembles.

3. Cas particulier du gabarit à un domaine

Le RAFT à un domaine constitue un cas particulier à cause de la symétrie de son châssis. Les calculs décrits plus haut concernant la distribution des produits au sein de chaque sous-groupe ne peuvent plus s'appliquer à ce cas précis. En effet, à cause de la symétrie, certains châssis deviennent équivalents et ne peuvent plus être comptabilisés comme de nouveaux produits au sein d'une banque mais comme isomères de position (cf. Figure 86)

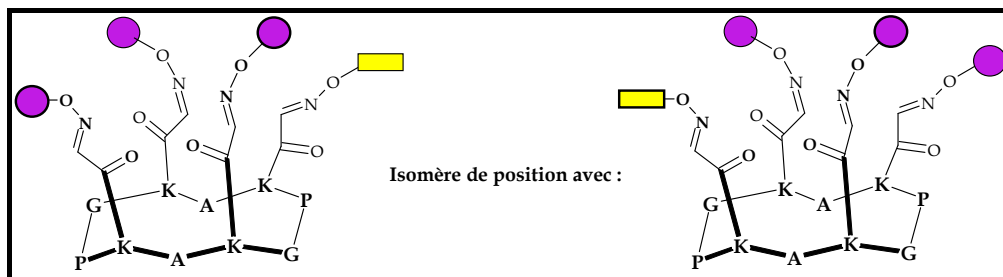


Figure 86 : Châssis symétriques : un seul produits identique, isomère de position.

De cette façon, l'assemblage combinatoire de quatre séquences peptidiques sur le RAFT forme la banque « mère » constituée de 136 produits différents si l'on prend en compte la symétrie du châssis.

En effet, ce mélange global de molécules peut être subdivisé en quatre sous-ensembles selon les combinaisons peptidiques suivantes :

- ⇒ un sous-ensemble comprenant 4 conjugués présentant un seul peptide de type $RAFT_{1D}([a])$;
- ⇒ un sous-ensemble comprenant 48 conjugués présentant deux peptides différents de type $RAFT_{1D}([a],[b])$;
- ⇒ un sous-ensemble comprenant 72 conjugués présentant trois peptides différents de type $RAFT_{1D}([a],[b],[c])$;
- ⇒ un sous-ensemble comprenant 12 conjugués présentant quatre peptides différents de type $RAFT_{1D}([a],[b],[c],[d])$,

donnant ainsi un total de 136 produits différents. C'est ce que montre la Figure 87.

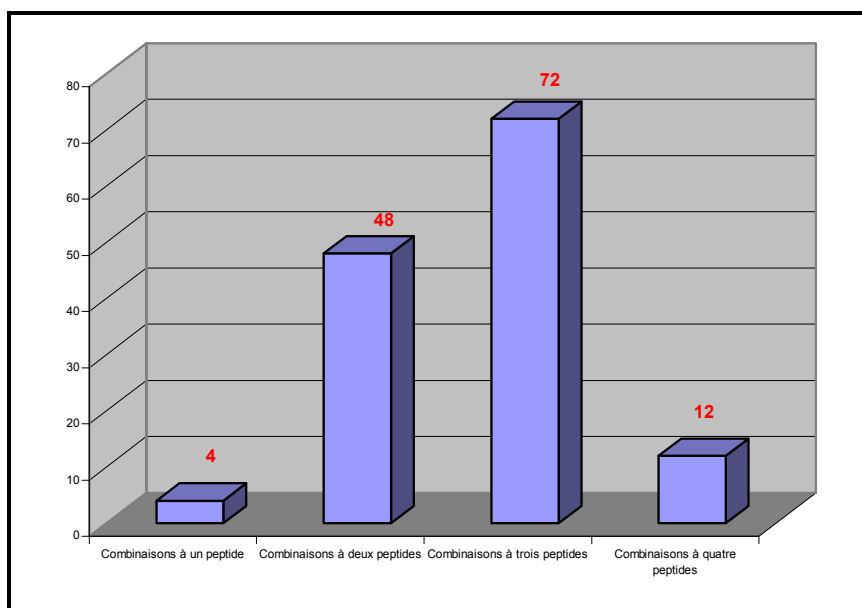


Figure 87 : Nombre total de produits formés avec 1, 2, 3 ou 4 ligands au sein de la banque « mère ».

Plus précisément,

- ⇒ si l'on considère le mélange du RAFT avec un seul des quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** ou **d**, on n'obtiendra qu'un seul produit : celui des quatre ligands identiques greffés sur les quatre sites de fixation du gabarit ;
- ⇒ si l'on considère le mélange du RAFT avec deux des quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** ou **d**, on obtiendra 10 produits constitués de : 2 produits aux quatre ligands identiques ; 4 produits aux ligands disposés de façon 2+2 sur le châssis et 4 produits aux ligands disposés de façon 1+3 sur le châssis ;
- ⇒ si l'on considère le mélange du RAFT avec trois des quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** ou **d**, on obtiendra un ensemble de 45 produits constitués : des matrices appartenant aux trois sous-ensembles résultant de l'assemblage de deux ligands (27 produits) et 18 matrices présentant trois ligands différents. Pour ce dernier type de produits, nous obtenons des matrices aux substituants de type $\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{a}]_2, [\mathbf{b}], [\mathbf{c}])$, $\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{a}], [\mathbf{b}]_2, [\mathbf{c}])$ et $\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{a}], [\mathbf{b}], [\mathbf{c}]_2)$. Chaque type de matrice possédant 6 isomères de position différenciables, cela nous donne donc un total de 18 produits ;
- ⇒ enfin, si l'on considère le mélange du RAFT avec les quatre séquences peptidiques **a**, **b**, **c** et **d**, on obtiendra 136 produits constitués des 14 sous-ensembles et de 12 matrices isomères de position présentant les quatre substituants, de type $\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{a}], [\mathbf{b}], [\mathbf{c}], [\mathbf{d}])$.

Le Tableau 3 résume ces chiffres :

Banque à :	1 substituant	2 substituants	3 substituants	4 substituants
Nombre de produits formés	1	10	45	136

Tableau 3 : Nombre total de produits dans chaque sous-groupe.

B. Prévion des chromatogrammes CLHP

1. Prévion de l'allure des chromatogrammes

Comme nous l'avons vu plus haut, il existe pour certains gabarits des isomères de position enrichissant certains types de molécules formés. Les matrices présentant quatre séquences identiques ne sont représentées que par un produit unique, tandis que les matrices du type 3+1 possèdent deux isomères de positions dans le cas où le gabarit est symétrique et quatre dans le cas où il ne l'est pas. On peut ainsi s'attendre à observer des chromatogrammes suivant cette règle d'enrichissement en produits comme le montre la Figure 88.

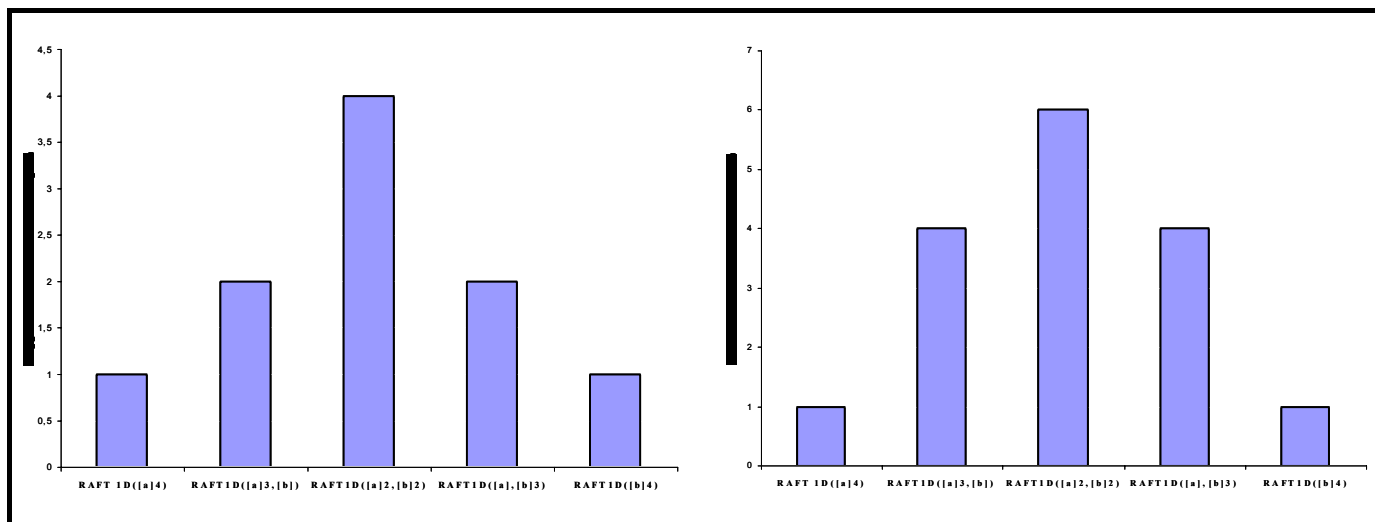


Figure 88 : Rapport d'intensité, pour des sous-bibliothèques à deux ligands, avec un gabarit symétrique (à gauche) ou asymétrique (à droite).

Lors de l'analyse des chromatogrammes, il nous faudra par ailleurs tenir compte de la séquence peptidique des différents substituants. En effet, chaque acide aminé possède un coefficient d'extinction molaire qui lui est propre, ce qui pourrait modifier quelque peu le rapport d'intensité entre les pics. La longueur d'onde à laquelle le chromatogramme sera enregistré jouera aussi un rôle important.

2. Prédiction des temps de rétention

Pour prévoir les temps de rétention des différentes matrices, il nous faut tout d'abord faire quelques suppositions.

Il nous faut tout d'abord faire une hypothèse concernant la distribution du chromatogramme. Pour cela, il nous faudra baser nos calculs sur les temps de rétention des matrices ne présentant qu'un seul substituant. Nous pouvons alors considérer ces matrices comme constituant les éléments frontière des chromatogrammes. En effet, la matrice présentant quatre motifs identiques d'une séquence polaire possèdera un caractère plus polaire qu'une matrice ne présentant qu'un de ces motifs.

Si l'on considère à présent une sous-bibliothèque à deux ligands dont les éléments frontière possèdent des temps de rétention très distincts, il est alors facilement envisageable d'obtenir un chromatogramme bien résolu présentant 5 pics distincts correspondant aux cinq types de produits formés. Parmi ces cinq pics, nous aurons alors l'espèce la plus polaire présentant quatre motifs peptidiques polaires, suivies de la matrice présentant trois de ces motifs, puis deux, puis un et enfin la matrice présentant les quatre séquences identiques les moins polaires du mélange.

Par ailleurs, afin de pouvoir calculer les temps de rétention des matrices que nous attendons, il nous faut supposer que ces temps suivent une loi linéaire.

Enfin, bien sûr, ces temps calculés étant spécifiques du gradient CLHP, il faudra garder le même gradient pour toutes les banques.

Le calcul prévisionnel des temps de rétention des nouveaux produits formés et obtenus sous forme de mélange peut donc s'effectuer de la manière suivante. Prenons l'exemple d'une bibliothèque à deux substituants **a** et **b**, avec $t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_4)) = n$ et $t_R(\text{RAFT}([\mathbf{b}]_4)) = p$.

On a :

$$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_3, [\mathbf{b}]_1)) = (3 * n + p) / 4 ;$$

$$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_2, [\mathbf{b}]_2)) = (2 * n + 2 * p) / 4 ;$$

$$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_1, [\mathbf{b}]_3)) = (n + 3 * p) / 4.$$

Pour une bibliothèque à trois substituants **a**, **b** et **c**, avec $t_R(\text{RAFT}([\mathbf{c}]_4)) = t$, on a :

$$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_2, [\mathbf{b}]_1, [\mathbf{c}]_1)) = (2 * n + p + t) / 4 ;$$

$$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_1, [\mathbf{b}]_2, [\mathbf{c}]_1)) = (n + 2 * p + t) / 4 ;$$

$$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_1, [\mathbf{b}]_1, [\mathbf{c}]_2)) = (n + p + 2 * t) / 4.$$

Enfin, pour la bibliothèque « mère » à quatre substituants **a**, **b**, **c** et **d**, avec $t_R(\text{RAFT}([\mathbf{d}]_4)) = w$, on a :

$$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}([\mathbf{a}]_1, [\mathbf{b}]_1, [\mathbf{c}]_1, [\mathbf{d}]_1)) = (n + p + t + w) / 4.$$

Ces suppositions quant aux allures des chromatogrammes et à la nature des pics devront être vérifiées par une analyse par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide haute performance (LC-MS).

Le paragraphe suivant présente la description et la caractérisation précises de l'une des trois bibliothèques que nous avons constituées. Néanmoins, dans un souci de clarté, nous avons également voulu décrire et caractériser les deux autres bibliothèques obtenues. Afin d'éviter toute répétition redondante, nous les avons présentées dans l'Annexe II.

D'autre part, pour une meilleure compréhension, une représentation de chaque sous-ensemble des bibliothèques à un et deux domaines se trouve dans l'Annexe III.

III. Description de la bibliothèque à un domaine, substituants cycliques

La Figure 89 récapitule la séquence et les temps de rétention des cinq peptides concernés et déjà décrits dans le chapitre précédent.

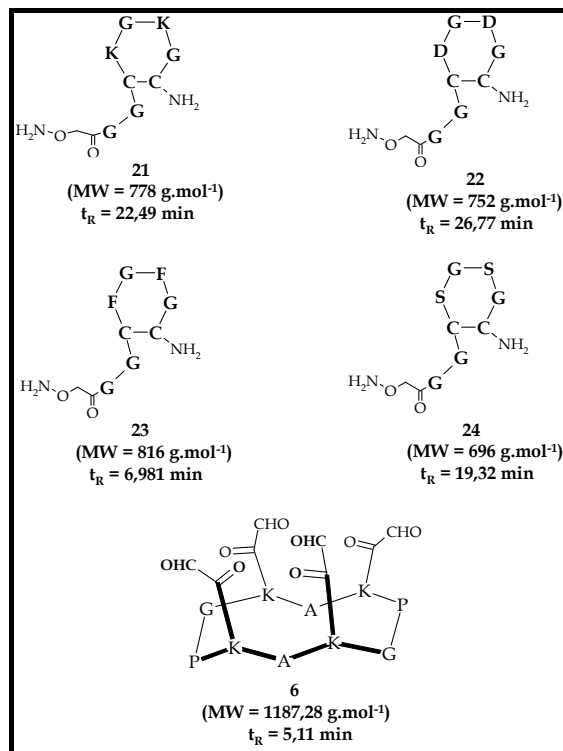


Figure 89 : Séquences, masses moléculaires et temps de rétention des peptides 21, 22, 23 et 24 ainsi que du RAFT 6. (C₁₈, Nucleosil, 250/4.6, 100 Å, 204 et 250 nm, gradient 0% B pendant 5 min puis 0 à 10%B en 30 minutes pour 21, 22 et 24 ; gradient 5 à 100 %B en 15 minutes pour 6 et 23).

A. Synthèse des RAFTs à un ligand (premier sous-ensemble)

La Figure 90 représente schématiquement le produit formé.

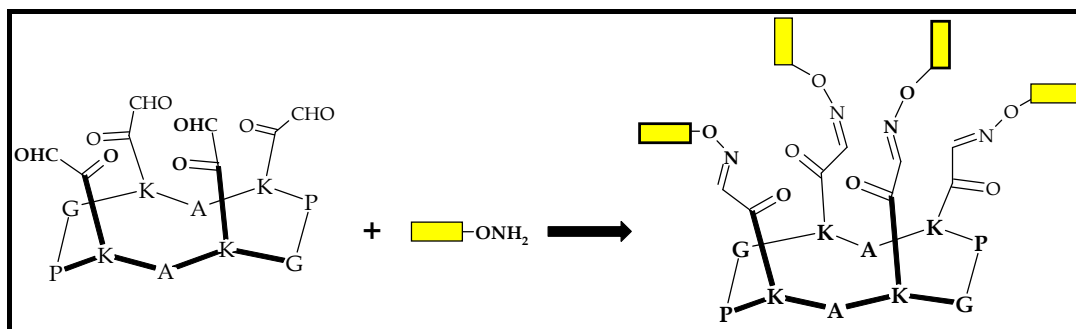


Figure 90 : Représentation de la formation d'un sous-ensemble à un ligand.

A partir des quatre séquences peptidiques de départ, nous obtenons quatre produits qui sont identifiés sans ambiguïté en CLHP ainsi que par spectrométrie de masse (ES-MS positif), cf. Figure 91.

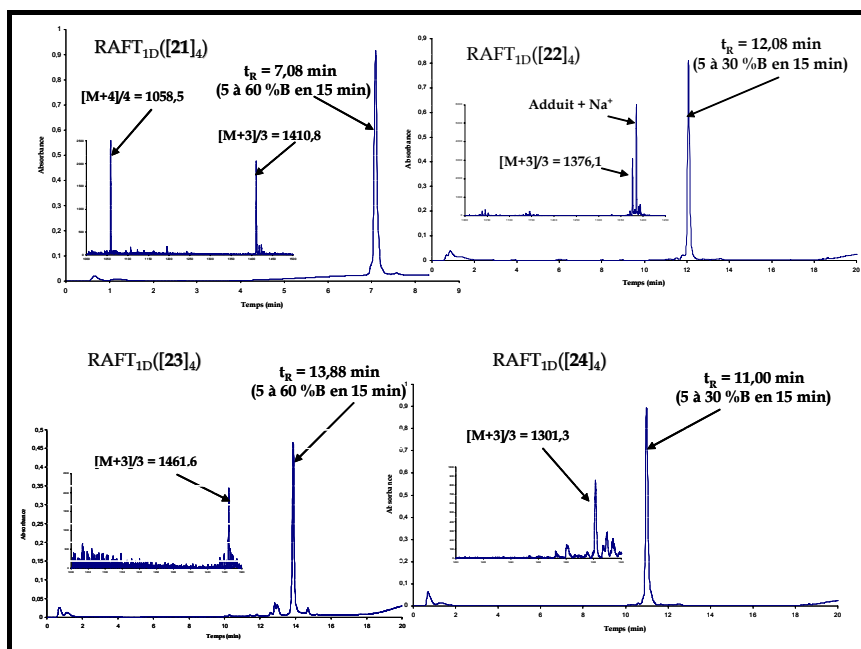


Figure 91 : Caractérisations CLHP et ES-MS des quatre produits ainsi obtenus. Gradient de 5 à 60 % de B ; C₁₈, Nucleosil, 30/4, 120 Å, 214 nm)

Ces quatre matrices furent injectée en CLHP analytique, à 214 nm, avec différents gradients ce que résume le Tableau 4.

Matrice	RAFT _{ID} ([21] ₄)	RAFT _{ID} ([22] ₄)	RAFT _{ID} ([23] ₄)	RAFT _{ID} ([24] ₄)
t_R (min – 5 à 60 % B – 15 min)	7,06	7,92	13,66	7,47
t_R (min – 5 à 30 % B – 15 min)	10,16	12,08	18,70	11,00

Tableau 4 : Temps de rétention à différents gradients des quatre matrices à quatre substituants identiques.

B. Caractérisation d'une sous-bibliothèque à deux ligands

Par cette méthode de synthèse, on obtient 6 sous-bibliothèques d'un total de 10 produits dont une représentation schématique se trouve ci-dessous.

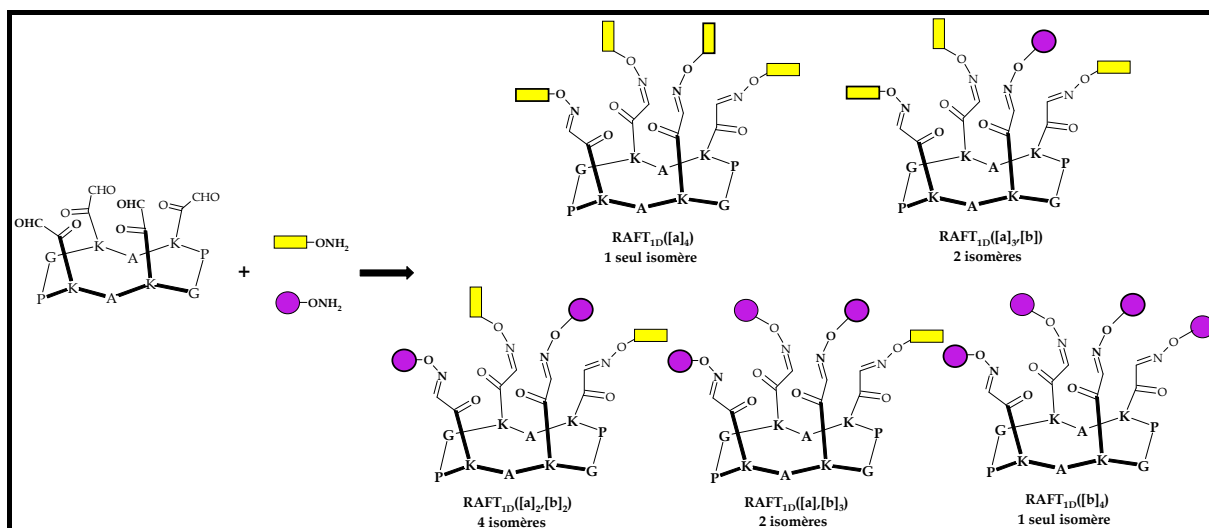


Figure 92 : Représentation des 5 types d'éléments composant une sous-bibliothèque à deux ligands.

Pour évaluer la pertinence de nos suppositions et de notre approche, nous décrivons par la suite un de ces six sous-ensembles.

1. La sous-bibliothèque $RAFT_{1D}([21],[22])$: prévision et analyse CLHP

Au sein de la bibliothèque $RAFT_{1D}([21],[22])$, les deux matrices frontière sont : le $RAFT_{1D}([21]_4)$ et le $RAFT_{1D}([22]_4)$ dont les temps de rétention sont de 10,16 min et 12,08 min respectivement pour un gradient de 5 à 30 % B en 15 min.

A partir de ces temps de rétention et en appliquant les formules décrites plus haut, nous pouvons calculer les temps de rétention des nouvelles espèces formées au sein du mélange. On obtient donc le Tableau 5 qui représente les temps de rétention *théoriques* de la sous-bibliothèque $RAFT_{1D}([21],[22])$.

Type de molécule	$RAFT_{1D}([21]_4)$	$RAFT_{1D}([21]_3,[22])$	$RAFT_{1D}([21]_2,[22]_2)$	$RAFT_{1D}([21],[22]_3)$	$RAFT_{1D}([22]_4)$
Temps de rétention (min)	10,16	10,64	11,12	11,60	12,08

Tableau 5 : Temps de rétention *théoriques* de la sous-bibliothèque $RAFT_{1D}([21],[22])$.

Le chromatogramme CLHP de la sous-bibliothèque $RAFT_{1D}([21],[22])$, enregistré à 214 nm, confirme la tendance calculée. La légende de la Figure 93 reste une hypothèse qui devra être confirmée par une analyse en spectrométrie de masse.

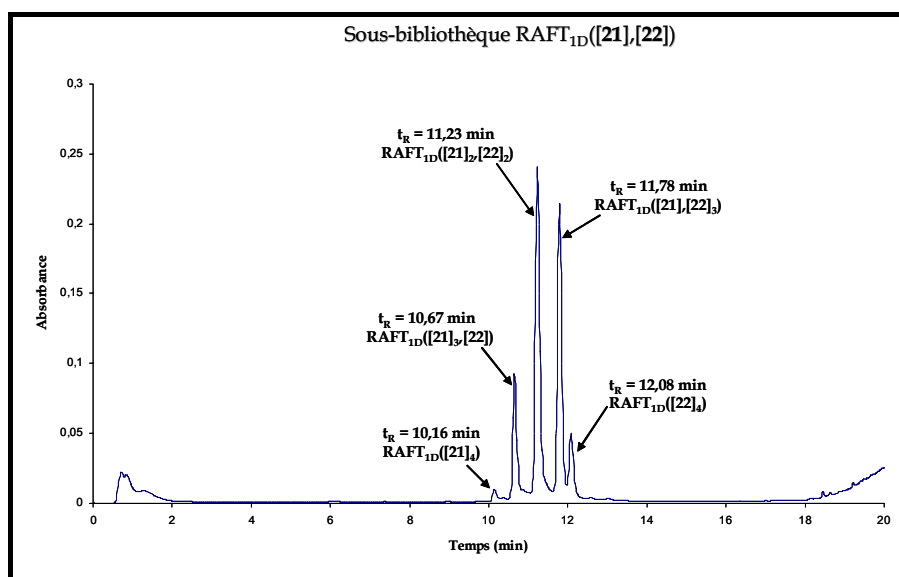


Figure 93 : Chromatogramme CLHP de la sous-bibliothèque RAFT_{1D}([21],[22]).

D'autre part, il est à noter que l'aspect du chromatogramme, dans sa distribution, suit les hypothèses que nous avons faites plus haut. On observe 5 pics parmi lesquels le plus intense est celui du milieu et plus on s'éloigne, plus les pics diminuent en intensité. On peut donc déjà penser que la supposition que nous avons faite quant à la distribution de la bibliothèque se confirme. On a en effet vers les extrémités du chromatogramme des espèces en plus faible abondance, donc moins d'isomères de position, que vers le centre du chromatogramme ce qui expliquerait la différence d'intensités entre les pics. On peut alors déjà nommer le pic le plus intense avec certitude comme étant l'espèce RAFT_{1D}([21]₂,[22]₂) puisque c'est elle qui a le plus d'isomères de position dans ce mélange.

Malgré tout, le chromatogramme n'est pas aussi symétrique, dans le cas présent, que nous le prévoyions. Ceci peut être dû à une distorsion du signal à cause d'une différence de coefficient d'extinction molaire entre les différentes espèces du mélange. Ce genre de problème fut plus facilement évité avec la banque de produits à deux domaines présentant le colorant dabsyl. En effet, pour cette banque, nous avons enregistré les chromatogrammes CLHP à une longueur d'onde de 466 nm, spécifique du dabsyl, ce qui a eu pour effet de limiter les différences de coefficients d'extinction molaire entre les matrices (cf. Annexe 1-II).

Un autre fait intéressant fut celui de l'amélioration de la résolution de certains chromatogrammes CLHP par la recherche de gradients plus appropriés. L'exemple le plus marquant fut celui de la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[16]) enregistré à 466 nm. Nous avons enregistré un premier spectre dans le gradient de 5 à 60 % de B en 15 minutes, mais à cause du chevauchement des pics, nous avons décidé de chercher un meilleur gradient à savoir de 30 à 50 % de B en 20 minutes. La Figure 94 montre la différence profonde de résolutions des

deux chromatogrammes de cette bibliothèque (pour une caractérisation complémentaire de cette bibliothèque, voir Annexe 1-II).

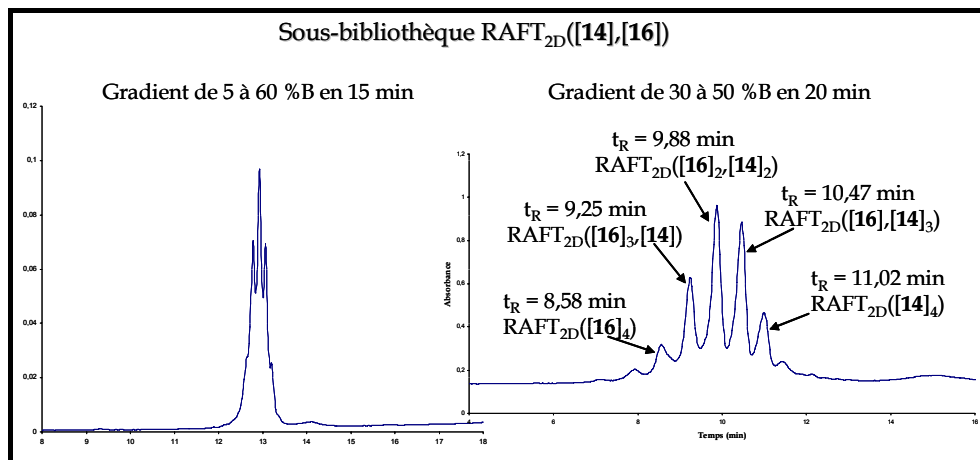


Figure 94 : Comparaison des chromatogrammes obtenus avec les gradients : de 5 à 60 %B en 15 min (à gauche) et de 30 à 50 %B en 20 min (à droite).

2. Analyse par LC-MS

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'analyse LC-MS s'effectue sur un spectromètre de masse couplé à une chromatographie liquide haute performance. Cette méthode d'analyse est très pratique en particulier lorsque l'échantillon à étudier se constitue d'un mélange de produits. On injecte donc l'échantillon comme on le ferait pour une analyse CLHP analytique classique en modifiant la quantité de solution injectée et sa concentration qui doivent être adaptées à la colonne ainsi qu'au spectromètre. Nous avons dû adapter le gradient à chaque sous-bibliothèque et dans ce cas précis, le gradient optimal était de 5 à 40 % de B en 15 minutes avec un débit de $250 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La colonne était une CC125/2 Nucleosil 100-3 C_{18} (Macherey-Nagel). Lors de la migration le long de la colonne, le mélange de produits est séparé puis directement injecté dans le spectromètre de masse. Par cette méthode il est donc possible d'analyser les différents produits d'un mélange de façon indépendante et de connaître leur « ordre » de migration le long de la colonne pour finalement pouvoir les identifier sur le chromatogramme.

En utilisant cette méthode, nous avons obtenu une série de spectres qui sont représentés dans la Figure 95.

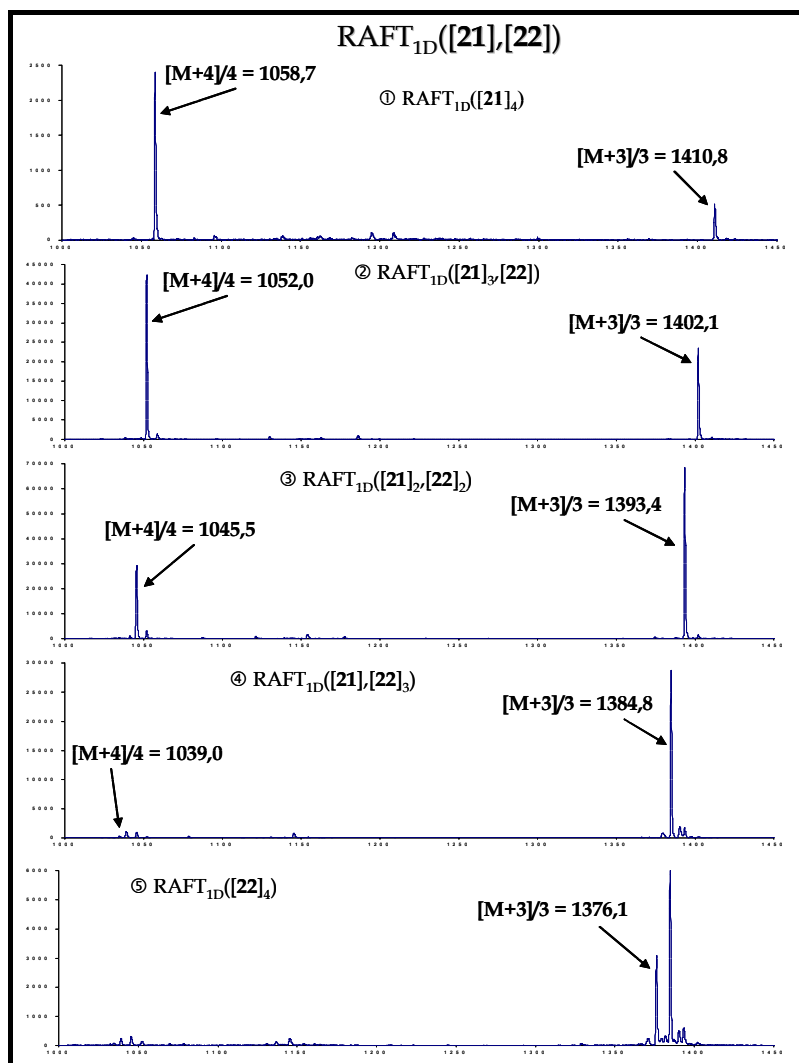


Figure 95 : Spectres de masses obtenus lors de l'analyse LC-MS.

Les différentes masses des produits détectés étant séparées de façon optimale, nous observons une chronologie dans l'apparition et la disparition des pics.

Ainsi, on a :

- ⇒ RAFT_{1D}([21]₄) : t_R = 10,16 min ;
- ⇒ RAFT_{1D}([21]₃, [22]) : t_R = 10,67 min (10,64 min) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([21]₂, [22]₂) : t_R = 11,23 min (11,12 min) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([21], [22]₃) : t_R = 11,78 min (11,60 min) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([22]₄) : t_R = 12,08 min.

Les temps indiqués entre parenthèses correspondent aux temps prévisionnels.

Nous pouvons donc en conclure que pour cette sous-bibliothèque, la distribution rejoint la théorie en deux points majeurs. Tout d'abord, la nature des cinq pics est conforme à la supposition faite quant à la polarité des matrices : celle comportant les quatre motifs les plus polaires est suivie de celle n'en comportant que trois et ainsi de suite. D'autre part, les

différences entre les temps calculés et ceux provenant de l'expérience sont infimes et peuvent être dues aux erreurs expérimentales, deux injections du même mélange ne donnant pas toujours exactement les mêmes temps de rétention pour les mêmes espèces. Cette méthode de calcul prévisionnel des temps de rétention est donc extrêmement satisfaisante et sera d'une grande aide pour l'analyse et la caractérisation des sous-bibliothèques plus complexes.

C. Caractérisation d'une sous-bibliothèque à trois ligands

Par cette méthode de synthèse, on obtient 4 sous-bibliothèques composées chacune d'un total de 45 produits dont une représentation théorique se trouve dans la Figure 96.

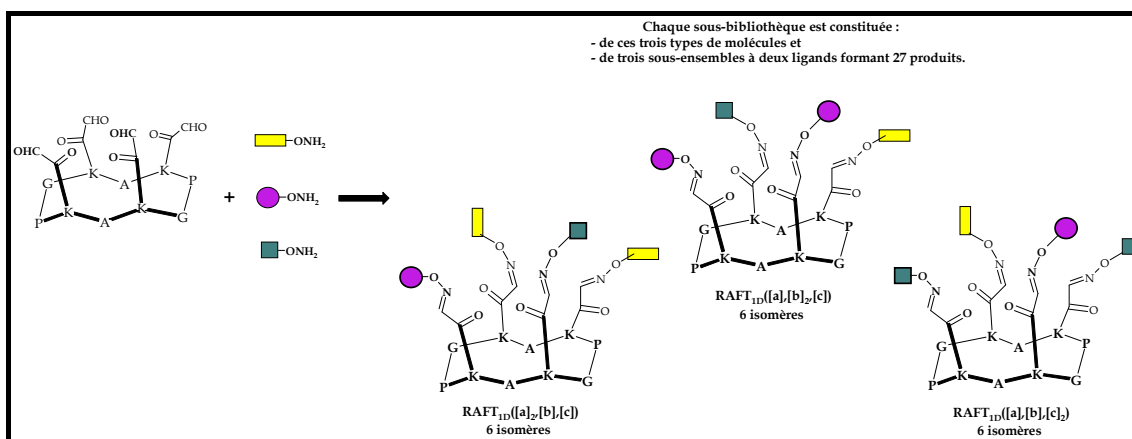


Figure 96 : Représentation des types d'éléments à trois substituants différents présents dans les sous-bibliothèques à trois ligands.

Ces banques seront analysées à la fois par superposition des chromatogrammes CLHP des mélanges constituant leurs sous-ensembles ainsi que par calcul prévisionnel des temps de rétention des matrices présentant trois substituants différents. Pour évaluer de la pertinence de nos suppositions et de notre approche, nous décrivons par la suite un de ces quatre sous-ensembles.

1. La sous-bibliothèque $RAFT_{1D}([21],[22],[23])$: prévision et analyse CLHP

Au sein de la bibliothèque $RAFT_{1D}([21],[22],[23])$, les trois matrices frontière sont $RAFT_{1D}([21]_4)$, $RAFT_{1D}([22]_4)$ et $RAFT_{1D}([23]_4)$ dont les temps de rétention pour un gradient de 5 à 30 % de B en 15 minutes sont de 10,16 min, 12,08 min et 18,7 min respectivement. A partir de ces trois temps, nous avons calculé les temps *théoriques* des trois nouveaux gabarits formés au sein du mélange. Ils sont présentés dans le Tableau 6.

Type de molécule	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22],[23])	RAFT _{ID} ([21],[22] ₂ ,[23])	RAFT _{ID} ([21],[22],[23] ₂)
Temps de rétention (min)	12,78	13,30	14,91

Tableau 6 : Temps de rétention théoriques des matrices à trois substituants au sein de la sous-bibliothèque RAFT_{ID}([21],[22],[23]).

Lors de l'analyse de cette bibliothèque, nous avons aligné les trois chromatogrammes des sous-éléments constitués de : RAFT_{ID}([21],[22]), RAFT_{ID}([21],[23]) et RAFT_{ID}([22],[23]). La Figure 97 présente une analyse comparative des chromatogrammes de ces sous-éléments avec celui de la sous-bibliothèque à trois substituants.

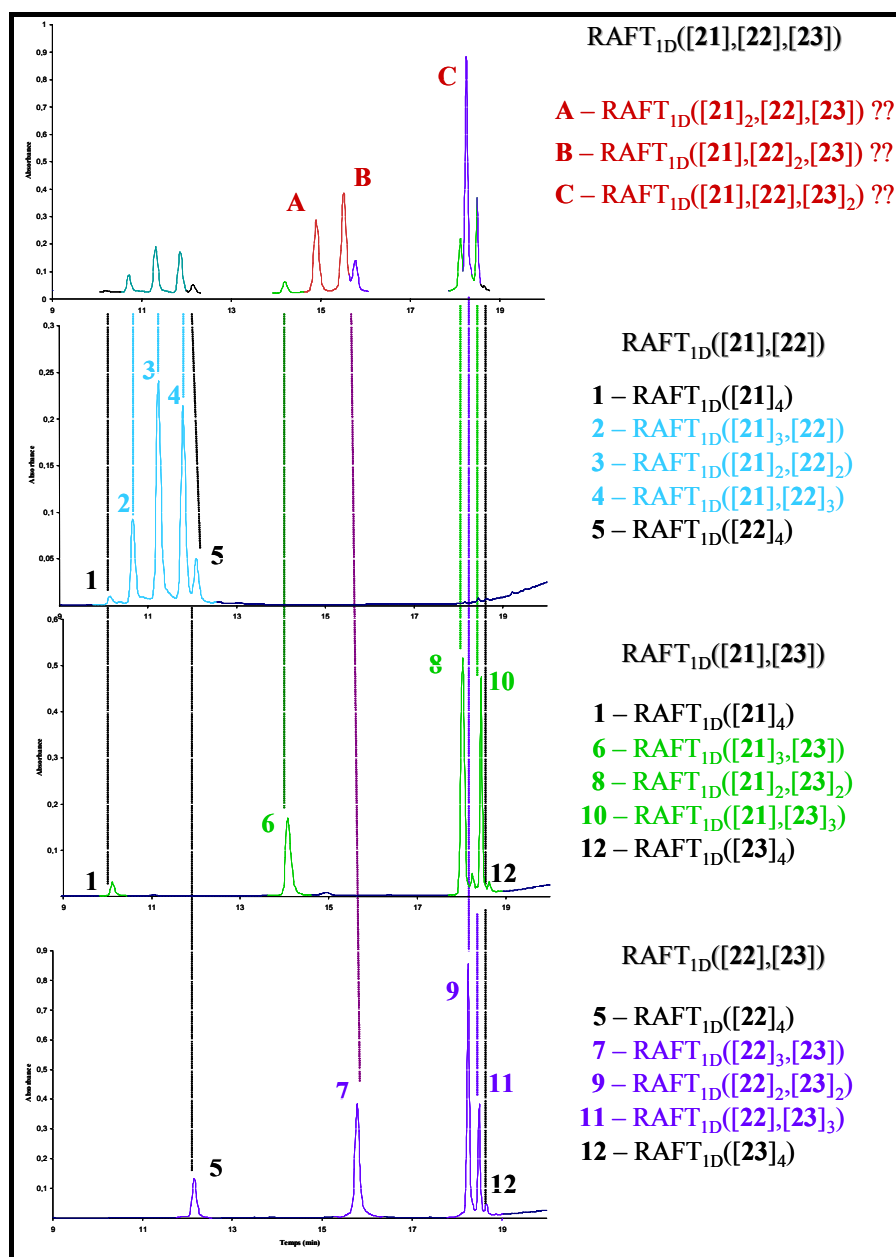


Figure 97 : Analyse comparative des trois chromatogrammes des sous-éléments de la sous-bibliothèque avec celui de la sous-bibliothèque RAFT_{ID}([21],[22],[23]).

A partir des observations ci-dessus, il est possible d'analyser le chromatogramme de la sous-bibliothèque $\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}],[\mathbf{22}],[\mathbf{23}])$. Les nouveaux pics qui y sont présents peuvent s'attribuer comme suit :

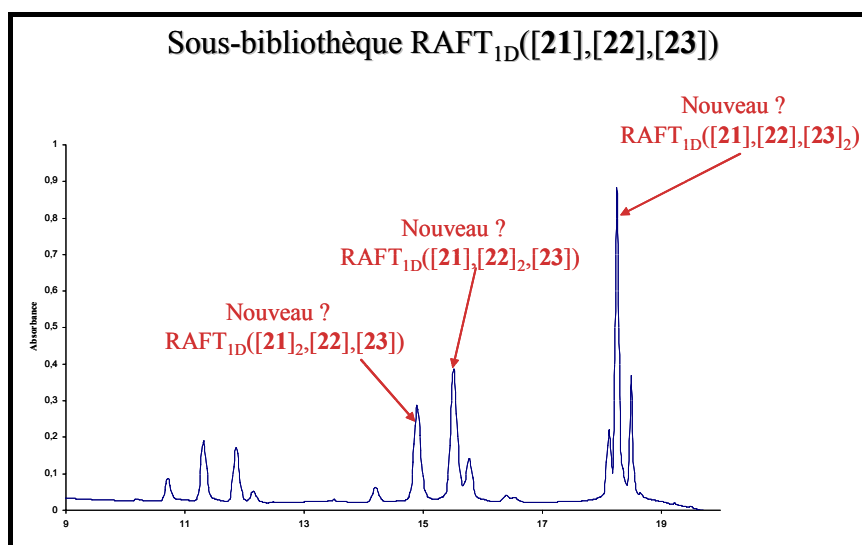


Figure 98 : Supposition de la nature des nouveaux éléments observés.

La même étude fut possible pour l'ensemble des sous-bibliothèques des trois banques de produits synthétisées. Néanmoins, certaines possédant une moins bonne résolution pour le gradient commun à la banque furent plus difficiles à caractériser et l'analyse LC-MS fut indispensable (cf. Annexe II).

L'analyse faite dans le cas présent n'est qu'une supposition basée sur l'analyse des trois sous-éléments composant la sous-bibliothèque $\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}],[\mathbf{22}],[\mathbf{23}])$. Ces hypothèses doivent être vérifiées par l'analyse de spectrométrie de masse LC-MS.

2. Analyse par LC-MS

Le Tableau 7 présente les masses molaires et m/z des nouveaux produits et des espèces encadrant ceux-ci.

Produit	$\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}]_3,[\mathbf{23}])$	$\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}]_2,[\mathbf{22}],[\mathbf{23}])$	$\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}],[\mathbf{22}]_2,[\mathbf{23}])$	$\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}]_2,[\mathbf{23}]_2)$
M =	4266	4240	4214	4304
$[M+3]/3 =$	1423	1414,3	1405,7	1435,7
Produit	$\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}],[\mathbf{22}],[\mathbf{23}]_2)$	$\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{22}]_2,[\mathbf{23}]_2)$	$\text{RAFT}_{1D}([\mathbf{21}],[\mathbf{23}]_3)$	
M =	4278	4252	4342	
$[M+3]/3 =$	1427	1418,3	1448,3	

Tableau 7 : Masses molaires et m/z des produits clés à observer en LC-MS.

A partir de ces données, nous avons effectué l'analyse LC-MS dont seuls les sept spectres de masse qui nous intéressent sont présentés dans la Figure 99.

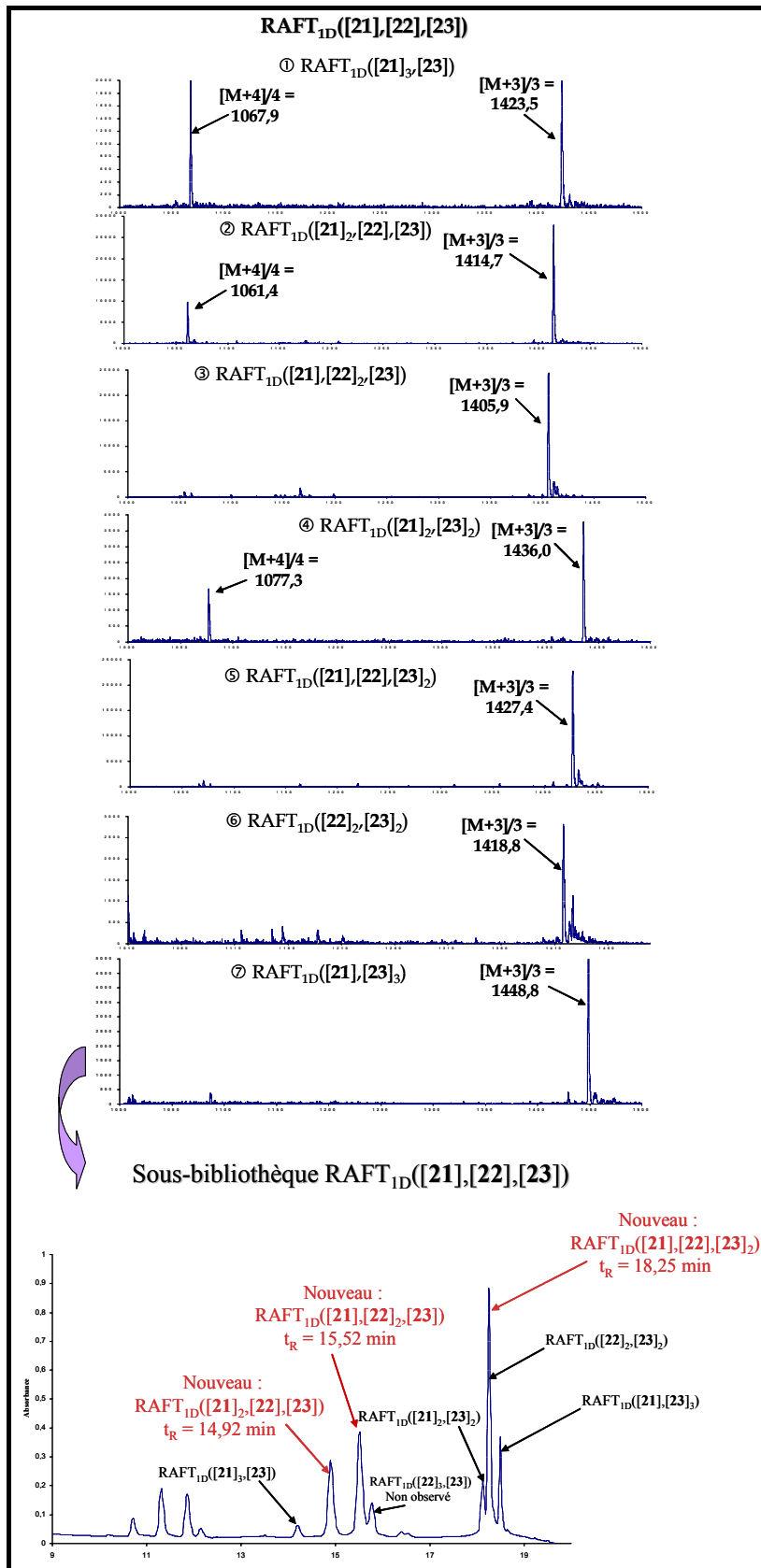


Figure 99 : Caractérisation de la bibliothèque RAFT_{ID}([21],[22],[23]).

L'analyse LC-MS confirme ainsi notre hypothèse nous permettant de caractériser les trois types de molécules présentant trois ligands différents et ayant les temps de rétention suivants pour un gradient de 5 à 30 % B en 15 min :

⇒ RAFT_{ID}([**21**]₂,[**22**],[**23**]) : t_R = 14,92 min (12,78 min) ;

⇒ RAFT_{ID}([**21**],[**22**]₂,[**23**]) : t_R = 15,52 min (13,30 min) et

⇒ RAFT_{ID}([**21**],[**22**],[**23**]₂) : t_R = 18,25 min (14,91 min).

Comme dans le paragraphe précédent le temps notés entre parenthèses sont les temps prévisionnels. Ils sont ici étonnamment très différents de ceux que l'on observe par l'expérience. Pour les sous-bibliothèques à trois substituants des autres banques, nous observons en revanche des temps de rétention des nouvelles matrices en corrélation avec les temps calculés (cf. Annexe II).

D'autre part, il est à noter que la matrice RAFT_{ID}([**22**]₃,[**23**]) n'est pas observée mais elle a été caractérisée lors de l'analyse des sous-bibliothèques à deux ligands.

Enfin, pour ce qui est de la banque obtenue à l'aide du RAFT à deux domaines présentant le colorant dabsyl, la caractérisation des sous-bibliothèques fut différentes. Nous nous sommes basés sur l'observation des matrices à quatre ligands identiques ainsi que sur celle des sous-bibliothèques à deux substituants. Il est alors apparu que l'ordre de migration des différents produits était strictement identique. Nous avons donc procédé à une analyse comparative des chromatogrammes CLHP des sous-bibliothèques à trois ligands avec ceux de leurs sous-éléments à deux ligands dans le but d'identifier les nouvelles matrices formées. Nous avons par ailleurs comparé ces résultats avec les temps de rétention calculés et ces deux données furent en corrélation. La suite de la caractérisation des sous-bibliothèques s'est alors faite par spectrométrie de masse ESI en modes positifs et négatifs afin de détecter un maximum de produits mais non plus pour déterminer leur ordre d'apparition sur le chromatogramme CLHP (cf. Annexe II-II).

D. Caractérisation de la bibliothèque à quatre ligands

Nous avons obtenu une banque « mère » d'un total de 136 produits, décrite schématiquement dans la Figure 100. Pour sa caractérisation, nous avons utilisé les mêmes méthodes que précédemment.

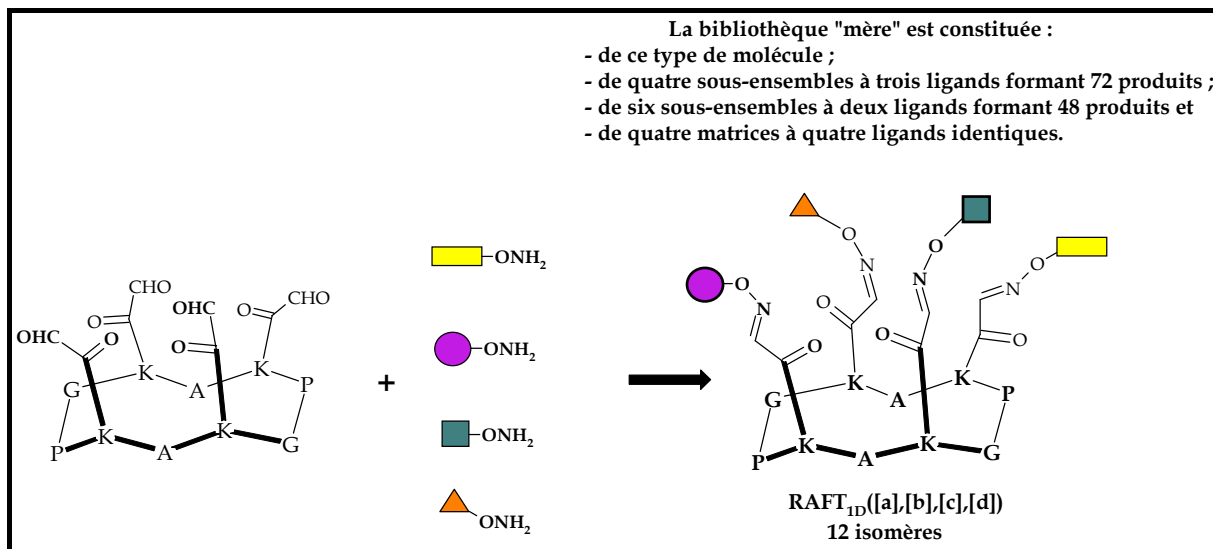


Figure 100 : Représentation du type d'élément à quatre motifs peptidiques différents dans la bibliothèque « mère ».

1. La bibliothèque RAFT_{ID}([21],[22],[23],[24]) : prévision et analyse CLHP

Par le calcul, nous prévoyons le temps de rétention *théorique* du gabarit présentant quatre motifs différents, RAFT_{ID}([21],[22],[23],[24]), à $t_R = 13,00$ min, ce qui est confirmé par la suite.

Afin d'analyser la bibliothèque « mère » à l'aide de chromatogrammes CLHP, nous avons comparé les quatre chromatogrammes des sous-éléments constitués de : RAFT_{ID}([21],[22],[23]), RAFT_{ID}([21],[22],[24]), RAFT_{ID}([21],[23],[24]), et RAFT_{ID}([22],[23],[24]) avec celui de la bibliothèque « mère ». La Figure 101 présente le bilan de cette étude comparative.

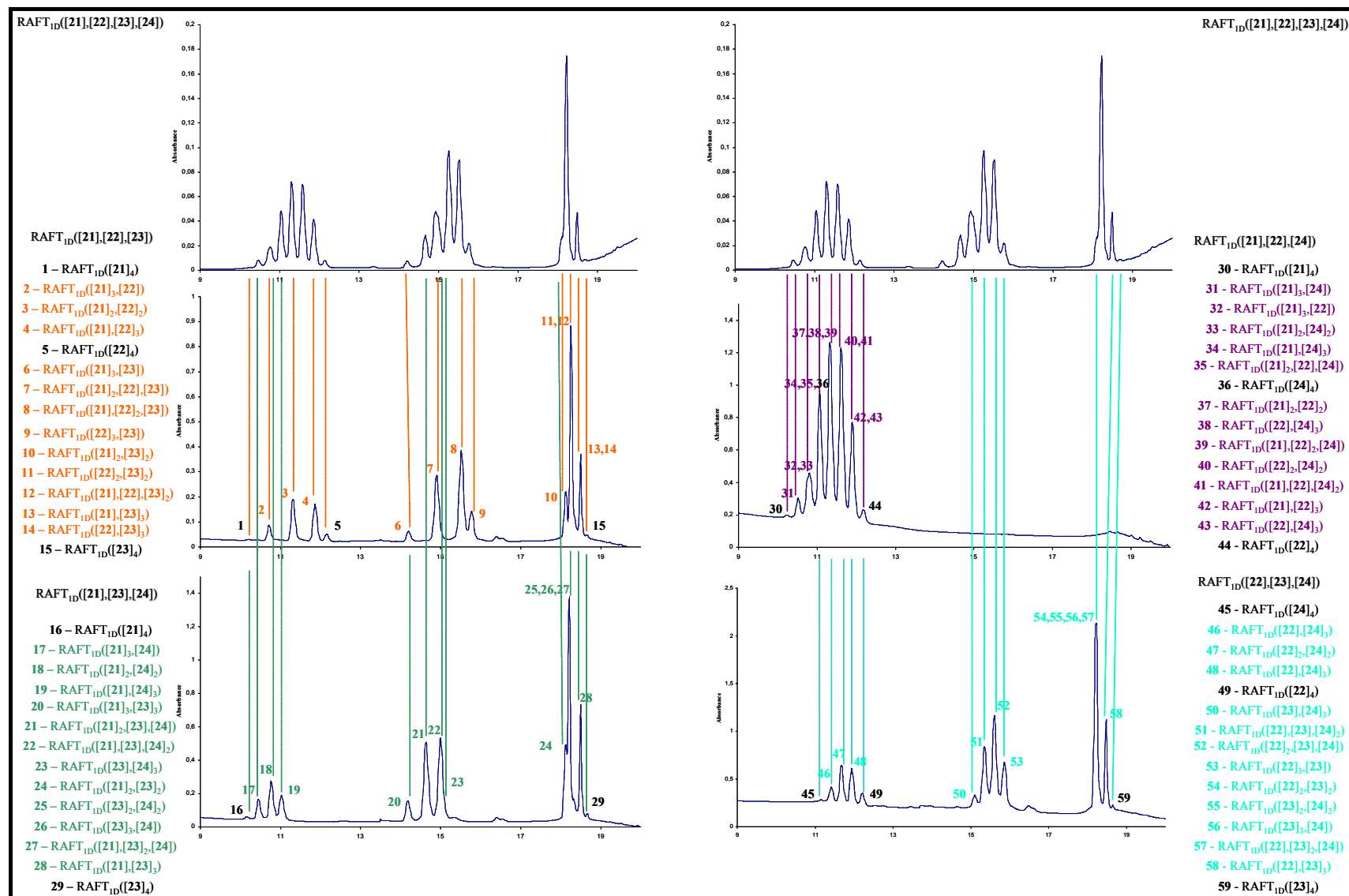


Figure 101 : Analyse comparative des quatre chromatogrammes des sous-éléments de la sous-bibliothèque avec celui de RAFT_{ID}([21],[22],[23],[24])

Afin d'avoir la meilleure caractérisation possible de cette bibliothèque de produits, nous avons procédé à une analyse LC-MS du mélange.

2. Analyse LC-MS

La Figure 102 représente ainsi les 34 masses observées sur 35 attendues au cours de l'analyse. La masse manquante étant le RAFT_{ID}([21]₄).

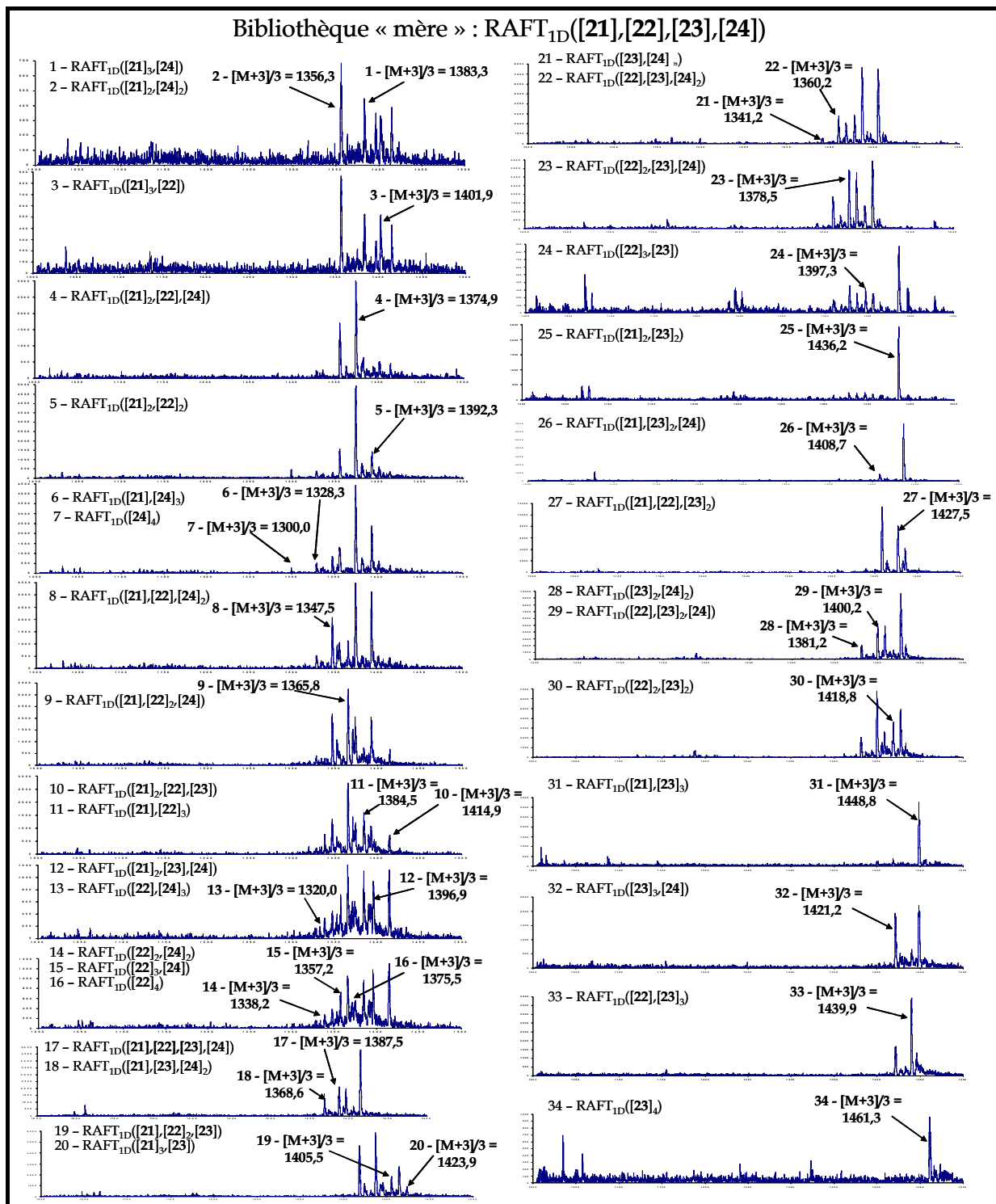


Figure 102 : Analyse LC-MS de la banque « mère ».

On observe quelques inversions quant à la nature des pics entre l'analyse des chromatogrammes CLHP et l'analyse LC-MS. Mais, globalement, la tendance est confirmée : les matrices portant les peptides **24** et **21** sont les plus polaires, suivies des matrices riches en peptide **22** et de celles présentant le peptide **23**. La matrice présentant quatre ligands différents se place entre les RAFT_{ID}([**22**]₄) et RAFT_{ID}([**21**]₃,[**23**]), on peut donc en conclure qu'elle possède un temps de rétention de l'ordre de 13,5 min. Le temps de rétention calculé était de 13,00 min.

On réalise les mêmes observations sur les deux autres banques de produits présentées en Annexe II – I et II.

On peut donc en conclure que l'analyse et la caractérisation de ces banques de produits est très satisfaisante, l'expérience rejoignant la théorie pour la plupart des cas.

En résumé...

La seconde partie de ce travail de thèse avait pour objectif la réalisation de plusieurs banques de produits associant les synthons linéaires ou cycliques sur une matrice, qu'elle soit monoface ou présentant un chromophore.

Ceci nous a tout d'abord conduit à optimiser les conditions d'assemblage : nombre d'équivalents nécessaires, température de réaction, nature du milieu pour éviter la précipitation des produits.

A l'issue d'une étude théorique des bibliothèques, nous avons émis une hypothèse sur le mode de migration des conjugués : leurs temps de rétention suivent une loi linéaire. Nous avons alors « prévu » l'aspect des chromatogrammes CLHP et optimisé les gradients. Ainsi avons-nous procédé à l'identification précise des conjugués présents au sein de chaque banque de produits à la fois par analyse CLHP et par spectrométrie de masse LC-MS, montrant que l'expérience rejoignait la théorie et la statistique.

Enfin, dans le but de tester par la suite ces banques de produits sur des cibles biologiques, nous avons mis au point une technique de purification des mélanges, autre que la purification par CLHP semi-préparative. Cette dernière méthode fut écartée par souci de conservation de l'intégrité des banques. La méthode utilisée met en jeu un support solide sur lequel les composés en excès dans le milieu pouvaient facilement se greffer. Leur élimination se faisant ensuite par simple filtration, nous avons obtenu des banques de pureté suffisante pour leur évaluation biologique.

CHAPITRE III

-

EVALUATIONS BIOLOGIQUES

Après avoir synthétisé et caractérisé différentes bibliothèques de peptides, nous avons poursuivi ce projet de recherche par l'évaluation de leurs activités biologiques.

Nous avons souhaité tester nos produits avec différentes sortes d'interactions :

- ⇒ Inhibition de l'interaction hormone-récepteur pour l'hormone GnRH ;
- ⇒ Inhibition d'une interaction protéine-protéine impliquée dans la transduction de signaux intracellulaires, à l'interface Grb2-SHC ;
- ⇒ Inhibition de l'activité enzymatique de l' α -chymotrypsine face à deux de ses substrats.

Au cours de ces études, nous avons été amenés à évaluer des interactions entre l'avidine et nos banques de produits. C'est ce dont traite le second paragraphe de ce chapitre.

I. Inhibition de l'interaction GnRH-récepteur

Cette approche de réalisation de mimes de surface par ciblage d'une protéine transmembranaire fut réalisée dans le prolongement de travaux de recherche effectués au sein du laboratoire^[173] et en collaboration avec l'équipe du professeur R. P. Millar, M.R.C. Unit for Molecular Endocrinology à Edinburgh, Ecosse. Elle repose sur le développement de molécules permettant d'inhiber l'action d'une hormone peptidique : la GnRH pour Gonadotropin-Releasing Hormon. Notre objectif était donc réaliser des bibliothèques de mimes de récepteurs de la GnRH.

A. La GnRH et son récepteur

1. La GnRH

Cette hormone fut découverte en 1971 par H. Matsuo *et al.*^[174] et est sécrétée par les neurones au niveau de l'hypothalamus. Elle est responsable de la libération d'hormones de la reproduction par l'hypophyse, les gonadotrophines : LH (Hormone Lutéinisante) et FSH (Hormone Folliculo-Stimulante). Ces dernières stimulent à leur tour divers processus biologiques et physiologiques dans les organes cibles (ovaires et testicules), comme par exemple la synthèse des stéroïdes.

La structure décapeptidique de la GnRH ou gonado-libérine est partagée par l'ensemble du monde animal et est représentée sur la Figure 103.

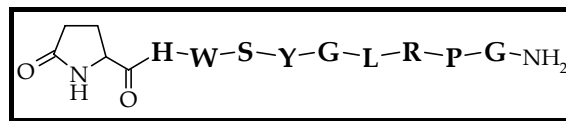


Figure 103 : Séquence peptidique de la GnRH.

Les trois actions principales de la GnRH se situent au niveau antérieur du lobe de l'hypophyse. Tout d'abord, elle stimule la synthèse et le stockage des gonadotrophines. Puis, elle induit le déplacement des gonadotrophines du stock de réserve à un stock opérationnel,

¹⁷³ Thèse de Mélanie Figuet. . “Conception et construction sur châssis cyclopeptidique de molécules reconnaissant le GnRH ou son récepteur G-couplé – Nouvelles méthodes d’incorporation de thiazolidines, mimes de la proline.” *Université Joseph Fourier – Grenoble I*, **05/12/04**, LEDSS.

¹⁷⁴ H. Matsuo, Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura, A. V. Schalli. “Structure of the porcine LH and FSH Releasing Hormons. The proposed amino acid sequence.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, *43*, 1334-1339.

prêt à les libérer directement. Enfin, c'est elle qui entraîne la libération immédiate des gonadotrophines.

Chez la femme, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) est l'hormone principale responsable du développement des follicules dans les ovaires, étape essentielle du développement d'ovocytes mûrs susceptibles d'être fécondés. Chez l'homme, la FSH est vitale pour la production de spermatozoïdes sains.

Quant à l'hormone lutéinisante (LH), elle est aussi nécessaire au développement d'un follicule mûr contenant un ovocyte capable d'être fécondé. De plus, cette hormone est responsable de la maturation finale de l'ovocyte puis de sa libération ou ovulation.

La sécrétion de ces hormones, induite par la GnRH et impliquant par la suite la synthèse de progestérone ou d'œstrogène, est due à un cycle de régulation impliquant une activation/inhibition complexe de production d'hormones, comme le montre la Figure 104.

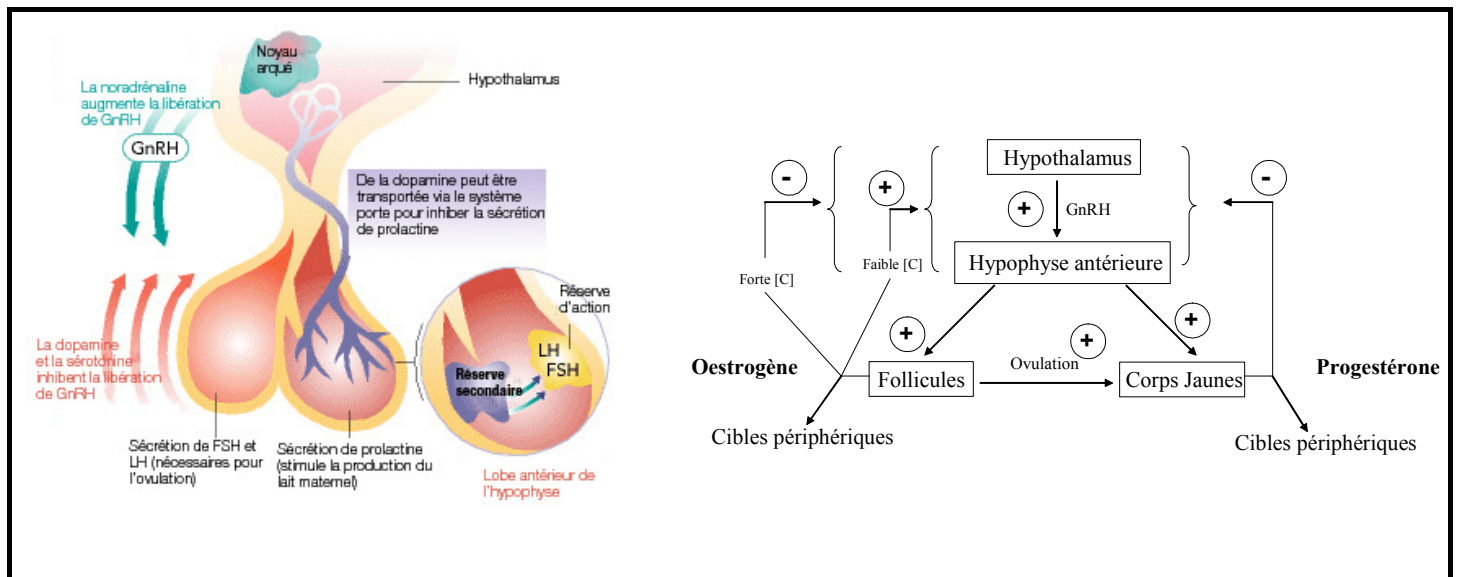


Figure 104 : Représentation schématique du contrôle hormonal chez la femme ; à droite, les flèches représentent les organes sur lesquels les hormones agissent, en stimulant (⊕) ou inhibant (⊖).

L'hormone peptidique GnRH agit sur les cellules cibles par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G. En se fixant sur la face externe de son récepteur, la GnRH active ce dernier après avoir été reconnue spécifiquement au niveau de son site de liaison. Cette reconnaissance est basée sur le principe de complémentarité de forme. L'interaction hormone/récepteur conduit alors à une cascade de réponses^[175] via la fixation de la protéine G. Pour plus de précisions sur cette cascade de réactions, voir Annexe IV.

¹⁷⁵ Z. Naor, D. Harris, S. Shacham. "Mechanism of GnRH receptor signaling : combinatorial talk of Ca²⁺ and protein kinase C." *Frontiers in neuroendocrinology*, **1998**, 19, 1-19.

2. Le récepteur de la GnRH

Le récepteur de la GnRH est un membre de la famille des récepteurs G-couplés (GPCR) qui représentent la plus grande famille de protéines membranaires^[176]. Ils ont la caractéristique commune d'être composés d'une seule chaîne polypeptidique comportant sept hélices hydrophobes transmembranaires, connectées entre elles par trois boucles intra- et extracellulaires. Les ligands naturels de cette famille sont de nature extrêmement variée (peptidique, hormonale, lipidique, ...). D'autre part, la liaison de ces derniers au domaine extracellulaire ou transmembranaire entraîne le changement de conformation du récepteur, lui permettant de s'associer à une protéine G. L'interaction avec le récepteur conduit alors à la production de seconds messagers intracellulaires et donc à divers processus physiologiques et biochimiques.

Ces récepteurs sont classés en trois groupes selon la longueur et la composition de leurs extrémités amino-terminales ou leurs domaines extracellulaires. Il est difficile d'obtenir des informations structurales fiables concernant ces récepteurs, c'est la raison pour laquelle, l'observation de la première structure tridimensionnelle aux rayons X du récepteur de la Rhodopsine a permis une grande avancée en la matière^[177]. En effet, cette découverte a amené à la réalisation de nombreuses recherches d'homologies de séquences et de mutagenèse dirigée pour étudier les autres récepteurs.

Cette famille de récepteurs jouant un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et patho-physiologiques, leur étude dans la découverte de nouveaux médicaments représente un chiffre d'affaire de l'ordre de plusieurs milliards de dollars^[178]. En effet, en 2004, il était estimé que 50% des derniers médicaments mis sur le marché, dont 25% des 200 meilleures ventes, ciblent les récepteurs G-couplés. Ils sont utilisés particulièrement pour traiter les maladies cardiovasculaires et gastro-intestinales, du système nerveux central ainsi que certains cancers et désordres immunitaires^[179]. Le Tableau 8 présente quelques médicaments dirigés contre certains de ces récepteurs.

¹⁷⁶ H. Schalbe, G. Wess. "Dissecting G-protein-coupled receptors : structure, function and ligand interaction." *ChemBioChem*, **2002**, 3, 915-919.

¹⁷⁷ K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano. "Crystal structure of rhodopsin : a G-protein-coupled receptor." *Science*, **2000**, 289, 739-745.

¹⁷⁸ T. Klabunde, G. Hessler. "Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors." *ChemBioChem*, **2002**, 3, 928-944.

¹⁷⁹ W. J. Thomsen, J. Gatlin, D. J. Unett, D. P. Behan. "Developping functional GPCR screen." *Curr. Drug Discovery*, **2004**, 13-18.

Médicament	Maladie	Récepteurs GPCR	\$
Loratadine	Allergies	H ₁	3011
Olanzapine	Schizophrénie	D ₂ /D ₁ /5-HT _{2A/2C}	2350
Losartan	Hypertension	AT ₁	1715
Risperidone	Schizophrénie	D ₂ /5-HT _{2A}	1603
Leuprolide	Cancer	LH-RH	1394
Gabapentin	Douleur	GABA _B	1334
Fexofenadine	Allergies	H ₁	1070
Sumatriptan	Migraine	5-HT _{1B/D}	1068
Salmeterol	Asthme	β ₂	942
Ranitidine	Ulcère	H ₂	871
Montelukast	Asthme	LTD ₄	860
Famotidine	Ulcères	H ₂	850
Doxazosin	Hypertension	α ₁	795
Goserelin	Cancer	LH-RH	744
Valsartan	Hypertension	AT ₁	727
Buspirone	Dépression	5-HT ₁	709
Cetirizine	Allergie	H ₁	699
Fentanyl	Douleur	μ-opiate	656
Ipratropium	Asthme	Muscarinique	598
Metoprolol	Hypertension	β ₁	577

Tableau 8 : Médicament dirigés contre certains GPCR et les maladies qu'ils induisent ; la colonne \$ indique leur apport financier sur l'année 2002.

Le récepteur de la GnRH a été cloné et étudié par l'équipe du professeur R. P. Millar qui a ainsi pu identifier les boucles extracellulaires EC1 et EC3 comme étant les éléments fondamentaux à la reconnaissance^[180].

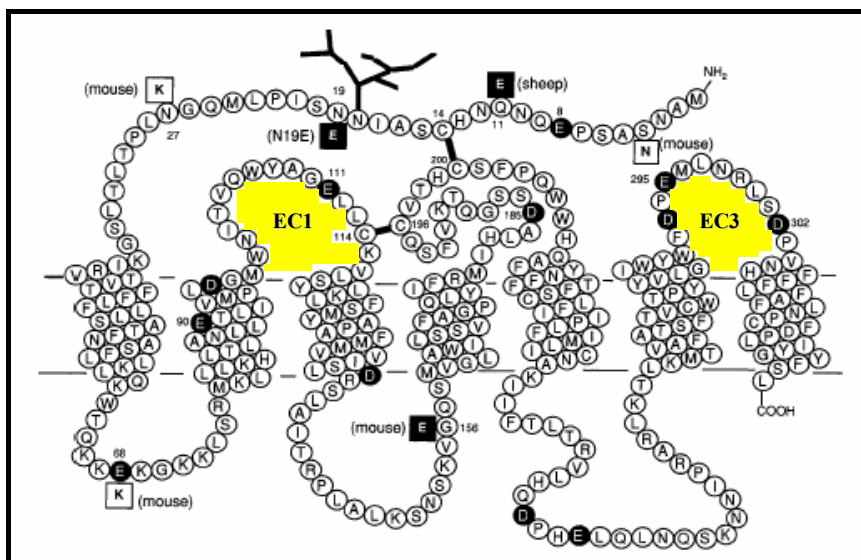


Figure 105 : Récepteur humain de la GnRH.

¹⁸⁰ J. S. Davidson, D. Assefa, A. Pawson, P. Davies, J. Hapgood, I. Becker, C. Flanagan, R. Roeske, R. P. Millar. "Irreversible activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by photoaffinity cross-linking : localization of attachment site to Cys residue in N-terminal segment." *Biochemistry*, **1997**, *36*, 12881-12889.

3. Acides aminés impliqués dans la reconnaissance

Des études de mutagenèse dirigée^[181], de modification du ligand et de modélisation ont permis de démontrer que certains résidus comme Asp⁹⁸, Asn¹⁰², Lys¹²¹ ou Asp³⁰², présents sur les boucles EC1 et EC3, sont fortement impliqués dans la reconnaissance entre le récepteur et son ligand.

C. A. Flanagan *et al.*^[182] ont ainsi démontré que la chaîne latérale de l'Asp⁹⁸ permet de former une liaison hydrogène avec le δ NH du résidu His² de la GnRH, ce qui stabilise le complexe hormone-récepteur.

L'Asn¹⁰² joue également un rôle très important en réalisant une autre liaison hydrogène avec l'extrémité C-terminale glycinamide de la GnRH^[183]. En effet, une mutation de cet acide aminé en alanine induit une diminution très importante de l'interaction avec la GnRH.

De plus, le résidu Lys¹²¹, donneur de liaison hydrogène, interagit avec les cycles aromatiques riches en électrons des résidus His² et Trp³ de la GnRH^[184].

Quant à Asp³⁰² (ou Glu³⁰¹ pour le récepteur de la souris^[185]), il est spécifique au résidu Arg⁸ de la GnRH car il établit une interaction électrostatique entraînant une conformation de type β -turn chez l'hormone^[186].

D'autres acides aminés sont également impliqués dans les mécanismes d'interaction comme le résidu apolaire Leu²³⁷ présent dans la troisième boucle intracellulaire par exemple^[187]. Il est à noter aussi que des résidus aromatiques situés à proximité de la troisième

¹⁸¹ D. Keinan, E. Hazum. "Mapping of gonadotropin-releasing hormone receptor binding site." *Biochemistry*, **1985**, 4, 7728-7732.

¹⁸² C. A. Flanagan, V. Rodic, K. Konvicka, T. Yuen, L. Chi, J. E. Rivier, R. P. Millar, H. Weinstein, S. C. Sealfon. "Multiple interactions of the Asp⁽⁹⁸⁾ side chain of gonadotropin-releasing hormone receptor contribute differentially to ligand interaction." *Biochemistry*, **2000**, 39, 8133-8141.

¹⁸³ J. S. Davidson, C. A. McArdle, P. Davies, R. Elario, C. A. Flanagan, R. P. Millar. "Asn¹⁰² of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a critical determinant of potency of agonists containing C-terminal glycinamide." *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 15510-15514.

¹⁸⁴ W. Zhou, V. Rodic, S. Kitanovic, C. A. Flanagan, L. Chi. "A locus of the gonadotropin-releasing hormone receptor that differentiates agonist and antagonist binding sites." *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 18853-18857.

¹⁸⁵ C. A. Flanagan, I. I. Becker, J. S. Davidson, I. K. Wakefield, W. Zhou, S. C. Sealfon, R. P. Millar. "Glutamate 301 of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor confers specificity for arginine 8 of mammalian gonadotropin-releasing hormone." *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 22636-22641.

¹⁸⁶ R. Petry, D. Craik, G. Haaime, B. Fromme, H. Klump, W. Kiefer, D. Palm, R. P. Millar. "Secondary structure of the third extracellular loop responsible for ligand selectivity of a mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor." *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1026-1034.

¹⁸⁷ H. O. Chung, Q. Yang, K. J. Catt, K. K. Arora. "Expression and function of the gonadotropin-releasing hormone receptor are dependent on a conserved apolar amino acid in the third intracellular loop." *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 35756-35762.

boucle extracellulaire, comme Tyr²⁹⁰ ou Phe³¹⁰, jouent un rôle important dans les processus de reconnaissance^[188,189] en interagissant avec le résidu Trp³ de la GnRH.

B. Approche et ciblage du récepteur et de l'hormone

1. Travaux antérieurs

Lors de ses travaux de thèse au sein de notre laboratoire et portant sur la GnRH, Mélanie Figuet a cherché à mimer cette hormone plutôt que son récepteur. Pour cela, elle a synthétisé des séquences GnRH qu'elle a greffé sur des châssis RAFT à un et à deux domaines. Ces molécules avaient l'intérêt principal de présenter l'hormone de façon multivalente augmentant la concentration locale en GnRH et avec elle l'affinité des conjugués pour le récepteur.

Le greffage de quatre motifs GnRH sur un châssis à un domaine a donné lieu à des tests sur des lignes de cellules de rat HEK 293 surexprimant le récepteur de la GnRH. A l'issue de ces tests, il a été montré que le conjugué présentait la même affinité pour le récepteur que le composé naturel et que de plus, il induisait la même réponse dans la cellule. D'autre part, une incubation prolongée de cette matrice avec la lignée de cellules de rat SCL60 a montré son internalisation avec le récepteur.

2. Elaboration d'éléments de reconnaissance

Comme nous l'avons décrit dans les chapitres I et II, nous avons synthétisé des bibliothèques de produits composés d'un châssis RAFT présentant différentes séquences peptidiques. En ce qui concerne le ciblage de la GnRH, les séquences peptidiques choisies pour mimer le récepteur furent les quatre séquences linéaires rappelées dans la Figure 106.

C'est à partir des études de chercheurs, menées sur le récepteur lui-même et évoquées plus haut, que nous avons choisi les séquences des quatre fragments peptidiques. En effet, nous avons voulu que ces séquences contiennent prioritairement les résidus Asp, Asn, Lys, Leu et Phe représentant les résidus Asp⁹⁸, Asp³⁰², Asn¹⁰², Lys¹²¹, Leu²³⁷ et Phe³¹⁰ du récepteur ainsi que quelques résidus de leur environnement. Ne connaissant pas la conformation libre de la GnRH et son positionnement par rapport à ces quatre fragments, nous avons choisi de présenter ces résidus dans plusieurs séquences et à différentes positions au sein de celles-ci.

¹⁸⁸ S. Hövelmann, S. H. Hoffmann, R. Kühne, T. T. Laak, H. Reiländer, T. Beckers. "Impact of aromatic residues within transmembrane helix 6 of the human gonadotropin-releasing hormone receptor upon agonist and antagonist binding." *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1129-1136.

¹⁸⁹ S. Chauvin, M. Hibert, A. Bérault, R. Counis. "Critical implication of transmembrane Phe³¹⁰, possibly in conjunction with Trp²⁷⁹, in the rat gonadotropin-releasing hormone receptor activation." *Biochemical Pharm.*, **2001**, *62*, 329-334.

D'autre part, avons-nous cherché à disposer ces résidus de manière à respecter les positions relatives qu'ils ont au sein de récepteur.

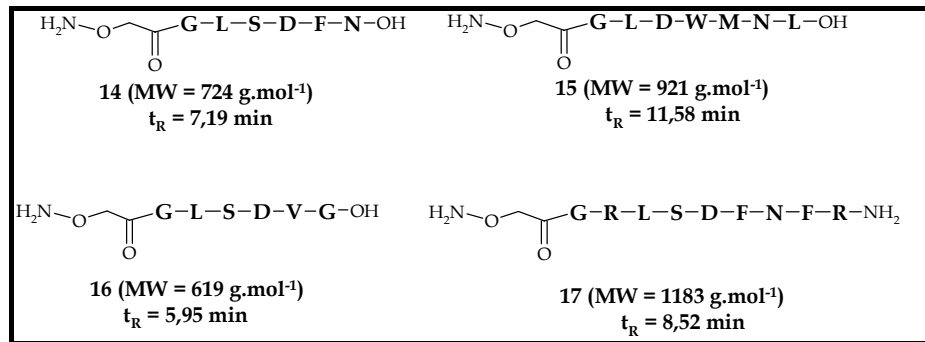


Figure 106 : Rappel des quatre séquences peptidiques linéaires.

C. Tests effectués

1. Principe des colonnes d'affinité

Le test de ces bibliothèques de molécules repose sur une éventuelle affinité entre la protéine cible et les différents produits présents au sein de la bibliothèque. Il existe une large gamme de méthodes pour tester et sélectionner des molécules d'intérêt parmi lesquelles la colonne d'affinité.

La Figure 107 montre le principe général des tests d'affinité. On utilise des colonnes présentant une phase stationnaire qu'il est possible de fonctionnaliser avec la protéine cible. Des méthodes d'analyses indirectes (analyses UV par exemple) permettent de quantifier combien de molécule cible a pu être immobilisée. L'étape de fonctionnalisation de la colonne est suivie d'une étape de lavage afin d'enlever les protéines cibles non liées à la colonne et qui pourraient biaiser les résultats lors du test des produits. On effectue ensuite une étape de blocage des sites de la phase stationnaire qui n'ont pas été fonctionnalisés. Puis on dissout les molécules à tester dans une solution tampon à une concentration choisie qui est mise à éluer sur la colonne. Il est possible d'effectuer plusieurs passages de cette solution sur la colonne.

Cette méthode d'analyse permet une vérification des résultats obtenus au cours des tests en analysant la banque de produits initiale, avant son passage sur la colonne. Par la suite, l'analyse des solutions d'éléments non reconnus en complémentarité avec celle des solutions d'élution doit être en corrélation avec l'analyse de la banque de produits avant le test.

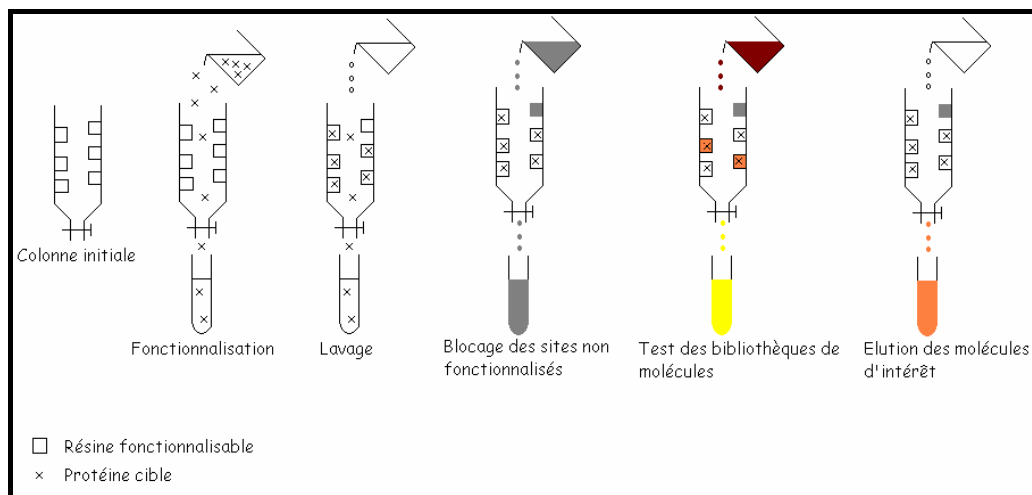


Figure 107 : Principe des tests d'affinité pour des molécules marquées en rouge, plus la concentration est faible, plus la couleur de la solution tend vers le jaune.

2. Colonne d'affinité fonctionnalisée aldéhyde

Le laboratoire ayant l'expertise de la formation d'une liaison chimiosélective entre des groupements aldéhydes et des groupements oxyamines, nous avons utilisé cette méthode. Pour cela, nous avons greffé une séquence GnRH présentant une fonction oxyamine sur une colonne d'affinité fonctionnalisée avec des groupements aldéhydes. Cette méthode nécessite donc avant tout la synthèse de l'hormone présentant un groupement amino-oxy.

a. Synthèse de la 6-DLys-GnRH oxyamine

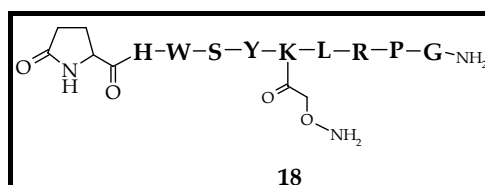


Figure 108 : 6-DLys-GnRH oxyamine.

A son extrémité C-terminale, la GnRH possède un groupement amide à la place du groupement carboxyle libre. Nous avons donc choisi une résine amide : la résine Rink Amide MBHA[®] sur laquelle nous avons réalisé une synthèse SPPS classique.

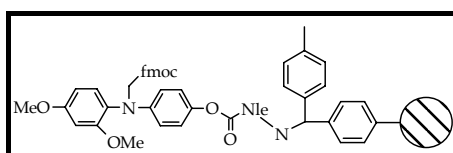


Figure 109 : Résine Rink Amide MBHA[®].

La séquence naturelle de la GnRH présente un résidu Glycine en position 6. Il a donc fallu le modifier afin de pouvoir greffer une fonction oxyamine à ce niveau de la séquence de

l'hormone. Pour cela, nous avons suivi le protocole décrit par Koch *et coll.*^[190] qui ont réalisé la synthèse sur phase solide d'un analogue de la GnRH fonctionnalisée sur la chaîne latérale de la 6-DLys en employant une stratégie Fmoc/tBu.

Lors de notre synthèse sur synthétiseur automatique de peptide, nous avons choisi une stratégie similaire pour laquelle nous avons préféré le groupement N-ε Alloc pour la chaîne latérale de la D-Lys. Ce groupement orthogonal permettra d'introduire la fonction oxyamine.

Après purification et lyophilisation, on obtient une poudre blanche avec un rendement global de 42 %.

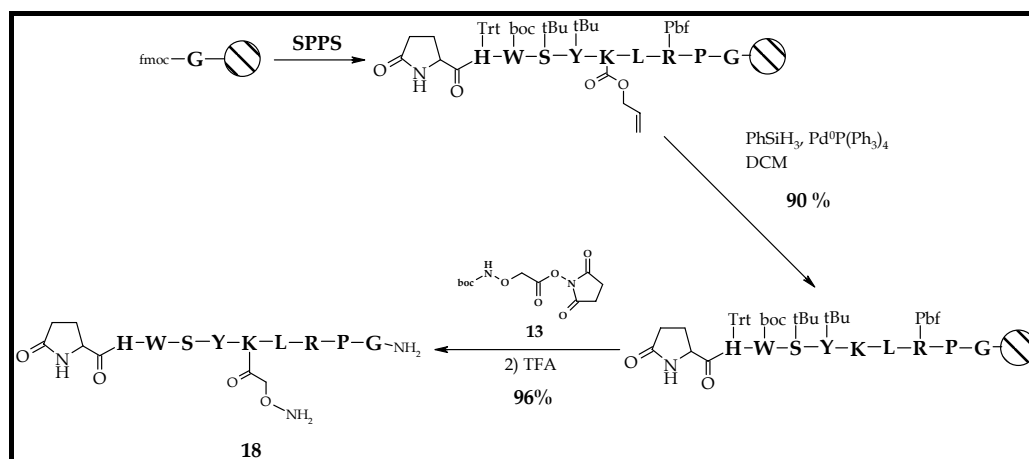


Figure 110 : Synthèse par SPPS de la 6-D-Lys-GnRH oxyamine.

b. Mise au point des conditions

Pour pouvoir évaluer la faisabilité de la méthode avant de l'appliquer directement aux produits d'intérêt, nous avons tout d'abord effectué une réaction de couplage entre la résine fonctionnalisée aldéhyde et un peptide oxyamine disponible, le peptide 15.

Pour cela, nous avons préparé une solution contenant le peptide 15 à une concentration de $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un mélange d'eau et d'acétonitrile. Par la suite, le peptide 15 est couplé sur la colonne par injections répétées en CLHP analytique : la solution d'éluion recueillie sera injectée afin d'observer la disparition du peptide.

Le test s'effectuera dans une pipette Pasteur munie d'un coton hydrophile avec un excès de peptide par rapport au taux de substitution théorique de la résine. A l'issue de ce test, il semble que 10 éluions de la colonne sont nécessaires à la complète fonctionnalisation de la résine par le peptide.

¹⁹⁰ S. Rahimipour, N. Ben-Aroya, M. Fridkin, Y. Koch. "Design, synthesis and evaluation of a long-acting, potent analog of Gonadotropin-releasing hormone." *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3645-3652.

c. Fonctionnalisation de la colonne

D'après l'essai que nous avons effectué précédemment, nous avons pu observer qu'il était possible de greffer de l'ordre de 5,2 μmol de produit par mL de résine aldéhyde. Pour cet essai, comme précédemment nous avons utilisé un excès de 6-DLys-GnRH oxyamine. En utilisant la même méthode qu'auparavant, nous n'avons pas noté que le peptide réagissait avec la résine. Il a donc fallu utiliser une méthode différente de fonctionnalisation. Nous avons pour cela mis directement la résine en présence de la solution contenant le peptide **18**, solubilisé dans un mélange d'eau et d'acétonitrile, puis laissé sous agitation mécanique douce pendant plusieurs heures.

L'injection de cette solution en CLHP analytique montre une forte diminution du pic correspondant au produit **18** et l'apparition en grande quantité d'un autre produit ($t_R = 7,854$; 5 à 100 % B en 15 minutes). Ce produit est purifié en CLHP semi-préparative puis analysé en masse donnant les multichargés suivants :

$$[M+2]/2 = 1359,6 ; [M+3]/3 = 906,4 ; [M+4]/4 = 680,0.$$

Ces multichargés correspondent à un produit de masse $2716 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui pourrait correspondre à deux motifs GnRH plus 65 en envisageant que le couplage du peptide **18** ait détérioré la phase stationnaire. En effet, l'obtention de ces colonnes aldéhyde s'effectue par condensation d'une chaîne aliphatique reliée à un polymère d'une part et présentant une amine libre d'autre part sur une chaîne aliphatique présentant deux motifs aldéhydes. Une fois la condensation effectuée, la liaison $\text{N}=\text{CH}$ est réduite, comme le montre la Figure 111.

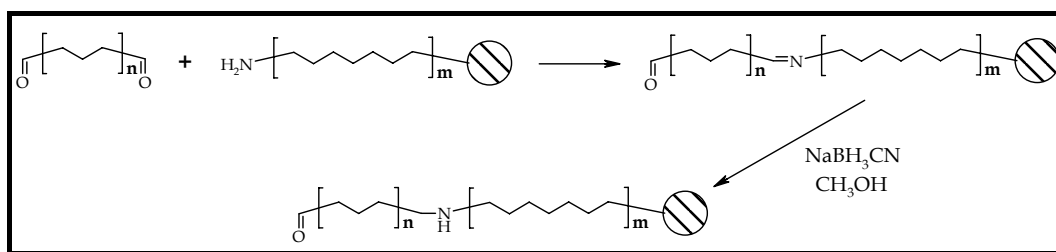


Figure 111. : Méthode d'obtention de colonnes fonctionnalisées aldéhyde, n et m inconnus.

Envisageons à présent que la réaction de réduction n'ait pas été totale, une partie de la phase présente une liaison $\text{N}=\text{CH}$ sur laquelle le motif oxyamine peut se condenser. On obtient alors une chaîne aliphatique fonctionnalisée à chaque extrémité par le peptide **18**. Lors de la condensation, le peptide **18** perd deux atomes d'hydrogène, soit quatre en tout, donnant une masse de $(1326-2)\times 2 = 2648$. Chaque peptide **18** est relié à un atome de carbone lui-même relié à la chaîne aliphatique présentant initialement deux motifs aldéhydes, soit une masse de 26. Ce qui nous donne un total de 2674. La masse que nous avons observée était de

2716. Il reste donc une différence de masse de 42 à élucider, masse que l'on pourrait attribuer à un enchaînement de trois $-CH_2-$.

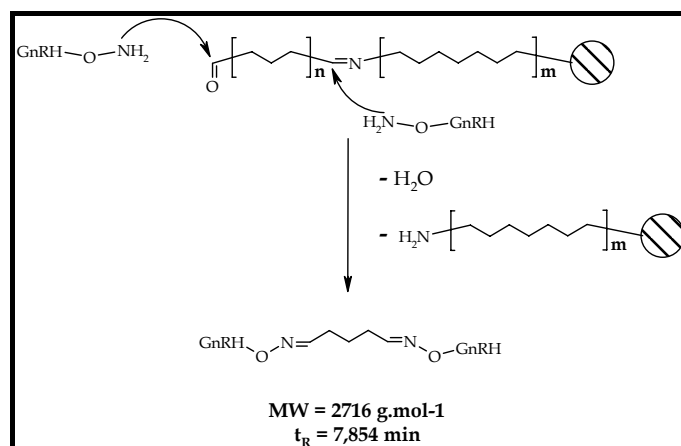


Figure 112 : Produit obtenu à l'issue de la fonctionnalisation.

Cette expérience fut répétée et nous avons observé le même phénomène.

Nous avons alors envisagé que les conditions de pH étaient trop dures et que notre peptide avait subi une hydrolyse. Nous avons donc recommencé l'expérience en utilisant une solution tampon TRIS à pH 7.

Cette fois la fonctionnalisation se fait dans un corps de pipette pasteur munie de coton hydrophile. L'injection en CLHP analytique de la solution contenant le peptide **18** révèle que celui-ci n'est plus détectable après quatre éluions consécutives. On en conclut donc que la colonne a été fonctionnalisée avec succès.

d. Test de la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])

Pour cela, on dissout la bibliothèque pour se placer à une concentration moyenne de $8.10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$. On effectue alors plusieurs fois l'éluion de la solution à tester. Après trois éluions, la coloration rouge due au motif dabsyl est visible sur la phase et ne migre plus. On peut donc en conclure que certaines molécules ont une affinité pour le peptide immobilisé.

Afin de pouvoir analyser les produits retenus, ceux-ci doivent être tout d'abord décrochés de la phase stationnaire.

Pour cela, nous avons tout d'abord utilisé la solution de tampon TRIS, faisant ainsi évoluer le pH de la colonne de 2 à 7, ce qui contribue souvent à décrocher les produits. Dans notre cas, cette éluion n'a pas été suivie d'effet, les conjugués restant liés à la colonne.

La modification de la force ionique est aussi utilisée pour éluer des produits d'une colonne d'affinité. Pour cela, nous avons utilisé une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0,5 M dont nous avons effectué cinq passages sur la colonne. Comme précédemment, les peptides sont restés liés à la colonne.

Face à ces diverses difficultés, nous avons choisi de changer de phase stationnaire, préférant ainsi utiliser une phase constituée d'avidine et d'agarose.

3. Colonne d'affinité avidine-agarose

La fonctionnalisation se fera alors à l'aide d'une séquence GnRH présentant un motif biotine, qui est le ligand naturel de l'avidine.

a. Synthèse de la 6-DLys-GnRH-biotine

La synthèse a été réalisée par SPPS classique comme pour la GnRH oxyamine. La seule modification provient de l'introduction de la biotine en présence de PyBOP[®], à la place du BocAminoxysuccinimide comme le décrit la Figure 113.

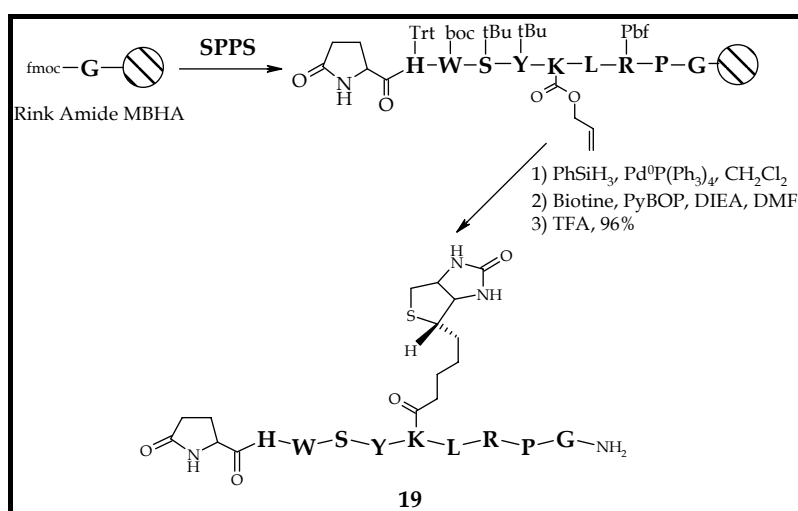


Figure 113 : Synthèse de la 6-DLys-GnRH-biotine 19.

Après coupure de la résine et déprotection, le peptide **19** est purifié par CLHP semi-préparative. Il est ainsi obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement global de 56%.

b. Fonctionnalisation de la colonne

La capacité moyenne de liaison de la résine est de 20 µg soit 8.10⁻⁸ mol de biotine, que l'on fonctionnalise avec un large excès du peptide **19** dissout dans du tampon TRIS (pH 7).

Après une incubation de cinq heures sous agitation mécanique à température ambiante, on contrôle la fonctionnalisation de la résine par injection en CLHP analytique du surnageant, comme nous l'avons décrit plus haut.

c. Test de la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])

Lors de ce test, on souhaite utiliser une quantité en bibliothèque de produits qui soit trois fois supérieure aux sites fonctionnalisés par la GnRH de façon saturer tous les sites.

Selon l'étude réalisée par E. Hazum^[191] sur la purification de récepteurs transmembranaires de GnRH chez le rat, nous laisserons incuber nos composés pendant 14h à une température comprise entre 26°C et 30°C. Préalablement, nous aurons solubilisé les conjugués de RAFT_{2D}([**14**],[**15**],[**16**],[**17**]) dans une solution tampon TRIS à pH 7 contenant un faible pourcentage d'acétonitrile afin de faciliter la solubilisation des produits et éviter leur précipitation sur la colonne par la suite.

La résine est ensuite transférée dans le corps d'une pipette Pasteur munie d'un coton hydrophile puis lavée à l'aide de tampon TRIS.

Malgré les nombreux lavages effectués, la coloration rouge, due au motif dabsyl présent sur le châssis **13**, persiste sur la colonne, supposant alors une affinité entre certains mimes de récepteurs et le peptide **19**.

Afin de pouvoir éluer les produits retenus, la résine est lavée en utilisant une solution de chlorure de sodium (NaCl) 0,5 M.

La forte concentration en sels de ces solutions d'élution rend très difficile l'analyse directe en masse. De plus, après désalage des solutions et compte tenu de la très faible quantité de produits contenue dans celles-ci, l'analyse en masse fut infructueuse. Il faudra donc procéder au test des différentes sous-bibliothèques et utiliser la méthode de déconvolution décrite dans l'introduction pour identifier les composés actifs.

d. Réalisation d'un blanc

Il s'agit ici de tester les mêmes produits que précédemment sur la phase stationnaire non fonctionnalisée. La réalisation de ce test est identique à celle décrite plus haut, elle ne diffère que lors de la fonctionnalisation qui s'effectue en l'absence de peptide **19**.

Contrairement à ce que nous envisagions, la réalisation de ce test « à blanc » a mis en évidence une non-spécificité de notre bibliothèque de produits. En effet, à l'issue du test, nous observons que la banque de produits est retenue par la résine. Ce dernier résultat suggère que les conjugués semblent posséder à la fois une affinité pour la protéine avidine et pour l'hormone GnRH, d'après les résultats du paragraphe 2.d.

Les sous-bibliothèques pourront donc être testées avec l'avidine sur cette même phase stationnaire, afin d'identifier les molécules d'intérêt, ce qui fera l'objet du paragraphe suivant.

¹⁹¹ E. Hazum. "Purification of gonadotropin releasing hormone receptors using the avidin-biotin technique." *J. Chromatography A*, **1990**, 510, 233-238.

II. Etudes d'interactions avec l'avidine

Ce paragraphe fait partie de la suite logique des résultats obtenus précédemment. Néanmoins, nous devons préciser que l'étude réalisée ici a pour but de valider l'approche et les objectifs de ce projet de recherche. L'intérêt de l'étude des interactions de nos produits ne réside pas dans la découverte potentielle de nouveaux ligands de l'avidine entrant en compétition avec la biotine mais plus simplement dans l'évaluation des méthodes de test et de déconvolution.

A. L'avidine

1. Description de la structure

L'avidine est une glycoprotéine que l'on trouve dans le blanc d'œuf. Elle se compose de quatre sous-unités, chacune composée de 128 résidus d'acides aminés et de masse moléculaire de 15600 g.mol^{-1} . L'une de ses principales propriétés réside en sa haute capacité de liaison avec son ligand naturel, la vitamine H ou biotine. La constante de dissociation du complexe est de l'ordre de 10^{-15} M , ce qui constitue la plus forte constante de liaison non covalente connue dans la nature^[192]. Ainsi par exemple, la trop forte consommation de blanc d'œuf cru peut résulter en une carence en vitamine H qui peut être fatale.

La structure cristalline de l'avidine a une taille de l'ordre de 2 \AA et révèle la présence d'une boucle de liaison de 13 acides aminés dont la conformation change en fonction de la présence ou non de la biotine^[193].

La Figure 114 présente la surface de contact entre l'avidine et deux de ses ligands, la biotine et l'ester de *para*-nitrophenyl..



Figure 114 : Surfaces de contact de l'avidine liée à la biotine (gauche) et au p-nitrophenyl ester (droite).

¹⁹² E. Pinn, A. Pähler, W. Saenger, G. A. Petsko, N. M. Green. "Crystallization and preliminary X-Ray investigation of avidin." *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 123, 545-546.

¹⁹³ T. Huberman, Y. Eisenberg-Domovich, G. Gitlin, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah. "Chicken avidin exhibits pseudo-catalytic properties." *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 32031-32039.

2. Eléments de ciblage

Lors d'études effectuées sur la reconnaissance de l'avidine par des séquences d'acides aminés *via* des méthodes d'élaboration de bibliothèques de peptides puis de sélection, différents motifs furent trouvés. Ainsi les peptides présentant les séquences :

-H-X-H- ou -H-P-X-P- dans la série des L-acides aminés (X = un des 20 acides aminés naturels), ou les séquences

-r-w-f-, -k-w-x-g-, -k-x-x-w-y-p-, -y-x-x-g-y- dans la série des D-acides aminés (x = un des 20 D-acides aminés),

reconnaissent l'avidine de façon spécifique.

Parmi les peptides sélectionnés par S. Ostergaard et *al.*^[194], on se rend compte que les résidus aliphatiques positionnés en X donnent les séquences ayant le plus d'affinité pour l'avidine. Au contraire, pour la série des D-acides aminés, outre le fait que les séquences reconnues sont très différentes de celles reconnues dans la série des L-acides aminés, ce sont des résidus comme le tryptophane, la tyrosine, la lysine ou l'arginine qui jouent un rôle primordial dans la reconnaissance lorsqu'ils sont positionnés en x.

3. Applications

Les applications liées à la découverte du complexe avidine-biotine sont nombreuses. Ce complexe peut tout d'abord être utilisé pour effectuer une sélection de molécules d'intérêt. Par exemple, comme l'illustre le travail de S. Ostergaard et *al.*, il est possible de synthétiser d'une part une bibliothèque de peptides sur phase solide et d'autre part la protéine cible biotinylée. La mise en incubation de ces deux sortes de molécules résulte en trois types de produits : les peptides non reconnus sur phase solide, la protéine cible biotinylée seule et le complexe biotine-protéine-peptide-résine. Après lavage et élimination de la protéine seule, on ajoute un complexe peroxidase-avidine au mélange. Ce dernier se fixera uniquement sur la biotine restée dans le milieu. Il sera alors possible de sélectionner les peptides d'intérêt en ajoutant le substrat de la peroxydase qui révélera ainsi les billes de résine présentant les peptides reconnus par la protéine cible.

Une autre application est le ciblage de tumeurs à l'aide des fortes interactions entre l'avidine et la biotine. Des équipes de chercheurs travaillant sur le TNF- α , « Tumor Necrosis Factor α », visent à améliorer l'action de ce produit, actuellement en phases cliniques I et II. En effet, le TNF- α possède de bonnes propriétés anti-tumorales et, en particulier, une grande

¹⁹⁴ S. Ostergaard, P. H. Hansen, M. Olsen, A. Holm. "Novel avidin and streptavidin binding sequences found in synthetic peptide libraries." *FEBS Lett.*, **1995**, 362, 306-308.

efficacité dans la destruction sélective de la néo-vascularisation associée au développement des tumeurs *in vitro*. Chez le patient, sa très haute toxicité implique que seule une dose 8 à 20 fois moins importante que celle observée comme étant efficace chez l'animal ne peut être administrée. Ce produit est donc limité pour l'instant à des traitements locaux ou locorégionaux. C'est ainsi que A. Corti et coll.^[195,196] ont développé une nouvelle stratégie utilisant d'une part une molécule de TNF- α biotinylée et une tumeur pré ciblée avec de l'avidine d'autre part. Ils ont ainsi pu observer que l'action conjuguée de ces deux types de molécules induisait une augmentation de la persistance de TNF- α à la surface de la tumeur augmentant ainsi son activité anti-tumorale sans augmenter sa toxicité. Enfin, la présence de ce complexe à la surface de tumeurs a semblé pouvoir diminuer le taux de croissance de cellules dans des conditions expérimentales pour lesquelles le TNF- α non biotinylé était pratiquement inactif.

Enfin, une dernière application est l'utilisation du complexe avidine-biotine pour la purification et la sélection de protéines recombinantes.

B. Tests effectués

Avant d'effectuer les tests de reconnaissance de nos bibliothèques de produits avec l'avidine ainsi qu'avec le complexe avidine-biotine, nous avons tout d'abord réalisé un contrôle négatif. En effet, notre phase stationnaire est constituée d'agarose fixé à de l'avidine. Afin de pouvoir conclure à une éventuelle reconnaissance entre nos produits et l'avidine, il nous faut vérifier que les produits ne reconnaissent pas l'agarose. Pour cela, nous avons utilisé une solution contenant de l'agarose que nous avons laissé incubé sous agitation avec la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]) pendant quelques heures à température ambiante dans du tampon TRIS à pH 7. Nous avons alors transféré cette solution d'incubation dans le corps d'une pipette Pasteur munie d'un coton hydrophile. Après quelques lavages avec la solution tampon, tous les produits furent élués. Nous avons donc conclu que l'ensemble des produits de cette bibliothèque n'avait aucune affinité pour l'agarose et avons ainsi pu procéder à la réalisation de tests avec l'avidine.

¹⁹⁵ A. Corti, A. Gasparri, A. Sacchi, F. Curnis, R. Sangregorio, B. Colombo, A. G. Siccardi, F. Magni. "Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha : structure-activity relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells." *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 3866-3872.

¹⁹⁶ A. Gasparri, M. Moro, F. Curnis, A. Sacchi, S. Pagano, F. Veglia, G. Casorati, A. G. Siccardi, P. Dellabona, A. Corti. "Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models." *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 2917-2923.

1. Test avec l'Avidine sur une phase stationnaire d'agarose

a. Description du test

La phase stationnaire utilisée est identique à celle décrite dans le paragraphe précédent. Il s'agit de molécules d'avidine-agarose.

Une quantité comprise entre 0,3 et 0,9 mg de chacune des quinze bibliothèques est alors solubilisée dans une solution de tampon TRIS contenant de l'acétonitrile afin d'éviter toute précipitation des produits lors du test. On procède alors en plusieurs étapes :

- ⇒ On mesure tout d'abord l'absorbance UV de cette solution ;
- ⇒ Elle est ensuite versée sur la colonne ;
- ⇒ La solution en sortie de colonne des produits non reconnus est mesurée en UV ;
- ⇒ Les produits reconnus sont élués grâce à une solution de NaCl (0,5 M) et leur absorbance mesurée en UV.

La Figure 115 explicite les quatre étapes principales du test.

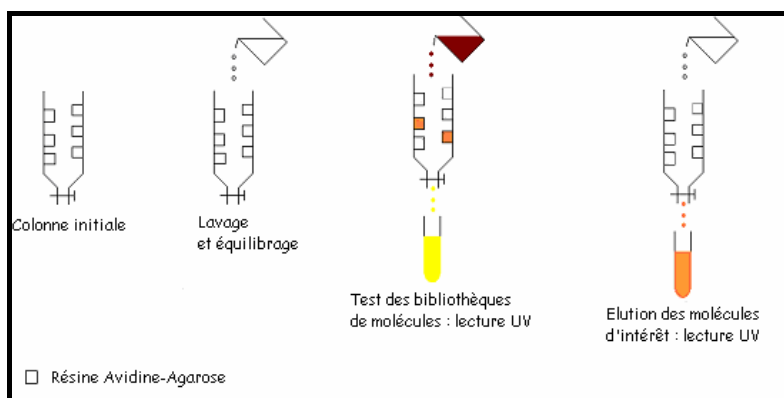


Figure 115 : Description du test des banques sur la phase avidine-agarose.

b. Résultats

Les différentes mesures UV effectuées lors de chaque test nous ont ainsi permis de dresser le tableau de résultats suivant. Le pourcentage mesuré représente la somme des signaux mesurés en sortie de colonne lors du lavage et de l'élué par rapport au signal mesuré pour la solution de départ. Le pourcentage élué établit une comparaison entre le signal de la solution de départ et celui de la solution éluée. Enfin, nous avons calculé le rapport entre ces deux pourcentages afin de pouvoir comparer les différentes valeurs.

Type de RAFT	% mesuré	% élué	% élué / % mesuré
RAFT _{2D} ([14])	100	19,5	0,2
RAFT _{2D} ([15])	80,5	26,8	0,33
RAFT _{2D} ([16])	100	13,5	0,14
RAFT _{2D} ([17])	X	X	X
RAFT _{2D} ([14],[15])	100	21,45	0,21
RAFT _{2D} ([14],[16])	93,4	5,6	0,06
RAFT _{2D} ([14],[17])	78,7	7,9	0,1
RAFT _{2D} ([15],[16])	100	19,6	0,19
RAFT _{2D} ([15],[17])	100	32,4	0,32
RAFT _{2D} ([16],[17])	76	6	0,08
RAFT _{2D} ([14],[15],[16])	46,2	46,1	1
RAFT _{2D} ([14],[15],[17])	86,5	11,5	0,13
RAFT _{2D} ([14],[16],[17])	79,9	13	0,16
RAFT _{2D} ([15],[16],[17])	50	8,1	0,16
RAFT _{2D} ([14],[15],[16],[17])	70,8	1,05	0,01

Tableau 9 : Pourcentages des valeurs mesurées, éluées et rapport de ces valeurs : ■ : bibliothèques présentant le plus d'affinité pour l'avidine.

L'analyse de ce tableau montre que quatre bibliothèques sont majoritairement reconnues. La plus reconnue d'entre elles est la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16]). Ensuite, ce sont deux bibliothèques à deux peptides (RAFT_{2D}([14],[15]) et RAFT_{2D}([15],[17])), puis la bibliothèque constituée du seul peptide 15, RAFT_{2D}([15]). On peut donc penser que les gabarits majoritairement reconnus sont ceux présentant le plus grand nombre de motifs peptide 15.

2. Test avec le complexe Avidine-Biotine sur une phase stationnaire d'agarose

L'intérêt de ce second test est de pouvoir évaluer les emplacements où ont lieu les interactions des conjugués avec la protéine cible. Si les résultats restent inchangés, nous pourrions penser que la présence de la biotine n'influe pas sur les interactions et donc que nos conjugués se lient plutôt en dehors du site de fixation de la biotine sur l'avidine. En revanche, si nous ne détectons plus d'interactions entre nos produits et la cible, nous pourrions penser que les interactions ont lieu au niveau du site de fixation de la biotine.

a. Description du test

La phase stationnaire utilisée est identique à celle décrite plus haut. Il s'agit de molécules d'avidine-agarose. On solubilise alors une petite quantité de biotine dans du tampon TRIS contenant un peu de DMF pour faciliter la solubilisation de la biotine.

Comme précédemment, nous utilisons les mêmes quantités en banques de produits et les mêmes solutions.

Le test réalisé est identique au précédent, il comporte simplement une étape supplémentaire de fonctionnalisation avant le test des banques.

La Figure 116 montre les cinq étapes principales du test.

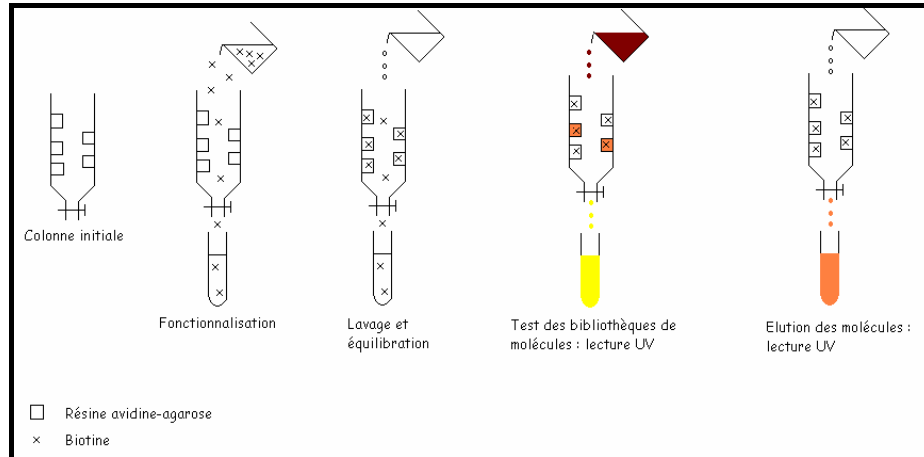


Figure 116 : Description du test des banques effectué avec le complexe avidine-biotine lié à de l'agarose.

b. Résultats

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus pour les différents mélanges, de la même manière que précédemment. Le pourcentage mesuré représente la somme des signaux mesurés en sortie de colonne lors du lavage et de l'élution par rapport au signal mesuré pour la solution de départ. Le pourcentage élué établit une comparaison entre le signal de la solution de départ et celui de la solution éluée. Enfin, nous avons calculé le rapport entre ces deux pourcentages afin de pouvoir comparer les différentes valeurs.

Type de RAFT	% mesuré	% élué	% élué / % mesuré
RAFT _{2D} ([14])	99,5	8,3	0,08
RAFT _{2D} ([15])	74,7	18,2	0,24
RAFT _{2D} ([16])	94,5	X	X
RAFT _{2D} ([17])	X	X	X
RAFT _{2D} ([14],[15])	100	3,7	0,04
RAFT _{2D} ([14],[16])	86,8	2,6	0,03
RAFT _{2D} ([14],[17])	90,2	2,9	0,03
RAFT _{2D} ([15],[16])	86,6	1,3	0,02
RAFT _{2D} ([15],[17])	76,1	3,95	0,05
RAFT _{2D} ([16],[17])	64,1	X	X
RAFT _{2D} ([14],[15],[16])	26,5	26,5	1
RAFT _{2D} ([14],[15],[17])	84	15,5	0,18
RAFT _{2D} ([14],[16],[17])	67,3	15,5	0,23
RAFT _{2D} ([15],[16],[17])	72,9	4,5	0,06
RAFT _{2D} ([14],[15],[16],[17])	79,8	1,85	0,02

Tableau 10 : Pourcentages des valeurs mesurées, éluées et rapport de ces valeurs : [] : bibliothèques présentant le plus d'affinité pour le complexe avidine-biotine.

On note ici que les bibliothèques RAFT_{2D}([14],[15],[16]) et RAFT_{2D}([15]) sont reconnues par le complexe avidine-biotine, mais avec une plus faible affinité que lors du test précédent. On peut donc penser que ces molécules se lient en dehors mais à proximité du site de fixation de la biotine sur l'avidine.

En revanche, la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[16],[17]) se lie avec une meilleure affinité que précédemment, ce qui laisse à penser que les molécules qui la constituent reconnaissent à la fois l'avidine et la biotine.

Enfin, les bibliothèques à deux peptides précédemment reconnues ne présentent ici aucune affinité pour le complexe avidine-biotine, ce qui suggère une interaction dans le site même de fixation de la biotine sur l'avidine.

Ces différentes affinités peuvent s'expliquer par la présence de charges positives au niveau du site de fixation de la biotine ainsi qu'à proximité du site tandis que les peptides utilisés pour constituer les bibliothèques sont majoritairement chargés négativement.

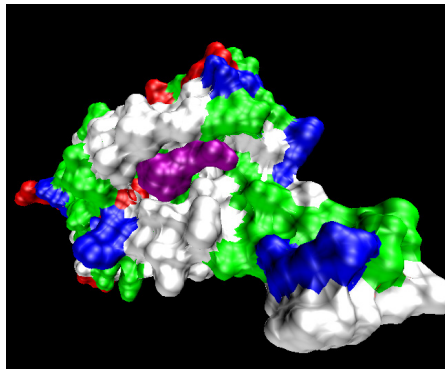


Figure 117 : La protéine avidine en interaction avec une molécule de biotine (mauve) ; les charges positives sont représentées en rouge, les charge négatives en bleu.

III. Ciblage du domaine SH2 de la protéine Grb2

Comme nous l'avons évoqué plus haut, le ciblage du domaine SH2 de la protéine Grb2 interagissant avec la protéine SHC constitue la cible biologique principale du projet ACI dans le cadre duquel s'inscrit cette thèse. Ces deux protéines en interactions font partie d'une cascade de signaux intracellulaires à partir de l'activation du récepteur de facteur de croissance ErbB2.

A. Généralités

La protéine Grb2 fait partie des protéines appartenant aux cascades des réactions induites par les récepteurs à tyrosine kinase, les cascades MAPK.

Il y a au moins 14 familles connues et leur classement est basé sur les différences existant entre leurs domaines extracellulaires. Parmi toutes ces familles, on peut citer différents récepteurs de facteurs de croissance comme :

- ⇒ Les EGFR pour Epidermal Growth Factor Receptors,
- ⇒ Les ILGFR pour Insulin-like Growth Factor-I Receptors,
- ⇒ Les PDGFR pour Platelet Derived Growth Factor Receptors,
- ⇒ Les FGFR pour Fibroblast Growth Factors Receptors,
- ⇒ Les VEGFR pour Vascular Endothelial Growth Factor Receptors...

Tous ces récepteurs à tyrosine kinase ont la propriété de transmettre une information en partant d'un ligand peptidique extracellulaire provoquant un message intracellulaire. Puis après un grand nombre de réactions, l'expression d'un gène est finalement contrôlée pour donner lieu à une activité biologique. Dans la suite de ce paragraphe, nous nous intéresserons plus particulièrement à la sous-classe I de ces récepteurs, la famille des récepteurs de facteur de croissance de l'épiderme.

1. Famille des récepteurs de facteurs de croissance de l'épiderme

a. Généralités

Au sein de la famille des récepteurs de facteur de croissance de l'épiderme, on trouve quatre récepteurs différents, nommés : ErbB1 ou HER1, ErbB2 ou HER2 ou Neu, ErbB3 ou HER3 et ErbB4 ou HER4.

Ces récepteurs ont en commun une région extracellulaire interagissant avec différents ligands ; une région membranaire unique ; un domaine cytoplasmique contenant un domaine à tyrosine kinase. L'ensemble de ces récepteurs est exprimé dans les tissus mésenchymaux, épithéliaux et nerveux où ils jouent un rôle fondamental dans la prolifération, l'adhésion, l'homéostasie, la migration et la différenciation cellulaire.

Sous des conditions physiologiques normales, l'activation de ces récepteurs ErbB est contrôlée avec l'expression spatiale et temporelle de leurs ligands spécifiques. En effet, la liaison d'un ligand à la surface d'un récepteur induit la formation de différents homo- ou hétéro-dimères ayant pour conséquence l'activation du domaine kinase intrinsèque et la phosphorylation de certains résidus tyrosine dans le domaine cytoplasmique du récepteur. Ces résidus servent alors de sites de fixation pour de nombreuses molécules de signalisation entraînant par la suite l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires.

En fonction de la complexité de l'organisme, celui-ci possède un ou plusieurs récepteurs avec un ou plusieurs ligands spécifiques. Par exemple, chez la Drosophile, le système des récepteurs ErbB a évolué pour posséder à présent un seul récepteur avec cinq ligands différents. Chez les vertébrés évolués, il existe quatre récepteurs différents possédant une multitude de ligands induisant la formation de différentes natures de dimères et donnant lieu à une grande diversité de signaux potentiels. Ces récepteurs se trouvent dans une grande diversité de tissus et jouent un rôle important à la fois lors du développement embryonnaire et chez l'adulte.

Chacun de ces récepteurs possède des ligands spécifiques, nommés facteurs de croissance, que l'on peut résumer comme suit^[197]:

Récepteurs	ErbB1 (ou EGFR)	ErbB1 et ErbB4	ErbB3 et/ou ErbB4	ErbB1-ErbB2 hétérodimère	ErbB2
Ligands :	EGF, TGF α , amphiregulin	Betracellulin, epiregulin, HB-EGF	Neuregulin = heregulin = neu differentiation factors = NDF	EGF	Pas de ligand spécifique connu : récepteur orphelin.

Tableau 11 : Les récepteurs ErbB et certains de leurs ligands respectifs.

D'autre part, il a été montré que les récepteurs ErbB1 et ErbB2 sont surexprimés lors de nombreux cancers humains comme les cancers des ovaires, de la prostate ou du sein, générant des tumeurs dues à une dérégulation de l'expression.

¹⁹⁷ M. A. Olayioye, A. Badache, J. M. Daly, N. E. Hynes. "An essential role for Src kinase in ErbB receptor signaling through the MAPK Pathway" *Exp. Cell. Res.*, **2001**, 267, 81-87.

Chacun de ces quatre récepteurs, en plus de posséder des ligands spécifiques, présente des caractéristiques fonctionnelles et tissulaires qui lui sont propres^[198]. Nous ne parlerons ici que du récepteur ErbB2, pour de plus amples informations concernant les trois autres récepteurs, voir en Annexe IV.

⇒ ErbB2

Le récepteur ErbB2 est un récepteur orphelin car on ne lui connaît pas encore de ligand totalement caractérisé. Lors d'études comparatives des régions extracellulaires des récepteurs ErbB1, ErbB2 et ErbB3, il apparaît clairement que ErbB2 possède une grande différence structurale avec les deux autres récepteurs^[199]. En effet, il a été montré que ErbB2 a une conformation fixe proche de celle de ErbB1 lorsque celui-ci est lié et activé par un ligand, c'est-à-dire que la boucle d'interaction est exposée prédisposant à une éventuelle dimérisation.

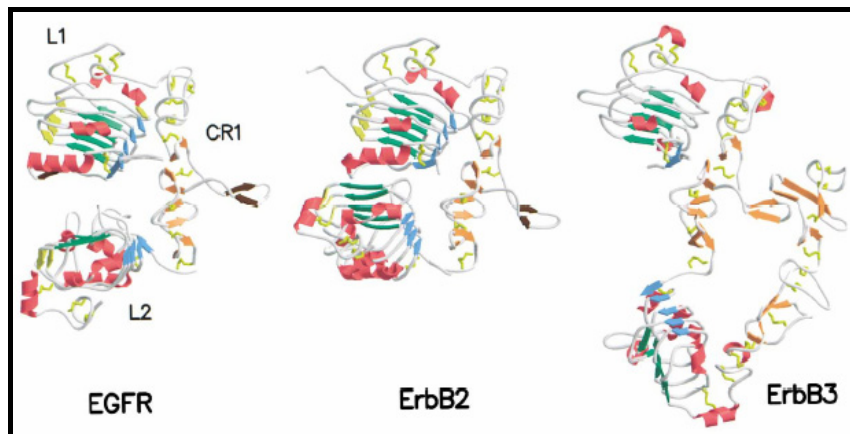


Figure 118 : Comparaison des structures des domaines extracellulaires de ErbB1, ErbB2 et ErbB3.

2. Cascades de réactions induites par les facteurs de croissance

a. Interaction ligand-récepteur et dimérisation

Une fois que le ligand interagit à la surface du récepteur, une cascade de réactions a lieu. Cette cascade de réactions commence tout d'abord par l'homo- ou l'hétérodimérisation des récepteurs induisant leur activation comme le montre la Figure 119^[200] :

¹⁹⁸ X. Chen, G. Levkowitz, E. Tzahar, D. Karunakaran, S. Lavi, N. Ben-Baruch, O. Leitner, B. J. Ratzkin, S. S. Bacus, Y. Yarden. "An immunological approach reveals biological differences between the two NDF/Heregulin receptors, ErbB-3 and ErbB-4." *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 7620-7629.

¹⁹⁹ T. P. J. Garrett, N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, M. Kofler, R. N. Jorissen, E. C. Nice, A. W. Burgess, C. W. Ward. "The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors." *Mol. Cell*, **2003**, 11, 495-505.

²⁰⁰ Livre. L. Stryer. "Biochemistry" p.312.

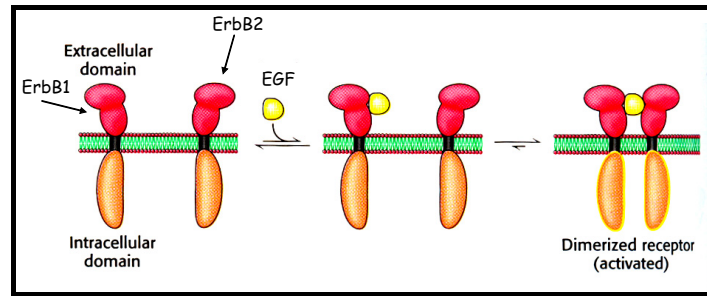


Figure 119 : Représentation schématique de la dimérisation d'un récepteur.

La dimérisation des récepteurs ErbB entraîne l'activation de leur activité kinase intrinsèque. Il est intéressant de noter que toutes les combinaisons d'appariement de ces quatre récepteurs peuvent être induites par leurs dix ligands spécifiques connus, générant ainsi une grande diversité de voies de signalisation intracellulaires^[201].

D'une façon générale, il est à noter que le ligand entraîne la dimérisation des récepteurs. Par la suite, c'est la composition du dimère ErbB qui induit un changement conformationnel qui déterminera finalement le choix du domaine C-terminal du récepteur ErbB dont les tyrosines seront phosphorylées.

b. Phosphorylation et premier ligand

Une fois que le récepteur est activé, une trans-phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques a lieu sur sa partie cytoplasmique. Ces phosphotyrosines constituent des sites de fixation ("docking-site") pour les domaines SH2 et PTB des molécules de signalisation intracellulaires comme par exemple : les protéines adaptables SHC et Grb2, les protéines phosphatases SHP-1 et SHP-2 ou les protéines kinases Phosphatidylinositol 3-kinase et c-Src. Une précision concernant la description des domaines SH2 et PTB se trouve en Annexe IV.

La protéine adaptatrice Grb2 se lie au récepteur de tyrosine kinase grâce à son domaine SH2 et utilise deux domaines SH3 pour se lier au facteur Ras et entraîner une cascade de réactions.

D'une façon générale, il est à noter que les quatre récepteurs ErbB activent le système de signalisation MAPK décrit dans le paragraphe suivant.

c. Système de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)

Ce système de signalisation est l'un des systèmes les plus utilisés par la nature car il permet d'accomplir un nombre gigantesque de transformations. Chez les eucaryotes, il contrôle des réactions cellulaires fondamentales comme la prolifération, la différenciation, la

²⁰¹ M. A. Olayioye. "Intracellular signalling pathways of ErbB2/HER-2 and family members." *Breast Cancer Res.*, **2001**, 3, 385-389.

survie cellulaire ou l'apoptose. Le schéma de réaction classique est composé d'une protéine-G réagissant avec un module central composé de trois kinases : une kinase kinase MAPK (MAPKKK) qui phosphoryle et active une kinase MAPK (MAPKK) qui phosphoryle et active MAPK. Dans le cas présent des récepteurs à tyrosine kinase, la protéine-G est nommée Ras ; MAPKKK est nommée Raf ; MAPKK est nommée MEK et MAPK est nommée ERK^[202].

La protéine adaptatrice SHC se lie au récepteur ErbB phosphorylé via son domaine PTB. Elle est ensuite elle-même phosphorylée et interagit avec l'autre protéine adaptatrice Grb2 qui se lie à SHC via son domaine SH2. D'autre part, Grb2 interagit avec SOS *via* deux domaines SH3. Ce dernier constitue un facteur d'échange GDP/GTP. Il agit alors sur la protéine Ras et l'active en échangeant le groupement GDP qu'elle présente pour un groupement GTP, comme le montre la Figure 120^[203].

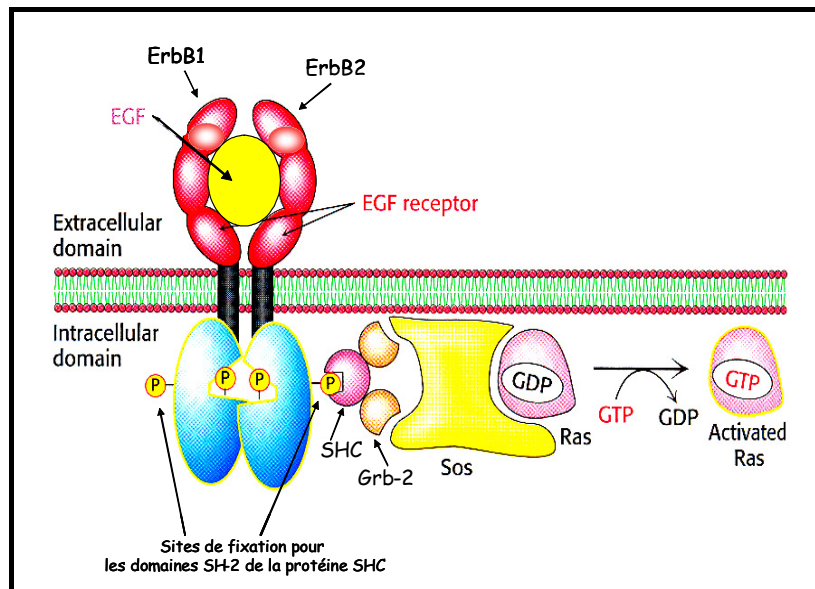


Figure 120 : Représentation schématique d'une partie du système MAPK.

La protéine Ras activée agit à son tour comme un adaptateur qui se lie alors à la kinase Raf avec une forte affinité et provoque leur migration vers la membrane cellulaire où a lieu l'activation de Raf. Une succession de réactions engendre par la suite l'activation du facteur de transcription Elk (cf. Annexe IV).

Celui-ci transcrit alors l'ADN et il en résulte enfin une prolifération cellulaire.

Il paraît logique que tout dysfonctionnement dans le contrôle de l'activation des facteurs de croissance conduit au développement de tumeurs et de cancers (cf. Annexe IV).

²⁰² W. Kolch. "Meaningful relationships : the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." *Biochem. J.*, **2000**, 351, 289-305.

²⁰³ Livre. L. Stryer. "Biochemistry" p.316.

⇒ Les récepteurs de facteurs de croissance...

Depuis qu'une équipe de chercheurs a découvert en 1984 qu'un rétrovirus oncogénique codait pour un homologue muté du récepteur ErbB1^[204], de nombreuses études ont été menées visant à connaître l'implication de ces récepteurs dans le développement du cancer. Dans de nombreux cas, les récepteurs ErbB, en particulier ErbB1 et ErbB2, sont activés à la suite d'une production autocrine de ligands, d'une surexpression de récepteurs ou de mutations comme le résume le tableau ci-dessous^[205] :

Receptor	Activation	Cancer
ErbB1	Mutation (type III)	Glioma Breast, ovarian
ErbB1	Overexpression	SCCHN Breast Ovarian Glioma
ErbB1+ TGF- α	Autocrine loop	SCCHN NSCLC Lung, colon Breast
ErbB2	Overexpression	Breast Ovarian Stomach Bladder Salivary Lung

Tableau 12 : Quelques exemples d'implication des récepteurs ErbB1 et ErbB2 dans les cancers humains.

Il a été démontré que la co-expression de ErbB1 et de ses ligands est associée avec un type de cancer très virulent ayant un faible pronostic.

Quant à l'activation de ErbB2, due à sa surexpression, elle entraîne une hétérodimérisation. Cette surexpression de ErbB2 a lieu dans 30% des cancers du sein ou des ovaires et active une cascade de réactions intracellulaires nommée signalisation de survie, qui favorise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose. Ce signal de survie nécessite l'activation du système MAPK. Il est à noter que l'action tumorigénique de ErbB2 n'est pas seulement limitée à un simple effet de prolifération mais c'est aussi un facteur métastatique^[206]. Enfin, des études réalisées sur différents types de cancers ont montré que la surexpression de ErbB2 dans les tumeurs est liée à une dérégulation génétique plutôt qu'à une amplification génétique.

²⁰⁴ M. J. Hayman, H. Beug. "Identification of a form of the avian erythroblastosis virus erb-B gene product at the cell surface." *Nature (London)*, **1984**, 309, 460-462.

²⁰⁵ T. Holbro, N. E. Hynes. "ErbB receptors : directing key signalling networks throughout life." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2004**, 44, 195-217.

²⁰⁶ S. Ménard, S. M. Pupa, M. Campiglio, E. Tagliabue. "Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer." *Oncogene*, **2003**, 22, 6570-6578.

Enfin, concernant les récepteurs ErbB3 et ErbB4, seulement peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent...

En vue de chimiothérapies, les récepteurs ErbB ont été largement étudiés et différentes stratégies de thérapies ont été développées, *in vitro* :

- ⇒ Inhibition de transcription ou translation,
- ⇒ Inhibition de la localisation du récepteur en surface de cellule grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux,
- ⇒ Déstabilisation du récepteur.

D'autre part, dans les essais cliniques quelques molécules sont également présentes :

- ⇒ Utilisation de petites molécules entrant en compétition avec l'ATP au niveau du domaine kinase du récepteur,
- ⇒ Anticorps empêchant l'interaction de ligands, l'activation du récepteur et/ou induisant l'internalisation du récepteur.

Le Tableau 13 cite quelques exemples de produits en phase de test clinique. A cette liste, nous pouvons ajouter les produits C225[®] et Erbitux[®] ciblant ErbB1 ; Trastuzumab[®] et rhumMAb 4D5[®] ciblant ErbB2 ; ZD-1839[®] et Gefitinib[®] inhibiteurs de ErbB.

Compound	Type	Company	Target	Status	Indication
Herceptin	Hum. mAb	Genentech/ Roche	ErbB2	Approved in several countries	Metastatic breast
Cetuximab	Chim. mAb	Imclone/ Merck/ Bristol-Myers Squibb	ErbB1	Phase III	SCCHN, colon
EMD 72000	Hum. mAb	Merck	ErbB1	Phase I/II	^a
TheraCIM	Hum. mAb	YM Biosciences	ErbB1	Phase I/II	^a
ABX-EGF	Hum. mAb	Abgenix	ErbB1	Phase I	^a
Iressa	TKI	AstraZeneca	ErbB1	Phase III, approved in Japan	NSCLC
Tarceva (OSI-774)	TKI	OSI/ Genentech/ Roche	ErbB1	Phase III	Pancreas
PKI166	TKI	Novartis	ErbB1	Phase II, stopped ^b	^a
CI-1033	TKI, irrev.	Pfizer	ErbB1, ErbB2	Phase II	^a
GW2016	TKI	GlaxoSmith Kline	ErbB1, ErbB2	Phase I	^a
EKB-569	TKI, irrev.	Wyeth	ErbB1	Phase I	^a

Tableau 13 : Produits ciblant les cancers induits par les récepteurs ErbB, en phase clinique^[205].

a : début de phase clinique ; b : ce produit a été retiré à cause de sa toxicité sur le foie trop élevée.
SCCHN : catégories de cancers du cerveau et de la gorge (Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck);
NSCLC : une catégorie de cancer du poumon (Non-Small Cell Lung Carcinoma).

⇒ Herceptin®

L'Herceptin® fut utilisée pour la première fois en 1998 dans le but de traiter des cancers du sein métastatiques où une surexpression de ErbB2 avait été observée. Il s'agit d'un anticorps monoclonal murin humanisé IgG1. En effet, dans les cancers sans surexpression de ErbB2, l'Herceptin® n'a pas montré d'activité antitumorale. L'administration d'Herceptin® à des patientes ayant progressé après un ou deux traitements chimiothérapeutiques a donné de bons résultats en tant que seule molécule active. De plus, l'Herceptin® associée à une chimiothérapie de première ligne conventionnelle a augmenté la survie des patientes. Ce médicament est bien toléré par les patientes et ne présente pas les effets secondaires classiques des agents cytotoxiques classiques. En revanche, ce produit associé à des molécules stimulantes au niveau cardiaque a engendré des dysfonctionnements du cœur.

⇒ Cetuximab®

Cette molécule est un anticorps monoclonal qui se lie à la région extracellulaire de ErbB1 et empêche le ligand de s'y accrocher. De plus, Cetuximab® stimule l'internalisation du récepteur. Il a été testé sur une large gamme de cellules cancéreuses *in vitro* où il a montré une action inhibitrice dans le cycle cellulaire et l'induction à l'apoptose. *In vivo*, Cetuximab® s'est montré efficace dans l'inhibition de croissance tumorale, le blocage d'angiogenèse, l'empêchement de formation de métastases et dans l'augmentation de la réponse à des agents chimiothérapeutiques.

⇒ Iressa®

C'est une petite molécule inhibitrice utilisée dans le traitement des tumeurs solides. Elle est utilisée en monothérapie de second ou troisième rang et a amélioré la survie de patients atteints de NSCLC avancé. Ses effets secondaires sont limités à part une diarrhée aiguë marquant la dose limite à administrer.

Enfin, la technique de vaccination thérapeutique est en développement. Elle induit une mémoire immunologique sur le long terme à l'aide de populations de lymphocytes T et B possédant une cytotoxicité potentielle face à un antigène tumoral spécifique. Néanmoins, des études sur les animaux ont montré que ces vaccins n'ont qu'une activité limitée voire nulle et que cette thérapie était totalement inefficace si elle n'était pas administrée dans les premiers jours suivant l'implantation tumorale...

3. Conception d'inhibiteurs d'interactions Grb2-SHC

La protéine Grb2 joue un rôle essentiel dans la transformation cellulaire au cours de la cascade de réaction MAPK en particulier lors de tumeurs. En effet, entre 40 et 50% des tumeurs mammaires présentent une surexpression des récepteurs de la famille ErbB à tyrosine kinase et la simple suppression de la fonction de la protéine Grb2 suffit à inhiber la prolifération cellulaire oncogénique^[207].

C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes de chercheurs se sont penchées sur l'étude du domaine SH2 de la protéine Grb2 dans le but de découvrir des inhibiteurs potentiels pouvant ainsi bloquer la cascade de réactions qui découle de l'interaction du domaine SH2 de Grb2 avec la protéine SHC.

Dans leur approche, H. W. H. G. Kessels et *coll.*^[208] ont élaboré une banque de peptides dont la séquence générale est la suivante : ASpYXXXXSA où X représente un des vingt acides aminés naturels constituant ainsi une banque de 20⁴ peptides différents. Ces peptides furent d'abord testés pour leur reconnaissance avec le domaine SH2 de Grb2 et les motifs pY-Q/E-N-L/I sont apparus comme présentant les plus fortes affinités. L'équipe a ensuite testé la sélectivité de ces peptides pour ce domaine SH2 précis et les peptides pY-K/R-N-L/I ont été sélectionnés. Il apparaît ainsi qu'en position i+1, par rapport au résidu pY, un résidu Lys ou Arg est nécessaire pour une bonne sélectivité. D'autre part, la position i+2 est fondamentale et doit obligatoirement comporter un résidu Asn pour obtenir une haute affinité entre le peptide et le domaine SH2. Enfin, en position i+3, la présence du résidu Leu ou Ile augmente l'affinité de liaison du peptide pour le domaine SH2.

Dans la même optique, P. Nioche et *coll.*^[209,210] ont étudié les structures cristallines du domaine SH2 de Grb2 en présence de deux séquences peptidiques. La première est dérivée de la séquence de la protéine SHC phosphorylée qui se lie au domaine SH2, P-S-pY-V-N-V-Q-N. La seconde a été synthétisée à partir des travaux de Gay et *coll.*^[211] qui ont montré qu'un peptide phosphorylé contraint présentait une meilleure affinité qu'un peptide

²⁰⁷ Y. Xie, A. M. Pendergast, M. C. Hung. "Dominant-negative mutants of Grb2 induced reversal of the transformed phenotypes caused by the point mutation-activated Rat *HER-2/Neu*." *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 30717-30724.

²⁰⁸ H. W. H. G. Kessels, A. C. Ward, T. N. M. Schumacher. "Specificity and affinity motifs for Grb2 SH2-ligands interactions." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 8524-8529.

²⁰⁹ W. Q. Liu, M. Vidal, N. Gresh, B. P. Roques, C. Garbay. "Small peptides containing phosphotyrosine and adjacent α Me-Phosphotyrosine or its mimetics as highly potent inhibitors of Grb2 SH2 domain." *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3737-3741.

²¹⁰ P. Nioche, W. Q. Liu, I. Broutin, F. Charbonnier, M. T. Latreille, M. Vidal, B. Roques, C. Garbay, A. Ducruix. "Crystal structures of the SH2 domain of Grb2 : highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor." *J. Mol. Biol.*, **2002**, 315, 1167-1177.

²¹¹ B. Gay, P. Furet, C. Garcia-Echeverria, J. Rahuel, P. Chêne, H. Fretz, J. Schoepfer, G. Caravatti. "Dual specificity of Src homology 2 domains for phosphotyrosine peptide ligands." *Biochem.*, **1997**, 36, 5712-5718.

monophosphorylé, mAZ-pY-Ac₆C-N-NH₂ (où Ac₆C = acide cyclohexylaminocarboxylique). W. Q. Liu *et al.*^[212] ont montré qu'un peptide bisphosphorylé était encore plus affiné pour Grb2 et à l'issue de l'étude, la séquence a pu être optimisée pour mAZ-pY-(αMe)pY-N-NH₂ et son activité comparée avec la même séquence ne présentant qu'une αMeY. Il apparaît ainsi que le groupement phosphate est fondamental étant donné que l'activité de la première structure est de l'ordre de 100 fois supérieure à celle de la seconde ($K_d = 3 \pm 1$ nM contre $K_d = 250 \pm 50$ nM). Ils ont ensuite étendu leur étude afin de trouver de nouvelles molécules et ont synthétisé des séquences d'activités comparables à celle de la bisphosphorylée précédente : mAZ-pTyr-(L)(αMe)pPO₃H₂Phe-N-NH₂ ainsi que différentes pro-drogues peptidiques. Il est à noter que le dernier peptide cité présente une activité *in vitro* voisine de celui possédant - (αMe)pTyr- mais qu'il devrait être plus actif *in vivo*. En effet, étant donné que son groupement phosphate est directement greffé au cycle phenyl, sa sensibilité vis-à-vis des phosphatases devrait être plus faible^[212].

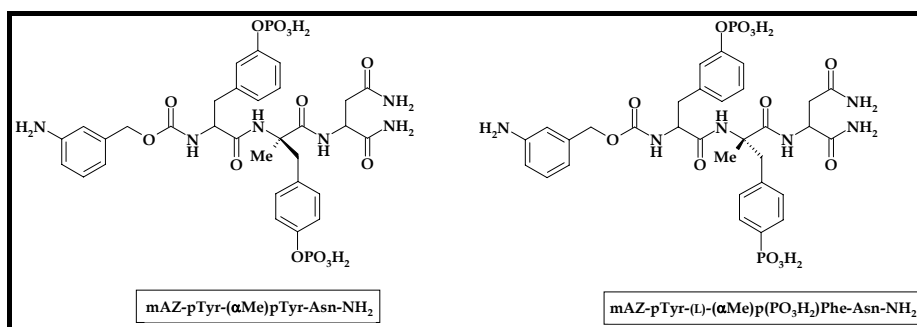


Figure 121 : Structure des deux molécules présentant une activité intéressante face à Grb2.

De leur côté, Z. D. Shi *et coll.*^[213] ont tenté de synthétiser des agents inhibiteurs utilisables dans toutes les cellules et sans nécessité d'utilisation de pro-drogues. Pour cela, ils se sont basés sur des structures de peptides macrocycliques élaborées dans des travaux antérieurs depuis 1998. En améliorant ces molécules, ils sont arrivés à la structure du produit de la Figure 122 qui possède une constante de dissociation de 75 pM (ce qui représente l'affinité la plus élevée jamais reportée d'un récepteur synthétique pour un domaine SH2) et inhibe l'association de Grb2 avec la partie cytoplasmique de ErbB2 avec un $IC_{50} \leq 10$ nM. Ainsi cette molécule pourrait-elle représenter une nouvelle classe de produits thérapeutiquement intéressants dans le ciblage du domaine SH2 de la protéine Grb2.

²¹² W. Q. Liu, M. Vidal, C. Olszowy, E. Million, C. Lenoir, H. Dhôtel, C. Garbay. "Structure-activity relationships of small phosphopeptides, inhibitors of Grb2 SH2 domain, and their prodrugs" *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1223-1233.

²¹³ Z. D. Shi, K. Lee, H. Liu, M. Zhang, L. R. Roberts, K. M. Worthy, M. J. Fivash, R. J. Fisher, D. Yang, T. R. Burke Jr. "A novel macrocyclic tetrapeptide mimetic that exhibits low-picomolar Grb2 SH2 domain-binding affinity." *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **2003**, *310*, 378-383.

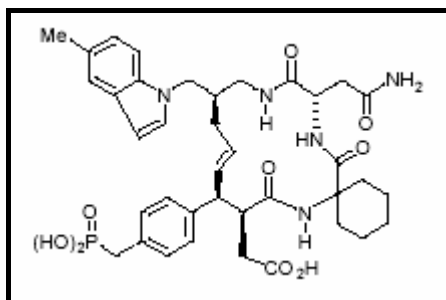


Figure 122 : Tetrapeptide macrocyclique reconnaissant le domaine SH2 de la protéine Grb2.

L. Oligino et *coll.*^[214] se sont aussi intéressés à l'inhibition de l'interaction du domaine SH2 de Grb2 avec la protéine SHC. Dans leur étude, ils ont ainsi pu mettre en évidence que les séquences reconnues ne nécessitaient pas forcément la présence d'un résidu phosphorylé. Ils ont donc généré par « *phage display* » une banque de peptides comportant une séquence de neuf acides aminés variable, encadrée par deux cystéines afin de former des ponts disulfures intramoléculaires. Ils ont ainsi obtenu des peptides présentant une flexibilité conformationnelle limitée en comparaison avec les mêmes peptides linéaires. Cette banque de peptides a ensuite été testée sur le domaine SH2 de Grb2. D'autre part la séquence de SHC liant le domaine SH2 a été testée, donnant un IC₅₀ standard de 2 µM. Enfin, un peptide de la banque a été sélectionné puis testé en présence de la séquence SHC. Il apparaît alors que ce dernier peptide, c[C-E-L-Y-E-N-V-G-M-Y-C], bloque l'interaction de SHC sur le domaine SH2 donnant à penser qu'il se lie à côté ou dans la poche de liaison du peptide phosphorylé. D'autre part, la présence du pont disulfure semblerait importante pour l'interaction entre le domaine SH2 et le peptide dont l'affinité de liaison est de l'ordre du micromolaire.

L'équipe de Y. Z. Lin a effectué une étude similaire portant sur l'inhibition d'interaction entre la protéine SHC et le domaine SH2 de la protéine Grb2 par une séquence peptidique non phosphorylée. En effet, l'étude de cellules transformées montre la présence de protéines SHC non phosphorylées en interaction avec Grb2. Tout d'abord, M. Rojas et *coll.*^[215] ont étudié les différences d'affinités de la protéine SHC pour le domaine SH2 de Grb2 en fonction de l'état de phosphorylation du résidu tyrosine 317 (de SHC). Il a ainsi été démontré dans un premier temps, à la fois *in vivo* et *in vitro*, que des peptides contenant le résidu tyrosine se liaient au domaine SH2 de Grb2 quel que soit leur état de phosphorylation. Dans un deuxième temps, l'équipe a cherché à mettre au point une séquence peptidique non phosphorylée présentant la même affinité pour Grb2 que la protéine SHC. Il apparaît ainsi que

²¹⁴ L. Oligino, F. D. Lung, L. Sastry, J. Bigelow, T. Cao, M. Currant, T. R. Burke, Jr., S. Wang, D. Krag, P. P. Roller, C. R. King. "Nonphosphorylated peptide ligands for the Grb2 Src homology 2 domain." *J. Biol.Chem.*, **1997**, 272, 29046-29052.

²¹⁵ M. Rojas, S. Y. Yao, J. P. Donahue, Y. Z. Lin. "An alternative to phosphotyrosine-containing motifs for binding to an SH2 domain." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 234, 675-680.

le groupement hydroxyl du résidu tyrosine joue un rôle prépondérant dans la reconnaissance du peptide pour Grb2 et qu'il nécessite un groupement acide carboxylique à proximité mimant le groupement phosphate en formant des liaisons hydrogènes avec le groupement hydroxyl. Pour cela, ils ont donc inséré un coude entre les résidus acide aspartique et tyrosine à l'aide de la séquence D-P-S . Par la suite, ils ont augmenté l'affinité du peptide en lui greffant la séquence V-N-V sur sa partie C-terminale, séquence commune à celle de la protéine SHC. Le peptide résultant, D-D-P-S-Y-V-N-V, se lie alors au domaine SH2 de Grb2 avec une bonne affinité.

Etant donné que les peptides ont souvent une faible stabilité métabolique en tant qu'agents thérapeutiques, P. Furet et son équipe ont réalisé la synthèse *de novo* de petites molécules non peptidiques antagonistes au domaine SH2 de Grb2^[216]. Dans ce but, ils ont tout d'abord étudié les interactions entre le domaine SH2 et une séquence possédant une tyrosine phosphorylée appartenant à un ligand de Grb2. Pour cela, ils ont cristallisé le complexe et l'ont observé aux rayons X. Il apparaît alors que le résidu tyrosine phosphorylé ainsi que le résidu asparagine sont des éléments clef dans la reconnaissance avec la cible. En effet, le groupement carboxyamide de l'asparagine réalise trois liaisons hydrogène tandis que le groupement phenyl phosphate est impliqué à la fois dans la formation de ponts salins et des interactions amine-aromatique avec les arginines de la protéine. Dans le but de mimer l'action de ces groupements et à l'aide de modélisation moléculaire, l'équipe a réalisé la synthèse de deux composés comportant un groupement 4-aminopyrimidine, un groupement phenyl phosphate et un espaceur à trois atomes. Le premier composé possède un espaceur aminoethyl, de conformation extrêmement flexible, tandis que le second présente un cycle aromatique conférant ainsi à la molécule une certaine rigidité par conjugaison, comme le montre la Figure 123 :

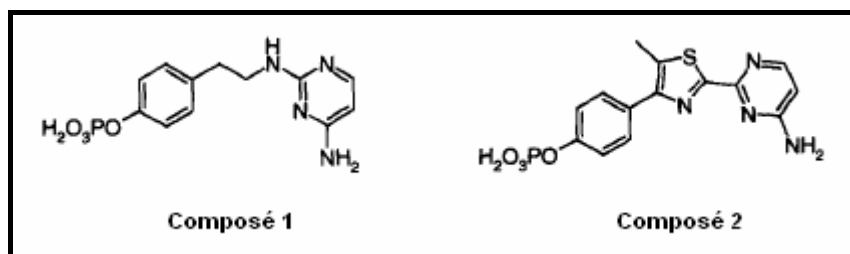


Figure 123 : Composés non peptidiques reconnaissant le domaine SH2 de Grb2.

Des tests d'inhibition ont ensuite été réalisés sur ces deux molécules et des peptides de référence. Il apparaît alors que le premier composé ne présente pas d'activité pour une

²¹⁶ G. Caravatti, J. Rahuel, B. Gay, P. Furet. "Structure-based design of a non-peptidic antagonist of the SH2 domain of Grb2." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 1973-1978.

concentration de 200 μM tandis que le second possède un IC_{50} de 26 μM , ce qui est comparable aux activités des peptides de référence. On peut attribuer cette différence à la rigidité du second composé lui conférant ainsi un avantage entropique sur le premier composé et augmentant son affinité pour le domaine SH2 de Grb2.

Une autre cible inscrite dans le projet ACI est la protéine Erbin. Des informations complémentaires se trouvent dans l'Annexe IV à propos de molécules inhibant ses interactions avec d'autres protéines.

B. Description du test

Dans le but de tester nos banques de peptides avec le domaine SH2 de la protéine Grb2, un test ELISA a été mis au point. Il résulte d'une collaboration avec le Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM U648, CNRS FRE 2718, Faculté de Pharmacie, Université René Descartes, 4, avenue de l'observatoire, 75270 Paris cedex 06 (France). Ce test se déroule sur trois jours consécutifs et est composé de sept étapes décrites ci-dessous.

Ce test nécessite l'utilisation d'une plaque comportant 96 puits et possédant une couche de Streptavidine. D'autre part, la protéine cible, Grb2, se trouve sous forme chimérique avec la protéine GST qui sera ensuite reconnue par un anticorps anti-GST lors de la révélation du test.

Les protéines GST (Glutathione S-Transferase) sont une famille d'enzymes qui catalysent la formation de conjugués entre la glutathione (GSH) et une large variété de composés électrophiles comme des médicaments ou des toxines par exemple.

Ce test se réalise en cinq étapes :

- ⇒ immobilisation d'une des deux protéines ciblées ;
- ⇒ compétition entre la seconde protéine cible et les conjugués testés ;
- ⇒ réaction avec un premier anticorps (anti-GST) ;
- ⇒ réaction avec un second anticorps, couplé à une peroxidase ;
- ⇒ révélation du test et lecture des données.

La Figure 124 résume ces différentes étapes.

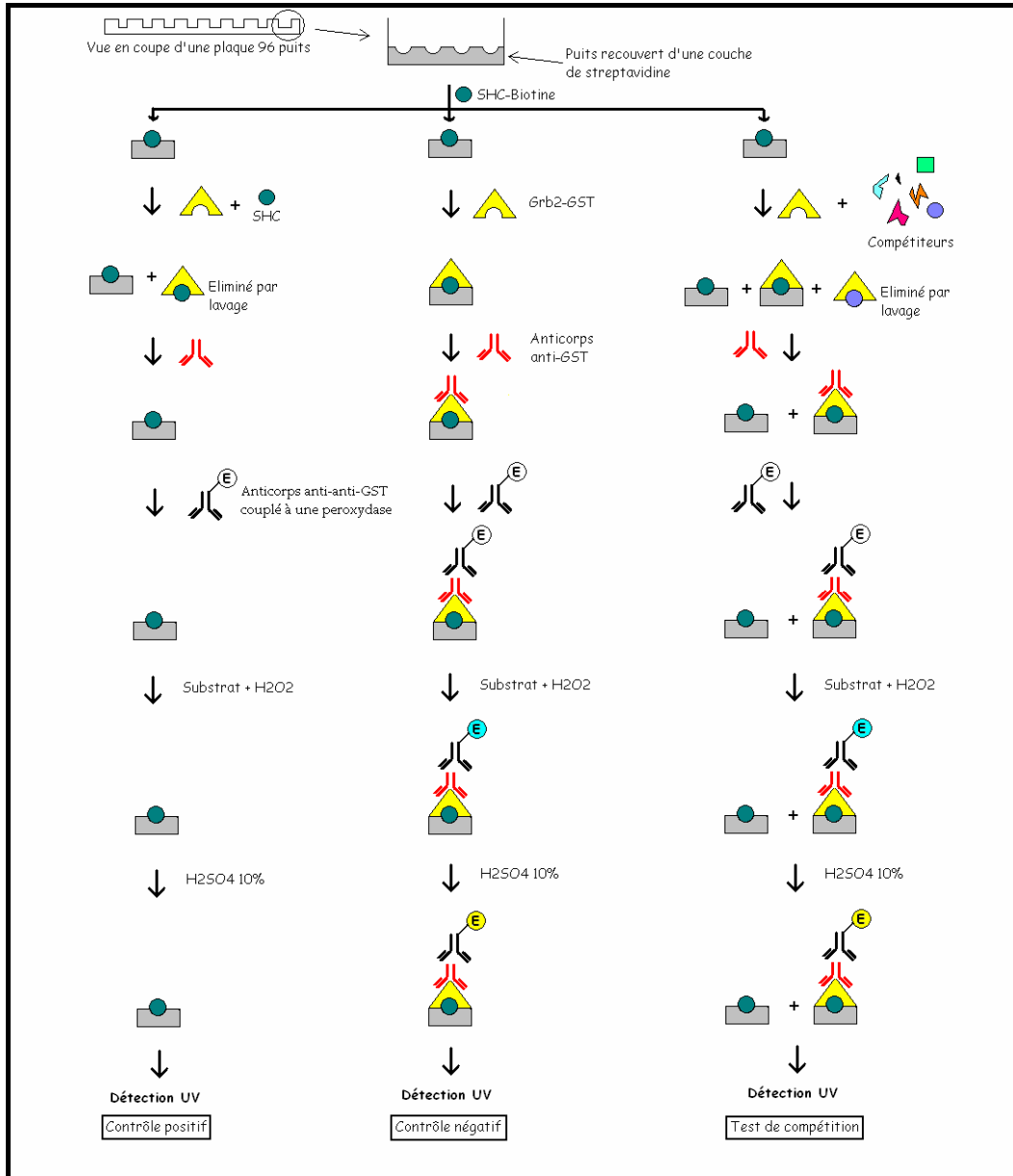


Figure 124 : Test ELISA d'inhibition d'interaction entre les protéines SHC et Grb2.

Précisions concernant la révélation du test

On ajoute pour cela une solution de réactif composée de 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine et de H₂O₂ 1 : 1 que l'on laisse réagir exactement 8 min.

Dans les puits contenant un anticorps couplé à une enzyme peroxydase, la solution prend une coloration bleu-vert ; on n'observe pas de changement de couleur dans les autres puits. En effet, la peroxydase, présente dans certains puits, catalyse la réaction d'oxydation de la 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine en présence de peroxyde d'hydrogène comme décrit ci-dessous^[217,218]. Il est à noter que si l'on laisse ces deux réactifs en présence pendant une trentaine de minutes, la même réaction a lieu. Il est donc impératif de contrôler les temps de réaction de façon précise.

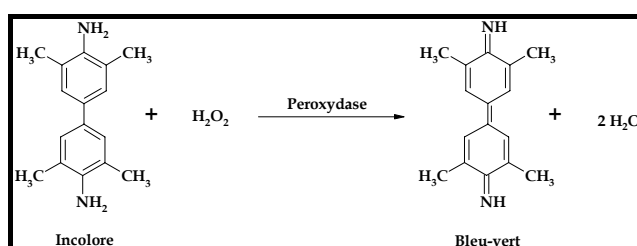


Figure 125 : Oxydation de la 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine par H₂O₂, catalysée par une peroxydase.

La réaction est ensuite stoppée par l'ajout d'acide sulfurique à 10% qui bloque la réaction en protonant la molécule précédemment réduite, comme le montre la Figure 126. La coloration bleu-vert vire alors au jaune que l'on mesure rapidement en absorbance à 450 nm.

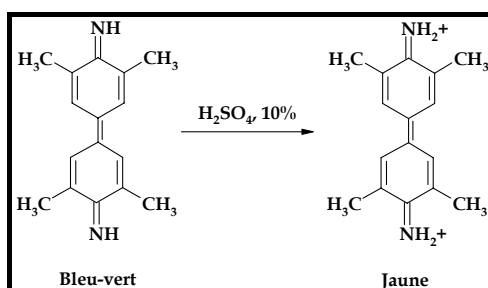


Figure 126 : Quenshing de la réaction.

Une représentation visuelle des différentes étapes de ce test se trouve en Annexe IV.

C. Résultats et conclusions

Nous avons testé les banques de peptides linéaires. Ces peptides linéaires ne sont pas contraints conformationnellement et présentent plusieurs motifs aromatiques (Phe, Trp),

²¹⁷ V. R. Holland, B. C. Saunders, F. L. Rose, A. L. Walpole. "A safer substitute for benzidine in the detection of blood." *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 3299-3302.

²¹⁸ H. H. Liem, F. Cardenas, M. Tavassoli, M. B. Poh-Fitzpatrick, U. Muller-Eberhard. "Quantitative determination of haemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, a safe substitute for benzidine." *Anal. Biochem.*, **1979**, *98*, 388-393.

chargés négativement (Asp) ou présentant un groupement carbamide (Asn) qui semblent être impliqués dans la reconnaissance entre la protéine Grb2 et son ligand spécifique. Nous avons tout d'abord testé ces bibliothèques à une concentration unique afin de déterminer si certains produits présentaient une activité face à la protéine. A l'issue de plusieurs tests et d'une mise au point quant à la teneur finale en DMSO (10%), nous avons observé que cinq banques à deux domaines, parmi les douze testés, présentaient une activité face à la protéine. Concernant les RAFT à un domaine, l'ensemble des mélanges a été testé mais n'a pas donné de résultat d'inhibition satisfaisant. Par la suite, nous évoquerons donc principalement les mélanges constitués à partir de RAFTs à deux domaines. Nous avons testé chaque mélange indépendamment et certains à différentes concentrations.

1. Détermination de la concentration des mélanges

Etant donné qu'il s'agit de mélanges constitués de molécules de poids moléculaires différents, variant entre 3930 et 6186 g.mol⁻¹, il existe différentes méthodes pour déterminer la masse moléculaire moyenne de chaque mélange.

Dans notre approche, nous avons calculé la masse moléculaire moyenne des mélanges en prenant en compte chaque molécule du mélange et non pas en déterminant une moyenne arbitraire entre les masses molaires des extrémités.

⇒ RAFTs à un ligand : il n'y a qu'une seule molécule en solution, la concentration finale doit donc être au minimum de 1 μM et la solution mère de 10 μM ;

⇒ Mélanges à deux peptides : pour chacun de ces mélanges, 16 composés sont formés. Il faudra donc que la concentration finale globale minimale soit de 16 μM et la solution mère de 160 μM ;

⇒ Mélanges à trois peptides : 81 composés sont formés nécessitant une concentration finale de 81 μM avec une solution mère de 810 μM ;

⇒ Banque « mère » à quatre peptides : ce mélange présente l'ensemble de toutes les molécules qu'il est possible de former de façon aléatoire à l'aide de quatre peptides sur quatre sites de liaison soit 256 molécules. La concentration finale de la solution doit donc être de 256 μM lors du test, il est donc impératif que la solution mère ait une concentration de 2,56 mM.

En ce qui concerne le mélange à un domaine, la concentration de la solution mère sera de 1,36 mM car 136 molécules sont formées pour une masse molaire globale de 4564 g.mol⁻¹.

2. Test global à 1 μ M et 0,1 μ M

Parmi les quinze mélanges à deux domaines précédemment cités, douze ont été testés aux concentrations de 1 μ M et de 0,1 μ M : RAFT_{2D}([14]); RAFT_{2D}([15]); RAFT_{2D}([17]); RAFT_{2D}([14],[15]); RAFT_{2D}([14],[16]); RAFT_{2D}([14],[17]); RAFT_{2D}([15],[16]); RAFT_{2D}([15],[17]); RAFT_{2D}([16],[17]); RAFT_{2D}([14],[15],[16]); RAFT_{2D}([15],[16],[17]); RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]).

Lors de la première série de tests que nous avons effectuée, la teneur finale en DMSO était de 1%. Nous avons observé que certains mélanges présentaient une activité mais les solutions mères ayant précipité, nous avons réitéré le test dans 10% de DMSO pensant que la précipitation des produits avait biaisé les résultats du test. Lors de la seconde série de tests, les activités des mélanges se sont trouvées confirmées avec un meilleur signal. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus. Les valeurs surlignées en bleu sont celles du test négatif. Au contraire, les valeurs d'absorbance surlignées en jaune sont plus faibles, elles présentent une inhibition pour les mélanges :

- ⇒ RAFT_{2D}([14],[15],[16]) (C-F 11) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) (G 10-11/ H 10-11) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([14],[17]) (A-F 10) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([15],[17]) (A-F 8) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([16],[17]) (A-F 50) et
- ⇒ RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]) (G 5-7/ H 5-7),

qui furent testés aux deux concentrations, deux et trois fois respectivement.

Les valeurs surlignées en rose correspondent quant à elles aux valeurs d'absorbance obtenues pour le contrôle en compétition (ou contrôle positif) effectué à différentes concentrations en ligand SHC317.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.928	1.826	1.868	1.998	1.830	1.793	1.870	1.780	1.259	1.506	2.417	0.501
B	1.858	1.496	1.482	1.609	1.482	1.493	1.452	1.603	1.361	1.007	2.313	0.452
C	2.001	1.922	2.020	1.995	1.777	1.691	1.579	1.751	1.170	1.548	1.359	0.674
D	2.068	1.632	1.526	1.654	1.492	1.560	1.456	0.811	1.498	1.510	1.533	1.048
E	0.233	1.896	1.889	1.956	1.864	1.773	1.851	1.869	1.178	1.398	1.429	0.088
F	0.238	1.664	1.588	1.649	1.550	1.339	1.563	1.681	1.510	1.633	1.620	0.092
G	0.267	2.076	1.996	1.887	0.786	0.742	0.683	1.851	1.788	1.600	1.566	0.088
H	0.288	1.653	1.776	1.763	1.244	1.177	1.058	1.702	1.837	1.700	1.634	0.093

Tableau 14 : D.O. obtenues à 450nm. Les valeurs les plus faibles correspondent à une concentration de 1 μ M en molécules testées.

On peut alors en déduire les pourcentages d'inhibition pour les mélanges présentant une activité :

Mélanges à 1µM	RAFT _{2D} ([14],[17])	RAFT _{2D} ([15],[17])	RAFT _{2D} ([16],[17])	RAFT _{2D} ([14],[15],[16])	RAFT _{1D} ([14],[15],[16],[17])	RAFT _{2D} ([14],[15],[16],[17])
Réduction du Signal Maximal (%)	37,4%	23,9%	49,3%	41,2%	33,2%	68,8%

Tableau 15 : Pourcentages d'inhibitions pour six mélanges testés.

A la vue de ces résultats, nous avons testé cinq de ces six mélanges à différentes concentrations afin de pouvoir déterminer les valeurs d'IC₅₀ de chaque banque. Nous avons d'autre part effectué la même étude pour le peptide servant lors du contrôle positif.

3. Test à différentes concentrations

a. Le peptide utilisé pour le contrôle positif (SHC317)

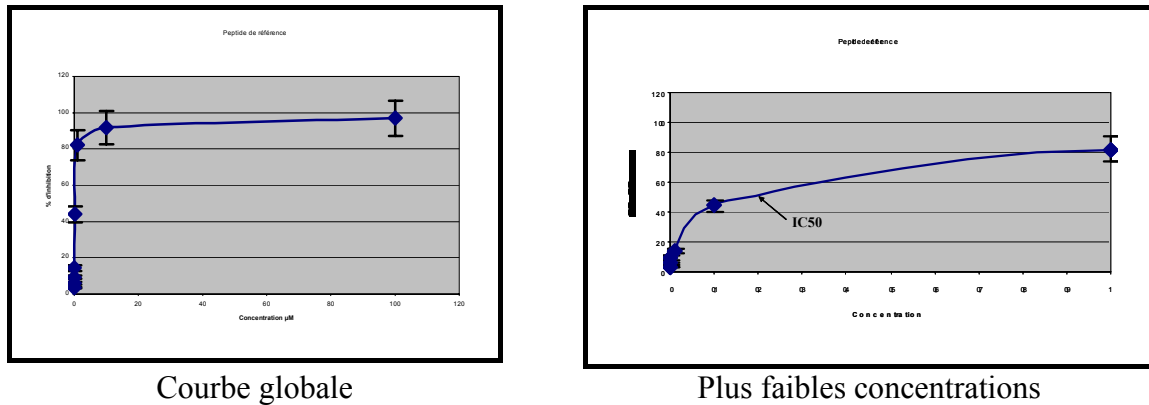


Figure 127 : Courbes d'inhibition pour le peptide de référence

Après l'analyse de ces deux courbes, on peut dire que nous avons atteint les concentrations en peptide pour 100% d'inhibition ainsi que pour une inhibition nulle. Ainsi ce peptide a-t-il un IC₅₀ de 0,2 µM.

b. Test de la banque RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17])

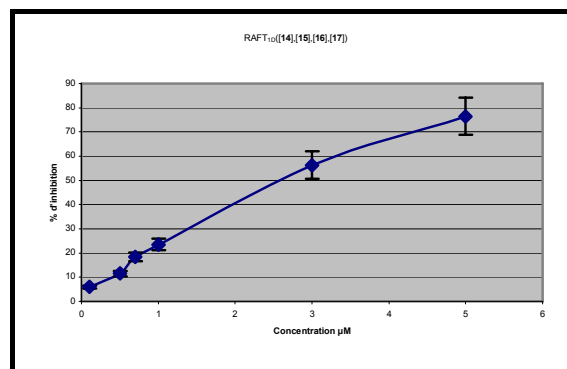


Figure 128 : Courbe d'inhibition de la bibliothèque RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]).

La courbe obtenue ne présente pas la forme classique des courbes d'inhibition, on peut donc penser que nous n'avons pas encore réellement atteint les limites frontières aussi bien dans les plus faibles concentrations que dans les plus hautes. Néanmoins, et en extrapolant, nous pouvons évaluer un IC_{50} de l'ordre de 2,7 μM .

c. Test de la banque RAFT_{2D}([14],[17])

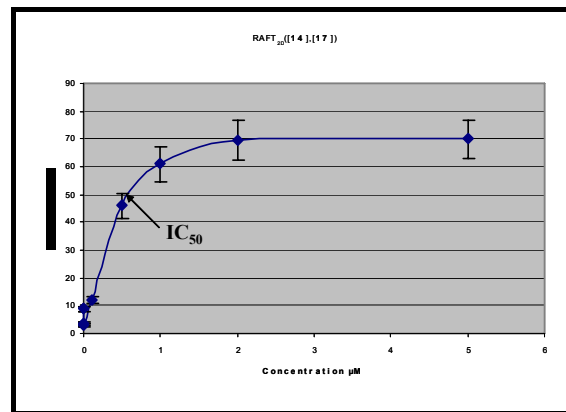


Figure 129 : Courbe d'inhibition de la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[17]).

Cette courbe ressemble bien à celle obtenue avec le peptide de référence utilisé pour le test. En effet, elle présente un plateau de saturation vers les hautes concentrations en produit. Nous pouvons donc déterminer un IC_{50} de 0,6 μM pour ce mélange.

d. Test de la banque RAFT_{2D}([15],[17])

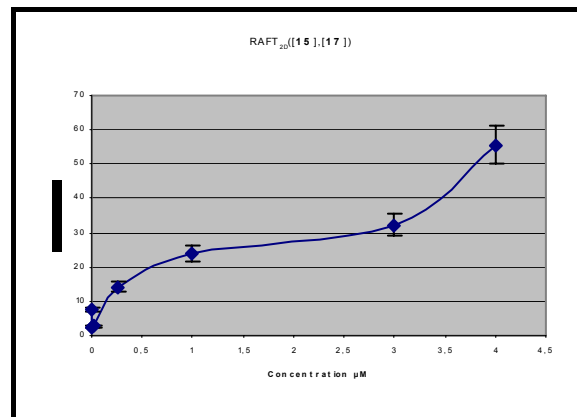


Figure 130 : Courbe d'inhibition de la bibliothèque RAFT_{2D}([15],[17]).

Cette courbe est très surprenante dans sa forme. Elle ne présente pas de plateau de saturation de concentration mais un plateau pour des concentrations comprises entre 1 et 3 μM . On peut donc supposer un IC_{50} de l'ordre de 2 μM pour ce mélange, mais ce résultat nécessite une confirmation à l'aide de tests supplémentaires. On peut également supposer que le fait de tester un mélange de plusieurs produits peut avoir des répercussions sur l'allure de la courbe d'inhibition résultante. En effet, si plusieurs produits du mélange sont actifs mais ont

des IC_{50} différents, il est tout à fait possible d’imaginer que la courbe d’inhibition résultante présentera plusieurs plateaux...

e. Test de la banque RAFT_{2D}([16],[17])

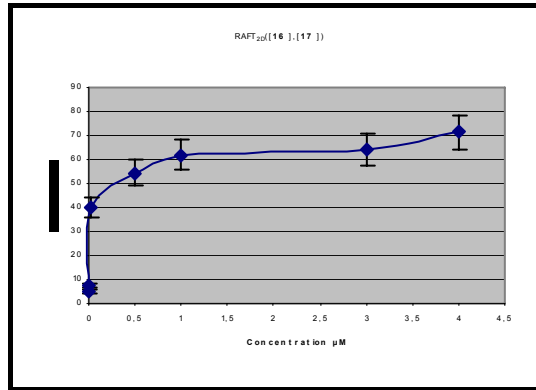


Figure 131 : Courbe d’inhibition de la bibliothèque RAFT_{2D}([16],[17]).

En faisant les mêmes observations que pour la banque précédente, on peut conclure d’un IC_{50} de 0,3 µM pour ce mélange.

f. Test de la banque RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])

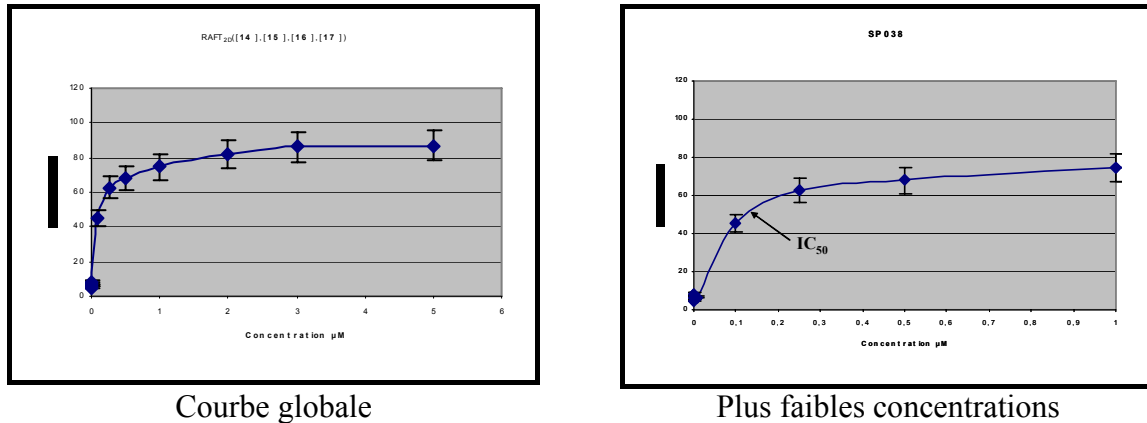


Figure 132 : Courbes d’inhibition de la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]).

Les courbes obtenues sont tout à fait satisfaisantes dans la forme qu’elles adoptent : elles sont comparables avec les courbes obtenues pour le peptide de référence. D’autre part, leur analyse donne un IC_{50} de 0,12 µM, inférieur à celui du peptide de référence, ce qui est très encourageant.

4. Conclusions

Les valeurs d'IC₅₀ que nous avons obtenues pour les différents mélanges se trouvent résumées ci-dessous :

Mélanges	Peptide de référence	RAFT _{2D} ([14],[17])	RAFT _{2D} ([15],[17])	RAFT _{2D} ([16],[17])	RAFT _{1D} ([14],[15],[16],[17])	RAFT _{2D} ([14],[15],[16],[17])
IC ₅₀ (µM)	0,2	0,6	X	0,3	2,7	0,12

Tableau 16 : Valeurs d' IC₅₀ des différents cinq mélanges testés ainsi que du peptide de référence.

Il apparaît ainsi qu'une bibliothèque présente une meilleure affinité pour le domaine SH2 de la protéine Grb2 que le peptide de référence utilisé pour le test. Il s'agit ici de la bibliothèque composée de toutes les molécules qu'il est possible de former à l'aide de quatre peptides en les greffant sur le RAFT. Cette haute affinité pourrait donc s'expliquer de plusieurs manières.

La première serait qu'une ou plusieurs de ces molécules présentent en effet une bonne affinité pour la protéine Grb2. Mais dans ce cas encore, il est important de considérer ce résultat avec recul. Si plusieurs molécules jouent un rôle dans la reconnaissance avec la protéine, alors, le calcul de l'IC₅₀ est biaisé. Il est important de considérer que la valeur d'IC₅₀ que nous observons est celle du mélange testé. A partir de cette considération, il y a plusieurs cas de figure envisageables :

⇒ si un composé est très actif au sein du mélange, le pourcentage d'inhibition des interactions atteindra rapidement son maximum sans que nous ne puissions détecter l'activité d'un autre composé ;

⇒ si plusieurs composés sont actifs au sein du mélange et avec un IC₅₀ du même ordre de grandeur, l'IC₅₀ résultant pour le mélange sera biaisé. En effet, il sera inférieur à l'IC₅₀ de chaque conjugué car la présence de plusieurs composés d'activités comparables augmente artificiellement la concentration en composé actif. D'autre part, on pourra avoir la fausse impression qu'il n'y a qu'un seul composé très actif. L'IC₅₀ résultant pour le mélange pourrait alors être plusieurs fois inférieur à la valeur des IC₅₀ des composés actifs considérés individuellement.

La meilleure configuration serait bien sûr qu'il n'y ait qu'une seule molécule reconnaissant la protéine cible, mais cela ne semble guère être le cas au vu des valeurs des IC₅₀ des sous-bibliothèques présentant une activité. En effet, leur valeur étant inférieure à celle de la bibliothèque « mère », il est plus vraisemblable que la valeur de 0,12 soit une

valeur résultante de l'activité de plusieurs molécules provenant de plusieurs sous-bibliothèques.

La seconde serait qu'arbitrairement, nous avons voulu effectuer ce test à des concentrations calculées en tenant compte du nombre de molécules différentes présentes dans chaque mélange. Cette approche possède l'avantage de ne pas favoriser une molécule par rapport à une autre, mais l'inconvénient est que plus le mélange contient de molécules, plus il devra être concentré. Ainsi est-il possible de biaiser le test en utilisant des solutions globalement trop concentrées en molécules à tester.

Enfin, en comparant les IC_{50} des deux mélanges globaux, ne différant que par la séquence de leur châssis peptidique, il est légitime de s'interroger. Pourquoi ces deux bibliothèques, *a priori* identiques du point de vue des molécules impliquées dans la reconnaissance, ne possèdent-elles pas un IC_{50} identique et *a fortiori* ont-elles une telle différence, de l'ordre d'un facteur 20, entre leurs deux valeurs d' IC_{50} ? La présence du groupement dabsyl sur la face inférieure du RAFT à deux domaines joue-t-elle un rôle dans cette différence? On serait tenté de répondre que non. En effet, si le groupement dabsyl était impliqué d'une façon quelconque dans la reconnaissance, pourquoi y aurait-il alors une telle différence d'activité entre des mélanges comparables (RAFT + deux peptides par exemple)? Nous ne pouvons pas répondre à cette question pour l'instant car l'évaluation des matrices sans substituants ainsi que des substituants seuls sont actuellement en cours au laboratoire.

D'autre part, nous observons aussi la présence de deux sous-bibliothèques possédant des IC_{50} de l'ordre de celui du peptide de référence. Ces résultats sont encourageants pour trois raisons.

La première, est que ces deux sous-bibliothèques sont des mélanges à deux peptides différents avec un RAFT à deux domaines. Ce qui implique qu'elles ne sont théoriquement composées que de 16 produits, leur concentration globale étant donc beaucoup plus faible que celle de la bibliothèque principale. Pourtant, nous observons une inhibition tout à fait satisfaisante, on ne peut donc pas attribuer cette inhibition à une concentration globale trop élevée de la solution. Ainsi l'hypothèse de restriction émise plus haut concernant la bibliothèque principale et sa concentration globale trop élevée peut-elle être écartée.

La seconde est que ces deux sous-bibliothèques font partie d'un groupe comparable de mélanges constitués de deux peptides différents et d'un RAFT à deux domaines présentant un groupement dabsyl sur sa face inférieure. Or, il apparaît que parmi ces six mélanges, seuls deux présentent une activité visible, un troisième paraît aussi inhiber l'interaction protéine-peptide mais avec plus de difficulté. Quant aux trois autres mélanges, ils n'ont aucune activité

concluante malgré la répétition du test. On peut donc en conclure qu'il y a une certaine sélectivité au niveau de la reconnaissance entre les molécules du mélange et la protéine cible. Ceci pourrait donc constituer un premier élément de réponse quant à l'implication éventuelle du groupement dabsyl, non sélectif, dans la reconnaissance...

Enfin, la troisième est que ces deux mélanges ont en commun le peptide **17** ce qui pourrait donner un premier élément de corrélation entre la présence du peptide **17** et de molécules actives dans les mélanges testés. Lors du test de la matrice présentant quatre motifs **17**, nous avons également noté une bonne activité du conjugué.

On peut donc penser, comme nous l'évoquions plus haut, que nous avons plusieurs conjugués actifs, le RAFT_{2D}([**17**]₄) tout d'abord. Ce qui peut expliquer l'activité des trois banques à deux ligands. Nous avons également la banque à trois ligands RAFT_{2D}([**14**],[**15**],[**16**]) qui est active mais dont les sous-éléments ne sont pas actifs, on peut donc penser que ce sont les matrices présentant trois ligands différents qui ont une activité. Enfin, nous pouvons faire la même hypothèse concernant la banque « mère », il est possible que les matrices présentant quatre substituants différents aient une activité.

Pour plus de clarté, nous avons dressé le Tableau 17. Il représente la corrélation entre les bibliothèques inhibitrices et les peptides les composant :

Mélanges principaux	14,15,16,17	14,15,16	15,16,17	14,16,17	14,15,17
Sous-mélanges	14,15,16	14,15	15,16	14,15	14,15
	15,16,17	14,16	15,17	14,17	14,17
	14,16,17	15,16	16,17	16,17	15,17
	14,15,17	14	15	14	14
	14,15	15	16	16	15
	14,16	16	17	17	17
	14,17				
	15,16				
	15,17				
	16,17				
	14				
	15				
	16				
	17				

Tableau 17 : Corrélation entre les différentes bibliothèques, leur activité et les peptides les composant.

Bibliothèque non surlignées : non inhibitrices ; Bibliothèques : inhibitrices .

Ces résultats sont encore à considérer avec recul et la tendance observée devra être confirmée par des études complémentaires. En effet, il est surprenant par exemple d'observer une activité pour les sous-mélanges RAFT_{2D}([15],[17]), RAFT_{2D}([16],[17]) et RAFT_{2D}([17]) tandis que la bibliothèque les englobant, RAFT_{2D}([15],[16],[17]), ne semble pas active...

IV. Perspectives : ciblage d'une enzyme, l' α -chymotrypsine

Pour effectuer un travail le plus complet possible, nous avons également choisi de cibler une enzyme. Le premier exemple qui nous est apparu fut celui de l' α -chymotrypsine à cause de l'étude de A. D. Hamilton *et coll.* et que nous avons citée plus haut. Malheureusement, nous n'avons pas eu assez de temps pour réaliser suffisamment de tests d'inhibition pour pouvoir conclure quant à une inhibition de l'activité de l'enzyme en présence de nos banques de produits. En revanche, cette étude est en cours. Nous présentons donc dans ce paragraphe une étude bibliographique de l'enzyme ciblée ainsi que les tests que nous envisageons de réaliser par la suite.

A. L' α -chymotrypsine

L' α -chymotrypsine est une protéase. Il existe plusieurs types de ces enzymes qui ont la caractéristique commune de dégrader les autres protéines *via* l'hydrolyse de liaisons peptidiques. Elles jouent donc un rôle primordial dans les procédés cellulaires en :

- ⇒ détruisant les protéines non utilisées ;
- ⇒ dégradant des protéines et peptides dans des buts nutritionnels ;
- ⇒ jouant un rôle de défense contre des protéines ou peptides invasifs et
- ⇒ contrôlant l'activité protéique.

C'est la raison pour laquelle l'étude de l'inhibition de leur activité présente un intérêt important. Un exemple d'étude d'inhibition de protéases impliquées dans la maladie pre-eclampsia est présenté dans l'Annexe IV.

Les protéases sont de forme globulaire solubles dans l'eau. Etant donné que les protéases sont des enzymes, on peut les classer à l'aide des quatre groupes fonctionnels majoritairement présents dans leur site actif, formant ainsi quatre familles de protéases :

- ⇒ Les sérines protéases,
- ⇒ Les cystéines protéases,
- ⇒ Les aspartates protéases, et
- ⇒ Les métallo-protéases.

L' α -chymotrypsine, comme la trypsine et l'élastine, font partie de la famille des sérines protéases. Ces trois protéines ont une structure globale différente mis à part la conformation de leurs sites actifs qui est identique. Malgré tout, les caractéristiques de leurs

substrats spécifiques sont différentes. En effet, l' α -chymotrypsine reconnaît des substrats encombrés et aromatiques tandis que la trypsine reconnaît des substrats chargés positivement et l'élastine de petits substrats neutres.

Enfin, il existe de nombreuses autres protéases comme la protéase fongique, la pepsine, la papaine, la bromélaïne, ou la subtilisine.

L' α -chymotrypsine, comme la trypsine, est une enzyme digestive, synthétisée et sécrétée dans les cellules du pancréas. Comme la plupart des enzymes, l' α -chymotrypsine est obtenue à partir d'un précurseur inactif, le chymotrypsinogène, constitué de 245 acides aminés. Il est synthétisé afin d'éviter une destruction involontaire de protéines ainsi que pour réguler l'activité enzymatique ; il est sécrété dans le duodénum. Le chymotrypsinogène est converti dans la forme mature et active par la perte protéolytique de deux dipeptides aux positions 14-15 et 147-148. La protéine active est alors composée de trois chaînes polypeptidiques liées de façons covalentes grâce à des ponts disulfures et non-covalentes à travers des interactions non polaires et des liaisons hydrogène. L'enzyme résultante est ainsi composée de deux domaines comparables d'environ 120 acides aminés chacun, formant des feuillettes β anti-parallèles et présentant deux poches hydrophobes S_1 et S_2 .

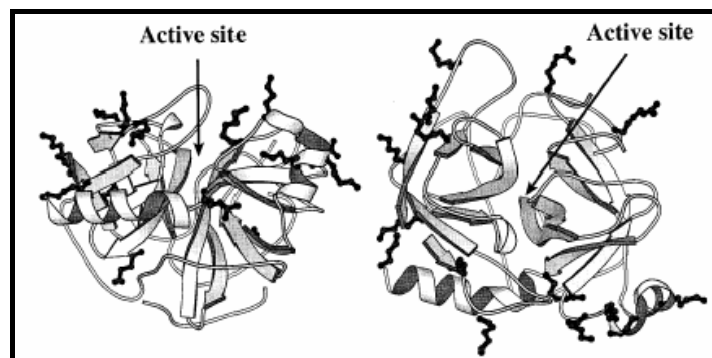


Figure 133 : Représentation de l' α -Chymotrypsine : vue de côté et vue du dessus.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, bien que la trypsine et l' α -chymotrypsine soient de structures comparables, elles reconnaissent des substrats différents. Ainsi la trypsine agit-elle sur les résidus lysine et arginine tandis que l' α -chymotrypsine agit sur de plus grands résidus hydrophobes comme le tryptophane, la tyrosine ou la phénylalanine.

Dans l'activité catalytique de l' α -chymotrypsine, les résidus His⁵⁷, Asp¹⁰² et Ser¹⁹⁵ jouent un rôle primordial comme le décrit la Figure 134.

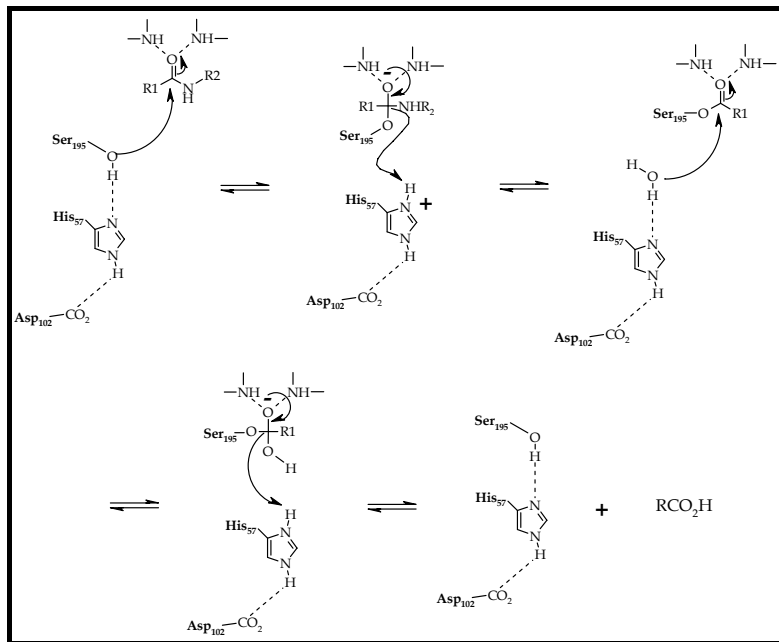


Figure 134 : Description de l'activité catalytique de l' α -Chymotrypsine.

L'importance des inhibiteurs

Les protéases effectuent de nombreuses transformations dans l'organisme qui sont essentielles à la vie, mais qui, dérégées et incontrôlées, deviennent problématiques. C'est la raison pour laquelle il existe de nombreux inhibiteurs de protéases naturels, qui dans la plupart des cas, sont utilisés une fois que la protéase a été activée. Dans les organismes supérieurs, il existe un équilibre délicat entre les protéases et leurs inhibiteurs naturels aidant ainsi au contrôle de l'activation et du catabolisme de nombreuses protéines intra- et extracellulaires. Chez les mammifères, c'est la circulation sanguine qui apporte l'essentiel des glycoprotéines agissant comme inhibiteurs de protéases.

Ceux-ci présentent une liaison peptidique sur laquelle les protéases peuvent agir, servant ainsi de substrat à différentes protéases. L'inhibiteur et la protéase forment alors un complexe extrêmement stable où la liaison peptidique de l'inhibiteur sera hydrolysée très lentement permettant ainsi de réduire l'activité catalytique de la protéase.

Il existe au moins 18 familles d'inhibiteurs de protéases, chacune possédant une conformation commune autour de la liaison peptidique réactive mais différant dans leur structure globale. Ainsi certaines sont-elles actives uniquement avec la trypsine tandis que d'autres agissent à la fois sur la trypsine et l' α -chymotrypsine. Ces inhibiteurs sont présents un peu partout dans la nature, dans les graines, beaucoup dans les légumes et chez les bactéries.

Mimes d'inhibiteurs connus

De nombreuses équipes de chercheurs se sont ainsi intéressées à synthétiser des mimes d'inhibiteurs de l' α -chymotrypsine.

Par exemple, D. H. Kim *et al.*^[219] ont réalisé une inhibition de l' α -Chymotrypsine à l'aide de methyl et de benzyl de l'acide 2-allyl-3-benzenpropanoïque, puis ont développé leurs études à l'ester de benzyl de l'acide (S)-(1-benzyl-2-thiolethyl)-carbamique en présence de Zn(II)^[220].

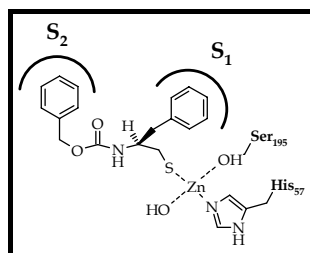


Figure 135 : Représentation de l'inhibiteur de l' α -Chymotrypsine présentant du Zn(II) se liant aux poches S₁ et S₂ de l'enzyme.

O. Renaudet *et al.*^[221] ont réalisé la synthèse d'une bibliothèque d'oligomères d'oximes présentant de nombreux motifs aromatiques qu'ils ont ensuite testé sur six protéases différentes (la subtilisine, l'élastase, la thermolysine, la trypsine, la papaine et l' α -Chymotrypsine). Seule l' α -Chymotrypsine fut inhibée à l'aide d'un tetra- ainsi que d'un pentamère confirmant ainsi que l'inhibition provient de multiples interactions.

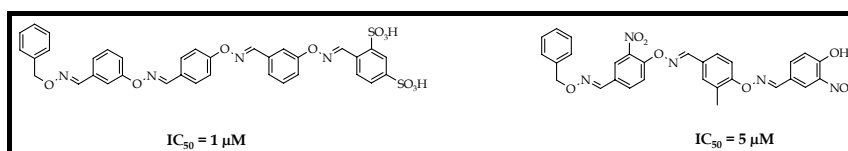


Figure 136 : Oligomères d'oximes inhibant l'activité enzymatique de l' α -Chymotrypsine ; les valeurs d' IC_{50} sont précisées.

Ils ont ensuite élargi leur étude à des bibliothèques d'oligomères d'éthers qu'ils ont testés sur les mêmes enzymes que précédemment mis à part la thermolysine^[222]. Dans ce cas, deux motifs tetra- et pentamères ont été identifiés comme inhibiteurs de l'activité enzymatique à la fois de l' α -chymotrypsine, la trypsine et de la subtilisine. En effet, il s'agit ici de composés plus flexibles et donc moins sélectifs.

²¹⁹ D. H. Kim, Z.-H. Li, S. S. Lee, J.-I. Park, S. J. Chung. "A novel type of structurally simple nonpeptide inhibitors for α -chymotrypsin. Induced-fit binding of methyl 2-allyl-3-benzene-propanoate to the S₂ subsite pocket." *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 239-249.

²²⁰ M. S. Han, D. J. Oh, D. H. Kim. "Inhibition of α -chymotrypsin with thiol-bearing substrate analogues in the presence of zinc ion." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 701-705.

²²¹ O. Renaudet, J.-L. Reymond. "Iterative oxime bond chemistry leads to protease inhibitors." *Org. Lett.*, **2003**, 5, 4693-4696.

²²² O. Renaudet, J.-L. Reymond. "Synthesis of ether oligomers." *Org. Lett.*, **2004**, 6, 397-400.

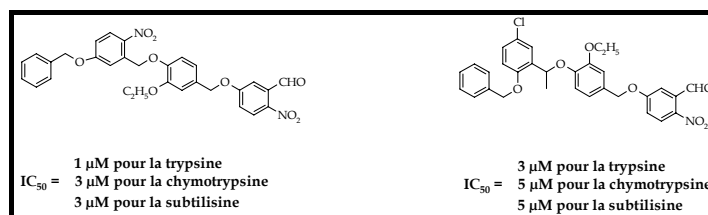


Figure 137 : Oligomères d'éthers inhibant l'activité enzymatique de l' α -Chymotrypsine, la trypsin et de la subtilisine : les valeurs d' IC_{50} sont précisées.

Dans le but de cibler le site actif cationique de l' α -chymotrypsine, A. D. Hamilton *et coll.*^[223] ont réalisé la synthèse de peptides cycliques présentant deux résidus anioniques, -G-D-G-D-, un résidu anionique et un résidu hydrophobe, -G-D-G-Y- afin d'effectuer un maximum de contacts avec les résidus basiques. D'autre part et pour comparaison, ils ont synthétisé un peptide contenant deux résidus cationiques, -G-K-G-K-. Ces séquences furent ensuite greffées sur un analogue de calix[4]arène (cf. Figure 138) puis testées face à l' α -Chymotrypsine et l'élastase. Les tests ont montré que le châssis présentant le motif -G-D-G-D- réduisait l'activité enzymatique de l' α -chymotrypsine et qu'il lui était spécifique étant donné qu'il n'a aucune action d'inhibition pour l'élastase.

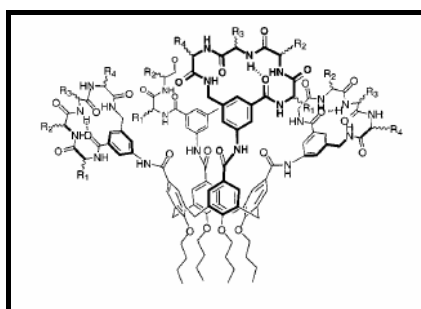


Figure 138 : Représentation générales des châssis synthétisés pour l'inhibition de l' α -Chymotrypsine.

Comme nous l'avons évoqué dans les chapitres précédents, nous nous sommes inspirés du travail de cette dernière équipe de chercheurs pour élaborer nos banques de peptides contraints. Nous avons néanmoins élargi les possibilités de reconnaissance en utilisant également des acides aminés hydrophobes ou générant des liaisons hydrogène.

B. Test effectué

Lors des tests, nous nous sommes basés sur deux types de tests d'inhibition. Le premier effectué par l'équipe de A. D. Hamilton et le second selon les travaux de O. Renaudet. Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions de dilution, de tampon et de température que lors des deux tests décrits dans la littérature.

²²³ H. S. Park, Q. Lin, A. D. Hamilton. "Protein surface recognition by synthetic receptors : a route to novel submicromolar inhibitors for α -chymotrypsin." *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 8-13.

Dans le deux cas, on met tout d'abord l'enzyme ainsi que nos banques de produits à incuber entre 30 minutes et 24h à 25°C. Par la suite, on ajoute le substrat spécifique à l'enzyme et on trace une courbe d'activité enzymatique mesurant l'absorbance en fonction du temps à 410 nm. L'action de l'enzyme sur son substrat libérera la partie du substrat émettant dans le jaune, ce qui nous permettra de quantifier l'activité enzymatique.

Lors de nos premier tests, certaines bibliothèques ont montré une forte activité d'inhibition mais ceci n'a pas été reproductible. Des tests supplémentaires sont actuellement en cours au laboratoire.

Néanmoins, il est à noter que d'après les résultats publiés par A. D. Hamilton, l'inhibition de l'activité de l'enzyme n'est pas supérieure à 10%. Ceci pourrait expliquer nos difficultés rencontrées lors de la répétition des tests et de l'exploitation des résultats.

En résumé...

La dernière partie de ce travail de thèse a été constituée d'une première évaluation biologique des banques de produits formées face à différentes cibles : une hormone, une protéine signal et une enzyme. Pour cela, nous avons conçu et mis au point plusieurs tests.

Nous avons travaillé sur colonne d'affinité tout d'abord dans le but de mimer le récepteur hormonal. Après de premiers résultats encourageants, une observation d'interactions non spécifiques nous a conduit à évaluer notre méthode vis-à-vis d'interactions avec l'avidine.

Ce dernier test, sur colonnes d'affinité, nous a permis de valider notre approche et d'effectuer une déconvolution sur les résultats obtenus. Nous avons observé que certaines de nos banques de produits reconnaissent l'avidine seule tandis que d'autres banques, différentes des premières, reconnaissent l'avidine en interaction avec la biotine. Ce dernier résultat nous a permis de penser que nous disposions de conjugués spécifiques de certains points d'ancrage à la surface de l'avidine.

Par ailleurs, nous avons réalisé plusieurs tests ELISA pour évaluer l'inhibition de l'interaction des protéines Grb2 et SHC par nos produits. Ce dernier test a donné de bons résultats encourageants à partir desquels nous avons également effectué une déconvolution qui tend à identifier une matrice (RAFT_{2D}([17]₄) et deux types de matrices (RAFT_{2D}([14],[15],[16]) et RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]) comme étant les conjugués actifs des mélanges testés.

Enfin, un test d'inhibition enzymatique fut initié et est actuellement en cours au laboratoire afin de pouvoir conclure quant à l'activité potentielle de certains produits.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion et perspectives...

Le but de ce travail de thèse a consisté en la conception, la synthèse et la caractérisation de mimes de surfaces d'interactions protéine-protéine par stratégie d'assemblage combinatoire.

Notre stratégie d'assemblage s'articule autour d'un châssis moléculaire cyclodécapeptidique RAFT. Ce gabarit peut présenter deux surfaces d'adressage indépendantes permettant de séparer le domaine des ligands, pour la reconnaissance de surfaces, de molécules marquées. Cette caractéristique est essentielle pour garantir l'indépendance des deux fonctions et assurer que les molécules transportées par le châssis n'affectent pas les propriétés de reconnaissance des ligands. Le second atout du squelette cyclodécapeptidique RAFT réside dans la présentation de quatre résidus lysine sur sa face supérieure permettant de conférer à la matrice une présentation multiple de substituants.

Outre la synthèse de plusieurs châssis (monoface et présentant un chromophore), nous avons développé la synthèse de plusieurs substituants. Les premiers furent utilisés pour élaborer des mimes d'un récepteur G-couplé, le récepteur de la GnRH. Ce travail fut réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Professeur R. P. Millar, M. R. C. Unit for Molecular Endocrinology à Edinburg. Nous avons pour cela créé et synthétisé quatre séquences peptidiques linéaires. Par la suite, nous avons cherché à créer des mimes de surfaces sur lesquels nous pourrions tester une variété de cibles. Ce travail fut également réalisé en collaboration avec l'équipe du Professeur C. Garbay, INSERM U648, CNRS FRE 2718, Faculté de Pharmacie, Université René Descartes, 4, avenue de l'observatoire, 75270 Paris cedex 06. Nous avons pour cela synthétisé quatre séquences peptidiques, conformationnellement contraintes présentant une boucle fermée par un pont disulfure, possédant des propriétés de charges ou d'hydrophobicité différentes.

Lors de la synthèse des synthons conformationnellement contraints, nous avons dû mettre au point et optimiser la cyclisation des peptides. La première méthode de synthèse en solution n'aboutissant pas au résultat escompté, nous avons changé toute la synthèse ainsi que le support solide. Nous sommes finalement parvenus à cycliser les produits sur support.

La perspective de travail est d'utiliser cette méthode pour réaliser des variations combinatoires sur quelques positions de la boucle et obtenir des banques de synthons.

Nous avons alors réalisé diverses banques de conjugués en assemblant de manière combinatoire jusqu'à quatre substituants sur les quatre positions du gabarit RAFT. Après une mise au point des conditions opératoires (nombre d'équivalents, température de réaction, contrôle de la précipitation des conjugués...), nous avons synthétisé une totalité de 45 banques de produits.

Après ces étapes de synthèse des substituants ainsi que des banques de produits, nous avons procédé à la caractérisation précise des mélanges. Pour cela, nous nous sommes exclusivement servis d'analyses par CLHP et par spectrométrie de masse (ESI et LC-MS).

L'analyse des banques obtenues, qu'elles furent synthétisées à partir de synthons linéaires ou cycliques, a montré que la distribution des produits suivait la distribution statistique que nous attendions. Par la suite, les analyses complémentaires par spectrométrie de masse ont confirmé ces observations, à quelques erreurs expérimentales près.

La combinaison de ces analyses nous a permis de pouvoir caractériser et identifier la majeure partie des éléments constituant nos banques de produits. L'identification de nos produits au sein de nos diverses banques est fondamentale. Tout d'abord pour pouvoir évaluer si notre approche de création de mimes de surfaces est la bonne. La caractérisation totale de certains mélanges nous a permis de voir que nous étions capables de synthétiser tous les types de composés que l'on doit observer en théorie et que leur distribution sur les chromatogrammes CLHP suit une loi linéaire. Par cette méthode, il nous a donc été possible de montrer que nous pouvions prévoir les temps de rétention des conjugués en fonction de leur composition en substituants sur la matrice. D'autre part, la comparaison des intensités relatives par analyse CLHP des espèces présentes au sein d'une même sous-bibliothèque nous a permis de constater que la formation du lien oxime s'effectuait selon la même réactivité quelles que furent les séquences peptidiques mises en jeu. Ceci nous donne à penser que la présence de résidus glycine en fin de chaîne ont permis d'obtenir des séquences peptidiques aux réactivités similaires, les fonctions oxyamines étant portées par des résidus identiques.

Par ailleurs, il est à noter que ces mêmes résidus devaient jouer un rôle d'espaceur dans l'optique de tests de reconnaissance vis-à-vis de cibles biologiques, rendant plus accessible la séquence peptidique des synthons assemblés sur la matrice.

Finalement, cette partie de synthèse chimique s'est terminée par la résolution du problème de la purification des banques de produits. En effet, c'est une étape fondamentale pour l'évaluation de l'intérêt biologique des molécules formées puisque ces dernières ne peuvent être testées en présence des réactifs à savoir les synthons présents en large excès dans le milieu réactionnel.

Une première méthode, que nous avons utilisée puis évaluée, était de purifier les banques par CLHP semi-préparative. Cette méthode présentait l'avantage d'être fortement utilisée au laboratoire, sa mise au point fut donc aisée. En revanche, des problèmes de détection tout d'abord puis de temps de rétention de certains des synthons ont montré que cette méthode n'était pas idéalement adaptée à nos produits. En effet, nous risquions de biaiser la composition des banques purifiées si nous n'en détectons pas tous les produits ou si un synthon avait un temps de rétention comparable à certains produits.

Nous avons donc développé et mis au point une nouvelle méthode de purification consistant en l'utilisation d'une phase stationnaire fonctionnalisée avec des groupements aldéhydes réagissant avec les synthons. De cette manière, seuls les synthons en excès furent éliminés du milieu réactionnel par simple filtration de la résine. Les mélanges de produits furent ainsi obtenus après lyophilisation avec une pureté suffisante pour réaliser les premières évaluations de notre approche au niveau des activités biologiques.

Nous avons donc poursuivi ce projet de recherche en testant nos banques de produits avec diverses cibles protéiques. Nous avons tout d'abord testé les banques de mimes de récepteurs G-couplés de la GnRH avec l'hormone par des tests d'affinité sur colonne. Par la suite, nous avons réalisé des tests d'affinité supplémentaires avec l'avidine. Par ailleurs, des tests de reconnaissance ELISA entre une partie de la séquence de la protéine signal Grb2 et nos banques de peptides cycliques furent effectués. Enfin, nous avons commencé des tests supplémentaires d'inhibition enzymatique.

Sur l'ensemble de ces cibles, certains mélanges ont montré avoir une activité de l'ordre de 0,5 μ M. Nous pouvons donc en conclure que notre approche est satisfaisante dans le sens où nous avons réussi à réaliser des inhibiteurs d'interactions de surfaces dans un temps restreint et à observer l'activité de certaines bibliothèques.

Ces premiers résultats sont encourageants et impliquent la réalisation de tests supplémentaires sur les cibles déjà testées afin d'identifier les composés actifs. Par la suite, une synthèse dirigée de ces composés devrait être réalisée afin de les posséder purs et de pouvoir réaliser des tests sur une plus large gamme de concentrations. Par ailleurs, nous pourrions réaliser des études structurales (RMN, cristallographie) afin de pouvoir déterminer de la nature des interactions.

En effet, l'intérêt d'utiliser ces banques de produits assemblées à la surface d'un châssis RAFT est que dans certains cas, cette technique permettrait de montrer que la présence de plusieurs éléments est nécessaire pour qu'ait lieu une interaction, que ce soit une multiprésentation d'éléments identiques ou variés. Dans le premier cas, nous pourrions parler d'interactions multivalentes si l'activité d'inhibition résultante, obtenue avec le RAFT, était supérieure à quatre ; l'augmentation de l'activité n'étant pas uniquement un problème de concentration locale. Dans le second cas, si nous notons la nécessité d'éléments diverses (différents peptides ou molécules de différentes natures) pour observer une activité, nous pourrions alors parler d'interaction de surface (discontinue ?) car ces éléments ne sont pas connectés entre eux.

Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué à plusieurs endroits de ce manuscrit, nous envisageons également de réaliser des mimes de surfaces avec des « blocs d'assemblage » de différentes natures que ce soient des peptides, des motifs saccharidiques, des oligonucléotides, des hétérocyles, des lipides... Ils est tout a fait envisageable de réaliser des bibliothèques utilisant la même approche que celle décrite dans ce manuscrit et composées de « blocs » de natures identiques ou différentes.

Enfin, nous pourrions chercher à mimer des cibles biologiques supplémentaires. Au cours de ce travail, nous avons ciblé un récepteur transmembranaire, une glycoprotéine, une protéine signal et une enzyme. Il est envisageable de poursuivre ce travail en s'intéressant à des protéines de la même famille que celles que nous avons étudiées ou à de nouvelles cibles ayant des propriétés de charge ou de conformations comparables. Par exemple, il serait judicieux de chercher à cibler certaines boucles d'anticorps pour inhiber certaines interactions anticorps-antigène ou bien de cibler l'ADN pour en inhiber sa réplication...

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Généralités

A. Réactifs et solvants

Tous les composés chimiques et les solvants commerciaux utilisés pour la synthèse proviennent de Fluka, Sigma Aldrich, Acros Organics ou Interchim.

Les acides aminés protégés sont fournis par France Biochem (Mendor, France), BACHEM-Biochimie SARL (Voisins-Le-Bretonneux, France), Advanced ChemTech ou Calbiochem-Novabiochem. Le réactif de couplage PyBOP[®] est fourni par Calbiochem-Novabiochem (Fontenay-sous-bois, France). Les résines Rink-Amide MBHA[®], Sieber Amide[®] sont fournies par Calbiochem-Novabiochem, la résine Fmoc-G-Sasrin[®] par BACHEM et la résine Chlorure de 2-Chlorotriptyle par Advanced ChemTech (Valenciennes, France).

B. Synthétiseur automatique de peptides

L'assemblage automatisé des peptides linéaires protégés a été réalisé à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides Advanced Chem Tech 348 Ω .

C. Tests ELISA

L'ensemble des réactifs utilisés pour effectuer les tests proviennent de chez Sigma Aldrich ainsi que les plaques recouvertes d'une couche de Streptavidine.

Les pipettes utilisées sont des monocanaux de 10, 20, 100, 200, 1000 et 5000 μL et des multicanaux de 100 et de 300 μL et les cônes de 10, 200, 300 et 1000 μL proviennent de chez Eppendorf[®].

D. Chromatographie

Les chromatographies CLHP analytiques (C_{18} , Nucleosil, 30/4, 120 \AA pour les gradients sur 15 minutes et C_{18} , Nucleosil, 250/4.6, 100 \AA pour les gradients sur 30 minutes) ont été réalisées en utilisant un équipement Waters, comportant une pompe Waters 600, un système de contrôle Waters 600E, un détecteur UV Waters 2487 dual λ , et un intégrateur 746 ou le logiciel Empower de chez Waters.

Les chromatographies CLHP semi-préparatives (C_{18} , Delta Pak, 200/25, 100 \AA) ont été effectuées sur un équipement prepLC Universal Base et prepLC 25 mm Module.

Les colonnes sont éluées avec des gradients linéaires de solvant A (0,09 % TFA dans H₂O) et B (0,09 % TFA dans CH₃CN : H₂O 9 :1) avec des débits standards de 1,3 mL/min en analytique et de 22 mL/min en semi-préparative. L'eau de qualité Milli-Q est obtenue par filtration d'eau distillée sur un système de cartouche Milli-Q[®], l'acétonitrile et l'acide trifluoroacétique pour CLHP analytiques et semi-préparatives sont fournis respectivement par Carlo-Erba et Sds (Peypin, France).

E. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse, (SM), basse résolution ESI (Ionisation par ElectroSpray) ont été enregistrés sur le spectromètre Bruker Daltonics[®] Esquire 3000 plus au service de spectrométrie de masse du LEDSS. Le système LC-MS utilisé quant à lui une colonne CC125/2 Nucleosil 100-3 C18 (Macherey-Nagel) avec un débit de 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

F. Spectrométrie UV

La réalisation des spectres UV a été effectuée sur un Cary 400 Scan de chez Varian[®] en utilisant des cuvettes de précision en Quartz SUPRASIL[®] de 1 mL, 10.0 mm de chez Hellma[®].

L'enregistrement de l'absorbance des plaques 96-puits lors des tests ELISA a été fait à l'aide d'un SPECTRAMax PLUS³⁸⁴ de chez Molecular Devices[®].

G. Spectrométrie RMN

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur les spectromètres BRUKER[®] AC200 et AM300. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport à un pic de solvant pris comme référence interne. Les spectres sont décrits avec les abréviations : s=singulet ; d=doublet ; dd=doublet dédoublé ; t=triplet ; td=triplet dédoublé ; q=quadruplet ; m=multiplet.

II. Protocoles standards pour la synthèse des peptides

A. Synthèse de peptides linéaires protégés par SPPS

Les peptides linéaires protégés ont été assemblés manuellement ou de manière automatisée à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides Advanced ChemTech 348 Ω . Ces synthèses ont été réalisées selon les protocoles de SPPS en stratégie Fmoc/tBu. Les différentes étapes de synthèse sur support solide sont réalisées dans un réacteur en verre comportant un filtre en verre fritté scellé à sa base. Ce fritté permet ainsi l'élimination des solvants et des réactifs en excès sous air comprimé. Avant utilisation, ce réacteur est silanisé pendant 6 heures grâce à une solution de $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ puis lavé plusieurs fois avec du dichlorométhane (DCM) et du diméthylformamide (DMF) jusqu'à obtention d'un pH de 7. Notons qu'il est possible d'ajouter quelques gouttes de diisopropyléthylamine (DIEA) au DCM afin de faciliter la neutralisation.

En début de synthèse, la résine est lavée et gonflée dans le réacteur en utilisant du DCM ($2 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 15 \text{ min}$) puis du DMF ($2 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 15 \text{ min}$).

B. Couplage des acides aminés protégés Fmoc N- α

1. Couplage manuel – Protocole 1

Les réactions de couplage sont réalisées en utilisant : 2 éq. d'acides aminés protégés Fmoc-N- α ; 2 éq. de PyBOP[®] comme réactif de couplage et 3 à 4 éq. de DIEA comme base (pour se placer à pH 8-9) par rapport au taux de substitution de la résine utilisée, dans du DMF préalablement dégazé (10 mL.g^{-1}). La réaction de couplage est agitée pendant 15 à 30 minutes. Il est à noter que les équivalents sont calculés par rapport au taux de substitution théorique de la résine. Après le couplage, celle-ci est lavée avec du DMF ($5 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min}$) puis du DCM ($2 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min}$) et enfin avec du DMF ($2 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min}$).

Dans le cas où la résine ferait des agrégats, elle est lavée avec du méthanol ($2 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min}$) puis du DCM ($2 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min}$) et enfin avec du DMF ($2 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min}$).

2. Premier couplage sur résine 2-Chlorotrityle[®] - **Protocole 2**

Ce premier couplage est une réaction de substitution nucléophile avec l'acide aminé, il ne nécessite donc pas la présence de PyBOP[®]. Si le taux de substitution de la résine est très élevé (de l'ordre de 2,1 mmol.g⁻¹), il est recommandé de n'utiliser que 0,3 éq. d'acide aminé (pour obtenir un taux de substitution de l'ordre de 0,6-0,7 mmol.g⁻¹). Les sites n'ayant pas réagi seront ensuite bloqués selon le **protocole 6**.

3. Couplage automatisé – **Protocole 3**

Les réactions de couplage réalisées sur le synthétiseur de peptides sont toujours doublées et durent 25 minutes. On utilise alors 2,3 éq. d'acides aminés, à partir d'une solution à 0,5 M, et 2,3 éq. de PyBOP[®], à partir d'une solution à 0,25 M ainsi qu'une solution de DIEA à 1 M. Le calcul des équivalents est effectué par rapport au taux de substitution théorique de la résine.

Celle-ci est ensuite lavée avec du DMF (5x17 mL.g⁻¹ x 1 min). L'étape suivante est la déprotection des groupements Fmoc puis la série de lavages est la suivante : on lave tout d'abord avec du DMF (2x17 mL.g⁻¹ x 1 min), puis avec du MeOH (1x17 mL.g⁻¹ x 2 min), avec du DCM (2x17 mL.g⁻¹ x 1 min) et enfin avec du DMF (2x17 mL.g⁻¹ x 1 min).

4. Couplage en solution – **Protocole 4**

Les réactions de couplage sont réalisées en utilisant : 2 éq. d'acides aminés protégés Fmoc-N- α ; 2 éq. de PyBOP[®] comme réactif de couplage et 3 à 4 éq. de DIEA comme base (pour se placer à pH 8-9), dans du DMF préalablement dégazé ([C] = 10⁻² M). La réaction de couplage est agitée pendant 15 à 30 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite. Le peptide est alors obtenu sous forme d'une poudre blanche après précipitation et lavages à l'éther.

C. Coupure des groupements protecteurs Fmoc-N- α sur support solide – Protocole 5

La résine est traitée par une solution de pipéridine à 20% dans du DMF (1x20 mL.g⁻¹ x 5 min puis 2x20 mL.g⁻¹ x 10 min). Elle est ensuite lavée avec du DMF (5x20 mL.g⁻¹ x 1 min). Ce protocole est identique aussi bien pour la synthèse manuelle que celle automatisée.

La quantité de groupements Fmoc clivés peut alors être déterminée par spectrométrie UV. En effet, le dibenzofulvène produit par la coupure du groupement Fmoc forme un adduit avec la pipéridine dont le coefficient d'extinction molaire est de $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 299 nm. Les solutions de coupure et de lavage sont rassemblées dans une fiole jaugée de 250 mL

et leur volume complété par du MeOH. Le blanc est effectué à l'aide d'une solution de 2,9 mL de MeOH dans une cuvette de 1 cm de largeur. On mesure ensuite l'absorbance en diluant 100 μ L de la solution dans les 2,9 mL de MeOH, valeur lue à $\lambda = 299$ nm.

L'absorbance UV à 299 nm de cette solution (A_{299}) permet de quantifier les groupements Fmoc coupés (n_{Fmoc}) en appliquant la loi de Beer-Lambert : $n_{\text{Fmoc}} = A_{299} * V / (\epsilon_{299} * l)$. Dans notre cas, V représente le volume de la cuve, ici $V = 3$ mL ; ϵ_{299} le coefficient d'extinction molaire de l'adduit en solution à $\lambda = 299$ nm, ici $\epsilon_{299} = 7800$ mol⁻¹.L.cm⁻¹ ; l la longueur du chemin optique, ici $l = 1$ cm.

Cette valeur est communément utilisée pour suivre l'avancement d'une synthèse peptidique sur support solide. Il est ainsi possible d'évaluer de manière indirecte le taux de substitution de la résine.

D. Blocage des sites de réaction

Ces réactions peuvent être utilisées pour deux éventualités. Dans le cas de taux de substitution de résine trop élevés qui induiraient à terme un fort encombrement stérique lors de l'élongation des peptides impliquant la formation de peptides tronqués, il est possible de bloquer les sites de réaction. D'autre part, dans le cas d'une séquence peptidique longue et encombrée pour laquelle on effectue des double ou triple couplages d'acides aminés, si l'ensemble de la résine présente encore des amines libres, il est possible de les faire réagir pour y stopper l'élongation du peptide. Cette méthode nécessite une purification du peptide par la suite.

1. Cas de la résine 2-Chlorotrityle[®] - Protocole 6

Après le premier couplage d'acide aminé de la séquence, la résine est tout d'abord lavée avec du DMF (5x20 mL.g⁻¹ x 1 min). Ensuite, on effectue une substitution nucléophile sur la résine afin de bloquer les sites n'ayant pas encore réagit. Pour cela, on utilise une solution de DMF/MeOH/DIEA 17/2/1 que l'on met à réagir sur la résine (3x20 mL.g⁻¹ x 10 min). La résine est ensuite lavée avec du DMF (2x20 mL.g⁻¹ x 1 min).

2. Blocage des amines libres (« capping ») – Protocole 7

Après avoir effectué un double couplage, la résine est tout d'abord lavée avec du DMF (5x20 mL.g⁻¹ x 1 min). Ensuite, on bloque les amines libres n'ayant pas encore réagit. Pour cela, on utilise une solution de DMF/Pyridine/Anhydride Acétique 7/2/1 que l'on met à réagir

sur la résine (2x20 mL/g⁻¹ x 5 min). La résine est ensuite lavée avec du DMF (2x20 mL.g⁻¹ x 1 min).

E. Suivi de la réaction de couplage peptidique

Il s'agit ici d'effectuer une détection qualitative d'amines libres contrôlant l'avancée des couplages en cours.

1. Le test de Kaiser

Ce test est utilisable avec les résines Sasrin[®] et PAL[®].

Il requiert :

- ⇒ Une solution de ninhydrine (500 mg) dans 10 mL d'éthanol ;
- ⇒ Une solution de phénol (80 g) dans 20 mL d'éthanol ;
- ⇒ Une solution de 2 mL de KCN 1 mM diluée à 100 mL avec de la pyridine.

Afin d'effectuer ce test, il est important de prélever quelques grains de résine dans un tube à calciner lorsque celle-ci se trouve dans le DCM. On ajoute alors 3 gouttes de chaque solution. Le tube est ensuite porté à 80-100°C pendant 3 minutes. La présence de fonctions amines libres se traduit par une coloration bleue des grains de résine (test positif). Si tel est le cas, le couplage devra être réitéré jusqu'à l'obtention de grains incolores au moment du test qui sera négatif.

2. Le test TNBS

Ce test est utilisable avec les résines Sasrin[®] et Chlorure de 2-Chlorotriptyle[®] et Rink-Amide MBHA[®].

Il requiert :

- ⇒ Une solution d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) à 1% dans le DMF
- ⇒ Une solution de DIPEA : DMF à 1 : 9.

Pour ce test, on prélève quelques grains de résine dans un tube à calciner lorsque celle-ci se trouve dans le DMF ou le DCM. On ajoute alors 3 gouttes de chaque solution. Le tube est laissé à température ambiante pendant une minute. La présence de fonctions amines libres se traduit par une coloration orange des grains de résine (test positif). Comme lors du test précédent, si le test se révèle être positif, le couplage devra être réitéré jusqu'à obtention de grains incolores au moment du test qui sera alors négatif.

3. Préparation d'échantillon pour l'analyse CLHP

Au cours de la synthèse, il est important de vérifier la pureté du peptide en élongation et la présence d'éventuels peptides tronqués. Pour cela, il est possible d'analyser par CLHP analytique un petit aliquot de résine. Il est à noter que cette analyse sera plus judicieuse après la réalisation d'un couplage car le peptide présentera un groupement Fmoc protégeant son amine terminale et qu'il sera possible de détecter sans ambiguïté à la longueur d'onde de 299 nm.

Pour cela, on prélève quelques grains de résine dans un tube à calciner lorsque celle-ci se trouve dans le DCM. Par ailleurs, une solution de coupure de la résine, composée majoritairement de TFA et de « scavengers » en fonction de la séquence peptidique, est préparée dans un pilulier. Cette solution est ensuite ajoutée aux billes de résine dont on laisse se détacher la séquence peptidique pendant une période variant entre 15 minutes et 2 heures. La solution de coupure est ensuite filtrée et évaporée sous air comprimé. On précipite alors le peptide dans l'éther puis on le solubilise dans quelques gouttes de solvant CLHP avant de l'injecter en CLHP analytique aux deux longueurs d'onde de 214 nm et 299 nm.

F. Cyclisation des peptides en solution – Protocole 8

Le peptide linéaire protégé est dissout dans du DMF ou du DCM à une concentration de 0,5 mmol.L⁻¹ puis on additionne du PyBOP[®] (1 éq.) et de la DIEA pour se placer à pH 8-9. Le mélange réactionnel est alors agité à température ambiante pendant une heure. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le peptide cyclique précipité puis lavé dans l'éther. D'une façon générale, la poudre blanche ainsi obtenue est utilisée sans purification supplémentaire.

G. Formation de ponts disulfure sur phase solide – Protocole 9

La résine est préalablement lavée à l'aide de DCM (2x20 mL.g⁻¹ x 1 min) et de DMF (2x20 mL.g⁻¹ x 1 min). On ajoute ensuite une solution de DMF (20 mL.g⁻¹) contenant 8 éq. de I₂ et 10 éq. de DIEA. La résine est laissée sous agitation pendant une heure à température ambiante puis est lavée de nombreuses fois à l'aide de DMF et de DCM jusqu'à disparition de coloration jaune/orange caractéristique de la présence d'iode.

H. Formation de ponts disulfure en solution

1. A l'air – Protocole 10

Le peptide est dissout dans de l'eau millipore à une concentration de 1 mg.mL^{-1} placée à un pH de 9-10 à l'aide de DIEA. A l'aide d'une pipette pasteur plongeant dans la solution et reliée à un tuyau d'air comprimé, on fait alors buller de l'air dans la solution pendant 12 heures. L'avancée de la réaction est alors contrôlée à l'aide du test d'Ellman décrit plus bas ainsi que par spectrométrie de masse.

2. Avec du DMSO – Protocole 11

Le peptide est dissout dans de l'eau millipore à une concentration de 1 mg.mL^{-1} contenant 20% de DMSO et dont le pH est ajusté à 6 à l'aide de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NH}_3$. La solution est alors placée sous agitation et son avancée contrôlée à l'aide du test d'Ellman décrit plus bas ainsi que par spectrométrie de masse.

I. Détection des fonctions thiol libres – Test d'Ellman

Ce test nécessite de l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) qui réagit quantitativement avec les groupements thiols présents en solution pour former un anion jaune.

Ainsi, on dissout le DTNB dans une solution de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 8 avec une concentration de 4 mg.mL^{-1} . En parallèle, une partie du mélange réactionnel est diluée à l'aide de la solution tampon pour obtenir 3 mL d'une solution contenant de 0,1 à 0,2 μmol de peptide. On y ajoute alors 100 μL de la solution de DTNB. Après 15 minutes de réaction, l'absorbance de la solution est mesurée à une longueur d'onde de 410 nm.

En parallèle, on prépare une solution de référence pour laquelle on n'utilisera que 3 mL de solution tampon et 100 μL de la solution de DTNB. Après 15 minutes de réaction, son absorbance à 410 nm sera mesurée.

On peut alors calculer la concentration en groupements thiols à l'aide de la relation suivante : $[\text{SH}] = (A_{410} - \text{Ech} - A_{410} - \text{Réf}) / 13650$, où 13650 est le coefficient d'extinction molaire de l'anion thionitrobenzoïque.

J. Coupure des groupements protecteurs des chaînes latérales

1. Coupure des groupements Boc en solution – Protocole 12

Le peptide est dissout dans une solution d'acide trifluoroacétique à 50% dans du DCM et agité à température ambiante pendant une heure. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu précipité dans l'éther.

2. Coupure d'autres groupements que le Boc – Protocole 13

Dans le cas où d'autres groupements protecteurs des chaînes latérales sont présents, comme le groupement *tert*-butyloxy (-OtBu), 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) ou 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl (Pmc) sont présents, l'emploi de TFA pur, si la séquence peptidique le permet, ou plus concentré est nécessaire.

3. Coupure du groupement *N*-ε Alloc en solution – Protocole 14

Lors de cette déprotection, il est important de veiller à travailler sous une atmosphère la plus anhydre possible. Le peptide est donc traité tout d'abord pendant trois minutes avec du DCM anhydre ($[C] = 10^{-2}$ M) et du PhSiH₃ (50 éq.) sous une atmosphère d'argon. On ajoute ensuite Pd⁰(PPh₃)₄ (0,2 éq.) et après 30 minutes de réaction sous atmosphère inerte, on ajoute un volume de MeOH au mélange qui est concentré après 15 minutes de réaction supplémentaire. On solubilise ensuite le peptide dans un volume minimal de DCM/MeOH et on le précipite dans l'éther.

Dans le cas où le peptide est soluble dans un mélange Eau/Acétonitrile, il est possible de le séparer du palladium restant par filtration et centrifugation suivies d'une lyophilisation.

Au contraire, si le peptide n'est pas soluble dans un mélange Eau/Acétonitrile, il ne sera pas possible de séparer le palladium résiduel qui sera conservé et purifié lors des étapes suivantes.

4. Coupure du groupement *N*-ε Alloc sur support solide – Protocole 15

La résine est lavée avec du DCM (2x20 mL.g⁻¹ x 10 min). Le cycle de coupure consiste à traiter la résine avec du PhSiH₃ (50 éq.) dans 5 mL de DCM anhydre pendant 3 minutes sous argon, puis d'ajouter le catalyseur Pd⁰(PPh₃)₄ (0,2 éq.) et de laisser sous agitation pendant 30 minutes. Ce cycle est alors effectué une seconde fois, puis la résine est lavée par 2x10 mL de DCM, 4x10 mL de DMF/H₂O 9 :1, 2x10 mL de DMF et 2x10 mL de DCM.

K. Coupure de la résine – Protocole 16

La résine est lavée avec du DCM ($5 \times 20 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min}$) puis séchée sous air comprimé.

Elle est ensuite traitée de manière répétée par :

- ⇒ Une solution de TFA à 1% dans du DCM ($3 \times 10 \text{ mL.g}^{-1} \times 3 \text{ min}$) pour les résines Sasrin[®], Sieber Amide[®] et Chlorotrityle[®].
- ⇒ Une solution de TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5 pendant deux heures pour la résine Rink-Amide MBHA[®].

En fonction de la séquence peptidique synthétisée, il est important d'utiliser différents scavengers dans différentes proportions comme le montre le tableau ci-dessous. Ainsi, si la séquence présente des résidus Arginine ou Tryptophane, il est recommandé d'utiliser soit une solution contenant du TFA ainsi que du TMSBr/Thioanisole à 1M avec du m-cresol et de l'EDT soit une solution contenant 81,5% de TFA ainsi que 5% de thioanisole ; 5% de phénol ; 5% d'eau ; 2,5% d'EDT et 1% de TIS, ceci en fonction du nombre de résidus Arginine présents dans la séquence peptidique. D'autre part, si la séquence contient un résidu Cystéine ou Méthionine, la solution de coupure devra contenir 94,5 % de TFA ainsi que 2,5 % d'eau ; 2,5 % d'EDT et 1% de TIS.

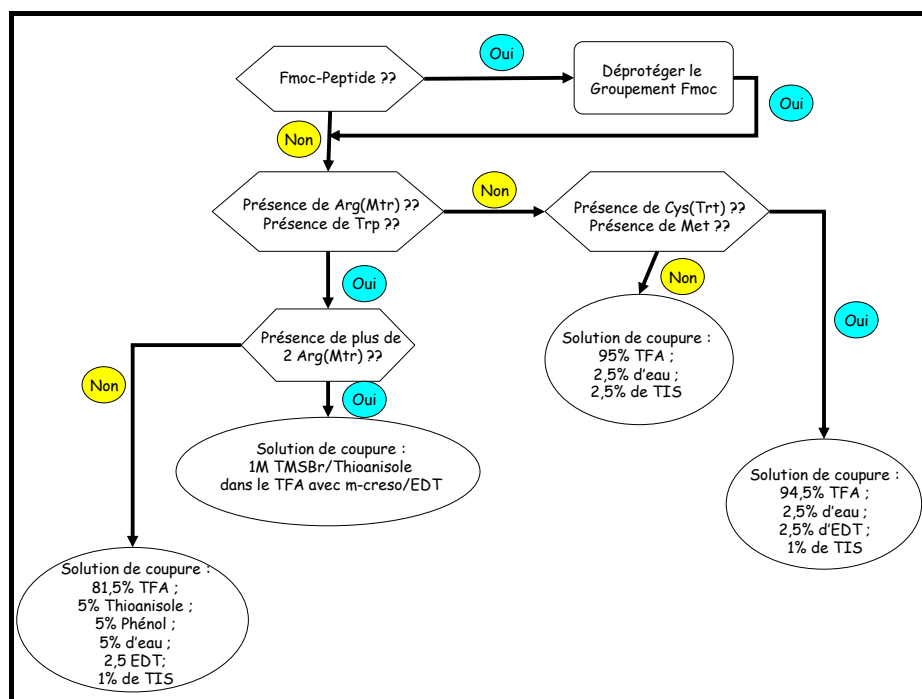


Figure 139 : Différentes solutions de coupure recommandées.

Après concentration des solutions de coupure, le peptide brut est obtenu par précipitation à l'éther et lavé avec ce même solvant. Il est ensuite séché sous pression réduite et peut être purifié par CLHP semi-préparative.

L. Formation de l'aldéhyde glyoxylique – Protocole 17

Le peptide est dissout dans de l'eau millipore à une concentration de 10^{-2} mol.L⁻¹, puis on additionne du périodate de sodium (2 éq./site). La réaction est laissée à température ambiante pendant une heure et suivie par CLHP analytique. Le peptide ainsi oxydé est ensuite purifié directement par CLHP semi-préparative puis lyophilisé pour donner une poudre blanche.

M. Couplage chimiosélectif – Protocole 18

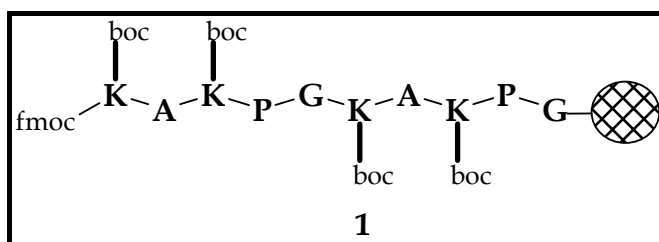
Le peptide aldéhydique est dissout dans une solution tampon acétate de sodium ou acétate d'ammonium 0,1 M à pH 4,5 ([C] = 10^{-2} M) et le peptide oxyamine est additionné à la solution de manière à être en quantité de 2 éq. par site de couplage. La réaction est placée sous agitation à température ambiante ou à 45°C pendant une durée variant entre 2 et 48 heures. Le brut réactionnel est alors purifié par CLHP semi-préparative. Après lyophilisation, le peptide est obtenu sous forme de poudre.

III. Synthèses des RAFTs

A. RAFT à un domaine

1. Fmoc-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-
Résine : 1

Le peptide **1** est assemblé selon le **protocole 1** par synthèse manuelle à partir de 500 mg de résine G-Sasrin[®] (taux de substitution 0,69 mmol.g⁻¹).



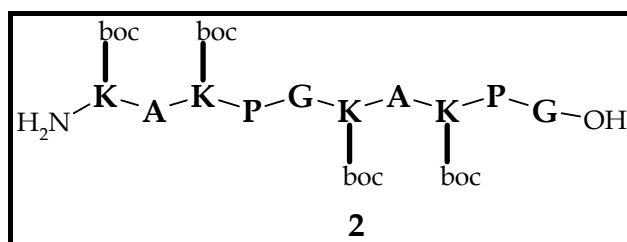
Pureté estimée par CLHP : 83% sur un aliquot de résine.

CLHP : $t_R = 13,11$ min (214 et 299 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

SM (ESI) : C₇₉H₁₂₂N₁₄O₂₁ (M_{calc} = 1603,9) ; m/z : [M+2]/2 = 802,8 ; [M+3]/3 = 535,6.

2. NH₂-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-
COOH : 2

Le groupement Fmoc-*N*-α terminal du peptide **1** (0,23 mmol) est déprotégé selon le **protocole 5** puis le peptide est décroché de la résine selon le **protocole 16**, le peptide est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (344 mg ; 0,23 mmol).



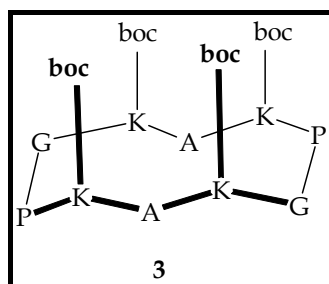
Rendement par rapport au taux de substitution de la résine : 67%.

CLHP : $t_R = 10,45$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

SM (ESI) : C₆₄H₁₁₂N₁₄O₁₉ (M_{calc} = 1681,69) ; m/z : [M+1] = 1381,62 ; [M+2]/2 = 691,34.

3. c[Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly] : 3

La réaction de cyclisation est réalisée selon le **protocole 8** et le peptide cyclique **3** est obtenu après précipitation et lavage à l'éther (306 mg ; 0,22 mmol).



Rendement : 96%.

CLHP : $t_R = 11,21$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

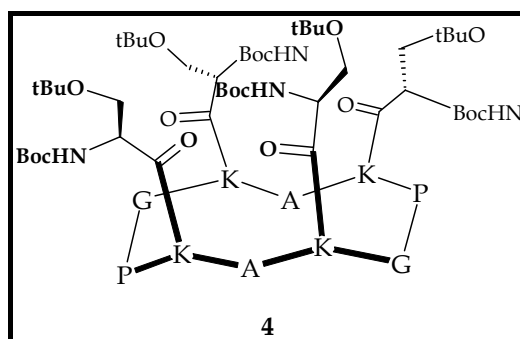
SM (ESI) : $C_{64}H_{110}N_{14}O_{18}$ ($M_{calc} = 1363,7$) ; m/z : $[M+2]/2 = 682,7$; $[M+3]/3 = 455,5$.

4. $c[\text{Lys}(\text{Boc-Ser}(-\text{OtBu}))\text{-Ala-Lys}(\text{Boc-Ser}(-\text{OtBu}))\text{-Pro-Gly-Lys}(\text{Boc-Ser}(-\text{OtBu}))\text{-Ala-Lys}(\text{Boc-Ser}(-\text{OtBu}))\text{-Pro-Gly}]$: 4

Les groupements $N\text{-}\epsilon$ Boc du peptide **3** (306 mg ; 0,22 mmol) sont déprotégés selon le **protocole 12**.

Analyse CLHP : $t_R = 11,61$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 30 minutes).

Les résidus Boc-Ser(-OtBu) sont incorporés selon le protocole 4. On récupère alors 391 mg (0,2 mmol) de peptide sous la forme d'une poudre blanche après évaporation du solvant et précipitation à l'éther.



Rendement : 91%.

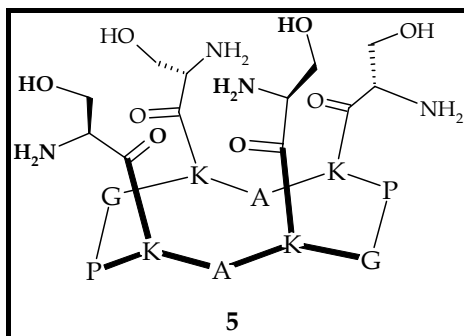
CLHP : $t_R = 14,10$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

$t_R = 37,05$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{92}H_{162}N_{18}O_{26}$ ($M_{calc} = 1936,42$) ; m/z : $[M+2]/2 = 969,3$; $[M+3]/3 = 646,55$.

5. $c[\text{Lys}(\text{Ser})\text{-Ala-Lys}(\text{Ser})\text{-Pro-Gly-Lys}(\text{Ser})\text{-Ala-Lys}(\text{Ser})\text{-Pro-Gly}]$: 5

La réaction de déprotection des groupements Boc et OtBu est ensuite réalisée selon les protocoles 12 et 13. On obtient alors 238 mg de peptide **5** (0,18 mmol) sous la forme d'une poudre blanche.



Rendement : 90%.

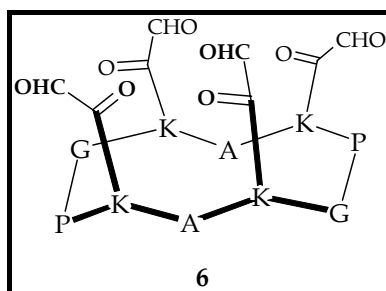
CLHP : $t_R = 5,81$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

$t_R = 12,05$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{56}H_{98}N_{18}O_{18}$ ($M_{\text{calc}} = 1311,50$) ; m/z : $[M+2]/2 = 656,7$; $[M+3]/3 = 438,0$.

6. c[Lys(COCHO)-Ala-Lys(COCHO)-Pro-Gly-Lys(COCHO)-Ala-Lys(COCHO)-Pro-Gly] : **6**

Les quatre résidus serine du composé **5** (0,18 mmol) sont oxydés selon le **protocole 17**. Le peptide oxydé **6** (178 mg ; 0,15 mmol) est obtenu sous la forme d'une poudre blanche après purification par CLHP semi-préparative.



Rendement : 83% ; rendement global : 43%.

CLHP : $t_R = 5,11$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

$t_R = 12,20$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 30 minutes).

CLHP semi-préparative : $t_R = 14,50$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{52}H_{78}N_{14}O_{18}$ ($M_{\text{calc}} = 1187,28$) ; m/z : $[M+2]/2 = 594,6$; $[M+3]/3 = 396,8$.

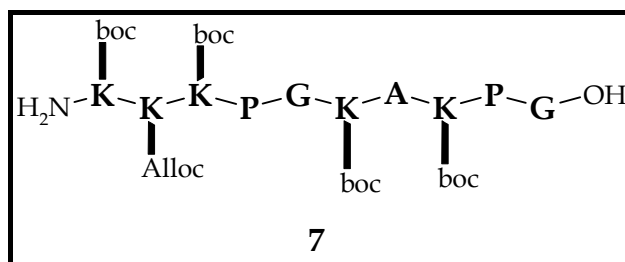
B. RAFTs à deux domaines

1. Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Résine : **7**

Le peptide **7** est d'abord assemblé selon le **protocole 1** par synthèse manuelle à partir de 500 mg de résine G-Sasrin[®] (taux de substitution 0,69 mmol.g⁻¹).

CLHP : $t_R = 13,23$ min (214 et 299 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

Le groupement Fmoc-N- α terminal est déprotégé selon le protocole 5 puis le peptide est décroché de la résine selon le protocole 15. Le peptide **7** est alors obtenu sous la forme d'une poudre blanche (502,5 mg ; 0,33 mmol).



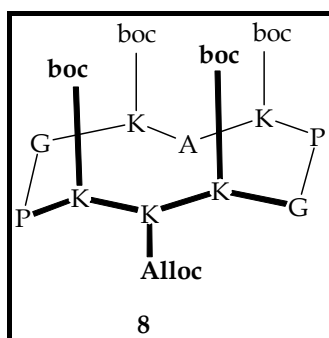
Rendement par rapport au taux de substitution de la résine : 95%.

CLHP : $t_R = 10,76$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

SM (ESI) : $C_{71}H_{123}N_{15}O_{21}$ ($M_{\text{calc}} = 1522,8$) ; m/z : $[M+2]/2 = 762,4$; $[M+3]/3 = 508,7$.

2. c[Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly] : **8**

La réaction de cyclisation est réalisée selon le **protocole 8** et le peptide cyclique **8** est obtenu après précipitation et lavage à l'éther (478 mg ; 0,32 mmol).



Rendement : 96%.

CLHP : $t_R = 12,37$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

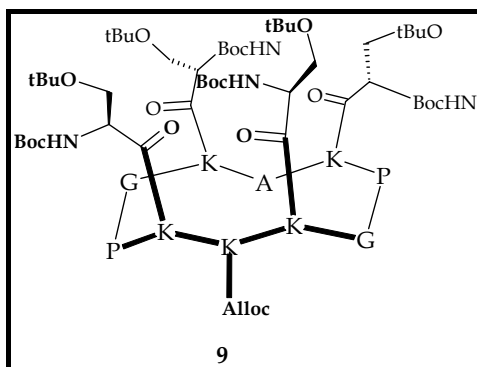
SM (ESI) : $C_{71}H_{121}N_{15}O_{20}$ ($M_{\text{calc}} = 1504,84$) ; m/z : $[M+2]/2 = 753,5$; $[M+3]/3 = 502,65$.

3. c[Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Lys(Alloc)-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Pro-Gly-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Ala-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Pro-Gly] : **9**

Les groupements $N\text{-}\epsilon$ Boc du peptide **8** (478 mg ; 0,32 mmol) sont déprotégés selon le **protocole 12**.

Analyse CLHP : $t_R = 6,40$ min (C_{18} , 214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

Les résidus Boc-Ser(-OtBu) sont incorporés selon le protocole 4. On récupère alors 585,2 mg (0,28 mmol) de peptide sous la forme d'une poudre blanche après évaporation du solvant et précipitation à l'éther.



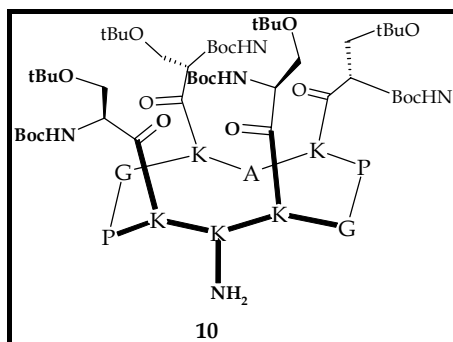
Rendement : 88%.

CLHP : $t_R = 14,73$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

SM (ESI) : $C_{99}H_{175}N_{19}O_{28}$ ($M_{calc} = 2079,61$) ; m/z : $[M+2]/2 = 1040,86$.

4. c[Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Lys-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Pro-Gly-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Ala-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Pro-Gly] : **10**

Le groupement N- ϵ Alloc est déprotégé selon le **protocole 14**. On obtient alors 424 mg (0,21 mmol) de peptide **10** sous forme d'une poudre blanche.



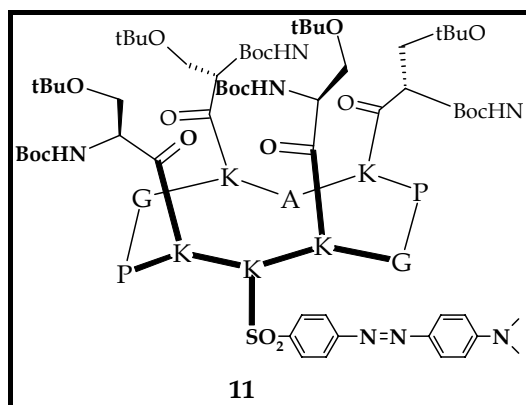
Rendement : 76%.

CLHP : $t_R = 13,27$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

SM (ESI) : $C_{95}H_{169}N_{19}O_{26}$ ($M_{calc} = 1993,5$) ; m/z : $[M+2]/2 = 997,8$; $[M+3]/3 = 665,6$.

5. c[Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Lys(Dabsyl)-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Pro-Gly-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Ala-Lys(Boc-Ser(-OtBu))-Pro-Gly] : **11**

209 mg de peptide **10** (0,10 mmol) sont dissout dans du DMF à une concentration de $10^{-2}M$. On additionne ensuite du chlorure de dabsyl (1 éq.) et de la DIEA pour se placer à pH 8-9. Après une heure d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé à sec et le peptide **11** est précipité à l'éther puis purifié en CLHP semi-préparative pour finalement donner 160 mg (0,07 mmol) de produit de couleur rouge.



Rendement : 70%.

CLHP : $t_R = 16,12$ min (214 et 466 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

CLHP semi-préparative : $t_R = 33,02$ min (C_{18} , 214 et 466 nm, 5 à 100% B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{109}H_{182}N_{22}O_{28}S$ ($M_{\text{calc}} = 2280,9$) ; m/z : $[M+2]/2 = 1141,1$; $[M+3]/3 = 761,45$.

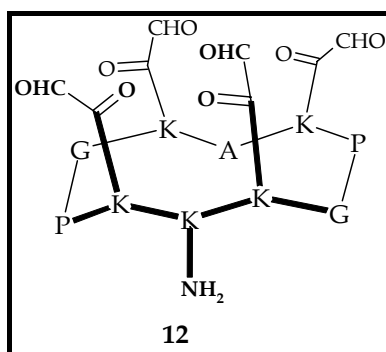
6. c[Lys(COCHO)-Lys-Lys(COCHO)-Pro-Gly-Lys(COCHO)-Ala-Lys(COCHO)-Pro-Gly] : **12**

Les groupements –Boc et –tBu des résidus Sérine du produit **10** (100 mg ; 0,05 mmol) sont éliminés selon les **protocoles 12 et 13**.

CLHP : $t_R = 5,45$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes).

SM (ESI) : $C_{59}H_{105}N_{19}O_{18}$ ($M_{\text{calc}} = 1368,6$) ; m/z : $[M+1] = 1368,7$; $[M+2]/2 = 684,7$.

Le composé intermédiaire est oxydé selon le **protocole 17**. Après purification par CLHP semi-préparative, le composé **12** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (30 mg ; 0,024 mmol).



Rendement : 48%.

CLHP : $t_R = 6,12$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes).

CLHP semi-préparative : $t_R = 8,00$ min (C_{18} , 214 et 250 nm, 5 à 60% B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{55}H_{85}N_{15}O_{18}$ ($M_{\text{calc}} = 1244,4$) ; m/z : $[M+2]/2 = 623,3$; $[M+3]/3 = 415,9$.

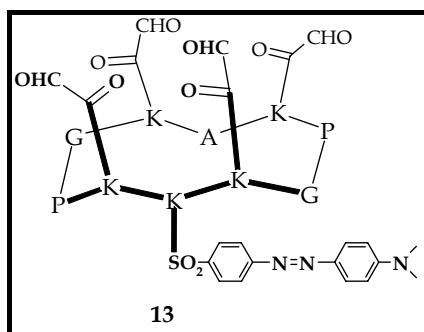
7. c[Lys(COCHO)-Lys(Dabsyl)-Lys(COCHO)-Pro-Gly-Lys(COCHO)-Ala-Lys(COCHO)-Pro-Gly] : **13**

Les groupements –Boc et –tBu des résidus sérine du produit **11** (36 mg ; 0,018 mmol) sont éliminés selon les **protocoles 12 et 13**.

CLHP : $t_R = 8,49$ min (214 et 466 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

SM (ESI) : $C_{73}H_{118}N_{22}O_{20}S$ ($M_{calc} = 1655,95$) ; m/z : $[M+1] = 1656,1$; $[M+2]/2 = 828,8$; $[M+3]/3 = 553,0$.

Le composé intermédiaire est oxydé selon le **protocole 17**. Après purification par CLHP semi-préparative, le composé **13** est obtenu sous la forme d'une poudre rouge (24 mg ; 0,015 mmol).



Rendement : 83%.

CLHP : $t_R = 8,47$ min (214 et 466 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

$t_R = 11,05$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes).

CLHP semi-préparative : $t_R = 14,6$ min (C_{18} , 214 et 466 nm, 5 à 100% B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{63}H_{92}N_{18}O_{21}S$ ($M_{calc} = 1531,7$) ; m/z : $[M+2]/2 = 766,3$.

IV. Synthèse des synthons peptidiques

A. Synthèse des peptides linéaires

1. H₂NO-CH₂-CO-Gly-Leu-Ser-Asp-Phe-Asn-OH : **14**

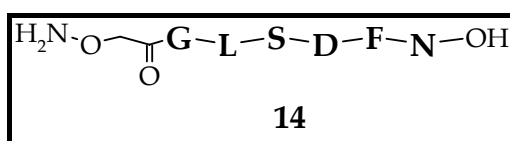
a. 1^{ère} synthèse :

Le peptide convenablement protégé, Fmoc-Gly-Leu-Ser(*t*Bu)-Asp(*t*Bu)-Phe-Asn(*Trt*)-OH, est assemblé selon le **protocole 1** par synthèse manuelle à partir de 1 g de résine 2-Chlorotrityle[®] (taux de substitution 2,1 mmol.g⁻¹).

CLHP : t_R = 11,24 min (214 et 299 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

Le groupement Fmoc-*N*-α terminal est déprotégé selon le **protocole 5**. Ensuite l'ester *N*-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est couplé en utilisant 1 éq. (177 mg ; 0,615 mmol) et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans du DMF dégazé à une concentration de 10⁻² M durant 30 minutes.

Le peptide est alors décroché de la résine et déprotégé à l'aide d'une solution TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5. On évapore alors la solution de coupure, précipite le peptide dans l'éther puis le purifie par CLHP semi-préparative. Après lyophilisation, le peptide linéaire **14** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (244 mg ; 0,336 mmol).



Rendement : 58%.

CLHP : t_R = 7,19 min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

t_R = 17,57 min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes)

t_R = 22,97 min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes ; en présence d'acétone)

CLHP semi-préparative : t_R = 14,6 min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 30 minutes).

SM (ESI) : C₃₀H₄₄N₈O₁₃ (M_{calc} = 724,73) ; m/z : [M+1] = 725,1.

Observation de produits secondaires :

SM (ESI) : m/z : [M+1] = 798,2 : peptide 14 présentant deux motifs oxyamine.

b. 2^{nde} synthèse :

Même protocole que le précédent. 500 mg de résine.

Rendement : 60%.

Produits secondaires :

SM (ESI) : m/z : [M+1] = 668,1 : peptide 14 tronqué, il manque un résidu glycine.

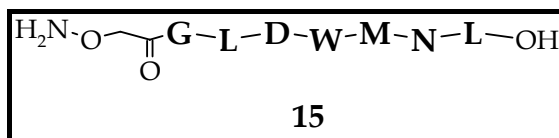
c. 3^{ème} synthèse :

Même protocole que le précédent. 1 g de résine.

Rendement : 78%.

2. H₂NO-CH₂-CO-Gly-Leu-Asp-Trp-Met-Asn-Leu-OH : **15**a. 1^{ère} synthèse :

Le protocole de synthèse est identique à celui utilisé pour le peptide **14**, à partir de 1g de résine. Le peptide est ensuite décroché de la résine en utilisant une solution de TFA/H₂O/Thioanisole/Phenol/EDT/TIS 84/5/5/5/2,5/1. Après purification par CLHP semi-préparative et lyophilisation, le peptide linéaire **15** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (338 mg ; 0,36 mmol).



Rendement : 61%.

CLHP : t_R = 11,58 min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

t_R = 23,51 min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes)

t_R = 23,71 min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes ; en présence d'acétone)

CLHP semi-préparative : t_R = 21,00 min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 30 minutes).

SM (ESI) : C₄₀H₆₀N₁₀O₁₃S (M_{calc} = 921,05) ; m/z : [M+1] = 921,3.

Observation de produits secondaires :

SM (ESI) : m/z : [M+1] = 994,3 : Peptide 2 présentant deux motifs oxyamine.

b. 2^{nde} synthèse :

Même protocole que le précédent. 1 g de résine.

Rendement : 67%.

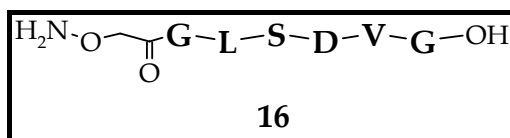
3. H₂NO-CH₂-CO-Gly-Leu-Ser-Asp-Val-Gly-OH : **16**a. 1^{ère} synthèse :

Le peptide convenablement protégé, Fmoc-Gly-Leu-Ser(*t*Bu)-Asp(*t*Bu)-Val-Gly-OH, est assemblé selon le **protocole 3** par synthèse automatisée à partir de 500 mg de résine Sasrin-Gly[®] (taux de substitution 0,6 mmol.g⁻¹).

CLHP : t_R = 12,58 min (214 et 299 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

Le groupement Fmoc-*N*-α terminal est déprotégé selon le **protocole 5**. Ensuite l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est couplé en utilisant 1 éq. et 3 à 4 éq. de DIPEA comme base pour se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans du DMF dégazé à une concentration de 10⁻² M durant 30 minutes.

Le peptide est alors décroché de la résine et déprotégé à l'aide d'une solution TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5. On évapore alors la solution de coupure, précipite le peptide dans l'éther puis le purifie par CLHP semi-préparative. Après lyophilisation, le peptide linéaire **16** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (118 mg ; 0,19 mmol).



Rendement : 64%.

CLHP : t_R = 5,95 min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

t_R = 14,05 min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes)

t_R = 19,82 min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes ; en présence d'acétone)

CLHP semi-préparative : t_R = 11,20 min (C₁₈, 214 et 250 nm, 5 à 60% B en 30 minutes).

SM (ESI) : C₂₄H₄₁N₇O₁₂ (M_{calc} = 619,63) ; m/z : [M+1] = 620,1.

b. 2^{nde} synthèse :

Même protocole que le précédent ; obtention de 290 mg du peptide 16 (0,47 mmol).

Rendement : 78 %.

4. H₂NO-CH₂-CO-Gly-Arg-Leu-Ser-Asp-Phe-Asn-Phe-Arg-NH₂ : **17**

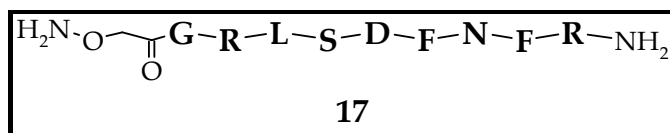
Le peptide est assemblé selon le **protocole 3** par synthèse automatisée à partir de 500 mg de résine Rink-Amide MBHA[®] (taux de substitution 0,8 mmol.g⁻¹).

CLHP : t_R = 9,25 min (214 et 299 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

Le groupement Fmoc-*N*-α terminal est déprotégé selon le **protocole 5**. Ensuite l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est couplé en

utilisant 1 éq. et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans du DMF dégazé à une concentration de 10^{-2} M durant 30 minutes.

Le peptide est alors décroché de la résine et déprotégé à l'aide d'une solution TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5. On évapore alors la solution de coupure, précipite le peptide dans l'éther puis le purifie par CLHP semi-préparative. Après lyophilisation, le peptide linéaire **17** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (615 mg ; 0,52 mmol).



Rendement : 65%.

CLHP : $t_R = 8,52$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

$t_R = 23,13$ min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes)

$t_R = 23,34$ min (214 et 299 nm, 0 à 20% B en 20 minutes ; en présence d'acétone)

CLHP semi-préparative : $t_R = 15,65$ min (C₁₈, 214 et 250 nm, 5 à 60% B en 30 minutes).

SM (ESI) : C₅₁H₇₈N₁₈O₁₅ ($M_{\text{calc}} = 1183,3$) ; m/z : $[M+1] = 1183,5$; $[M+2]/2 = 592,2$.

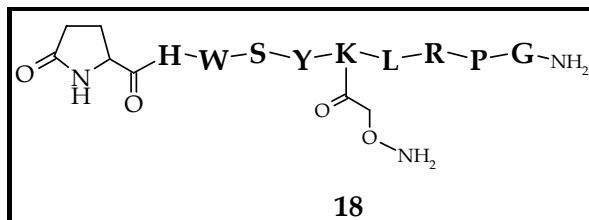
5. 6-DLys-GnRH-Oxyamine : **18**

Le peptide protégé est assemblé selon le **protocole 3** par synthèse automatisée à partir de 600 mg de résine Rink-Amide-MBHA[®] (taux de substitution 0,8 mmol.g⁻¹).

Le groupement N-ε Alloc est déprotégé selon le **protocole 15** et l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide tertbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est couplé en utilisant 1 éq. et 3 à 4 éq. de DIPEA comme base pour se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans du DMF dégazé à une concentration de 10^{-2} M durant 30 minutes.

Le peptide est ensuite décroché de la résine et déprotégé selon le **protocole 16**.

Le peptide linéaire **18** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche après purification par CLHP semi-préparative (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 30 min) puis lyophilisation (268 mg ; 0,2 mmol).



Rendement global : 42%.

CLHP : $t_R = 7,11$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

SM (ESI) : C₆₁H₈₇N₁₉O₁₅ ($M_{\text{calc}} = 1326,5$) ; m/z : $[M+2]/2 = 664,0$; $[M+3]/3 = 441,3$.

6. 6-DLys-GnRH-Biotine : **19**

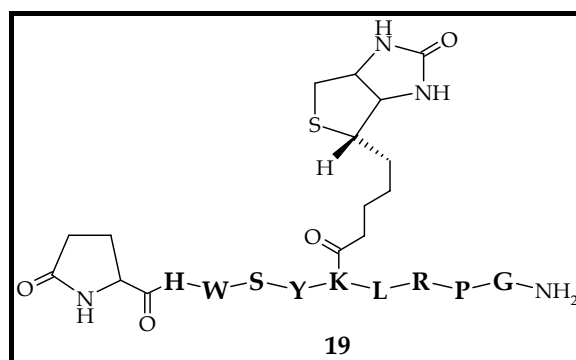
Le peptide convenablement protégé, pGlu-His(*Trt*)-Trp(*Boc*)-Ser(*tBu*)-Tyr(*tBu*)-dLys(*Alloc*)-Leu-Arg(*Pbf*)-Pro-Gly, est assemblé selon le **protocole 3** par synthèse automatisée à partir de 300 mg de résine Rink-Amide MBHA[®] (taux de substitution 0,8 mmol.g⁻¹).

CLHP : $t_R = 7,65$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

Le groupement *N*- ϵ Alloc est ensuite déprotégé selon le **protocole 14** et un résidu biotine est greffé au peptide à l'aide d'une solution contenant 2 éq. de chlorure de biotine, 2 éq. de PyBOP et 3 à 4 éq. de DIPEA pour se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans le DMF à 10⁻² M pendant 1 heure.

Le peptide est ensuite décroché de la résine et déprotégé selon le **protocole 16**.

Après évaporation, précipitation dans l'éther et purification en CLHP semi-préparative, le peptide **19** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (204 mg ; 0,14 mmol)



Rendement : 56%.

CLHP : $t_R = 9,40$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : C₆₁H₈₇N₁₉O₁₅ (M_{calc} = 1497,6) ; m/z : [M+2]/2 = 750,1 ; [M+3]/3 = 500,2.

B. Synthèses des peptides cycliques1. Boucle EC3 du récepteur de la GnRH : **20**

Le peptide est assemblé selon le **protocole 3** par synthèse automatisée à partir de 450 mg de résine Rink-Amide MBHA[®] (taux de substitution 0,8 mmol.g⁻¹).

Le groupement Fmoc -*N*- α terminal est ensuite déprotégé selon le **protocole 5**.

CLHP : $t_R = 8,40$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes).

L'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est alors couplé en utilisant 1 éq. (73,6 mg ; 0,256 mmol) et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour

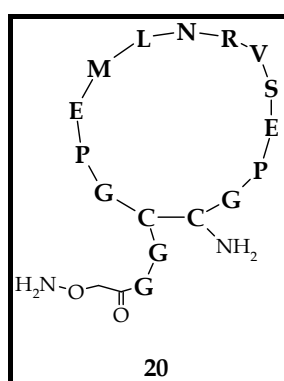
se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans du DMF dégazé à une concentration de 10^{-2} M durant 30 minutes. Une petite partie du peptide est alors décrochée pour analyse.

Rendement de la synthèse SPPS : 72%.

CLHP : $t_R = 8,46$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $C_{65}H_{108}N_{22}O_{24}S_3$ ($M_{calc} = 1677,91$) ; $m/z : [M+2]/2 = 840,1$.

On forme alors un pont disulfure entre les deux cystéines de la séquence avec le **protocole 9** et en suivant l'évolution de l'oxydation à l'aide du test d'Ellman. Le peptide est ensuite décroché de la résine selon le **protocole 16**. On précipite le peptide à l'éther et le purifie par CLHP semi-préparative pour obtenir une poudre blanche (198 mg ; 0,12 mmol).



Rendement : 35%.

CLHP : $t_R = 8,43$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

CLHP semi-préparative : $t_R = 14,50$ min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{65}H_{106}N_{22}O_{24}S_3$ ($M_{calc} = 1675,89$) ; $m/z : [M+1] = 1677,4$; $[M+2]/2 = 839,2$.

2. $H_2NO-CH_2-CO-Gly-Gly-Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Cys-NH_2$: **21**

Le peptide est assemblé selon le **protocole 3** par synthèse automatisée à partir de 820 mg de résine Rink-Amide MBHA[®] (taux de substitution $0,8 \text{ mmol.g}^{-1}$).

CLHP : $t_R = 7,60$ min (214 et 299 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

Le groupement Fmoc -*N*- α terminal est ensuite déprotégé selon le **protocole 5**.

CLHP : $t_R = 8,10$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

SM (ESI) : $C_{26}H_{50}N_{11}O_8S_2$ ($M_{calc} = 708,89$) ; $m/z : [M+1] = 708,1$.

L'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est alors couplé en utilisant 1 éq. et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9. La

réaction s'effectue dans du DMF dégazé à une concentration de 10^{-2} M durant 30 minutes. Une petite partie du peptide est alors décrochée pour analyse.

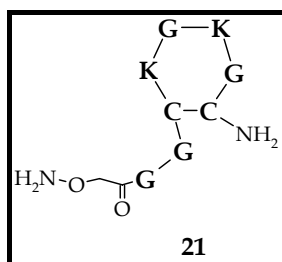
CLHP : $t_R = 9,56$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $C_{28}H_{53}N_{12}O_{10}S_2$ ($M_{calc} = 781,94$) ; m/z : $[M+1] = 781,2$.

La cyclisation selon le **protocole 9** étant infructueuse, on décroche alors le peptide de la résine selon le **protocole 16**, à l'aide d'une solution contenant 2,5% d'EDT et 1% de TIS. On précipite ensuite le peptide plusieurs fois à l'éther et on le purifie en CLHP semi-préparative.

CLHP semi-préparative : $t_R = 22,50$ min (214 et 250 nm, 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10% B en 30 minutes).

On cyclise enfin le peptide selon le **protocole 10** puis on le met à lyophiliser pour obtenir une poudre blanche (340mg ; 0,44 mmol).



Rendement : 69%.

CLHP : $t_R = 22,49$ min (214 et 250 nm, 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10% B en 30 minutes)

CLHP semi-préparative : $t_R = 19,50$ min (214 et 250 nm, 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10% B en 30 minutes)

SM (ESI) : $C_{28}H_{51}N_{12}O_{10}S_2$ ($M_{calc} = 779,92$) ; m/z : $[M+1] = 779,1$.

3. $H_2NO-CH_2-CO-Gly-Gly-Cys-Asp-Gly-Asp-Gly-Cys-NH_2$: **22**

a. 1^{ère} synthèse :

Le peptide est assemblé selon le **protocole 3** par synthèse automatisée à partir de 400 mg de résine Rink-Amide MBHA[®] (taux de substitution $0,8 \text{ mmol.g}^{-1}$).

CLHP : $t_R = 7,89$ min (214 et 299 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

Le groupement Fmoc -N- α terminal est ensuite déprotégé selon le **protocole 5**.

CLHP : $t_R = 27,80$ min (214 et 250 nm, 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10 %B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{22}H_{35}N_9O_{12}S_2$ ($M_{calc} = 681,71$) ; $m/z : [M+1] = 682,0$.

L'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est alors couplé en utilisant 1 éq. (58,7 mg ; 0,20 mmol) et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans du DMF dégazé à une concentration de 10^{-2} M durant 30 minutes. Une petite partie du peptide est alors décrochée pour analyse.

CLHP : $t_R = 29,91$ min (214 et 250 nm, 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10 %B en 30 minutes).

SM (ESI) : $C_{24}H_{38}N_{10}O_{14}S_2$ ($M_{calc} = 754,76$) ; $m/z : [M+1] = 755,0$.

La cyclisation selon le **protocole 9** étant infructueuse, on décroche alors le peptide de la résine selon le **protocole 16**, à l'aide d'une solution contenant 2,5% d'EDT et 1% de TIS. On précipite ensuite le peptide plusieurs fois à l'éther et on le purifie en CLHP semi-préparative.

CLHP semi-préparative : $t_R = 28,00$ min (214 et 250 nm, 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10% B en 30 minutes).

On cyclise le peptide selon le **protocole 10**. L'analyse en masse donne un adduit de la masse attendue plus 67, que l'on pourrait donc attribuer à la condensation d'un aldéhyde volatil de masse 86 g.mol^{-1} présent dans l'air que nous avons mis à buller dans le mélange réactionnel...

b. 2^{nde} synthèse :

Même protocole que celui décrit plus haut jusqu'à la cyclisation peptidique ; 800 mg de résine. La cyclisation s'effectue selon le **protocole 11**. L'utilisation du DMSO entraîne des difficultés de lyophilisation et implique une purification supplémentaire par CLHP semi-préparative.

CLHP semi-préparative : $t_R = 30,50$ min (214 et 250 nm, 0 %B pendant 5 minutes puis de 0 à 10% B en 30 minutes).

Après lyophilisation, nous obtenons une poudre blanche mais en très petites quantités (17,2 mg ; 0,023) par rapport celle mise à cycliser (150 mg ; 0,20 mmol) ainsi qu'au taux initial de substitution de la résine.

Rendement de synthèse avant cyclisation : 25%.

Rendement après cyclisation et purification : 12%.

Rendement global : 3%.

c. 3^{ème} synthèse :

Le peptide est assemblé selon le **protocole 1** par synthèse manuelle à partir de 1 g de résine Sieber Amide[®] (taux de substitution 0,55 mmol.g⁻¹). Puis le dernier acide aminé est déprotégé selon le **protocole 5**.

CLHP : $t_R = 6,268$ min (214 et 250 nm, 50 à 100% B en 15 minutes).

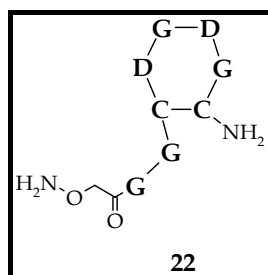
On effectue ensuite l'oxydation des cystéines dans le but de former un pont disulfure sur support solide selon le **protocole 9**.

CLHP : $t_R = 7,045$ min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

On détache ensuite le peptide de la résine en utilisant une solution à 3% de TFA dans le DCM en effectuant les cycles suivants : 5 x 20 mL x 30 minutes puis 7 x 20 mL x 15 minutes, le suivi de la coupure du peptide s'effectue par CLHP analytique. Celui-ci est ensuite évaporé sous pression réduite à froid et en ajoutant du DCM et du pentane à la solution de coupure afin de faciliter la précipitation du produit.

L'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est alors couplé en utilisant 1,1 éq. (115 mg ; 0,39 mmol) et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9 en solution dans le DMF à une concentration de 5 mg.mL⁻¹ pendant 30 minutes.

Après évaporation, puis déprotection selon le **protocole 12**, on purifie le produit par CLHP semi-préparative pour obtenir 62 mg (0,082 mmol) d'une poudre blanche.



Rendement global : 32%.

CLHP : $t_R = 12,58$ min (214 et 250 nm, 0 à 30% B en 30 minutes)

SM (ESI) : C₂₄H₃₆N₁₀O₁₄S₂ (M_{calc} = 752,74) ; m/z : [M+1] = 753,0.

4. H₂NO-CH₂-CO-Gly-Gly-Cys-Phe-Gly-Phe-Gly-Cys-NH₂ : 23

Le peptide est assemblé selon le **protocole 1** par synthèse manuelle à partir de 1 g de résine Sieber Amide[®] (taux de substitution 0,55 mmol.g⁻¹). Puis le dernier acide aminé est déprotégé selon le **protocole 5**.

CLHP : t_R = 6,069 min (214 et 250 nm, 50 à 100% B en 15 minutes).

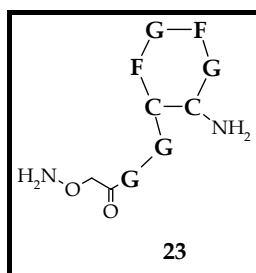
On effectue ensuite l'oxydation des cystéines dans le but de former un pont disulfure sur support solide selon le **protocole 9**.

On détache ensuite le peptide de la résine en utilisant une solution à 3% de TFA dans le DCM en effectuant les cycles suivants : 5 x 20 mL x 30 minutes puis 7 x 20 mL x 15 minutes, le suivi de la coupure du peptide s'effectue par CLHP analytique. Celui-ci est ensuite évaporé sous pression réduite à froid et en ajoutant du DCM et du pentane à la solution de coupure afin de faciliter la précipitation du produit.

L'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide tertbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est alors couplé en utilisant 1,2 éq. et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9 en solution dans le DMF à une concentration de 5 mg.mL⁻¹ pendant 30 minutes. On purifie une première fois le peptide par CLHP semi-préparative :

CLHP : t_R = 22,00 min (214 et 250 nm, 5 à 60% B en 30 minutes).

On déprotège alors le peptide à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H₂O à 95/2,5/2,5 et, après évaporation, on purifie le produit par CLHP semi-préparative pour obtenir 65 mg (0,080 mmol) d'une poudre blanche.



Rendement global : 35%.

CLHP semi-préparative : t_R = 28,40 min (214 et 250 nm, 5 à 35% B en 30 minutes)

Analytique : t_R = 6,981 min (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

SM (ESI) : C₃₄H₄₄N₁₀O₁₀S₂ (M_{calc} = 816,92) ; m/z : [M+1] = 817,3.

5. $\text{H}_2\text{NO-CH}_2\text{-CO-Gly-Gly-Cys-Ser-Gly-Ser-Gly-Cys-NH}_2$: **24**

Le peptide est assemblé selon le **protocole 1** par synthèse manuelle à partir de 1 g de résine Sieber Amide[®] (taux de substitution $0,55 \text{ mmol.g}^{-1}$). Puis le dernier acide aminé est déprotégé selon le **protocole 5**.

CLHP : $t_R = 12,010 \text{ min}$ (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

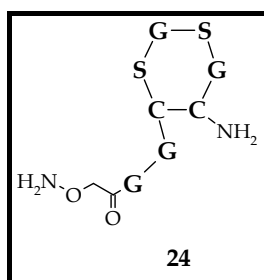
On effectue ensuite l'oxydation des cystéines dans le but de former un pont disulfure sur support solide selon le **protocole 9**.

On détache ensuite le peptide de la résine en utilisant une solution à 3% de TFA dans le DCM en effectuant les cycles suivants : 5 x 20 mL x 30 minutes puis 7 x 20 mL x 15 minutes, le suivi de la coupure du peptide s'effectue par CLHP analytique. Celui-ci est ensuite évaporé sous pression réduite à froid et en ajoutant du DCM et du pentane à la solution de coupure afin de faciliter la précipitation du produit.

L'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide tertbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique est alors couplé en utilisant 1,2 éq. et 3 à 4 éq. de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9 en solution dans le DMF à une concentration de 5 mg.mL^{-1} pendant 30 minutes.

CLHP : $t_R = 7,971 \text{ min}$ (214 et 250 nm, 5 à 100% B en 15 minutes).

On déprotège alors le peptide à l'aide d'une solution de TFA/TIS/ H_2O à 95/2,5/2,5 et, après évaporation, on purifie le produit par CLHP semi-préparative pour obtenir 100 mg (0,170 mmol) d'une poudre blanche.



Rendement global : 37%.

CLHP semi-préparative : $t_R = 17,50 \text{ min}$ (214 et 250 nm, 0% B pendant 5 minutes puis 0 à 10% B en 30 minutes)

Analytique : $t_R = 19,32 \text{ min}$ (214 et 250 nm, 0% B pendant 5 minutes puis 0 à 10% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_2$ ($M_{\text{calc}} = 696,72$) ; m/z : $[\text{M}+1] = 697,1$.

V. Synthèse de bibliothèques de molécules

A. Protocoles standards de synthèse

1. En présence d'eau et d'acétonitrile – **Protocole 19**

A 1 éq. du RAFT **6** ou **13** est additionné un total de 24 éq. de réactifs fonctionnalisés oxyamine dissouts dans 850 μL de tampon acétate d'ammonium pH 4,6 1M et 650 μL d'acétonitrile. L'avancée de la réaction est suivie par CLHP analytique en phase inverse à une longueur d'onde $\lambda = 214$ ou 466 nm et le mélange réactionnel est agité pendant un temps t à température ambiante ou un temps t' à 45°C. On purifie ensuite les produits afin d'éliminer les peptides oxyamine en excès. On obtient ainsi un mélange de produits sous la forme d'une poudre blanche ou rouge qui sera ensuite analysée par spectrométrie de masse.

2. En présence de DMSO – **Protocole 20**

Le RAFT **6** ou **13** est tout d'abord dissout dans le solvant A à une concentration de 10 mg.mL^{-1} . Les réactifs fonctionnalisés oxyamine sont quant à eux solubilisés dans 100% de DMSO à une concentration de 10 mg.mL^{-1} .

A 1 éq. du RAFT **6** ou **13** est alors additionné un total de 12 éq. de réactifs fonctionnalisés oxyamine. L'avancée de la réaction est suivie par CLHP analytique en phase inverse à une longueur d'onde $\lambda = 214$ ou 466 nm et le mélange réactionnel est agité pendant 3 heures à température ambiante. On purifie ensuite les produits afin d'éliminer les peptides oxyamine en excès. On obtient ainsi un mélange de produits sous la forme d'une poudre blanche ou rouge qui sera ensuite analysée par spectrométrie de masse.

3. Mode de purification – **Protocole 21**

Les premières bibliothèques de produits furent tout d'abord purifiées par CLHP semi-préparative. Mais devant le risque de ne pas récolter tous les produits, le **protocole 21** a été mis au point.

Il s'agit de purifier les banques de produits à l'aide d'une résine fonctionnalisée par un groupement aldéhydique.

Le **protocole 21** se constitue des étapes suivantes :

⇒ Préparation du gel :

On prélève le gel en suspension dans le glycérol auquel on ajoute de l'eau Milli-Q. On laisse ensuite décanter quelques minutes et on enlève le surnageant. On réitère ces opérations de lavage jusqu'à ce que le surnageant retiré soit limpide. On laisse ensuite un minimum d'eau en présence du gel afin de pouvoir prélever celui-ci.

⇒ Purification de la banque :

On prélève alors de l'ordre de 400 μ L de gel en suspension dans l'eau que l'on ajoute à chaque bibliothèque à purifier. On laisse ensuite sous agitation mécanique, de façon à ce que le gel soit en suspension uniformément dans la solution à purifier, pendant 6 heures.

⇒ Filtration de la banque :

On stoppe l'agitation et une fois que le gel s'est déposé au fond du vase réactionnel, on prélève un peu de solution afin de l'injecter en CLHP analytique. Si le chromatogramme obtenu révèle une absence totale de réactifs, la purification est terminée et on peut procéder à la filtration du mélange. Pour cela, on utilise une pipette Pasteur munie d'un coton pour filtrer la suspension. On rince le vase réactionnel et la pipette avec 10 mL de solvant B puis 10 mL de solvant A. On met ensuite le filtrat à lyophylier. Cette dernière étape est laborieuse à cause de la présence de DMSO en forte quantité. Elle nécessite donc d'être répétée plusieurs fois avant d'obtenir les produits sous forme de poudre.

⇒ Analyse :

Les banques de produits sont ensuite caractérisées par analyses CLHP tout d'abord. On définit ainsi trois gradients d'analyse :

⇒ Le **gradient A** (214 et 250 ou 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes) ;

⇒ Le **gradient B** (214 et 466 nm, 30 à 50% B en 20 minutes) ;

⇒ Le **gradient C** (214 et 250 nm, 5 à 30 %B en 15 minutes).

Ensuite, les banques de produits seront caractérisées par ES-MS et le cas échéant par LC-MS.

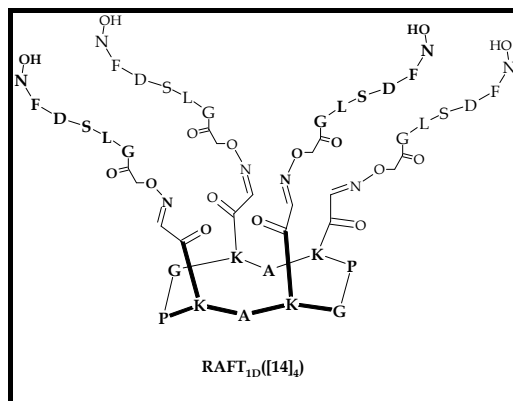
B. Bibliothèques de molécules à partir de peptides linéaires

1. Bibliothèques à un domaine

a. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([14])

Quantité en peptide [14] : 7,2 mg soit 10,0 μ mol ; synthèse selon les **protocoles 20 et 21**.

Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 2,12 mg soit 0,5 μ mol.



Rendement : 50%.

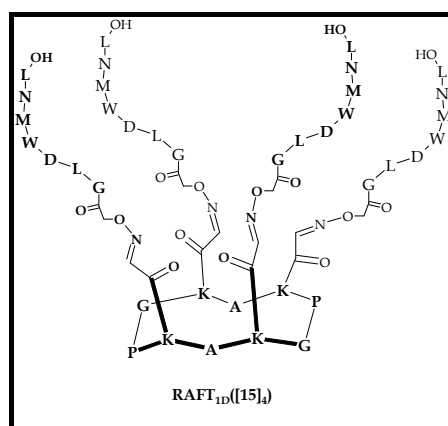
CLHP : $t_R = 11,45$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $M_{\text{calc}} = 4012$; $m/z : [M+3]/3 = 1338,7$.

b. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([15])

Quantité en peptide [15] : 9,2 mg soit 10,0 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 3,35 mg soit 0,7 μmol .



Rendement : 83%.

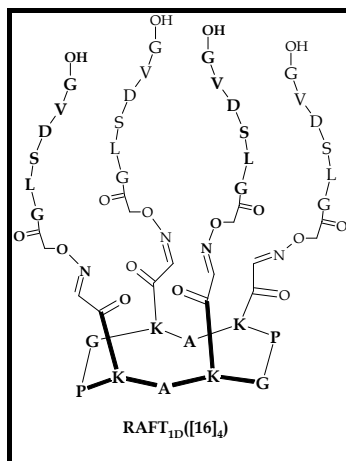
CLHP : $t_R = 15,43$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $M_{\text{calc}} = 4800$; $m/z : [M+3]/3 = 1600,3$.

c. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([16])

Quantité en peptide [16] : 6,3 mg soit 10,0 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 2,36 mg soit 0,7 μmol .



Rendement : 78%.

CLHP : $t_R = 10,55$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

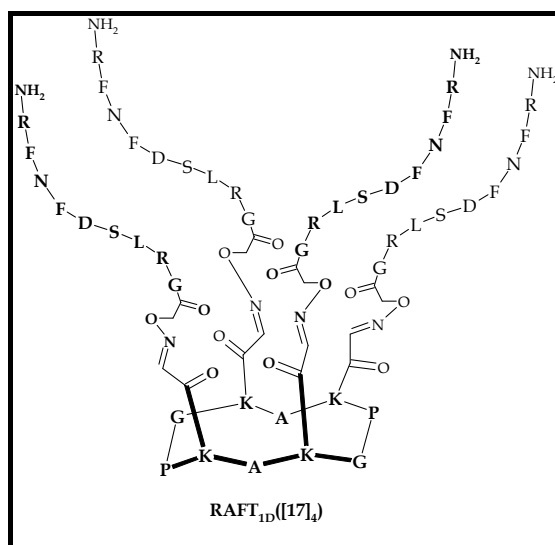
SM (ESI) : $C_{273}H_{400}N_{90}O_{76}S$ ($M_{\text{calc}} = 3596$) ;

m/z : $[M+3]/3 = 1198,4$.

d. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([17])

Quantité en peptide [17] : 11,8 mg soit 10,0 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 3,70 mg soit 0,6 μmol .



Rendement : 76%.

CLHP : $t_R = 11,42$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $M_{\text{calc}} = 5848$; m/z : $[M+3]/3 = 1968,9$.

e. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([14],[15])

Quantité en peptide [14] : 3,6 mg ; 5 μmol .

Quantité en peptide [15] : 4,6 mg ; 5 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 3,0 mg ; 0,7 μmol .

Rendement_{moy} : 84%.

	RAFT _{1D} ([14] ₄)	RAFT _{1D} ([14] ₃ ,[15])	RAFT _{1D} ([15] ₄)
t_R (Gradient A)	11,45 min	12,67 min	15,50 min
M_{cal}	4012,14	4208,45	4799,42
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1339,1 ; 1404,54	1404,49 ; 1053,62	1600,80 ; 1200,85
	RAFT _{1D} ([14] ₂ ,[15] ₂)	RAFT _{1D} ([14],[15] ₃)	
t_R (Gradient A)	13,72 min	14,65 min	
M_{calc}	4404,76	4601,07	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1469,93 ; 1102,70	1535,37 ; 1151,75	

f. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([14],[16])

Quantité en peptide [14] : 3,6 mg ; 5 µmol.

Quantité en peptide [16] : 3,1 mg ; 5 µmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 1,55 mg soit 0,396 µmol.

Rendement_{moy} : 47%.

	RAFT _{1D} ([16] ₄)	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[14])	RAFT _{1D} ([14] ₄)
t_R (Gradient A)	10,42 min	10,70 min	11,68 min
M_{cal}	3592,09	3686,84	4012,14
[M+3]/3	1198,5	1233,6	1339,1
	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[14] ₂)	RAFT _{1D} ([16],[14] ₃)	
t_R (Gradient A)	10,93 min	11,15 min	
M_{calc}	3791,94	3897,04	
[M+3]/3	1268,8	1303,8	

g. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([14],[17])

Quantité en peptide [14] : 3,6 mg ; 5 µmol.

Quantité en peptide [17] : 5,9 mg ; 5 µmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 3,06 mg ; 0,62 µmol.

Rendement_{moy} : 74%.

	RAFT _{1D} ([17] ₄)	RAFT _{1D} ([17] ₃ ,[14])	RAFT _{1D} ([14] ₄)
t_R (Gradient A)	11,42 min	11,43 min	11,45 min
M_{cal}	5845,43	5387,13	4012,14
[M+3]/3	X	1797,5	1338,4
	RAFT _{1D} ([17] ₂ ,[14] ₂)	RAFT _{1D} ([17],[14] ₃)	
t_R (Gradient A)	11,435 min	11,44 min	
M_{calc}	4928,83	4470,53	
[M+3]/3	1644,4	1491,4	

h. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([15],[16])

Quantité en peptide [15] : 4,6 mg ; 5 µmol.

Quantité en peptide [16] : 3,1 mg ; 5 µmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,85 mg ; 0,68 μmol .

Rendement_{moy} : 81%.

	RAFT _{1D} ([16] ₄)	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[15])	RAFT _{1D} ([15] ₄)
t _R (Gradient A)	10,55 min	12,15 min	15,50 min
M _{cal}	3592,09	3893,92	4799,42
[M+3]/3	1198,5	1299,3	1600,80
	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[15] ₂)	RAFT _{1D} ([16] ₁ ,[15] ₃)	
t _R (Gradient A)	13,45 min	14,53 min	
M _{calc}	4195,75	4497,58	
[M+3]/3	1399,3	1499,6	

i. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([15],[17])

Quantité en peptide [15] : 4,6 mg ; 5 μmol .

Quantité en peptide [17] : 5,9 mg ; 5 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,76 mg ; 0,53 μmol .

Rendement_{moy} : 63%.

	RAFT _{1D} ([17] ₄)	RAFT _{1D} ([17] ₃ ,[15])	RAFT _{1D} ([15] ₄)
t _R (Gradient A)	11,42 min	12,57 min	15,50 min
M _{cal}	5845,43	5583,93	4799,42
[M+3]/3	X	1862,5	1600,4
	RAFT _{1D} ([17] ₂ ,[15] ₂)	RAFT _{1D} ([17] ₁ ,[15] ₃)	
t _R (Gradient A)	13,55 min	14,63 min	
M _{calc}	5322,43	5060,93	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1775,3 ; 1331,5	1687,4 ; 1266,0	

j. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([16],[17])

Quantité en peptide [16] : 3,1 mg ; 5 μmol .

Quantité en peptide [17] : 5,9 mg ; 5 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 3,63 mg ; 0,75 μmol .

Rendement_{moy} : 89%.

	RAFT _{1D} ([16] ₄)	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[17])	RAFT _{1D} ([17] ₄)
t _R (Gradient A)	10,55 min	10,80 min	11,42 min
M _{cal}	3592,09	4155,43	5845,43
[M+3]/3	1198,3	1386,3	X
	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[17] ₂)	RAFT _{1D} ([16] ₁ ,[17] ₃)	
t _R (Gradient A)	11,10 min	11,33 min	
M _{calc}	4717,77	5282,11	
[M+3]/3	1574,0	1762,0	

k. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{1D}([14],[15],[16])

Quantité en peptide [14] : 2,44 mg ; 3,33 μmol .

Quantité en peptide [15] : 3,10 mg ; 3,33 μmol .

Quantité en peptide [16] : 2,08 mg ; 3,33 μ mol ; synthèse selon les **protocoles 20** et **21**.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,0 mg ; 0,48 μ mol.

Rendement_{moy} : 57%.

CLHP : 5 Massifs de 5 pics (t_R = 10,6-11,78 min), 4 pics (t_R = 12,2-12,7 min), 3 pics (t_R = 13,5-13,7 min), 2 pics (t_R = 14,48-14,78 min) et 1 pic (t_R = 15,5 min); 214 et 250 nm, Gradient A.

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{14}]_2, [\mathbf{15}], [\mathbf{16}])) = 12,52 \text{ min ;}$

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{14}], [\mathbf{15}]_2, [\mathbf{16}])) = 13,62 \text{ min ;}$

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{14}], [\mathbf{15}], [\mathbf{16}]_2)) = 12,35 \text{ min.}$

La totalité des masses attendues est observée :

	RAFT _{ID} ([14] ₄)	RAFT _{ID} ([15] ₄)	RAFT _{ID} ([16] ₄)	RAFT _{ID} ([16] ₁ , [14] ₃)
M_{cal}	4012,14	4799,42	3592,09	3897,04
[M+3]/3	1339,2	1600,80	1198,5	1304,3
	RAFT _{ID} ([16] ₂ , [14] ₂)	RAFT _{ID} ([16] ₃ , [14])	RAFT _{ID} ([15] ₁ , [14] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ , [14] ₂)
M_{calc}	3791,94	3686,84	4208,45	4404,76
[M+3]/3	1266,6	1233,6	1404,6	1469,7
	RAFT _{ID} ([15] ₃ , [14])	RAFT _{ID} ([15] ₁ , [16] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ , [16] ₂)	RAFT _{ID} ([15] ₃ , [16])
M_{calc}	4601,07	3893,92	4195,75	4497,58
[M+3]/3	1535,0	1299,3	1399,3	1499,6
	RAFT _{ID} ([14] ₂ , [15] ₁ , [16])	RAFT _{ID} ([14] ₁ , [15] ₂ , [16])	RAFT _{ID} ([14] ₁ , [15] ₁ , [16] ₂)	
M_{calc}	4102,79	4299,66	3988,25	
[M+3]/3	1366,9	1434,4	1333,9	

1. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{ID}([14]₁, [15]₁, [17]₁)

Quantité en peptide [14] : 2,44 mg ; 3,33 μ mol.

Quantité en peptide [15] : 3,10 mg ; 3,33 μ mol.

Quantité en peptide [17] : 3,99 mg ; 3,33 μ mol ; synthèse selon les **protocoles 20** et **21**.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,50 mg ; 0,52 μ mol.

Rendement_{moy} : 62%.

CLHP : 5 Massifs de 1 pic (t_R = 11,5-11,8 min), 3 pics (t_R = 12,5-12,8 min), 2 pics (t_R = 13,47-13,8 min), 1 pic (t_R = 14,48-14,7 min) et 1 pic (t_R = 15,5 min); 214 et 250 nm, Gradient A.

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{14}]_2, [\mathbf{15}], [\mathbf{17}])) = 12,70 \text{ min ;}$

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{14}], [\mathbf{15}]_2, [\mathbf{17}])) = 13,68 \text{ min ;}$

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{14}], [\mathbf{15}], [\mathbf{17}]_2)) = 12,55 \text{ min.}$

Douze masses sur les quinze attendues sont observées :

	RAFT _{ID} ([14] ₄)	RAFT _{ID} ([15] ₄)	RAFT _{ID} ([17] ₄)	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[14] ₃)
M_{cal}	4012,14	4799,42	5845,43	4470,53
[M+3]/3	1338,7	1600,4	X	1491,5
	RAFT _{ID} ([17] ₂ ,[14] ₂)	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[14] ₁)	RAFT _{ID} ([15] ₁ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ ,[14] ₂)
M_{calc}	4928,83	5387,13	4208,45	4404,76
[M+3]/3	1644,4	X	1404,1	1469,4
	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[14] ₁)	RAFT _{ID} ([15] ₁ ,[17] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ ,[17] ₂)	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[17] ₁)
M_{calc}	4601,07	5583,93	5322,43	5060,93
[M+3]/3	1534,8	X	1775,2	1687,8
	RAFT _{ID} ([14] ₂ ,[15] ₁ ,[17] ₁)	RAFT _{ID} ([14] ₁ ,[15] ₂ ,[17] ₁)	RAFT _{ID} ([14] ₁ ,[15] ₁ ,[17] ₂)	
M_{calc}	4667,02	4863,33	5125,14	
[M+3]/3	1556,9	1622,2	1709,6	

m. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{ID}([14],[16],[17])

Quantité en peptide [14] : 2,44 mg ; 3,33 μmol.

Quantité en peptide [16] : 2,08 mg ; 3,33 μmol.

Quantité en peptide [17] : 3,99 mg ; 3,33 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 1,82 mg ; 0,40 μmol.

Rendement_{moy} : 48%.

CLHP : 1 Massif de 6 pics : t_R = 10,55 -11,62 min (214 et 466 nm, Gradient A).

⇒ t_R(RAFT_{ID}([14]₂,[16]₁,[17]₁)) : compris entre 10,80 et 11,10 min ;

⇒ t_R(RAFT_{ID}([14]₁,[16]₂,[17]₁)) : compris entre 10,80 et 11,10 min ;

⇒ t_R(RAFT_{ID}([14]₁,[16]₁,[17]₂)) : compris entre 10,80 et 11,10 min.

Onze masses sur les quinze attendues sont observées :

	RAFT _{ID} ([14] ₄)	RAFT _{ID} ([17] ₄)	RAFT _{ID} ([16] ₄)	RAFT _{ID} ([16] ₃ ,[14] ₃)
M_{cal}	4012,14	5845,43	3592,09	3897,04
[M+3]/3	1338,6	X	X	1303,6
	RAFT _{ID} ([16] ₂ ,[14] ₂)	RAFT _{ID} ([16] ₃ ,[14] ₁)	RAFT _{ID} ([17] ₁ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([17] ₂ ,[14] ₂)
M_{calc}	3791,94	3686,84	4470,53	4928,83
[M+3]/3	1268,7	1233,4	1491,3	1644,3
	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[14] ₁)	RAFT _{ID} ([17] ₁ ,[16] ₃)	RAFT _{ID} ([17] ₂ ,[16] ₂)	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[16] ₁)
M_{calc}	5387,13	4155,43	4717,77	5282,11
[M+3]/3	X	1386,4	1574,0	X
	RAFT _{ID} ([14] ₂ ,[17] ₁ ,[16] ₁)	RAFT _{ID} ([14] ₁ ,[17] ₂ ,[16] ₁)	RAFT _{ID} ([14] ₁ ,[17] ₁ ,[16] ₂)	
M_{calc}	4365,43	4822,87	4260,53	
[M+3]/3	1456,3	1609,3	1421,4	

n. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{ID}([15],[16],[17])

Quantité en peptide [15] : 3,10 mg ; 3,33 μmol.

Quantité en peptide [16] : 2,08 mg ; 3,33 μmol.

Quantité en peptide [17] : 3,99 mg ; 3,33 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,71 mg ; 0,57 μmol .

Rendement_{moy} : 68%.

CLHP : 5 Massifs de 4 pics ($t_R = 10,6-11,85$ min), 2 pics ($t_R = 12,2-12,55$ min), 2 pics ($t_R = 13,4-13,7$ min), 1 pic ($t_R = 14,4-14,65$ min) et 1 pic ($t_R = 15,5$ min); 214 et 250 nm, Gradient A.).

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{15}]_2, [\mathbf{16}], [\mathbf{17}])) = 12,45$ min ;

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{15}], [\mathbf{16}]_2, [\mathbf{17}])) = 12,45$ min ;

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{15}], [\mathbf{16}], [\mathbf{17}]_2))$: non observé en LC-MS.

Huit masses sur les quinze attendues sont observées :

	RAFT _{ID} ([15] ₄)	RAFT _{ID} ([16] ₄)	RAFT _{ID} ([17] ₄)	RAFT _{ID} ([15] ₂ , [16] ₃)
M_{cal} [M+3]/3	4799,42	3592,09	5845,43	3893,92
	1600,3	X	X	1299,1
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([15] ₂ , [16] ₂)	RAFT _{ID} ([15] ₃ , [16])	RAFT _{ID} ([15], [17] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ , [17] ₂)
	4195,75	4497,58	5583,93	5322,43
M_{calc} [M+3]/3	1399,7	1500,0	X	1775,1
	RAFT _{ID} ([15] ₃ , [17])	RAFT _{ID} ([16], [17] ₃)	RAFT _{ID} ([16] ₂ , [17] ₂)	RAFT _{ID} ([16] ₃ , [17])
M_{calc} [M+3]/3	5060,93	4155,43	4717,77	5282,11
	1688,0	X	X	X
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([15] ₂ , [16], [17])	RAFT _{ID} ([15], [16] ₂ , [17])	RAFT _{ID} ([15], [16], [17] ₂)	
	5019,18	4455,51	5019,85	
	1674,4	1486,7	X	

o. Bibliothèque « mère » à quatre ligands :

RAFT_{ID}([14]₃, [15]₃, [16]₃, [17])

Quantité en peptide [14] : 1,8 mg ; 2,5 μmol .

Quantité en peptide [15] : 2,3 mg ; 2,5 μmol .

Quantité en peptide [16] : 1,6 mg ; 2,5 μmol .

Quantité en peptide [17] : 3,0 mg ; 2,5 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 3,1 mg ; 0,7 μmol .

Rendement_{moy} : 82%.

CLHP : 5 Massifs de 5 pics ($t_R = 10,6-11,63$ min), 5 pics ($t_R = 12,2-12,73$ min), 3 pics ($t_R = 13,45-13,8$ min), 1 pics ($t_R = 14,48-14,7$ min) et 1 pic ($t_R = 15,5$ min); 214 et 250 nm, Gradient A.

$\Rightarrow t_R(\text{RAFT}_{\text{ID}}([\mathbf{14}], [\mathbf{15}], [\mathbf{16}], [\mathbf{17}])) = 12,50$ min.

Sur l'ensemble des masses attendues, 25 sont observées :

	RAFT _{ID} ([14] ₄)	RAFT _{ID} ([15] ₄)	RAFT _{ID} ([16] ₄)
M_{cal} [M+3]/3	C ₁₇₆ H ₂₄₄ N ₄₆ O ₆₆ (M _{calc} = 4012,14)	C ₂₁₆ H ₃₁₀ N ₅₄ O ₆₆ S ₄ (M _{calc} = 4799,42)	C ₁₅₂ H ₂₃₃ N ₄₃ O ₆₂ (M _{calc} = 3592,09)
	1339,2	X	X

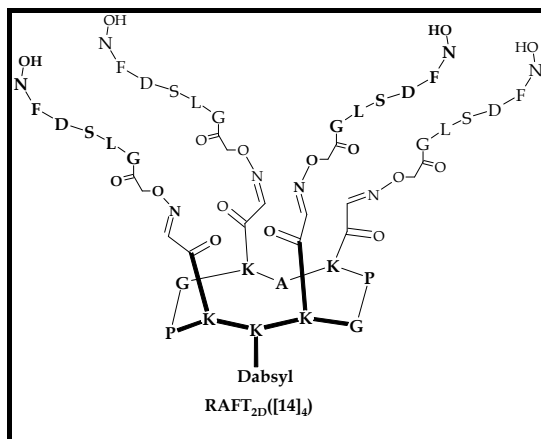
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([17] ₄)	RAFT _{ID} ([16] ₃ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([16] ₂ ,[14] ₂)
	C ₂₆₀ H ₃₈₀ N ₈₆ O ₇₄ (M _{calc} = 5845,43) X 1304,3	C ₁₇₀ H ₂₄₁ N ₄₆ O ₆₅ (M _{calc} = 3897,04) 1304,3	C ₁₆₄ H ₂₃₈ N ₄₅ O ₆₄ (M _{calc} = 3791,94) 1266,6
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([16] ₃ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ ,[14] ₂)
	C ₁₅₈ H ₂₃₅ N ₄₄ O ₆₃ (M _{calc} = 3686,84) X 1404,6	C ₁₈₆ H ₂₆₀ N ₄₈ O ₆₆ S (M _{calc} = 4208,45) 1404,6	C ₁₉₆ H ₂₇₆ N ₅₀ O ₆₆ S ₂ (M _{calc} = 4404,76) 1469,7
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([17] ₂ ,[14] ₂)
	C ₂₀₆ H ₂₉₂ N ₅₂ O ₆₆ S ₃ (M _{calc} = 4601,07) 1535,0	C ₂₃₉ H ₃₄₆ N ₇₆ O ₇₂ (M _{calc} = 5387,13) X	C ₂₁₈ H ₃₁₂ N ₆₆ O ₇₀ (M _{calc} = 4928,83) 1644,1
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[14] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[16] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ ,[16] ₂)
	C ₁₉₇ H ₂₇₈ N ₅₆ O ₆₈ (M _{calc} = 4470,53) 1491,3	C ₁₆₈ H ₂₅₃ N ₄₅ O ₆₃ S (M _{calc} = 3893,92) X	C ₁₈₄ H ₂₇₂ N ₄₈ O ₆₄ S ₂ (M _{calc} = 4195,75) 1399,3
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[16] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[17] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₂ ,[17] ₂)
	C ₂₀₀ H ₂₉₁ N ₅₁ O ₆₅ S ₃ (M _{calc} = 4497,58) 1499,6	C ₂₄₉ H ₃₆₃ N ₇₈ O ₇₂ S (M _{calc} = 5583,93) X	C ₂₃₈ H ₃₄₅ N ₇₀ O ₇₀ S ₂ (M _{calc} = 5322,43) X
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[17] ₃)	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[16] ₃)	RAFT _{ID} ([17] ₂ ,[16] ₂)
	C ₂₂₇ H ₃₂₈ N ₆₂ O ₆₈ S ₃ (M _{calc} = 5060,93) X 1386,0	C ₁₇₉ H ₂₇₀ N ₅₄ O ₆₅ (M _{calc} = 4155,43) 1386,0	C ₂₀₆ H ₃₀₇ N ₆₅ O ₆₈ (M _{calc} = 4717,77) 1574,0
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([17] ₃ ,[16] ₃)	RAFT _{ID} ([14] ₂ ,[15] ₃ ,[16] ₃)	RAFT _{ID} ([14] ₃ ,[15] ₂ ,[16] ₃)
	C ₂₃₃ H ₃₄₄ N ₇₆ O ₇₁ (M _{calc} = 5282,11) X 1366,9	C ₁₈₀ H ₂₅₇ N ₄₇ O ₆₅ S (M _{calc} = 4102,79) 1366,9	C ₁₉₀ H ₂₅₃ N ₄₉ O ₆₅ S ₂ (M _{calc} = 4299,66) 1434,4
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([14] ₃ ,[15] ₃ ,[16] ₂)	RAFT _{ID} ([14] ₂ ,[16] ₃ ,[17] ₃)	RAFT _{ID} ([14] ₃ ,[16] ₂ ,[17] ₃)
	C ₁₇₄ H ₂₅₄ N ₄₇ O ₆₄ S (M _{calc} = 3988,25) 1333,9	C ₂₉₁ H ₂₇₅ N ₅₅ O ₆₇ (M _{calc} = 4365,43) 1456,3	C ₁₈₅ H ₂₇₃ N ₅₅ O ₆₆ (M _{calc} = 4260,53) 1421,3
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([14] ₃ ,[16] ₃ ,[17] ₂)	RAFT _{ID} ([15] ₂ ,[16] ₃ ,[17] ₃)	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[16] ₂ ,[17] ₃)
	C ₂₁₂ H ₃₁₀ N ₆₆ O ₆₉ (M _{calc} = 4822,87) 1609,0	C ₂₂₂ H ₃₂₆ N ₆₈ O ₆₉ S ₂ (M _{calc} = 5019,18) 1567,6	C ₁₉₅ H ₃₈₉ N ₅₇ O ₆₆ S (M _{calc} = 4455,51) 1486,3
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([15] ₃ ,[16] ₃ ,[17] ₂)	RAFT _{ID} ([14] ₂ ,[15] ₃ ,[17] ₃)	RAFT _{ID} ([14] ₃ ,[15] ₂ ,[17] ₃)
	C ₂₂₂ H ₃₂₆ N ₆₈ O ₆₇ S (M _{calc} = 5019,85) 1674,1	C ₂₀₇ H ₂₉₄ N ₅₈ O ₆₈ S (M _{calc} = 4667,02) 1557,0	C ₂₁₇ H ₂₇₂ N ₅₅ O ₆₆ S ₂ (M _{calc} = 4863,33) 1622,0
M_{calc} [M+3]/3	RAFT _{ID} ([14] ₃ ,[15] ₃ ,[17] ₂)	RAFT _{ID} ([14] ₃ ,[15] ₃ ,[16] ₃ ,[17] ₃)	
	C ₂₂₈ H ₃₂₈ N ₆₈ O ₇₀ S (M _{calc} = 5125,14) 1709,4	C ₂₀₁ H ₂₅₃ N ₅₂ O ₆₅ S (M _{calc} = 4561,92) 1521,8	

2. Bibliothèques à deux domaines

a. RAFT à un ligand : RAFT_{2D}([14])

Quantité en [14] : 1,3 mg soit 15,7 μmol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps d'agitation t = 10 heures ; quantité de produit pur : 2,3 mg soit 0,528 μmol.



Rendement : 81 %.

CLHP : $t_R = 13,55$ min (214 et 466 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

$t_R = 13,71$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

$t_R = 11,12$ min (214 et 466 nm, 30 à 50% B en 20 minutes)

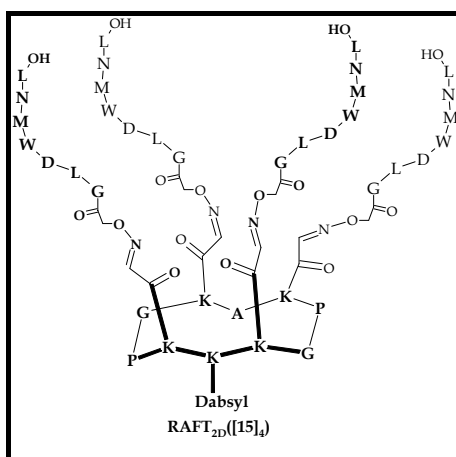
SM (ESI) : $C_{189}H_{264}N_{50}O_{68}S$ ($M_{\text{calc}} = 4356,57$) ;

m/z : $[M+2]/2 = 2179,2$; $[M+3]/3 = 1453,2$; $[M+4]/4 = 1090,6$.

b. RAFT à un ligand : RAFT_{2D}([15])

Quantité en peptide [15] : 14,4 mg soit 15,7 μmol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps d'agitation $t = 10$ heures ; quantité de produit pur : 2,45 mg soit 0,477 μmol .



Rendement : 73 %.

CLHP : $t_R = 17,37$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

$t_R = 22,795$ min (214 et 466 nm, 30 à 50% B en 20 minutes)

SM (ESI) : $C_{229}H_{330}N_{58}O_{68}S_5$ ($M_{\text{calc}} = 5143,85$) ;

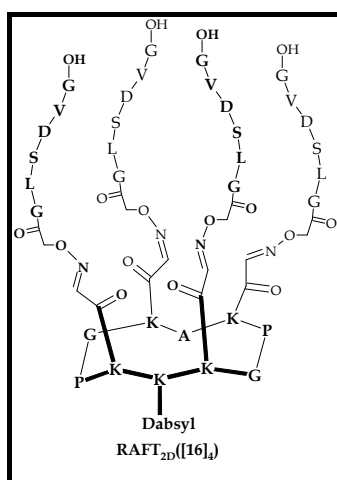
m/z : $[M+3]/3 = 1715,2$; $[M+4]/4 = 1286,7$.

m/z : $[M-4]/4 = 1284,8$; $[M-5]/5 = 1027,7$; $[M-6]/6 = 856,3$; $[M-7]/7 = 733,8$.

c. RAFT à un ligand : RAFT_{2D}([16])

Quantité en peptide [16] : 9,7 mg soit 15,7 μmol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps d'agitation $t = 10$ heures ; quantité de produit pur : 1,6 mg soit 0,406 μmol .



Rendement : 63 %.

CLHP : $t_R = 9,58$ min (214 et 466 nm, 5 à 100% B en 15 minutes)

$t_R = 12,742$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

$t_R = 8,20$ min (214 et 466 nm, 30 à 50% B en 20 minutes)

CLHP semi-préparative : $t_R = 23,5$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes).

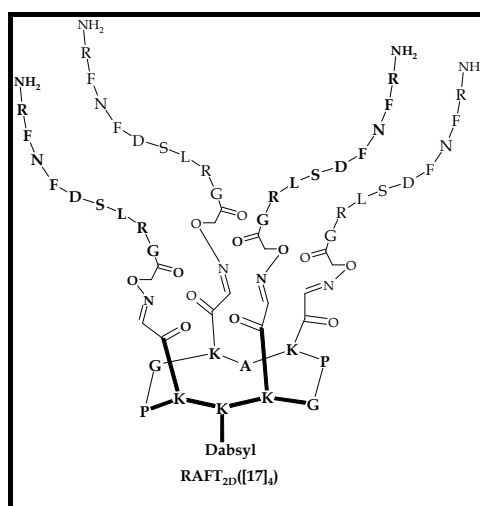
SM (ESI) : $\text{C}_{165}\text{H}_{253}\text{N}_{47}\text{O}_{64}\text{S}$ ($M_{\text{calc}} = 3936,52$) ;

m/z : $[M+2]/2 = 1969,8$; $[M+3]/3 = 1313,6$; $[M+4]/4 = 985,4$.

d. RAFT à un ligand : $\text{RAFT}_{2\text{D}}([17])$

Quantité en peptide [17] : 18,5 mg soit 15,7 μmol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps d'agitation $t = 10$ heures ; quantité de produit pur : 2,75 mg soit 0,444 μmol .



Rendement : 68%.

CLHP : $t_R = 12,44$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

$t_R = 10,10$ min (214 et 466 nm, 30 à 50% B en 20 minutes)

CLHP semi-préparative : $t_R = 22,0$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes).

SM (ESI) : $\text{C}_{273}\text{H}_{400}\text{N}_{90}\text{O}_{76}\text{S}$ ($M_{\text{calc}} = 6189,86$) ;

m/z : $[M+4]/4 = 1549,0$; $[M+5]/5 = 1239,5$; $[M+6]/6 = 1033,1$.

e. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{2D}([14],[15])

Quantité en peptide [14] : 56,8 mg ; 78,4 μ mol.

Quantité en peptide [15] : 72,3 mg ; 78,4 μ mol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Les quantités sont ici multipliées par dix, les volumes aussi.

Temps t d'agitation : 48 heures.

Quantité de produit pur : 9,9 mg ; 2,086 μ mol ; Rendement_{moy} : 32%.

	RAFT _{2D} ([14] ₄)	RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[15])
t_R (Gradient A)	13,28 min	14,32 min
t_R (Gradient B)	10,85 min	14,42 min
M_{calc}	C ₁₈₉ H ₂₆₄ N ₅₀ O ₆₈ S (M _{calc} = 4356,57)	C ₁₉₉ H ₂₈₀ N ₅₂ O ₆₈ S ₂ (M _{calc} = 4552,88)
[M+2]/2 ; [M+3]/3 ; [M+4]/4	2179,2 ; 1453,2 ; 1090,6	X ; 1519,3 ; 1139,4
	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15] ₂)	RAFT _{2D} ([14] ₁ ,[15] ₃)
t_R (Gradient A)	15,25 min	16,08 min
t_R (Gradient B)	17,48 min	20,30 min
M_{calc}	C ₂₀₉ H ₂₉₆ N ₅₄ O ₆₈ S ₃ (M _{calc} = 4749,19)	C ₂₁₉ H ₃₁₂ N ₅₆ O ₆₈ S ₄ (M _{calc} = 4945,5)
[M+2]/2 ; [M+3]/3 ; [M+4]/4	X ; 1584,3 ; 1188,5	X ; 1650,0 ; 1237,6
	RAFT _{2D} ([15] ₄)	
t_R (Gradient A)	16,90 min	
t_R (Gradient B)	22,85 min	
M_{calc}	C ₂₂₉ H ₃₃₀ N ₅₈ O ₆₈ S ₅ (M _{calc} = 5143,85)	
[M+2]/2 ; [M+3]/3 ; [M+4]/4	X ; 1715,2 ; 1286,7	

f. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{2D}([14],[16])

Quantité en peptide [14] : 5,68 mg ; 7,84 μ mol.

Quantité en peptide [16] : 4,86 mg ; 7,84 μ mol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t d'agitation : 48 heures.

Quantité de produit pur : 0,9 mg ; 0,229 μ mol ; Rendement_{moy} : 35%.

	RAFT _{2D} ([16] ₄)	RAFT _{2D} ([16] ₃ ,[14])
t_R (Gradient A)	12,742 min	12,74 min
t_R (Gradient B)	8,20 min	8,88 min
M_{calc}	C ₁₆₅ H ₂₅₃ N ₄₇ O ₆₄ S (M _{calc} = 3936,52)	C ₁₇₁ H ₂₅₅ N ₄₈ O ₆₅ S (M _{calc} = 4031,27)
[M+2]/2 ; [M+3]/3 ; [M+4]/4	1969,8 ; 1313,6 ; 985,4	1346,7 ; 1009,9 ; 807,7 ; 672,9
[M-3]/3 – [M-6]/6		
	RAFT _{2D} ([16] ₂ ,[14] ₂)	RAFT _{2D} ([16] ₁ ,[14] ₃)
t_R (Gradient A)	12,85 min	13,0 min
t_R (Gradient B)	9,50 min	10,08 min
M_{calc}	C ₁₇₇ H ₂₅₈ N ₄₉ O ₆₆ S (M _{calc} = 4136,37)	C ₁₈₃ H ₂₆₁ N ₅₀ O ₆₇ S (M _{calc} = 4241,47)
[M+3]/3 ; [M+4]/4 ; [M+5]/5	1396,5 ; 1053,0 ; 845,8	1418,7 ; 1064,3 ; X
	RAFT _{2D} ([14] ₄)	
t_R (Gradient A)	13,28 min	
t_R (Gradient B)	10,85 min	
M_{calc}	C ₁₈₉ H ₂₆₄ N ₅₀ O ₆₈ S (M _{calc} = 4356,57)	
[M+2]/2 ; [M+3]/3 ; [M+4]/4	2179,2 ; 1453,2 ; 1090,6	

g. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{2D}([14],[17])

Quantité en peptide [14] : 5,68 mg ; 7,84 μ mol.

Quantité en peptide [17] : 9,27 mg ; 7,84 μ mol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t' d'agitation : 20 heures.

Quantité de produit pur : 2,8 mg ; 0,522 μ mol.

Rendement_{moy} : 80 %.

CLHP semi-préparative : t_R = 21,80 min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes).

CLHP : t_R = 12,00-14,3 min (Gradient A)

t_R = 8,90-11,7 min (Gradient B)

Aucun des cinq types de produits n'est observé en spectrométrie de masse...

h. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{2D}([15],[16])

Quantité en peptide [15] : 7,22 mg ; 7,84 μ mol.

Quantité en peptide [16] : 4,86 mg ; 7,84 μ mol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t' d'agitation : 17 heures.

Quantité de produit pur : 1,18 mg ; 0,261 μ mol.

Rendement_{moy} : 40%.

	RAFT _{2D} ([16] ₄)	RAFT _{2D} ([16] ₃ , [15])
t _R (Gradient A)	12,742 min	13,82 min
t _R (Gradient B)	8,20 min	13,23 min
M _{calc}	C ₁₆₅ H ₂₅₄ N ₄₆ O ₆₄ S (M _{calc} = 3936,52	C ₁₈₁ H ₂₇₃ N ₄₉ O ₆₅ S ₂ (M _{calc} = 4238,35)
[M+2]/2 ; [M+3]/3 ; [M+4]/4	1969,8 ; 1313,6 ; 985,4	X ; 1414,0 ; 1060,8
	RAFT _{2D} ([16] ₂ , [15] ₂)	RAFT _{2D} ([16] ₁ , [15] ₃)
t _R (Gradient A)	14,88 min	15,81 min
t _R (Gradient B)	16,97 min	20,25 min
M _{calc}	C ₁₉₇ H ₂₉₂ N ₅₂ O ₆₆ S ₃ (M _{calc} = 4540,18)	C ₂₁₃ H ₃₁₁ N ₅₅ O ₆₇ S ₄ (M _{calc} = 4842,01)
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1514,4 ; 1136,2	1614,7 ; 1211,5
	RAFT _{2D} ([15] ₄)	
t _R (Gradient A)	16,90 min	
t _R (Gradient B)	22,85 min	
M _{calc}	C ₂₂₉ H ₃₃₀ N ₅₈ O ₆₈ S ₅ (M _{calc} = 5143,85)	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1715,2 ; 1286,7	

i. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{2D}([15],[17])

Quantité en peptide [15] : 7,22 mg ; 7,84 μ mol.

Quantité en peptide [17] : 9,27 mg ; 7,84 μ mol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t' d'agitation : 17 heures.

Quantité de produit pur : 2,59 mg ; 0,490 μ mol.

Rendement_{moy} : 75%.

CLHP :

Massif de 5 pics : $t_R = 13,43-16,48$ min (Gradient A)

Massif de 6 pics : $t_R = 13,10-21,62$ min (Gradient B)

Seuls les produits suivants sont observés par spectrométrie de masse :

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{17}],[\mathbf{15}]_3) : [M-5]/5 = 1080,0 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}]_4) : [M+3]/3 = 1715,2 ; [M+4]/4 = 1286,7.$$

j. Sous-bibliothèques à deux ligands : $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{16}],[\mathbf{17}])$

Quantité en peptide **[16]** : 4,86 mg ; 7,84 μmol .

Quantité en peptide **[17]** : 9,27 mg ; 7,84 μmol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t' d'agitation : 20 heures.

Quantité de produit pur : 2,08 mg ; 0,411 μmol .

Rendement_{moy} : 63%

CLHP :

Massif de 1 pic large : $t_R = 12,08-15,07$ min (214 et 466 nm, Gradient A)

Massif de 2 pics larges : $t_R = 8,30-11,20$ min (214 et 466 nm, Gradient B).

Aucun des cinq types de produits n'est observé en spectrométrie de masse...

k. Sous-bibliothèques à trois ligands : $\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{14}],[\mathbf{15}],[\mathbf{16}])$

Quantité en peptide **[14]** : 3,78 mg ; 5,22 μmol .

Quantité en peptide **[15]** : 4,8 mg ; 5,22 μmol .

Quantité en peptide **[16]** : 3,2 mg ; 5,22 μmol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t' d'agitation : 24 heures.

Quantité de produit pur : 1,94 mg soit 0,46 μmol .

Rendement_{moy} : 72%.

CLHP : 1 Massif de 6 pics : $t_R = 13,43-17,43$ min (Gradient A)

Parmi les types de produits attendus, seuls les suivants sont observés par spectrométrie de masse :

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}]_4) : [M+3]/3 = 1715,2 ; [M+4]/4 = 1286,7 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{16}]_4) : [M+2]/2 = 1969,8 ; [M+3]/3 = 1313,6 ; [M+4]/4 = 985,4 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}],[\mathbf{14}]_3) : [M+3]/3 = 1519,0 ; [M+4]/4 = 1139,9 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}]_2,[\mathbf{14}]_2) : [M+3]/3 = 1584,4 ; [M+4]/4 = 1188,6 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}]_3,[\mathbf{14}]) : [M+3]/3 = 1649,6 ; [M+4]/4 = 1237,7 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}],[\mathbf{16}]_3) : [M+3]/3 = 1414,0 ; [M+4]/4 = 1060,8 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}]_2,[\mathbf{16}]_2) : [M+3]/3 = 1514,6 ; [M+4]/4 = 1136,1 ;$$

$$\Rightarrow \text{RAFT}_{2D}([\mathbf{15}]_3,[\mathbf{16}]) : [M+3]/3 = 1614,7 ; [M+4]/4 = 1212,3 ;$$

- ⇒ RAFT_{2D}([**14**]₂,[**15**],[**16**]) : [M+3]/3 = 1484,1 ; [M+4]/4 = 1113,4 ; [M-2]/2 = 2223,7 ; [M-3]/3 = 1482,3 ;
- ⇒ RAFT_{2D}([**14**],[**15**]₂,[**16**]) : [M+3]/3 = 1549,7 ; [M+4]/4 = 1162,5 ; [M-2]/2 = 2322,2 ; [M-3]/3 = 1547,6 ;
- ⇒ RAFT_{2D}([**14**],[**15**],[**16**]₂) : [M+3]/3 = 1449,0 ; [M+4]/4 = 1087,1 ; [M-2]/2 = 2171,2 ; [M-3]/3 = 1447,2 ;

Ce qui nous donnent onze masses observées sur 15.

l. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{2D}([**14**],[**15**],[**17**])

Quantité en peptide [**14**] : 3,78 mg ; 5,22 μmol.

Quantité en peptide [**15**] : 4,8 mg ; 5,22 μmol.

Quantité en peptide [**17**] : 6,2 mg ; 5,22 μmol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t' d'agitation : 26 heures.

Quantité de produit pur : 2,963 mg ; 0,568 μmol.

Rendement_{moy} : 87%.

CLHP : 1 Massif de 6 pics : t_R = 13,63-17,28 min (Gradient A)

Aucun type de produit attendu n'est observé par analyse en spectrométrie de masse...

m. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{2D}([**14**],[**16**],[**17**])

Quantité en peptide [**14**] : 3,78 mg ; 5,22 μmol.

Quantité en peptide [**16**] : 3,2 mg ; 5,22 μmol.

Quantité en peptide [**17**] : 6,2 mg ; 5,22 μmol.

Temps t' d'agitation : 30 heures.

Quantité de produit pur : 2,0 mg ; 0,415 μmol.

Rendement_{moy} : 64%.

CLHP : 1 Massif de 8 pics : t_R = 11,72-16,08 min (Gradient A)

Seuls les masses suivantes sont observées :

- ⇒ RAFT_{2D}([**16**],[**14**]₃) : [M-7]/7 = 606,3 ; [M-8]/8 = 530,6 ;
- ⇒ RAFT_{2D}([**16**]₂,[**14**]₂) : [M-5]/5 = 828,5 ; [M-6]/6 = 690,2 ; [M-7]/7 = 591,3 ;
- ⇒ RAFT_{2D}([**16**]₂,[**17**]₂) : [M-5]/5 = 1015,8 ;
- ⇒ RAFT_{2D}([**14**],[**16**]₂,[**17**]) : [M-8]/8 = 574,8.

Ce qui nous donne 4 types de produits observés sur 15 attendus.

n. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{2D}([**15**],[**16**],[**17**])

Quantité en peptide [**15**] : 4,8 mg ; 5,22 μmol.

Quantité en peptide [**16**] : 3,2 mg ; 5,22 μmol.

Quantité en peptide [**17**] : 6,2 mg ; 5,22 μmol.

Temps t' d'agitation : 23 heures.

Quantité de produit pur : 2,82 mg ; 0,555 μ mol.

Rendement_{moy} : 85%.

CLHP : 1 Massif de 11 pics : t_R = 13,12-17,42 min (Gradient A)

Seule une masse parmi l'ensemble des 15 attendues est observée, il s'agit du type de produit : RAFT_{2D}([15],[16]₂,[17]) pour lequel on observe [M-8]/8 = 574,8.

o. Bibliothèque « mère » à quatre ligands :

RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])

Quantité en peptide [14] : 2,8 mg ; 3,92 μ mol.

Quantité en peptide [15] : 4,8 mg ; 3,92 μ mol.

Quantité en peptide [16] : 2,4 mg ; 3,92 μ mol.

Quantité en peptide [17] : 6,2 mg ; 3,92 μ mol ; synthèse selon le **protocole 19**.

Temps t' d'agitation : 30 heures.

Quantité de produit pur : 2,46 mg ; 0,503 μ mol.

Rendement_{moy} : 77%.

CLHP : Massif de 8 pics : t_R = 12,10-17,28 min (214 et 466 nm, Gradient A).

⇒ t_R(RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])) : estimé à 13,92 min.

On observe 19 masses parmi les 35 attendues, le tableau ci-dessous résume les multichargés observés :

	RAFT _{2D} ([14] ₄)	RAFT _{2D} ([15] ₄)	RAFT _{2D} ([16] ₄)	RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[15])
M	4375	5143	3939	4552
[M+4]/4 ; [M+5]/5	1089,6 ; X	1282,4 ; 1029,9	984,5 ; X	1141,7 ; X
	RAFT _{2D} ([15],[16] ₃)	RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16] ₂)	RAFT _{2D} ([14],[17] ₃)	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[17] ₂)
M	4240	4541	5732	5273
[M-3]/3	1412,2	X	X	X
[M+3]/3 ; [M+4]/4 ; [M+5]/5	X	1514,0 ; 1136,1	X	X
	X	X	1145,7	1056,4
	RAFT _{2D} ([15],[17] ₃)	RAFT _{2D} ([14],[15],[16] ₂)	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15],[16])	RAFT _{2D} ([14],[15] ₂ ,[16])
M	5929	4344	4448	4645
[M+5]/5	1188,9	X	X	X
[M+3]/3 ; [M+4]/4 ; [M-3]/3	X	X	X	1550,6 ; 1162,0
	X	1446,6	1482,1	1549,6
	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[16],[17])	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15],[17])	RAFT _{2D} ([15],[16] ₂ ,[17])	RAFT _{2D} ([14],[15] ₂ ,[17])
M	4710	5011	4803	5208
[M-3]/3	X	X	1600,3	X
[M+3]/3 ; [M+4]/4 ; [M+5]/5	X ; 1177,4	X	X	X ; 1303,5
	X	1005,6	X	1042,9
	RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16],[17])	RAFT _{2D} ([14],[16] ₂ ,[17])	RAFT _{2D} ([14],[15],[16],[17])	
M	5104	4606	4907	

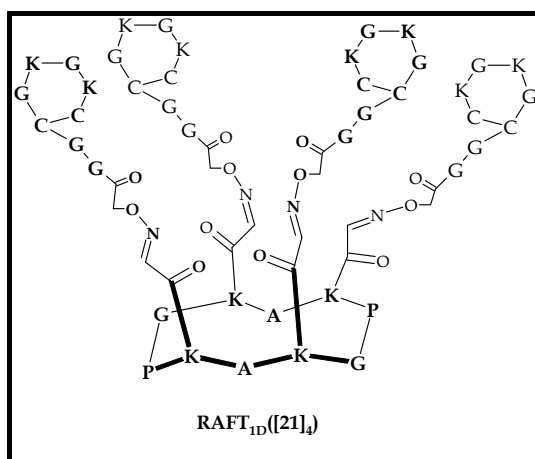
$[M+3]/3$;	X ; 1276,8	X ; 1149,9	X
$[M+4]/4$			X
$[M+5]/5$	1021,7	X	X
$[M-3]/3$	X	X	1634,7

C. Bibliothèques de molécules à partir de peptides cycliques – RAFTs à un domaine

1. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([21])

Quantité en peptide [21] : 7,8 mg soit 10,0 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 3,0 mg soit 0,71 μmol .



Rendement : 85%.

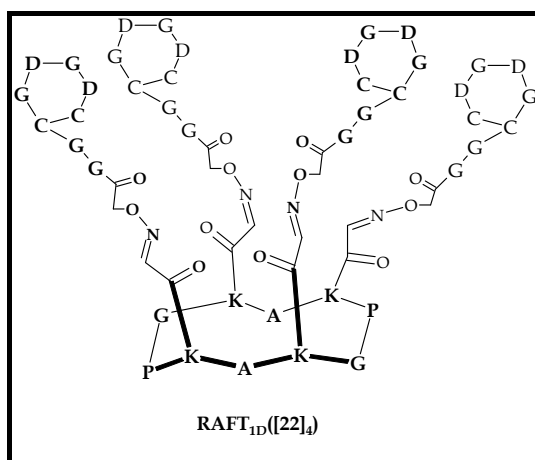
CLHP : $t_R = 7,06$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $M_{\text{calc}} = 4228$; m/z : $[M+3]/3 = 1410,8$; $[M+4]/4 = 1058,5$.

2. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([22])

Quantité en peptide [22] : 7,52 mg soit 10,0 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 2,8 mg soit 0,69 μmol .



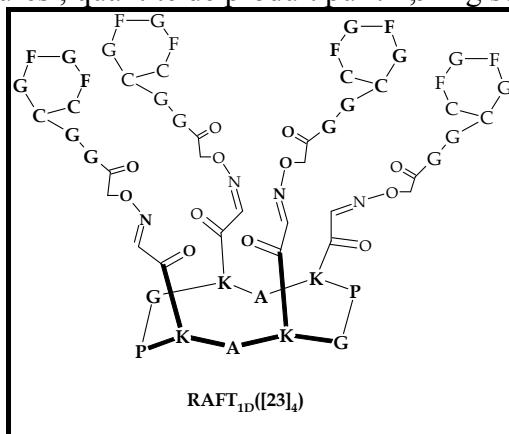
Rendement : 82%.

CLHP : $t_R = 12,06$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $M_{\text{calc}} = 4124$; $m/z : [M+3]/3 = 1376,1$.

3. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([23])

Quantité en peptide [23] : 8,16 mg soit 10,0 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.
Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 2,9 mg soit 0,66 μmol .



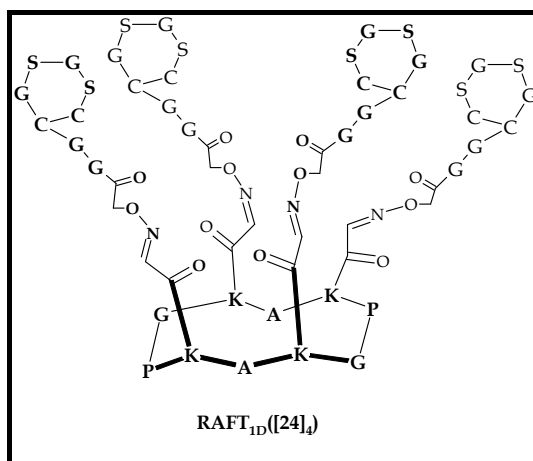
Rendement : 78%.

CLHP : $t_R = 13,66$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $M_{\text{calc}} = 4380$; $m/z : [M+3]/3 = 1461,6$.

4. RAFT à un ligand : RAFT_{1D}([24])

Quantité en peptide [24] : 6,96 mg soit 10,0 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.
Temps d'agitation $t = 3$ heures ; quantité de produit pur : 3,0 mg soit 0,77 μmol .



Rendement : 92%.

CLHP : $t_R = 7,45$ min (214 et 466 nm, 5 à 60% B en 15 minutes)

SM (ESI) : $M_{\text{calc}} = 3900$; $m/z : [M+3]/3 = 1301,3$.

5. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([21],[22])

Quantité en peptide [21] : 3,90 mg ; 5 μmol .

Quantité en peptide [22] : 3,75 mg ; 5 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,3 mg ; 0,54 μmol .

Rendement_{moy} : 64%.

	RAFT _{1D} ([21] ₄)	RAFT _{1D} ([21] ₃ ,[22])	RAFT _{1D} ([22] ₄)
t_R (Gradient C)	10,16 min	10,65 min	12,08 min
M_{cal}	4228	4202	4124
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1410,8 ; 1058,7	1402,1 ; 1052,0	1376,1 ; X
	RAFT_{1D}([21]₂,[22]₂)	RAFT_{1D}([21]₁,[22]₃)	
t_R (Gradient C)	11,22 min	11,78 min	
M_{calc}	4176	4150	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1393,4 ; 1045,5	1384,8 ; 1039,0	

6. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([21],[23])

Quantité en peptide [21] : 3,90 mg ; 5 μmol .

Quantité en peptide [23] : 4,08 mg ; 5 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,6 mg ; 0,61 μmol .

Rendement_{moy} : 72%.

	RAFT _{1D} ([21] ₄)	RAFT _{1D} ([21] ₃ ,[23])	RAFT _{1D} ([23] ₄)
t_R (Gradient C)	10,16 min	14,08 min	18,7 min
M_{cal}	4228	4266	4380
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1410,8 ; 1058,7	1423,4 ; 1068,0	1461,8 ; X
	RAFT_{1D}([21]₂,[23]₂)	RAFT_{1D}([21]₁,[23]₃)	
t_R (Gradient C)	18,03 min	18,45 min	
M_{calc}	4304	4342	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1436,2 ; 1077,4	1448,9 ; 1087,0	

7. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([21],[24])

Quantité en peptide [21] : 3,90 mg ; 5 μmol .

Quantité en peptide [24] : 3,48 mg ; 5 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,1 mg ; 0,49 μmol .

Rendement_{moy} : 58%.

	RAFT _{1D} ([21] ₄)	RAFT _{1D} ([21] ₃ ,[24])	RAFT _{1D} ([24] ₄)
t_R (Gradient C)	10,16 min	10,22 min	11,00 min
M_{cal}	4228	4146	3900
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1410,8 ; 1058,5	1383,4 ; 1038,0	1301,3 ; X
	RAFT_{1D}([21]₂,[24]₂)	RAFT_{1D}([21]₁,[24]₃)	
t_R (Gradient C)	10,47 min	10,78 min	
M_{calc}	4064	3982	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1356,0 ; 1017,4	1338,7 ; 997,1	

8. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([22],[23])

Quantité en peptide [22] : 3,75 mg ; 5 μ mol.

Quantité en peptide [23] : 4,08 mg ; 5 μ mol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,9 mg ; 0,69 μ mol.

Rendement_{moy} : 82%.

	RAFT _{1D} ([22] ₄)	RAFT _{1D} ([22] ₃ ,[23])	RAFT _{1D} ([23] ₄)
t_R (Gradient C)	12,08 min	15,77 min	18,7 min
M_{cal}	4124	4188	4380
[M+3]/3	1376,1	1397,3	1461,8
	RAFT _{1D} ([22] ₂ ,[23] ₂)	RAFT _{1D} ([22],[23] ₃)	
t_R (Gradient C)	18,25 min	18,50 min	
M_{calc}	4252	4316	
[M+3]/3	1418,8	1439,9	

9. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([22],[24])

Quantité en peptide [22] : 3,75 mg ; 5 μ mol.

Quantité en peptide [24] : 3,48 mg ; 5 μ mol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,7 mg ; 0,64 μ mol.

Rendement_{moy} : 76%.

	RAFT _{1D} ([22] ₄)	RAFT _{1D} ([22] ₃ ,[24])	RAFT _{1D} ([24] ₄)
t_R (Gradient C)	12,08 min	11,97 min	11,00 min
M_{cal}	4124	4068	3900
[M+3]/3	1376,1	1357,2	1301,3
	RAFT _{1D} ([22] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{1D} ([22],[24] ₃)	
t_R (Gradient C)	11,68 min	11,43 min	
M_{calc}	4012	3956	
[M+3]/3	1338,2	1320	

10. Sous-bibliothèques à deux ligands : RAFT_{1D}([23],[24])

Quantité en peptide [23] : 4,08 mg ; 5 μ mol.

Quantité en peptide [24] : 3,48 mg ; 5 μ mol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,5 mg ; 0,59 μ mol.

Rendement_{moy} : 70%.

	RAFT _{1D} ([23] ₄)	RAFT _{1D} ([23] ₃ ,[24])	RAFT _{1D} ([24] ₄)
t_R (Gradient C)	18,7 min	18,45 min	11,00 min
M_{cal}	4380	4260	3900
[M+3]/3	1461,8	1421,2	1301,3

t_R (Gradient C)	RAFT _{ID} ([23] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{ID} ([23] ₃ ,[24] ₃)
M_{calc}	18,13 min	14,96 min
[M+3]/3	4140	4020
	1381,2	1341,2

11. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{ID}([21],[22],[23])

Quantité en peptide [21] : 2,59 mg ; 3,33 μmol .

Quantité en peptide [22] : 2,51 mg ; 3,33 μmol .

Quantité en peptide [23] : 2,72 mg ; 3,33 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 3,0 mg ; 0,70 μmol .

Rendement_{moy} : 83%.

CLHP : 3 massifs de 5 pics ($t_R = 10,2-12,23$ min), 4 pics ($t_R = 14,2-15,87$ min) et 4 pics ($t_R = 18,1-18,65$ min) ; 214 et 250 nm, Gradient C.

$\Rightarrow t_R$ (RAFT_{ID}([21]₂,[22]₃,[23])) = 14,92 min ;

$\Rightarrow t_R$ (RAFT_{ID}([21],[22]₂,[23])) = 15,52 min ;

$\Rightarrow t_R$ (RAFT_{ID}([21],[22],[23]₂)) = 18,25 min.

Sur l'ensemble les 15 masses attendues, 14 sont observées :

	RAFT _{ID} ([21] ₄)	RAFT _{ID} ([22] ₄)	RAFT _{ID} ([23] ₄)	RAFT _{ID} ([21] ₃ ,[22])
M_{cal}	4228	4124	4380	4202
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1410,8 ; 1058,5	1376,1	1462,0	1402,1 ; 1052,0
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂)	RAFT _{ID} ([21],[22] ₃)	RAFT _{ID} ([21] ₃ ,[23])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[23] ₂)
M_{calc}	4176	4150	4266	4304
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1393,4 ; 1045,5	1384,8 ; 1039,0	1423,5 ; 1067,9	1436,0 ; 1077,3
	RAFT _{ID} ([21],[23] ₃)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[23])	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[23] ₂)	RAFT _{ID} ([22],[23] ₃)
M_{calc}	4342	4188	4252	4316
[M+3]/3	1446,6	X	1418,8	1439,9
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22],[23])	RAFT _{ID} ([21],[22] ₂ ,[23])	RAFT _{ID} ([21],[22],[23] ₂)	
M_{calc}	4240	4214	4278	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1414,7 ; 1061,4	1405,9 ; X	1427,4 ; X	

12. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{ID}([21],[22],[24])

Quantité en peptide [21] : 2,59 mg ; 3,33 μmol .

Quantité en peptide [22] : 2,51 mg ; 3,33 μmol .

Quantité en peptide [24] : 2,32 mg ; 3,33 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,7 mg ; 0,65 μmol ; Rendement_{moy} : 77%.

CLHP : 1 massifs de 8 pics ($t_R = 10,3-12,2$ min) ; 214 et 250 nm, Gradient C.

Sur l'ensemble les 15 masses attendues, 14 sont observées :

	RAFT _{ID} ([21] ₄)	RAFT _{ID} ([22] ₄)	RAFT _{ID} ([24] ₄)	RAFT _{ID} ([21] ₃ ,[22])
M_{cal}	4228	4124	3900	4202
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1411,0 ; 1058,6	1375,5	X	1402,9 ; 1051,9
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂)	RAFT _{ID} ([21],[22] ₃)	RAFT _{ID} ([21] ₃ ,[24])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[24] ₂)
M_{calc}	4176	4150	4146	4064
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1394,0 ; 1045,9	1384,2	1383,9 ; 1037,7	1355,3 ; 1017,4
	RAFT _{ID} ([21],[24] ₃)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[24])	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{ID} ([22],[24] ₃)
M_{calc}	3982	4068	4012	3956
[M+3]/3	1338,8	1357	1338,2	1320,5
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22],[24])	RAFT _{ID} ([21],[22] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([21],[22],[24] ₂)	
M_{calc}	4120	4094	4038	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1373,9 ; 1031,6	1365,9	1348,1 ; 1011,5	

13. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{ID}([21],[23],[24])

Quantité en peptide [21] : 2,59 mg ; 3,33 μmol.

Quantité en peptide [23] : 2,72 mg ; 3,33 μmol.

Quantité en peptide [24] : 2,32 mg ; 3,33 μmol ; synthèse selon les protocoles 20 et 21.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 2,8 mg ; 0,67 μmol ; Rendement_{moy} : 79%.

CLHP : 3 massifs de 4 pics (t_R = 10,2-11,0 min), 4 pics (t_R = 14,2-15,4 min) et 4 pics (t_R = 18,1-18,65 min) ; 214 et 250 nm, Gradient C.

⇒ t_R (RAFT_{ID}([21]₂,[23],[24])) = 11,10 min ;

⇒ t_R (RAFT_{ID}([21],[23]₂,[24])) = 18,10 min ;

⇒ t_R (RAFT_{ID}([21],[23],[24]₂)) = 14,63 min.

Sur l'ensemble les 15 masses attendues, 13 sont observées :

	RAFT _{ID} ([21] ₄)	RAFT _{ID} ([23] ₄)	RAFT _{ID} ([24] ₄)	RAFT _{ID} ([21] ₃ ,[23])
M_{cal}	4228	4380	3900	4266
[M+3]/3 ; [M+4]/4	X	1460,7 ; 1034,3	X	1423,4 ; 1068,2
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[23] ₂)	RAFT _{ID} ([21],[23] ₃)	RAFT _{ID} ([21] ₃ ,[24])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[24] ₂)
M_{calc}	4304	4342	4146	4064
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1435,4 ; 1077,9	1448,3	1382,7 ; 1038,5	1355,3 ; 1017,5
	RAFT _{ID} ([21],[24] ₃)	RAFT _{ID} ([23] ₃ ,[24])	RAFT _{ID} ([23] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{ID} ([23],[24] ₃)
M_{calc}	3982	4260	4140	4020
[M+3]/3	1328,1	1420,8	1381,9	1341,8
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[23],[24])	RAFT _{ID} ([21],[23] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([21],[23],[24] ₂)	
M_{calc}	4184	4222	4102	
[M+3]/3 ; [M+4]/4	1395,4 ; 1047,4	1408,8	1367,9	

14. Sous-bibliothèques à trois ligands : RAFT_{ID}([22],[23],[24])

Quantité en peptide [22] : 2,51 mg ; 3,33 μ mol.

Quantité en peptide [23] : 2,72 mg ; 3,33 μ mol.

Quantité en peptide [24] : 2,3 mg ; 3,33 μ mol ; synthèse selon les **protocoles 20 et 21**.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 3,0 mg ; 0,71 μ mol.

Rendement_{moy} : 84%.

CLHP : 3 massifs de 5 pics (t_R = 11,2-12,23 min), 4 pics (t_R = 15,12-15,87 min) et 3 pics (t_R = 18,2-18,65 min) ; 214 et 250 nm, Gradient C.

$\Rightarrow t_R$ (RAFT_{ID}([22]₂,[23],[24])) = 15,62 min ;

$\Rightarrow t_R$ (RAFT_{ID}([22],[23]₂,[24])) = 18,15 min ;

$\Rightarrow t_R$ (RAFT_{ID}([22],[23],[24]₂)) = 15,37 min.

Sur l'ensemble les 15 masses attendues, toutes sont observées :

	RAFT _{ID} ([22] ₄)	RAFT _{ID} ([23] ₄)	RAFT _{ID} ([24] ₄)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[23])
M_{cal}	4124	4380	3900	4188
[M+3]/3	1375,8	1461,2	1301,5	1397,5
	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[23] ₂)	RAFT _{ID} ([22],[23] ₃)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[24])	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[24] ₂)
M_{calc}	4252	4316	4068	4012
[M+3]/3	1418,6	1439,9	1357,2	1338,2
	RAFT _{ID} ([22],[24] ₃)	RAFT _{ID} ([23] ₃ ,[24])	RAFT _{ID} ([23] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{ID} ([23],[24] ₃)
M_{calc}	3956	4260	4140	4020
[M+3]/3	1319,9	1421,3	1381,2	1341,2
	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[23],[24])	RAFT _{ID} ([22],[23] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([22],[23],[24] ₂)	
M_{calc}	4132	4196	4076	
[M+3]/3	1378,5	1400,2	1359,9	

15. Bibliothèque « mère » à quatre ligands : RAFT_{ID}([21],[22],[23],[24])

Quantité en peptide [21] : 1,95 mg ; 2,5 μ mol.

Quantité en peptide [22] : 1,88 mg ; 2,5 μ mol.

Quantité en peptide [23] : 2,04 mg ; 2,5 μ mol.

Quantité en peptide [24] : 1,74 mg ; 2,5 μ mol ; synthèse selon les **protocoles 20 et 21**.

Temps t d'agitation : 3 heures.

Quantité de produit pur : 3,10 mg ; 0,73 μ mol.

Rendement_{moy} : 87%.

CLHP : 3 massifs de 7 pics (t_R = 10,5-12,18 min), 6 pics (t_R = 14,25-15,78 min) et 4 pics (t_R = 18,13-18,65 min) ; 214 et 250 nm, Gradient C.).

$\Rightarrow t_R$ (RAFT_{ID}([21],[22],[23],[24])) = 13,50 min.

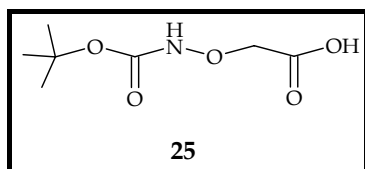
Sur l'ensemble les 35 masses attendues, 34 sont observées :

	RAFT _{ID} ([21] ₄)	RAFT _{ID} ([22] ₄)	RAFT _{ID} ([23] ₄)	RAFT _{ID} ([24] ₄)
M_{cal}	4228	4124	4380	3900
[M+3]/3	X	1375,5	1461,3	1300,0
	RAFT _{ID} ([23] ₃ ,[21] ₃)	RAFT _{ID} ([23] ₂ ,[21] ₂)	RAFT _{ID} ([23] ₃ ,[21])	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[21] ₃)
M_{calc}	4266	4304	4342	4202
[M+3]/3	1423,9	1436,2	1448,8	1401,9
	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[21] ₂)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[21])	RAFT _{ID} ([24] ₃ ,[21])	RAFT _{ID} ([24] ₂ ,[21] ₂)
M_{calc}	4176	4150	3982	4064
[M+3]/3	1392,3	1384,5	1328,3	1356,3
	RAFT _{ID} ([24] ₃ ,[21] ₃)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[23] ₃)	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[23] ₂)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[23] ₃)
M_{calc}	4146	4316	4252	4188
[M+3]/3	1383,3	1439,9	1418,8	1397,3
	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[24] ₃)	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{ID} ([22] ₃ ,[24])	RAFT _{ID} ([24] ₃ ,[23] ₃)
M_{calc}	3956	4012	4068	4260
[M+3]/3	1320,0	1338,2	1357,2	1421,2
	RAFT _{ID} ([24] ₂ ,[23] ₂)	RAFT _{ID} ([24] ₃ ,[23])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂ ,[23])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂ ,[23])
M_{calc}	4140	4020	4240	4214
[M+3]/3	1381,2	1341,2	1414,9	1405,5
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂ ,[23] ₂)	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[23] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[23] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[23] ₂ ,[24] ₂)
M_{calc}	4278	4184	4222	4102
[M+3]/3	1427,5	1396,9	1408,7	1368,6
	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[23] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[23] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([22] ₂ ,[23] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂ ,[24])
M_{calc}	4132	4196	4076	4120
[M+3]/3	1378,5	1400,2	1360,2	1374,9
	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂ ,[24])	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂ ,[24] ₂)	RAFT _{ID} ([21] ₂ ,[22] ₂ ,[23] ₂ ,[24])	
M_{calc}	4094	4038	4158	
[M+3]/3	1365,8	1347,5	1387,5	

VI. Synthèse de réactifs

A. Synthèse de l'acide *terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique* : 25

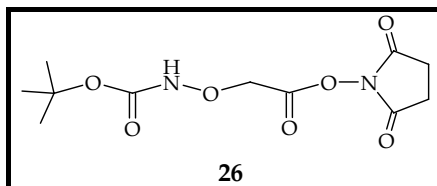
De l'hydrochlorure d'acide aminoxyacétique (2g ; 18,3 mmol) et de la soude (1,09 g ; 27,25 mmol ; 1,5 éq.) sont dissout dans un mélange acétate d'éthyle/dioxane (50/50 ; 66 mL/66 mL) que l'on refroidit à 0°C. On ajoute alors au goutte à goutte à l'aide d'une ampoule isobare une solution de *diterbutylpyrocarbonate* (4g ; 18,3 mmol ; 1 éq.) dans 30 mL de dioxane pendant une heure. On agite encore pendant 4 heures à température ambiante puis on évapore sous vide pour éliminer le dioxane. La solution aqueuse est ensuite acidifiée à l'aide d'une solution à 10% d'acide citrique à pH 3. On extrait alors 3 fois avec de l'acétate d'éthyle ; les phases organiques sont ensuite lavées à l'eau puis séchées sur Na₂SO₄ et concentrées pour donner un solide blanc.



RMN 1H (300 MHz, DMSO) : δ en ppm 10,08 (s, 1H, NH), 4,26 (s, 2H, OCH₂), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

B. Synthèse de l'ester *N-hydroxysuccinimide de l'acide terbutyloxycarbonyl-aminoxyacétique* : 26

On dissout le produit **25** dans un mélange acétate d'éthyle/dioxane (50/50 ; 22 mL/22 mL) que l'on refroidit à 0°C et auquel on additionne du *N*-hydroxysuccinimide (1,85 g ; 16,12 mmol) et du DCC (3,22 g ; 15,6 mmol). On observe la formation immédiate d'un précipité blanc, le DCU. Le mélange réactionnel est alors agité à température ambiante pendant 5 heures. On élimine ensuite le précipité par filtration et on évapore le mélange à sec. Les cristaux blancs obtenus sont alors dissouts dans de l'acétate d'éthyle. La phase organique est extraite 3 fois avec une solution aqueuse à 5% de NaHCO₃ et à l'eau puis séchée sur Na₂SO₄. Après évaporation à sec, on obtient 3,89 g (13,5 mmol) de cristaux blancs.



Rendement global : 74%.

SM (FAB) : C₁₁H₁₆N₂O₇ (M_{calc.} = 288) ; m/z : [M+H] = 289,0.

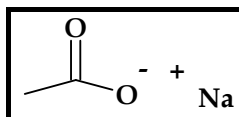
RMN 1H (300 MHz, DMSO) : δ en ppm 10,30 (s, 1H, NH), 4,82 (s, 2H, OCH₂), 2,51 (s, 4H, 2 CH₂), 1,42 (s, 9H, 3 CH₃).

VII. Réalisation de tests

A. Réalisation de solutions tampon

1. Tampons pour la synthèse peptidique

a. Tampon acétate de sodium 1M à pH 4,6



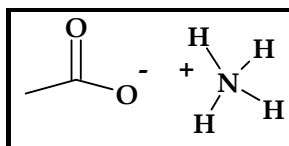
On prépare une solution de 250 mL de tampon en diluant tout d'abord 14,30 mL d'acide acétique ($60,053 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $d = 1,0499$; 15,01 g ; 0,25 mol) dans 100 mL d'eau distillée.

Le pH est ensuite ramené à 4,6 à l'aide d'une solution diluée de soude.

La solution est alors transférée dans une fiole jaugée de 250 mL que l'on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée en prenant garde à ce que le pH reste à 4,6.

La solution est ensuite conservée au frigidaire.

b. Tampon acétate d'ammonium 1M à pH 4,6



On prépare une solution de 250 mL de tampon en diluant tout d'abord 14,30 mL d'acide acétique ($60,053 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $d = 1,0499$; 15,01 g ; 0,25 mol) dans 100 mL d'eau distillée.

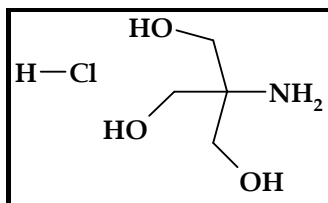
Le pH est ensuite ramené à 4,6 à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 22%.

La solution est alors transférée dans une fiole jaugée de 250 mL que l'on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée en prenant garde à ce que le pH reste à 4,6.

La solution est ensuite conservée au frigidaire.

2. Tampon pour les tests d'affinité sur colonne

a. Tampon TRIS 1M à pH 7



On prépare une solution de 100 mL de tampon en dissolvant tout d'abord 12,1 g de TRIS ($121,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 0,1 mol) dans 60 mL d'eau distillée.

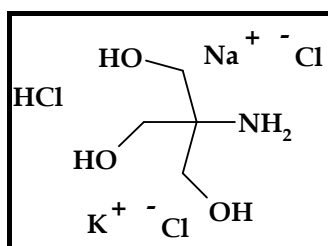
Le pH est ensuite ramené à 7 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 32%.

La solution est alors transvasée dans une fiole jaugée de 100 mL que l'on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée en prenant garde à ce que le pH reste à 7.

La solution est ensuite conservée au frigidaire.

3. Tampons pour le test ELISA de l'ACI

a. Stock 1 en TBS 280 mM en NaCl, 6 mM en KCl et 50 mM en TRIS



Pour préparer une grosse quantité de ce tampon TBS, on utilise 11 flacons de 60 mL suffisants pour tester de l'ordre de 14 plaques de 96 puits.

Pour cela, on dissout 20 pastilles de TBS ($0,75 \text{ mmol/pastille}$; 15 mmol) ; 2,2792g de NaCl ($58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 39 mmol) et 134,2 mg de KCl ($74,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 1,80 mmol) dans 300 mL d'eau distillée.

On transvase ensuite 25 mL de cette solution dans chacun des 11 flacons, préalablement lavés à l'eau distillée et séchés à l'étuve à 90-100°C.

La solution tampon est ensuite stérilisée dans un autoclave puis conservée au frigidaire à 4-8°C.

b. Stock 2 en TBS 14 mM en NaCl, 300 μM en KCl et 2,5 mM en TRIS

Cette solution tampon est préparée à chaque nouveau test.

Pour cela, on utilise un flacon de 25 mL de la solution Stock 1 en TBS que l'on transvase dans une fiole jaugée de 500 mL puis complète au trait de jauge à l'aide d'eau distillée.

La solution est ensuite conservée au frigidaire à 4-8°C. Si des précipitations apparaissent, il est impératif de préparer une nouvelle solution.

c. Stock 3 en TBS à 7 mM en NaCl, 150 μ M en KCl et 1,25 mM en TRIS

- Utilisé pour préparer la solution de lavage :

Cette solution tampon est préparée à chaque nouveau test.

Pour cela, on utilise 250 mL de la solution Stock 2 en TBS que l'on transvase dans une fiole jaugée de 500 mL à laquelle on ajoute 5 mL d'une solution Tween-20 à 10% et que l'on complète au trait de jauge à l'aide d'eau distillée.

La solution est ensuite conservée au frigidaire à 4-8°C. Si des précipitations apparaissent, il est impératif de préparer une nouvelle solution.

- Utilisé pour préparer les solutions d'incubation :

Cette solution tampon est suffisante pour effectuer deux tests.

Pour cela, on utilise 50 mL de la solution Stock 2 en TBS que l'on transvase dans une fiole jaugée de 100 mL à laquelle on ajoute 1 mL d'une solution Tween-20 à 10% et que l'on complète au trait de jauge à l'aide d'eau distillée.

La solution est ensuite conservée au frigidaire à 4-8°C. Si des précipitations apparaissent, il est impératif de préparer une nouvelle solution.

d. TBS1X à 7 mM en NaCl, 150 μ M en KCl et 1,25 mM en TRIS

Cette solution tampon est préparée à chaque nouveau test.

Pour cela, on utilise 50 mL de la solution Stock 2 en TBS que l'on transvase dans une fiole jaugée de 100 mL et que l'on complète au trait de jauge à l'aide d'eau distillée. La solution est ensuite conservée au frigidaire à 4-8°C. Si des précipitations apparaissent, il est impératif de préparer une nouvelle solution.

e. Solution de TBS-Tween-BSA 3%

Cette solution tampon est utilisée pour rincer les puits de la plaque après les différentes étapes du test.

Pour cela, on dissout 15 g de BSA dans 400 mL de la solution Stock 3 en TBS dans un bécher. On transvase ensuite cette solution dans une fiole jaugée de 500 mL que l'on complète au trait de jauge à l'aide de la solution Stock 3 en TBS tout en rinçant le bécher.

La solution est ensuite conservée au frigidaire à 4-8°C pendant deux jours en ne l'exposant à la température ambiante qu'une demi-heure avant chaque utilisation, car en effet, des précipitations peuvent apparaître sinon.

f. Solution de TBS1X-BSA 5%

Cette solution tampon est utilisée pour bloquer les sites de la plaque n'ayant pas réagit lors de la première étape du test.

Pour cela, on dissout 1,0 g de BSA dans 20 mL de la solution TBS1X d'une part et 0,5 g de BSA dans 10 mL de la solution TBS1X d'autre part à l'aide de fioles jaugées.

La solution n'est exposée à la température ambiante qu'une demi-heure avant son utilisation.

g. Solution de TBS-Tween-BSA 10%

- Incubation de Grb2-GST :

On dissout 1,0 g de BSA dans 20 mL de la solution Stock 3 en TBS d'une part et 0,5 g de BSA dans 10 mL de la solution Stock 3 en TBS d'autre part à l'aide de fioles jaugées.

La solution n'est exposée à la température ambiante qu'une demi-heure avant son utilisation.

- Incubations des anticorps :

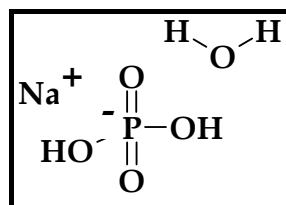
Cette solution est utilisée pour effectuer les deux étapes d'incubation d'anticorps lors de la fin du test.

Pour cela, on dissout 1,0 g de BSA dans 10 mL de la solution Stock 3 en TBS d'une part et 2,0 g de BSA dans 20 mL de la solution Stock 3 en TBS d'autre part à l'aide de fioles jaugées.

La solution est conservée au frigidaire à 4-8°C et n'est exposée à température ambiante qu'une demi-heure avant son utilisation.

4. Tampons pour le test ELISA avec l' α -chymotrypsine

a. Tampon NaH_2PO_4 5mM à pH 7,4



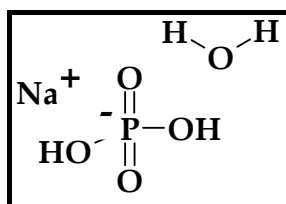
On prépare une solution de 1 L de tampon en dissolvant tout d'abord 687 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($137,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; 5 mmol) dans 800 mL d'eau distillée.

Le pH est ensuite ramené à 7,4 à l'aide d'une solution diluée de soude.

La solution est alors transvasée dans une fiole jaugée de 1 L que l'on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée en prenant garde à ce que le pH reste à 7,4.

La solution tampon est ensuite stérilisée dans un autoclave puis conservée au frigidaire.

b. Tampon NaH_2PO_4 1M à pH 8,21



On prépare une solution de 100 mL de tampon en dissolvant tout d'abord 14 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($137,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; 0,1 mol) dans 60 mL d'eau distillée.

Le pH est ensuite ramené à 8,21 à l'aide d'une solution diluée de soude.

La solution est alors transvasée dans une fiole jaugée de 100 mL que l'on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée en prenant garde à ce que le pH reste à 8,21.

La solution tampon est ensuite stérilisée dans un autoclave puis conservée au frigidaire.

B. Test d'affinité sur colonne

La capacité de liaison de la résine Avidine-Agarose[®] que nous utilisons est de 15 à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de produit biotinylé.

1. Test sur Agarose

a. Incubation des mimes de récepteur

Lors de cette étape, on dissout tout d'abord 1 mg de bibliothèque de mimes dans 20 mL de tampon $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ 10 mM auquel on ajoute 3 gouttes de A et 3 gouttes de B pour faciliter la solubilisation des peptides.

On pèse ensuite 10 mg d'agarose que l'on ajoute à la solution et que l'on laisse incuber pendant 14h à température ambiante sous agitation.

b. Lavage de la colonne

La solution contenant l'agarose est versée dans une pipette pasteur munie d'un coton hydrophile.

On rince alors 5 fois à l'aide de 6 mL d'une solution de tampon $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ 10 mM.

La coloration orange due à la présence du motif dabsyl sur les RAFT constituant les mimes de récepteurs permet d'observer à l'œil nu la migration des produits sur la colonne.

c. Elution

Afin d'éluer les molécules restées sur la résine, on utilise une solution à 0,5 M de 1,3 mL de NaCl (146 mg ; 2,50 mmol) dissouts dans du tampon $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ 10 mM.

L'éluion des produits est rapide et on injecte la solution en CLHP analytique (50µL). En revanche, l'analyse en masse n'est pas envisageable à cause de la trop grande quantité de sels présents en solution.

2. Test sur résine Avidine-Agarose[®]

a. Fonctionnalisation de la résine

On utilise pour ce test 500 µL de la suspension de glycérol aqueux contenant la résine soit 400 mg.

La solution est laissée sous agitation pendant 5 heures à température ambiante dans 20 mL de solution tampon TRIS·HCl 10 mM.

On lave ensuite dix fois la résine avec 20 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

b. Incubation des mimes de récepteur

Lors de l'étape d'incubation des mimes de récepteur de la GnRH, nous avons décidé arbitrairement d'utiliser une solution contenant trois fois plus de mimes de récepteurs que la capacité de liaison de la colonne qui est de l'ordre de 20 µg de biotine soit $8 \cdot 10^{-8}$ mol. Ainsi, en fonction de la masse moléculaire moyenne des bibliothèques de produits, on prépare une solution à $2,68 \cdot 10^{-6}$ M contenant les produits dans 1,25 mL de A, 1,75 mL de B et 19 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

On laisse alors incuber sans agitation à 4°C pendant 36 heures tout en effectuant une injection en CLHP analytique avant et après l'incubation (injection de 50 µL de solution).

c. Lavage de la colonne

La solution contenant la résine est versée dans une pipette pasteur munie d'un coton hydrophile.

On rince alors la résine à l'aide de 13 mL d'une solution composée de 0,7 mL de A, 1 mL de B et 11,3 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

La coloration orange due à la présence du motif dabsyl sur les RAFT constituant les mimes de récepteurs permet d'observer à l'œil nu la migration des produits sur la colonne.

d. Elution des molécules

Afin d'éluier les molécules restées sur la résine, on utilise une solution à 0,5 M de 5 mL de NaCl (146 mg ; 2,50 mmol) dissouts dans du tampon TRIS·HCl 10 mM.

L'éluion des produits est rapide et on injecte la solution en CLHP analytique (50µL). En revanche, l'analyse en masse n'est pas envisageable à cause de la trop grande quantité de sels présents en solution.

3. Test sur résine Biotine-Avidine-Agarose

a. Fonctionnalisation de la résine

On utilise pour ce test 500 μL de la suspension de glycérol aqueux contenant la résine soit 400 mg que l'on verse dans une pipette pasteur munie d'un coton hydrophile que l'on rince avec 20 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

On solubilise ensuite une pointe de spatule de biotine dans 10 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM contenant quelques gouttes de DMF. Cette solution est versée deux fois sur la colonne.

On rince ensuite la colonne ainsi fonctionnalisée à l'aide de 20 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

b. Incubation des mimes de récepteur

Lors de l'étape d'incubation des mimes de récepteur de la GnRH, nous avons décidé arbitrairement d'utiliser une solution contenant trois fois plus de mimes de récepteurs que la capacité de liaison de la colonne qui est de l'ordre de 20 μg de biotine soit $8 \cdot 10^{-8}$ mol. Ainsi, en fonction de la masse moléculaire moyenne des bibliothèques de produits, on prépare une solution à $2,68 \cdot 10^{-6}$ M contenant les produits dans 1,25 mL de A, 1,75 mL de B et 19 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

On laisse alors incuber sans agitation à 4°C pendant 36 heures tout en effectuant une injection en CLHP analytique avant et après l'incubation (injection de 50 μL de solution).

c. Lavage de la colonne

La solution contenant la résine est versée dans une pipette pasteur munie d'un coton hydrophile.

On rince alors la résine à l'aide de 13 mL d'une solution composée de 0,7 mL de A, 1 mL de B et 11,3 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

La coloration orange due à la présence du motif dabsyl sur les RAFT constituant les mimes de récepteurs permet d'observer à l'œil nu la migration des produits sur la colonne.

d. Elution des molécules

Afin d'éluer les molécules restées sur la résine, on utilise une solution à 0,5 M de 5 mL de NaCl (146 mg ; 2,50 mmol) dissouts dans du tampon TRIS·HCl 10 mM.

L'élution des produits est rapide et on injecte la solution en CLHP analytique (50 μL). En revanche, l'analyse en masse n'est pas envisageable à cause de la trop grande quantité de sels présents en solution.

4. Test sur résine GnRH-Biotine-Avidine-Agarose

a. Fonctionnalisation de la résine

On utilise pour ce test 500 μL de la suspension de glycérol aqueux contenant la résine soit 400 mg. La capacité de liaison de la résine prélevée est donc au maximum de l'ordre de 20 μg soit $8 \cdot 10^{-8}$ mol de peptide GnRH-biotine.

Afin d'avoir la certitude que tous les sites de réaction de la résine ont réagi, on utilise une solution à $3,38 \cdot 10^{-5}$ M de GnRH-Biotine (1 mg ; $6,67 \cdot 10^{-7}$ mol) dans 20 mL de solution tampon TRIS·HCl 10 mM.

La solution est laissée sous agitation pendant 5 heures à température ambiante.

On injecte en CLHP analytique la solution avant et après l'incubation observant ainsi une diminution d'absorbance de 2,11 à 1,50 montrant ainsi la fonctionnalisation de la colonne. On injecte la capacité totale de l'injecteur, 50 μL , afin de pouvoir comparer de façon fiable l'évolution de la teneur de la solution en peptide GnRH-Biotine.

On lave ensuite dix fois la résine avec 20 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

b. Incubation des mimes de récepteur

Lors de l'étape d'incubation des mimes de récepteur de la GnRH, nous avons décidé arbitrairement d'utiliser une solution contenant trois fois plus de mimes de récepteurs que de GnRH immobilisée sur la colonne. Ainsi, en fonction de la masse moléculaire moyenne des bibliothèques de produits, on prépare une solution à $2,68 \cdot 10^{-6}$ M contenant les produits dans 1,25 mL de A, 1,75 mL de B et 19 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

On laisse alors incuber sans agitation à 4°C pendant 36 heures tout en effectuant une injection en CLHP analytique avant et après l'incubation (injection de 50 μL de solution).

c. Lavage de la colonne

La solution contenant la résine est versée dans une pipette pasteur munie d'un coton hydrophile.

On rince alors la résine à l'aide de 13 mL d'une solution composée de 0,7 mL de A, 1 mL de B et 11,3 mL de tampon TRIS·HCl 10 mM.

La coloration orange due à la présence du motif dabsyl sur les RAFT constituant les mimes de récepteurs permet d'observer à l'œil nu la migration des produits sur la colonne.

d. Elution des molécules

Afin d'éluer les molécules restées sur la résine, on utilise une solution à 0,5 M de 5 mL de NaCl (146 mg ; 2,50 mmol) dissouts dans du tampon TRIS·HCl 10 mM.

L'élution des produits est rapide et on injecte la solution en CLHP analytique (50µL). En revanche, l'analyse en masse n'est pas envisageable à cause de la trop grande quantité de sels présents en solution.

C. Test ELISA de l'ACI

Afin d'être reproductible et d'éviter toute détérioration des réactifs utilisés pour effectuer ce test, il est recommandé d'effectuer celui-ci dans une pièce à air conditionné.

1. Incubation du peptide SHC317 biotinylé

Lors du test, on utilise 100 µL d'une solution à 400 ng.mL⁻¹. Cette solution est préparée à partir d'une solution mère de peptide SHC biotinylé concentrée à 100 µg.mL⁻¹ et conservée à -20°C.

Au sein de la plaque, seuls 88 des 96 puits seront fonctionnalisés à l'aide de ce peptide, ce qui représente un volume d'environ 10 mL.

On prépare ainsi la solution à tester en utilisant :

40 µL de la solution stock et 9960 µL de solution tampon TBS1X

Cette solution est alors pipetée à l'aide d'une pipette multicanaux et déposée dans chaque puits concerné en faisant attention à ce que les cônes de la pipette déposent la solution au fond des puits afin d'éviter les éventuelles interactions non spécifiques du peptide avec les parois des puits.

La plaque est ensuite couverte d'un film protecteur et laissée à incuber pour la nuit à 4°C au frigidaire.

Puits non fonctionnalisés avec le peptide SHC biotinylé :

E-H 1 : contrôle d'estimation des interactions non spécifiques

E-H 12 : contrôle de la réaction du réactif TMB avec l'air et la lumière.

2. Rinçage des puits

On prépare tout d'abord la solution tampon TBS-Tween-BSA 3%.

On vide alors la plaque puis la rince trois fois à l'aide de 300 mL/puits de solution tampon TBS-Tween-BSA 3%. Les mêmes cônes de la pipette multicanaux peuvent être utilisés pendant tout le rinçage, il est donc important de veiller à ne pas toucher aux parois des puits afin d'éviter toute contamination.

La plaque est ensuite séchée en la tapant avec précautions sur la table de travail recouverte de papier absorbant. On réitère l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gouttes

de liquide apparaissant sur le papier. Cette étape doit être effectuée avec précaution pour éviter de perdre une partie des peptides liés sur la plaque.

3. Blocage des sites de liaison non spécifiques

On prépare tout d'abord la solution tampon TBS-BSA 5%.

On distribue alors 300 μL de cette solution dans chaque puits. Celle-ci étant très visqueuse, les cônes sont changés à chaque nouveau pipetage.

La plaque est alors recouverte d'un film protecteur et laissée à incuber pendant 5 à 6 heures à 4°C dans un incubateur.

On vide alors la plaque et on la sèche en la tapant avec précautions sur la table de travail recouverte de papier absorbant. On réitère l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gouttes de liquide apparaissant sur le papier.

4. Incubation de la protéine GST-Grb2 et des bibliothèques de produits

On prépare tout d'abord la solution tampon TBS-Tween-BSA 10%.

a. Préparation de la solution de la protéine GST-Grb2

On distribue dans chaque puits 90 μL d'une solution contenant la protéine GST-Grb2 à 88 ng.mL^{-1} excepté pour les puits E-H 12 qui servent de contrôle de la réaction du réactif TMB avec l'air et la lumière. Cette solution est préparée à partir d'une solution mère de protéine GST-Grb2 concentrée à 550 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et conservée à -20°C.

Au sein de la plaque, seuls 92 des 96 puits seront fonctionnalisés à l'aide de ce peptide, ce qui représente un volume d'environ 9 mL.

On prépare alors une solution à 8800 ng.mL^{-1} en GST-Grb2 en utilisant :

4 μL de la solution stock et 246 μL de solution tampon Stock 3 en TBS

On prépare ainsi la solution à tester en utilisant :

90 μL de la solution précédente et 8910 μL de solution tampon Stock 3 en TBS

Cette solution est alors pipetée à l'aide d'une pipette multicanaux et déposée dans chaque puits excepté les puits E-H 12.

b. Préparation des solutions des autres réactifs

(a) Contrôle positif

Pour le contrôle positif, on utilise le peptide SHC317 non biotinylé dont la masse molaire est de 1145 g.mol^{-1} . On prépare ainsi une solution à 1 mM dans la solution tampon TBS1X contenant 10% de DMSO.

(b) Contrôle négatif et contrôle d'estimation des interactions non spécifiques

Pour ces deux contrôles, on utilise simplement une solution de DMSO.

c. Préparation des bibliothèques de produits

On prépare des solutions à 100 μM dans le DMSO en fonction de la masse moléculaire moyenne de chaque bibliothèque.

Dilution des produits :

(a) Contrôle positif

On pipette ainsi 10 μL de la solution mère que l'on transfère dans le puits A12, on mélange 4 fois. On pipette alors 10 μL de la solution du puits A12 que l'on transfère dans le puits B12 et que l'on mélange 4 fois. On réitère ces étapes jusqu'au puits D12 dont on pipette finalement 10 μL que l'on jette.

(b) Contrôle négatif et contrôle d'estimation des interactions non spécifiques

On pipette 10 μL de DMSO que l'on transfère dans chacun des puits A-H 1, que l'on mélange 4 fois et dont on pipette et jette 10 μL de solution.

(c) Contrôle de la réaction du réactif TMB avec l'air et la lumière

On transfère dans les puits E-H 12, 90 μL de solution tampon Stock 3 en TBS ainsi que 10 μL de DMSO. On mélange 4 fois cette solution dont on pipette 10 μL que l'on jette.

(d) Bibliothèques de produits

Pour chaque bibliothèque de produits, on transfère 10 μL de solution dans les puits de destination et on mélange 4 fois. On pipette alors 10 μL de solution que l'on jette.

La plaque est ensuite couverte d'un film protecteur et laissée à incuber pour la nuit à 4°C au frigidaire

d. Rinçage des puits

On prépare tout d'abord la solution tampon TBS-Tween-BSA 10% pendant que la plaque ainsi de la solution tampon de lavage TBS-Tween-BSA 3% reviennent à température ambiante.

On vide alors la plaque puis la rince quatre fois à l'aide de 300 mL/puits de solution tampon TBS-Tween-BSA 3%. On attend cinq minutes à chaque étape de lavage avant de

vider la plaque. Les mêmes cônes de la pipette multicanaux peuvent être utilisés pendant tout le rinçage, il est donc important de veiller à ne pas toucher aux parois des puits afin d'éviter toute contamination.

La plaque est ensuite séchée en la tapant avec précautions sur la table de travail recouverte de papier absorbant. On réitère l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gouttes de liquide apparaissant sur le papier. Cette étape doit être effectuée avec précaution pour éviter de perdre une partie des peptides liés sur la plaque.

e. Incubation de l'anticorps anti-GST

On distribue dans chaque puits 100 μL d'une solution contenant l'anticorps anti-GST à 1/1000 excepté pour les puits E-H 12 qui servent de contrôle de la réaction du réactif TMB avec l'air et la lumière. Cette solution est préparée à partir d'une solution mère d'anticorps anti-GST 1000 fois concentrée et conservée au frigidaire.

Au sein de la plaque, seuls 92 des 96 puits se verront transférer cet anticorps, ce qui représente un volume d'environ 10 mL.

On prépare ainsi la solution d'anticorps en utilisant :

11 μL de la mère d'anti-GST et 10989 μL de solution tampon TBS-Tween-BSA 10%

Cette solution est alors pipetée à l'aide d'une pipette multicanaux et déposée dans chaque puits concerné en faisant attention à ce que les cônes de la pipette déposent la solution au fond des puits afin d'éviter les éventuelles interactions non spécifiques de l'anticorps avec les parois des puits.

La plaque est ensuite couverte d'un film protecteur et laissée à incuber pendant 2 heures à 37°C dans un incubateur.

f. Rinçage des puits

Attendre que la solution tampon de lavage TBS-Tween-BSA 3% revienne à température ambiante.

On vide alors la plaque puis la rince quatre fois à l'aide de 300 mL/puits de solution tampon TBS-Tween-BSA 3%. On attend cinq minutes à chaque étape de lavage avant de vider la plaque. Les mêmes cônes de la pipette multicanaux peuvent être utilisés pendant tout le rinçage, il est donc important de veiller à ne pas toucher aux parois des puits afin d'éviter toute contamination.

La plaque est ensuite séchée en la tapant avec précautions sur la table de travail recouverte de papier absorbant. On réitère l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gouttes de liquide apparaissant sur le papier. Cette étape doit être effectuée avec précaution pour éviter de perdre une partie des peptides liés sur la plaque.

g. Incubation de l'anticorps anti-anti-GST couplé à une peroxydase

On distribue dans chaque puits 100 μL d'une solution contenant l'anticorps anti-anti-GST couplés à une peroxydase à 1/500 excepté pour les puits E-H 12 qui servent de contrôle de la réaction du réactif TMB avec l'air et la lumière. Cette solution est préparée à partir d'une solution mère d'anticorps anti-anti-GST couplés à une peroxydase 500 fois concentrée et conservée au frigidaire.

Au sein de la plaque, seuls 92 des 96 puits se verront transférer cet anticorps, ce qui représente un volume d'environ 10 mL.

On prépare ainsi la solution d'anticorps en utilisant :

22 μL de la mère d'anti-GST et 10978 μL de solution tampon TBS-Tween-BSA 10%

Cette solution est alors pipetée à l'aide d'une pipette multicanaux et déposée dans chaque puits concerné en faisant attention à ce que les cônes de la pipette déposent la solution au fond des puits afin d'éviter les éventuelles interactions non spécifiques de l'anticorps avec les parois des puits.

La plaque est ensuite couverte d'un film protecteur et laissée à incuber pendant 1 heures et 30 minutes à 37°C dans un incubateur.

h. Rinçage des puits

Attendre que la solution tampon de lavage TBS-Tween-BSA 3% revienne à température ambiante.

On vide alors la plaque puis la rince cinq fois à l'aide de 300 mL/puits de solution tampon TBS-Tween-BSA 3%. On attend cinq minutes à chaque étape de lavage avant de vider la plaque. Les mêmes cônes de la pipette multicanaux peuvent être utilisés pendant tout le rinçage, il est donc important de veiller à ne pas toucher aux parois des puits afin d'éviter toute contamination.

La plaque est ensuite séchée en la tapant avec précautions sur la table de travail recouverte de papier absorbant. On réitère l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gouttes de liquide apparaissant sur le papier. Cette étape doit être effectuée avec précaution pour éviter de perdre une partie des peptides liés sur la plaque.

Afin de vérifier que la plaque est propre ou non rayée et qu'il n'y aura pas de difficultés de détection UV une fois la révélation commencée, on nettoie le fond de la plaque à l'aide d'un papier absorbant et d'eau distillée. On lit alors l'absorbance de la plaque à 450 nm sur le SPECTRAMax PLUS³⁸⁴ (pathcheck off; automix : off). Les valeurs obtenues doivent être faibles et toutes de même ordre de grandeur sinon, il faut nettoyer a nouveau la plaque et recommencer la lecture.

i. Révélation à l'aide du substrat TMB

On distribue dans chaque puits 150 μL d'une solution du réactif TMB. Etant donné que les 96 puits sont concernés, cela représente de l'ordre de 16 mL.

Pour cela, on utilise les deux réactifs A et B du kit de réaction TMB, soit ainsi :

8 mL du réactif A et 8 mL du réactif B

Cette solution est alors pipetée à l'aide d'une pipette multicanaux et déposée dans chaque puits et la plaque est recouverte d'un film protecteur puis placée à l'abri de la lumière pendant 8 minutes après le dernier transfert de réactifs. La solution de réaction devient bleue.

On stoppe la réaction en ajoutant 150 μL d'une solution à 10% de H_2SO_4 . La solution de réaction devient alors jaune.

La réaction de révélation du test est rapide, cela implique donc que la lecture UV doit se faire immédiatement après avoir additionné la solution à 10% de H_2SO_4 . La lecture de l'absorbance de la plaque s'effectue à 450 nm sur le SPECTRAMax PLUS³⁸⁴ (pathcheck on ; automix : 5 sec.).

D. Test ELISA avec l' α -chymotrypsine

Pour ce test, nous utilisons :

- Une solution d'enzyme à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du tampon NaH_2PO_4 5mM à pH 7,4
- Une solution de substrat à 10 mM dans le DMSO
- Une solution d'inhibiteur à 1 mM dans l'eau distillée,

comme solutions mères.

Nous avons utilisé deux substrats distincts :

- Le BTNA ou *N*-benzoyltyrosine-*p*-nitroanilide, nommé **SI**
- Le *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide, nommé **SII**.

1. Test effectué avec le substrat SI

A chaque nouveau test, on prépare de nouvelles solutions d'enzyme, et de substrat afin de toujours avoir la même activité enzymatique lors du test.

Dans une plaque de 96-puits, on met ainsi à incuber :

- 100 μL d'une solution d'inhibiteur à 10 μM ou 100 μM , diluée dans du tampon NaH_2PO_4 5mM à pH 7,4
- 90 μL de la solution d'enzyme à $2,8\cdot 10^{-7}$ M, diluée dans du tampon NaH_2PO_4 5mM à pH 7,4

On laisse alors incuber l'enzyme et l'inhibiteur pendant 30 minutes à 25°C afin d'effectuer une première approche de l'inhibition de l'activité de l'enzyme en fonction de la nature de l'inhibiteur. Une fois ce premier test réalisé, l'enzyme et l'inhibiteur sont mis à incuber pendant 24 heures à 25°C.

On ajoute alors 10 µL de la solution de substrat à 140 µM, diluée dans le DMSO et on effectue une étude cinétique de l'activité enzymatique pendant 30 minutes à 405 nm.

2. Test effectué avec le substrat SII

A chaque nouveau test, on prépare de nouvelles solutions d'enzyme, et de substrat afin de toujours avoir la même activité enzymatique lors du test.

Dans une plaque de 96-puits, on met ainsi à incuber :

- 20 µL d'une solution d'inhibiteur à 10 µM ou 100 µM, diluée dans du tampon NaH₂PO₄ 5mM à pH 7,4
- 80 µL de la solution d'enzyme à 1.10⁻⁷ M, diluée dans du tampon NaH₂PO₄ 5mM à pH 7,4

On laisse alors incuber l'enzyme et l'inhibiteur pendant 30 minutes à 25°C afin d'effectuer une première approche de l'inhibition de l'activité de l'enzyme en fonction de la nature de l'inhibiteur. Une fois ce premier test réalisé, l'enzyme et l'inhibiteur sont mis à incuber pendant 24 heures à 25°C.

On ajoute alors 100 µL de la solution de substrat à 140 µM, diluée dans une solution à 10% de DMSO et on effectue une étude cinétique de l'activité enzymatique pendant 6 heures à 410 nm.

ANNEXE

ANNEXE I

-

**INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES SE RAPPORTANT A
L'INTRODUCTION**

I. Les interactions multivalentes

Les interactions multivalentes sont caractérisées par la liaison simultanée de plusieurs ligands à une entité biologique, comme une surface ou une molécule, ou de plusieurs récepteurs entre eux. Ces interactions représentent un concept fondamental en biologie et présentent des caractéristiques que les interactions monovalentes n'ont pas. En particulier, les interactions polyvalentes peuvent être plus fortes collectivement que ne le seraient des interactions monovalentes correspondantes. D'autre part, elles peuvent avoir des effets agonistes/antagonistes fondamentalement différents de ceux observés avec des systèmes monovalents.

A. Généralités

1. Définition de la multivalence^[224]

On définit la valence d'une particule, qu'elle soit une petite molécule, une protéine, un oligosaccharide, un virus ou une cellule comme le nombre de connections séparée et de même ordre qu'elle peut former avec d'autres particules à travers des interactions ligand-récepteur. Il est à noter que lors d'interactions multivalentes, on ne parle plus d'affinité qui définit la force d'interaction entre un récepteur et un ligand monovalent mais d'avidité qui concerne les processus polyvalents.

L'efficacité de la reconnaissance moléculaire entre deux particules multivalentes repose essentiellement sur un effet de synergie entre les interactions simultanées et coopératives de plusieurs ligands (peptides, sucres...) sur un ou plusieurs récepteurs membranaires. Des interactions polyvalentes requièrent donc deux partenaires : un ligands multivalent et une protéine possédant des sites de reconnaissance adéquats à la surface d'une cellule. Plusieurs événements peuvent favoriser ce type d'interactions : la cellule peut, soit utiliser un récepteur oligomérique possédant plusieurs CRD ou plus fréquemment, elle peut provoquer un regroupement de plusieurs récepteurs monovalents membranaires à un endroit précis de sa surface, améliorant ainsi l'efficacité de la liaison.

Plus que la complémentarité ligand/récepteur elle-même, ces phénomènes coopératifs nécessitent un arrangement spatial précis du récepteur, une présentation des ligands dans la

²²⁴ M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides. "Polyvalent interactions in biological systems : implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, 37, 2754-2794.

bonne orientation et un espacement adéquat leur permettant d'accéder à plusieurs sites de liaison.

La Figure 1 présente, à gauche, les différentes interactions monovalentes que l'on peut rencontrer. Ainsi est-il possible de rencontrer une simple interaction récepteur-ligand ou bien une interaction induisant une hétérodimérisation dudit récepteur. A droite sont représentées les différentes interactions polyvalentes que l'on peut observer. Les interactions multivalentes peuvent donc avoir lieu avec de multiples sites de liaison (Figure 1-a, droite) ; induire le « clustering » des récepteurs à la surface de la cellule et parfois induire l'activation d'une cascade de signalisation (Figure 1-b, droite) ; avoir lieu au niveau des sites de liaison primaires et secondaires des récepteurs (Figure 1-c) et enfin posséder une haute concentration locale en ligands induisant ainsi une augmentation de l'affinité du récepteur pour le ligand (Figure 1-d)^[225].

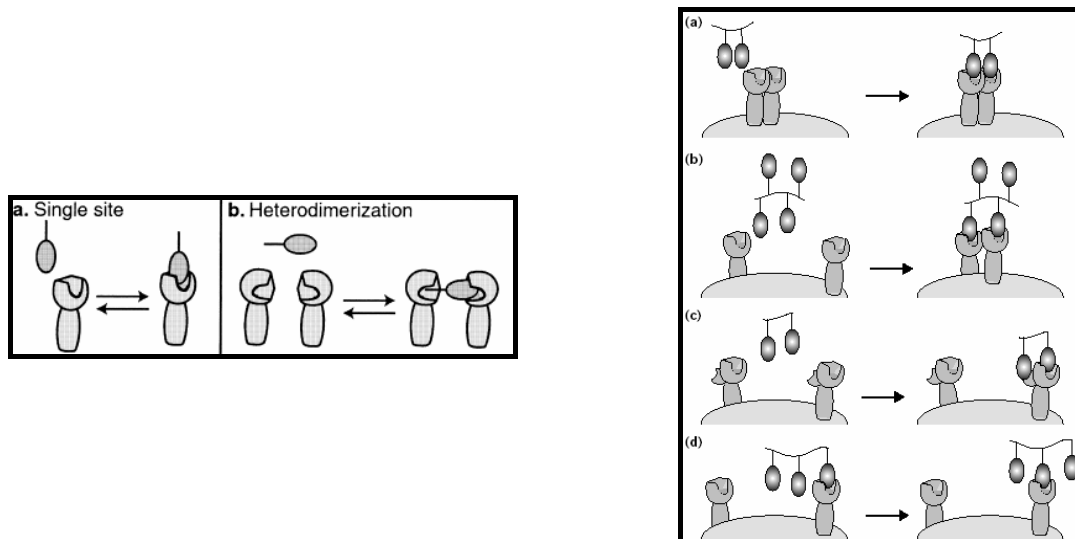


Figure 1 : Interactions monovalentes (à gauche) et polyvalentes (à droite).

2. La coopérativité

La coopérativité d'une interaction peut être positive, neutre ou négative en fonction de la différence d'énergie libre d'interaction entre un ligand et un récepteur impliqués dans une interaction polyvalente et l'énergie libre d'interaction entre un ligand et un récepteur impliqués dans une interaction monovalente.

Le meilleur exemple de coopérativité positive est celui de la liaison de O₂ aux molécules tétramériques d'hémoglobine. Ici, l'énergie libre de liaison de la seconde molécule de O₂ est plus favorable que lors de la liaison de la première molécule de O₂ à l'hémoglobine.

²²⁵ L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong. "Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 696-703.

Ce système n'est pas polyvalent. En effet, pour les systèmes polyvalents, il n'existe pas vraiment d'exemples présentant une coopérativité positive indubitable... Néanmoins, un exemple pourrait être l'association pentamérique de la toxine cholérique avec une portion oligosaccharidique de GM₁...

Au contraire, on peut citer l'exemple de la liaison bivalente d'un anticorps à des ligands présents avec une forte densité à la surface d'une bactérie comme ayant une coopérativité négative. Par contre, bien que la coopérativité de ces interactions soit négative, l'avidité mesurée pour les molécules bivalentes est plus élevée que l'affinité des molécules monovalentes. Il en résulte ainsi qu'une haute avidité ne nécessite pas forcément une coopérativité positive^[226].

3. Les avantages fonctionnels des interactions polyvalentes

La plupart du temps, les systèmes biologiques utilisent des interactions polyvalentes plutôt que leurs équivalents en interactions monovalentes à cause de certains avantages fonctionnels dont quelques exemples sont donnés ici.

a. Obtention un signal ou d'une réponse biologique graduée

Dans un système polyvalent, la force du signal peut varier fortement en fonction du nombre de paires ligand-récepteur qui participent à l'interaction. Cette capacité à générer une large gamme de signaux d'importances différentes (bien plus élaborée que le simple signal on-off d'un système binaire) peut ainsi induire une capacité à générer une réponse adaptée à l'intensité du signal biologique.

Un exemple réside en la clairance de pathogènes par les macrophages *via* un signal transmis par les antigènes. Ainsi, alors qu'un seul antigène ne peut provoquer l'ingestion du pathogène par le macrophage, deux antigènes induisent cette réponse. Le cas échéant, trois antigènes et plus induiront une réponse plus efficace. Ceci permet d'éviter la clairance de cellules ayant été reconnues à tort comme pathogène.

b. Efficacité de l'évolution

A travers l'évolution biologique auront lieu de nouvelles interactions entre de nouvelles molécules. Ainsi, au lieu de créer de nouvelles surfaces d'interactions, la Nature se sert du « pool » d'interactions déjà existant. Parfois un organisme remplacera ainsi une interaction de faible affinité par une interaction de haute affinité, ou bien simplement, il sera

²²⁶ A. Y. Karush, B. Dzantiev. "Polyvalent interactions of antibodies with bacterial cells." *Mol. Immunol.*, **1990**, 27, 965-971.

plus efficace d'augmenter un nombre d'interactions faibles pour donner une interaction plus forte collectivement plutôt que de créer une nouvelle molécule pour une nouvelle interaction.

D'autre part, le fait de fonctionner *via* des interactions polyvalentes confère aux systèmes biologiques une spécificité accrue.

c. Création de contacts de conformation

On peut simplement citer l'exemple de la communication entre deux cellules qui sera plus efficace et plus rapide si elles sont connectées par une grande surface plutôt que par une plus petite. Une unique interaction forte n'induit pas de changement conformationnel profond, provoquant une adaptation et un contact plus fort entre les deux cellules comme le montre la Figure 2.

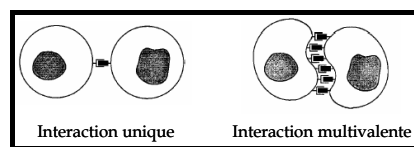


Figure 2 : Création de contacts de conformation entre deux grandes surfaces biologiques.

d. Donner un signal *via* des changements conformationnels profonds

Un exemple remarquable est celui de la liaison polyvalente de IgM à la surface polyvalente d'un pathogène. L'anticorps IgM est constitué de cinq structures bivalentes, ainsi, en se liant en dix points dans une direction commune, sa partie centrale devient plus exposée que lorsque l'anticorps n'est pas lié à une quelconque surface. Ici, le changement de conformation de IgM induite par une association polyvalente sert de signal. En effet, la cascade du complément est alors activée *via* une interaction avec la protéine C1 dans le sang (cf. Figure 3). Elle se conclue par l'assemblage des protéines C5b-C9 dans la membrane du microorganisme y créant alors des pores et induisant la mort dudit microorganisme. Au contraire, si IgM se lie à des entités monovalentes, il n'y aura pas de changement conformationnel assez fort pour activer la cascade du complément. Le changement conformationnel de l'anticorps est donc une nécessité pour qu'il y ait une réponse immunitaire.

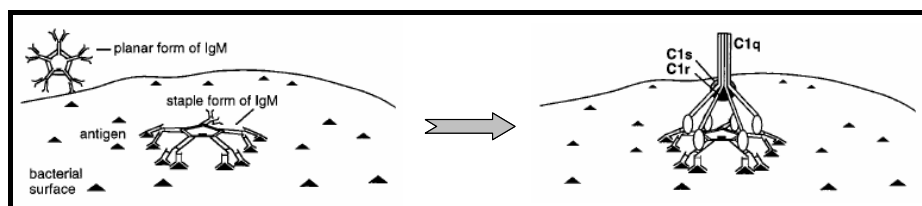


Figure 3 : Changements conformationnels de IgM et début de réponse immunitaire.

B. Exemples de phénomènes biologiques multivalents

1. Adhésion d'un virus à la surface d'une cellule

Au cours d'une infection virale, le virus s'adsorbe à la surface cellulaire dès le début du processus puis pénètre dans la cellule par endocytose. Lors de l'infection des cellules épithéliales des bronches par le virus *influenza*, la fixation se produit grâce à des interactions multivalentes entre les trimères d'une lectine largement présente à la surface du virus – l'hémagglutinine HA – et des résidus d'acides N-acétylneuraminidiques^[227] (ou acides sialiques) très fortement exprimés à l'extrémité terminale de la plupart de glycoprotéines de surface des cellules hôtes. Par conséquent, la spécificité tissulaire d'un virus pour un type de cellule particulier dépend principalement de la nature des lectines présentes à leur surface. Si les glycoconjugués cellulaires ne sont pas compatibles avec les lectines virales, l'étape clef d'adhésion et *a fortiori* l'infection n'auront pas lieu.

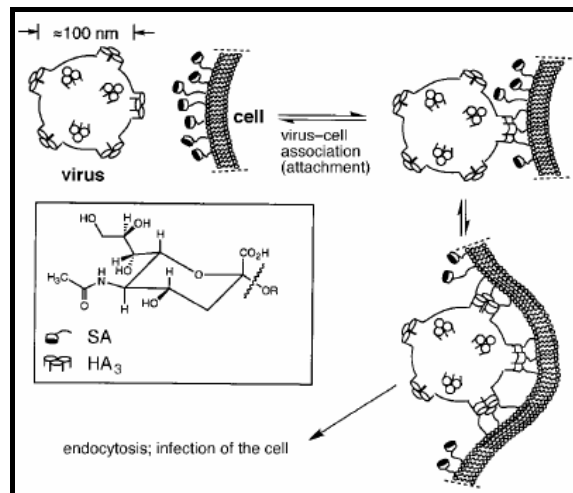


Figure 4 : Infection d'une cellule par le virus *influenza*.

Un autre exemple est l'interaction entre la protéine gp120 du virus VIH et la glycoprotéine 60K des CD4 présente à la surface des cellules T, impliquant ici non plus des interactions sucre-protéine mais protéine-protéine.

D'une manière plus générale, les virus ont la capacité de se lier à presque toutes les classes de molécules à la surface des cellules : les sucres bien sûr, mais aussi les lipides et les protéines.

²²⁷ D. C. Wiley, J. J. Skehel. "The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus." *Annu. Rev. Biochem.*, **1987**, 56, 365-394.

2. Adhésion d'une bactérie à un tissu hôte

La bactérie *E. coli* par exemple se lie de façon directe et indirecte à la surface des cellules épithéliales dans l'urètre et dans la vessie. Différentes protéines à sa surface sont responsables de cette préférence tissulaire. En particulier les fibrilles de type P et celles de type I. Prenons l'exemple des fibrilles de type P.

Tout d'abord, la bactérie se fixe très spécifiquement et fortement à la surface des cellules épithéliales via une lectine située à l'extrémité des filaments fibrille de type P. Celle-ci se lie à différentes copies de Gal- α (1,4)-Gal présent en à l'extrémité des glycolipides des cellules épithéliales du rein.

Ensuite, de nombreuses copies de la protéine F à la surface de *E. coli* se lient de façon polyvalente à la fibronectine, glycoprotéine soluble. Celle-ci à son tour, se lie de façon multivalente à la surface des cellules épithéliales comme le montre la Figure 5. Les bactéries se développent ainsi en cet endroit et causent de nombreux désordres urinaires.

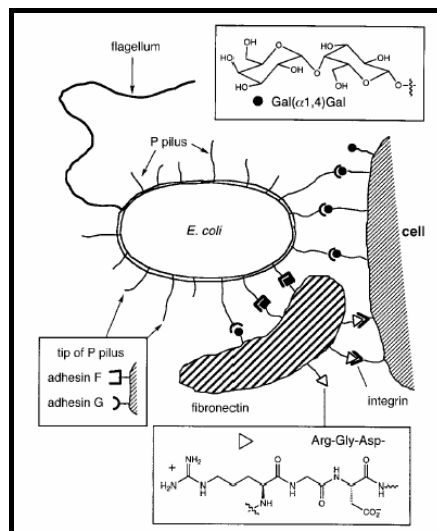


Figure 5 : Adhésion de *E. coli* à la surface de cellules épithéliales.

3. Adhésions cellule-cellule

La clairance et le renouvellement des érythrocytes sont assurés grâce aux récepteurs des asialoglycoprotéines^[228] des cellules hépatiques. Les érythrocytes immatures expriment à leur surface une multitude de résidus saccharidiques portant le motif sialylé à leur extrémité terminale. Au cours de leur vieillissement, la perte systématique de ces motifs laisse apparaître une succession de résidus Gal ou GalNAc, reconnus spécifiquement par les

²²⁸ G. Ashwell, J. Harford. "Carbohydrate-specific receptors of the liver." *Annu. Rev. Biochem.*, **1982**, *51*, 531-554 ; M. Spies. "The asialoglycoprotein receptor : a model for endocytic transport receptors." *Biochemistry*, **1990**, *29*, 10009-10018.

récepteurs des asialoglycoprotéines. Ce changement de structure tridimensionnelle des ligands au cours du temps permet aux cellules du foie de distinguer les érythrocytes sénescents et de les éliminer de la circulation sanguine (Figure 6-gauche).

Un autre exemple d'interaction cellule-cellule est celle impliquée dans la migration cellulaire. Les migrations cellulaires mettent en jeu des interactions entre la galactosyltransférase avec les glycoprotéines ou glycolipides présentant des résidus GlcNAc en leur partie terminale. Ainsi a-t-il été montré qu'une cellule maligne présentant la galactosyltransférase en sa surface était capable de migrer le long de surfaces présentant des résidus GlcNAc en gradient de concentration (Figure 6-droite)...

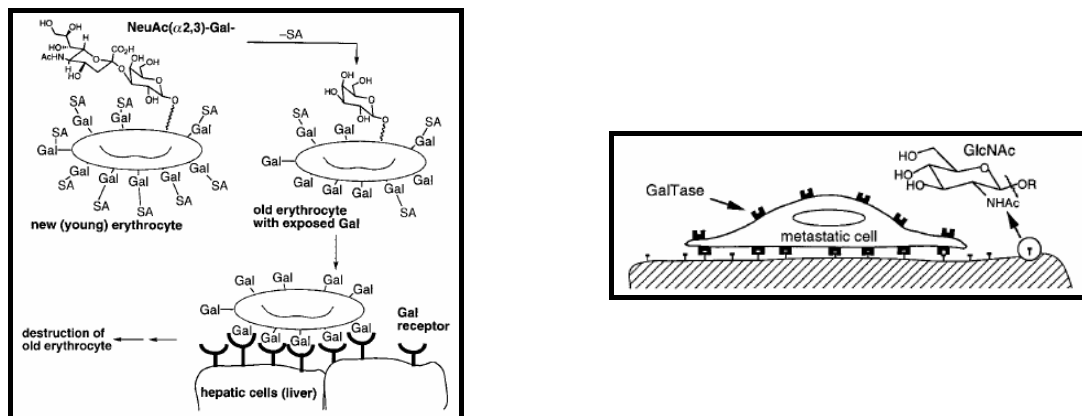


Figure 6 : Exemples d'interactions cellule-cellule

4. Adhésion de cellules à des molécules polyvalentes : bactéries, anticorps et macrophages

Toutes les classes d'anticorps possèdent de multiples récepteurs équivalents allant de deux (IgA, IgD, IgE, IgG), quatre (IgA), six (IgA) à dix (IgM). Ces récepteurs polyvalents interagissent avec des antigènes ou autres ligands présents à la surface de bactéries, parasites, virus, cellules du non-soi, etc... Par la suite, le système immunitaire enraille alors les infections et procède à la clairance des hôtes indésirables par l'action des macrophages. Ceux-ci se lient aux anticorps via les résidus mannose présents sur les parties Fc (Figure 7-gauche).

Un autre exemple est l'interaction entre un allergène et la surface de cellules matures qui présentent de nombreuses copies d'IgE et peuvent provoquer une inflammation locale en « dégranuler » en présence d'une trop forte abondance d'allergènes. Ce phénomène n'a pas lieu si l'IgE interagit avec des ligands monovalents, il faut un minimum de deux molécules liées à un IgE pour provoquer l'exocytose de granules contenant des molécules d'héparine ou d'histamine provoquant une rhinite (Figure 7-droite).

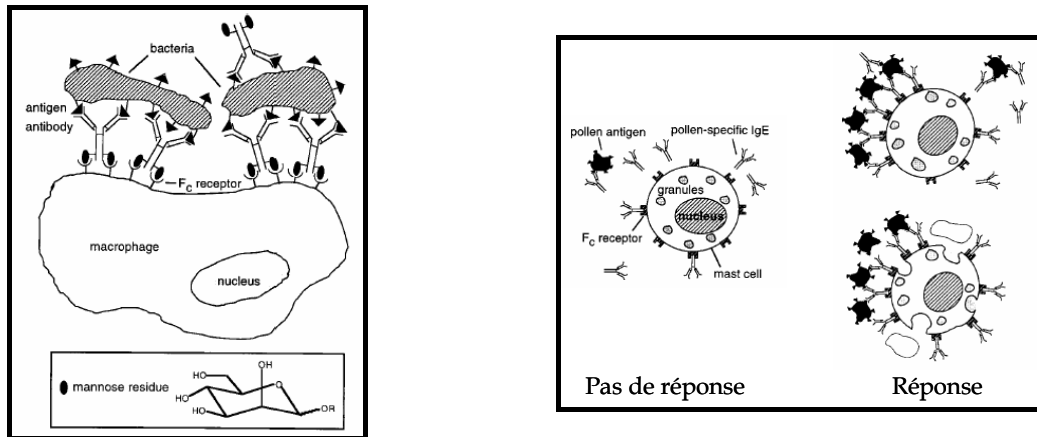


Figure 7 : Exemple d'adhésion de cellules à des molécules polyvalentes.

C. Applications à la production de produits pharmaceutiques

On peut évoquer ici l'exemple des travaux de J. A. Robinson décrits plus haut, ainsi que ceux de A. D. Hamilton ou de M. Mutter qui ont utilisé des châssis multivalents dans le but de greffer plusieurs ligands, identiques ou différents, en vue d'augmenter l'affinité de leurs molécules pour les cibles choisies.

L. K. Kiessling *et al.*^[229] ont étudié différents ligands multivalents et leurs effets sur l'inhibition de l'activité de la lectine concanavaleine A (Con A). Ils ont ainsi montré que leurs ligands de haute masse (protéines globulaires, polymères) constituaient des inhibiteurs de Con A tandis que leurs ligands linéaires oligomériques (dendrimères) étaient des effecteurs ayant pour effet la dimérisation ou l'oligomérisation des récepteurs de Con A favorisant aussi leur « clustering ».

²²⁹ J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling. "Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture." *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 14922-14933.

II. Le “Phage Display”

C'est en 1985 que paraît la première description de cette nouvelle technique de clonage dont les principaux acteurs sont des virus bactériens ou bactériophages^[230]. Son originalité vient du fait que le produit d'expression de la séquence d'ADN insérée dans le génome viral est exposé à la surface du phage. Le « phage display » consiste donc en l'expression de molécules d'intérêt à la surface du virus. Cette nouvelle technique possède plusieurs avantages. Le premier réside dans son utilité majeure qui est la construction et le criblage aisés et rapide de banques de ligands. Le second est que sa mise en œuvre ne requiert pas d'autres connaissances que les bases de la microbiologie et de la biologie moléculaire.

A. Les phages

Les phages ou bactériophages sont des virus bactériens, c'est-à-dire des parasites incapables d'assurer seuls leur reproduction, ils doivent pour cela infecter une bactérie hôte. Ainsi, après avoir parasité une cellule, le phage prend le contrôle de la machinerie cellulaire et fait synthétiser à la bactérie tous les éléments nécessaires à sa multiplication. Une fois ces différents éléments assemblés, le phage quitte la cellule bactérienne en induisant sa lyse ou en s'extirpant de la paroi bactérienne sans pour autant tuer la cellule.

Il existe différents types de phages dont deux sont principalement utilisés pour le « phage display » : le phage λ et le phage M13 (Figure 8).

Le phage λ est un phage lytique de l'ordre de 250 nm. Il est composé d'une tête et d'une queue. Le phage M13, quant à lui, fait partie de la famille des phages filamenteux dont la taille varie de 800 à 2000 nm de long et de 6 nm de diamètre. La capsid de ce dernier est constituée entre autres des protéines PVIII et PIII présentes à 2700 et 5 exemplaires respectivement. Ce sont ces protéines qui, une fois modifiées, sont utilisées pour présenter des protéines d'intérêt à la surface des phages.

²³⁰ G. P. Smith. “Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.” *Science*, **1985**, 228, 1315-1317.

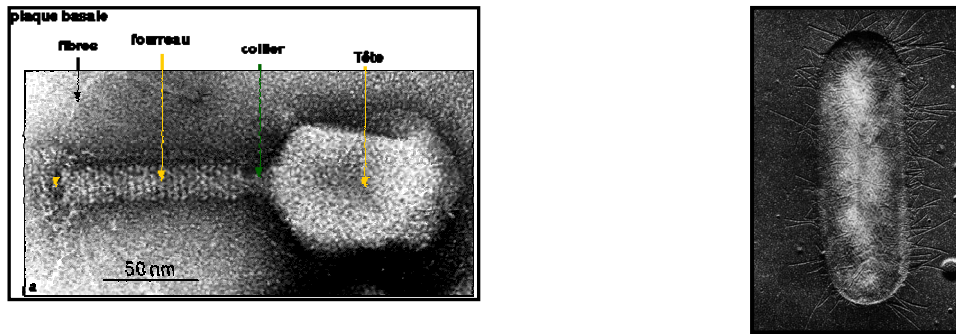


Figure 8 : A gauche : Phage λ ; à droite : Phage M13.

Mécanisme d'infection des phages

L'infection d'une bactérie par un phage s'effectue en cinq étapes principales :

- elle commence tout d'abord par la fixation du virus sur la paroi de la bactérie, à l'aide d'un système d'ancrage, et de sa digestion ;
- une fois fixé à la bactérie, le phage introduit son ADN viral dans le cytoplasme de la bactérie ;
- le phage détourne ensuite la machinerie cellulaire de la bactérie pour répliquer son ADN virale en l'insérant dans le génome bactérien ;
- la bactérie réplique alors l'ADN virale du phage ;
- s'en suit alors la synthèse des protéines de la capsid.

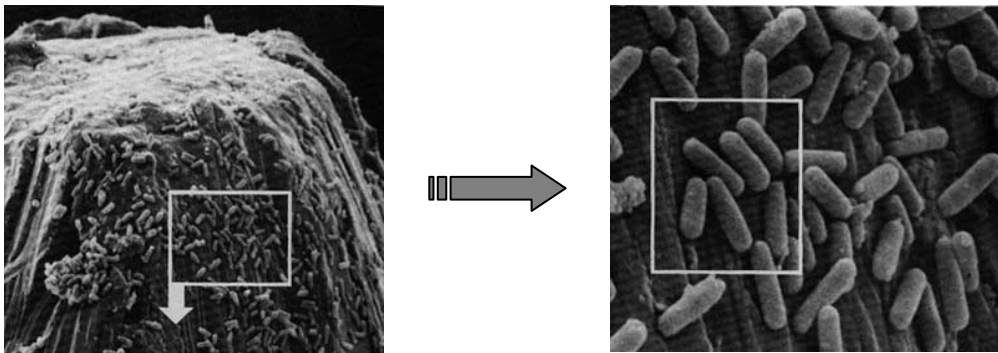


Figure 9 : Photographies au microscope électronique de l'infection d'une bactérie par un phage M13.

L'image de droite est un agrandissement de celle de gauche.

B. La construction des banques

Comme nous l'avons décrit plus haut, la construction de banques à l'aide de la méthode du « phage display » repose sur la présentation de peptides ou protéines d'intérêt à la surface des phages. Pour cela, les phages M13 possèdent les protéines PIII et PVIII exprimées à 5 et 2700 reprises et composées de 50 et 470 acides aminés respectivement. D'autre part, ces phages sont très bien tolérés par les bactéries lors de leur insertion et sont stables aux conditions utilisées lors des tests de sélection.

1. Elaboration des OGN

Dans le but de détourner l'infection de bactéries par des phages à notre profit et de faire exprimer des peptides d'intérêt à la surface de ces derniers, on utilise des séquences aléatoires d'oligonucléotides. Ces séquences sont synthétisées en utilisant des codons de type général NNK où N représente l'une des quatre bases (G, C, T ou A) et K seulement G ou T. Ceci a pour premier avantage d'éviter une surexpression de certains acides aminés due à la dégénérescence du code génétique. Comme la sérine qui peut être codée par six codons. Mais aussi, cela limite l'apparition de codons stop (TAA, TAG ou TGA), seul TAG peut ainsi être représenté. Les différentes séquences sont ensuite insérées dans l'ADN viral puis transcrites dans le but de constituer une bibliothèque de phages présentant une unique protéine modifiée exprimée en un à plusieurs exemplaires. Il existe deux méthodes distinctes de production de phages génétiquement modifiés. Celles-ci donnent lieu à la production de phages monovalents ou polyvalents^[231].

2. Phages monovalents – Phages polyvalents

La production de phages monovalents se fait par l'intermédiaire d'un unique phagemide présentant seulement un gène codant pour la protéine de surface désirée (PIII ou PVIII). Une fois la séquence d'ADN modifiée, on introduit le phagemide dans la bactérie hôte par électroporation. Etant donné que ce phagemide ne présente que le gène codant pour la protéine d'intérêt, il est donc nécessaire d'introduire simultanément dans la bactérie un phage auxiliaire permettant l'encapsulation des virions. Le phage auxiliaire a préalablement été modifié de façon à ce qu'il exprime ses protéines de surface de façon restreinte. Malgré tout, les phages produits présenteront à la fois la protéine de surface génétiquement modifiée mais aussi les protéines de surface du phage auxiliaire (Figure 10-A).

En ce qui concerne la production de phages polyvalents, on utilise le plasmide viral simple ou double brin présent dans les bactéries ayant déjà subi une infection par un phage. Ce plasmide est amplifié puis on y insère la séquence du peptide d'intérêt. Le plasmide est ensuite réintroduit dans la bactérie hôte par électroporation. Etant donné qu'une seule sorte de plasmide a été introduite dans la bactérie, toutes les protéines exprimées à la surface des virions produits comportent la séquence peptidique attendue (Figure 10-B).

²³¹ J. Hinfrey. "Le phage display." *Biofutur*, 1998, 182, 1-11.

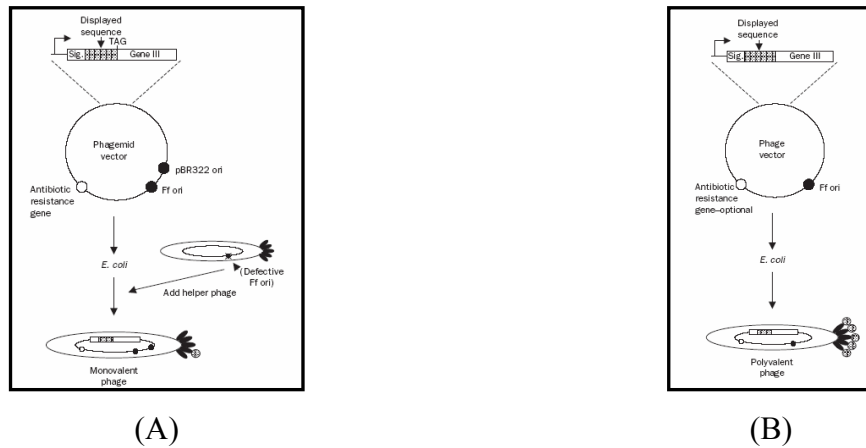


Figure 10 : A gauche : Phage monovalent ; à droite : phage polyvalent.

C. Intérêt d'une approche par rapport à l'autre

Tout d'abord, il est nécessaire d'adapter la méthode à la taille des peptides produits. En effet, si l'on souhaite que le phage présente un long peptide encombrant à sa surface, il sera préférable de produire des phages monovalents.

L'intérêt de produire des phages polyvalents est la grande quantité de peptides d'intérêts produite à la surface d'un même phage. Ceci permet, dans un premier temps, une meilleure sélection des bibliothèques ainsi obtenues. Par la suite, et afin de réaliser une sélection plus fine de peptides de plus forte affinité pour la cible, la méthode mettant en jeu des phages monovalents sera préférée.

Enfin, pour la production de petits peptides, l'utilisation de la protéine PVIII sera préférable tandis que la synthèse de longs peptides encombrés se fera mieux au sein de la protéine PIII car elle est exprimée en moins grand nombre à la surface des phages.

D'autre part, de nombreuses équipes de chercheurs ont utilisé des séquences de peptides contraints au cours de leurs travaux de recherche portant sur de nouveaux ligands pour des protéines cibles données. Il est à noter qu'en utilisant la méthode du « phage display », il est également possible de synthétiser des peptides contraints par des ponts disulfure. Pour cela, les séquences d'acides aminés aléatoires sont entourées par des résidus cystéine qui entraînent la formation de liaisons disulfure et la cyclisation du peptide^[232]. C'est lors de l'assemblage du phage que la formation de ponts disulfures est la plus efficace.

²³² L. B. Giebel, R. T. Cass, D. L. Milligan, D. C. Young, R. Arze, C. R. Johnson. "Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities." *Biochemistry*, **1995**, *34*, 15430-15435.

D. La sélection des molécules d'intérêt

En règle générale, la méthode du « phage display » est utilisée pour élaborer des bibliothèques de peptides présentant une séquence qui sera reconnue par un récepteur ou une protéine cible. Une fois que les phages d'intérêt sont isolés, leur ADN sera séquencé afin de connaître la séquence du peptide actif.

Pour effectuer ces tests de sélection, il existe plusieurs méthodes dont : les tests d'affinité *in vitro* ; la sélection *in vivo* sur cellules entières en culture ; la sélection *in vivo* sur des modèles animaux ou la sélection *ex vivo* sur des organes isolés par exemple^[233,234].

1. Tests d'affinité *in vitro*

Pour effectuer ces tests de sélection, les cibles sont immobilisées sur différents supports solides tels que des surfaces en plastique, des microbilles magnétiques ou des colonnes de chromatographie d'affinité. D'une façon générale, les cibles utilisées sont des anticorps, des protéines recombinantes ou bien de l'ADN simple brin. La première étape consiste en l'incubation des phages avec les protéines immobilisées. Il est important de faire succéder à cette étape un lavage qui éluera les phages liés aux protéines de façon non spécifique. Par la suite, on effectue une élution des phages immobilisés en utilisant pour cela des conditions dénaturantes ou des éluions compétitives par exemple. On amplifie alors les phages sélectionnés par infection de cellules bactériennes. Lors cette étape impliquant la machinerie cellulaire de réplication et transcription, des mutations peuvent intervenir, mais elles ne peuvent être que bénéfiques dans le sens où elles apportent une diversité supplémentaire à la bibliothèque de peptides initialement produite. On effectue alors une nouvelle sélection et réitère ces cycles jusqu'à obtention de molécules de haute affinité pour la cible. Finalement, on isole ces phages d'intérêt et séquence leur ADN afin d'identifier la séquence des peptides présentés à leur surface.

2. Sélection *in vivo* sur cellules entières en culture

Cette technique met en jeu des cultures cellulaires sur support solide ou en solution. On fait incuber les phages en présence de ces cellules. Afin d'évaluer le taux de liaisons non spécifique. Un blanc est effectué avec des phages en présence de cellules ne présentant pas le

²³³ G. P. Smith, V. A. Petrenko. "Phage display." *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 391-410.

²³⁴ H. B. Lowman. "Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1997**, 26, 401-424.

récepteur cible. Ensuite, après incubation, les phages liés aux cellules sont sélectionnés en utilisant la technique de cytométrie en flux.

Cette technique repose sur la fluorescence cellulaire. Elle consiste à faire défiler très rapidement (plusieurs milliers/seconde) les unes derrière les autres, des cellules en suspension monocellulaires devant un rayon laser. Ces cellules ont préalablement été traitées par un colorant fluorescent. Pour chaque cellule sont mesurées très précisément : la fluorescence émise à diverse longueurs d'onde (jusqu'à 9) et la lumière diffusée, recueillie dans deux directions différentes (l'une peut par exemple être corrélée avec la taille des cellules).

Selon ces paramètres, l'appareil peut ainsi reconnaître et regrouper des sous populations homogènes de cellules. Après une première phase d'analyse, il est possible de régler l'appareil pour qu'il sépare physiquement ces sous populations de cellules selon leurs charges. On fractionne alors le flux liquide en gouttelettes. La goutte contenant la cellule à séparer est chargée électriquement : elle est alors déviée, lors de son passage dans le champs électrique d'un condensateur, puis recueillie (Figure 11).

Enfin, selon la spécificité des réactifs fluorescents utilisés pour colorer les cellules, on a accès à l'étude quantitative de nombreuses caractéristiques comme la présence d'un antigène ou la quantité d'ADN ou d'ARN par exemple. En effet, on peut citer l'acridine orange qui colore en vert fluorescent l'ADN double brin et en rouge fluorescent l'ARN.

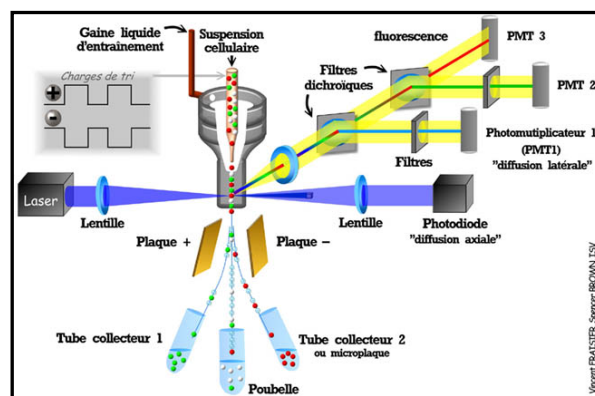


Figure 11 : Représentation schématique d'un appareillage de cytométrie en flux.

3. Sélection ex vivo sur des organes isolés

C'est la méthode qu'ont utilisé R. Pasqualini et E. Ruoslathi^[235] afin de sélectionner des ligands se liant spécifiquement sur certains organes. Ils ont pour cela travaillé avec des souris en leur injectant dans la queue, par intraveineuse, des phages exposant des peptides

²³⁵ R. Pasqualini, E. Ruoslathi. "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." *Nature*, **1996**, 380, 364-366.

d'intérêt. Après quelques minutes, les animaux sont sacrifiés par immersion dans l'azote liquide et différents organes récupérés. Les phages qui leur sont liés furent ensuite multipliés par culture bactérienne et de nouveaux cycles de sélection furent effectués chez l'animal.

E. Avantages et limites de cette technique

Si l'on considère la méthode de synthèse chimique de banque de produits, celle-ci semble âpre et laborieuse car, comme nous l'avons évoqué plus haut, le chimiste se doit de synthétiser chaque produit de manière indépendante, l'obtenant ainsi pur pour ensuite former différentes bibliothèques en fonction des produits qu'il mélange ensemble. Si, après criblage, une banque se révèle posséder une activité intéressante, le chimiste devra recommencer tout le travail de synthèse de produits et de banque en vue de nouveaux tests. Au contraire, dans le cas du « phage display », lorsqu'un clone se révèle être intéressant, il peut être multiplié rapidement et massivement, à un faible coût, en seulement quelques étapes.

En revanche, il est à noter que la diversité des banques se trouve limitée car certaines molécules ne peuvent être exprimées à la surface des phages car elles se trouvent être : toxiques pour la cellule hôte ; sensibles aux protéases endogènes ou réduisent l'infectiosité des phages.

Une autre limitation dans l'élaboration de ces banques réside dans le fait que leur taille ne peut dépasser 10^8 à 10^9 clones à cause d'une efficacité limitée des techniques de transformation d'*E. coli*. Ainsi, en considérant les 20 acides aminés naturels, et dans le but de produire toutes les combinaisons possibles, les peptides synthétisés ne peuvent être plus longs que 6 ou 7 acides aminés. Malgré tout, des techniques de recombinaison *in vivo* de plusieurs séquences ont pu dépasser cette limite en assemblant des répertoires de chaînes lourdes et légères introduites séparément dans les bactéries grâce à deux vecteurs différents. Ainsi, si deux répertoires constitués respectivement de 10^6 chaînes lourdes et de 10^6 chaînes légères sont introduits dans la cellule hôte, leur recombinaison peut en théorie aboutir à la création de 10^{12} fragments d'immunoglobulines différents^[236,237].

²³⁶ P. Waterhouse, A. D. Griffiths, K. S. Johnson, G. Winter. "Combinatorial infection and in vivo recombination : a strategy for making large phage antibody repertoires." *Nucleic Acid Research*, **1993**, *21*, 2265-2266.

²³⁷ F. Geoffroy, R. Sodoyer, L. Aujame. "A new phage display system to construct multicombinatorial libraries of very large antibody repertoires." *Gene*, **1994**, *151*, 109-113.

III. Identification des molécules d'intérêt

A. Méthode de séquençage de Sanger

Cette méthode met en jeu l'action d'exopeptidases. Avant de procéder au séquençage, il est important de séparer les sous-unités de la protéine, en cassant les ponts disulfures. Parmi les exopeptidases, on trouve les carboxypeptidases qui catalysent l'hydrolyse des résidus C-terminaux des polypeptides, mais elles présentent une telle spécificité face aux résidus qu'elles sont capables d'hydrolyser que leur action se limite à seulement quelques résidus. En revanche, les aminopeptidases hydrolysent séquentiellement les polypeptides depuis l'extrémité N-terminale et sont largement utilisées pour le séquençage.

B. Dégradation d'Edman

C'est la méthode de séquençage la plus utilisée ; elle s'effectue à partir de l'extrémité N-terminale des chaînes peptidiques. On utilise pour cela le phénylisothiocyanate (PITC ou réactif d'Edman) qui réagit avec les groupes N-terminaux des protéines en milieu légèrement alcalins pour former leur adduit phénylthiocarbamyl (PTC). Ce produit est traité par un acide fort anhydre comme l'acide trifluoroacétique, qui libère le résidu N-terminal sous sa forme dérivée thiazolinone mais sans hydrolyser les autres liaisons peptidiques. Ce dernier composé est extrait sélectivement par un solvant organique et transformé en dérivé phénylthiohydrantoïne (PTH) beaucoup plus stable par traitement avec un acide dilué. Il est alors comparé avec les standards connus en utilisant la CLHP ou la spectrométrie de masse par exemple.

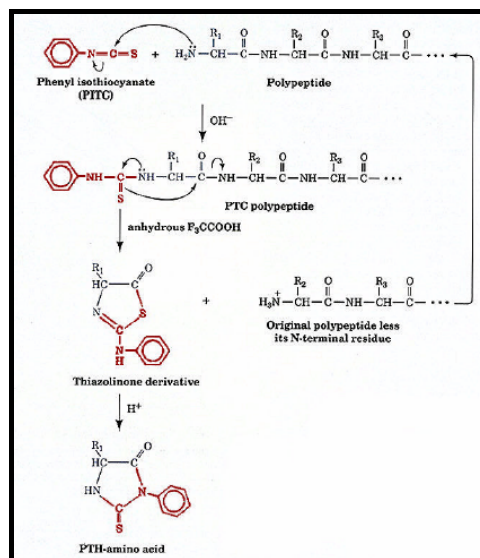


Figure 12 : Méthode de dégradation d'Edman.

ANNEXE II

-

CARACTERISATION DES BANQUES

RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])

I. Description de la bibliothèque à un domaine, substituants linéaires

La Figure 13 récapitule la séquence et les temps de rétention des cinq peptides concernés et déjà décrits dans le chapitre I.

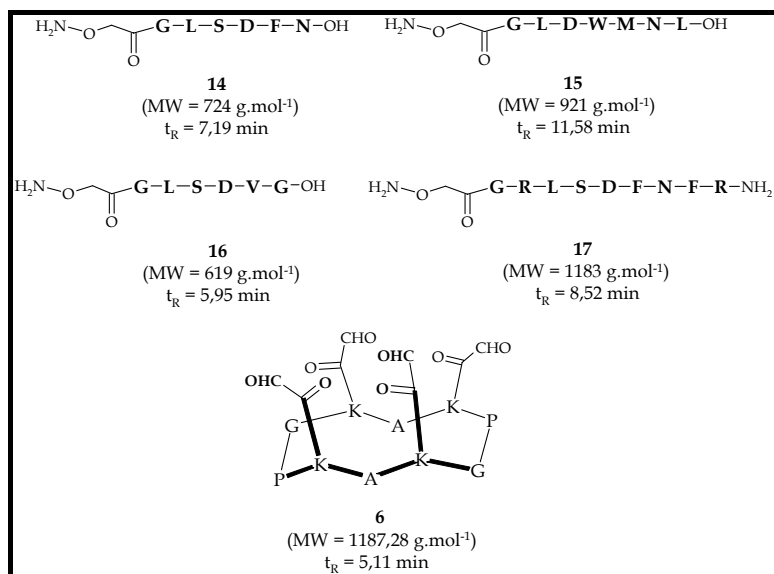


Figure 13 : Séquences des peptides 14, 15, 16 et 17 ainsi que du RAFT 6. Les temps des rétention indiqués ont été relevés pour un gradient de 5 à 60 % de B (14, 15, 16 et 17) et de 5 à 100 % de B pour 6. (C₁₈, Nucleosil, 30/4, 120 Å, 214 et 250 nm)

A. Synthèse des RAFTs à un ligand (premier sous-ensemble)

Après purification, on obtient les quatre produits qui sont identifiés sans ambiguïté en CLHP ainsi que par spectrométrie de masse (ES-MS positif), cf. Figure 14.

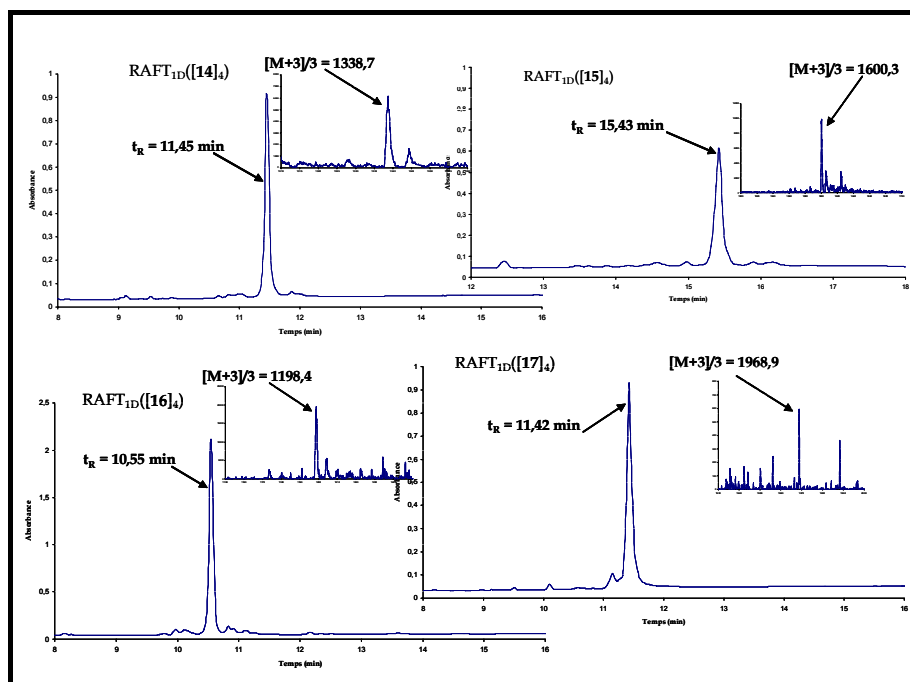


Figure 14 : Caractérisations CLHP et ES-MS des quatre produits ainsi obtenus. Gradient de 5 à 60 % de B : C₁₈, Nucleosil, 30/4, 120 Å, 214 nm)

B. Caractérisation d'une sous-bibliothèque à deux ligands

1. La sous-bibliothèque RAFT_{1D}([14],[16]) : prévision et analyse CLHP

Au sein de la bibliothèque RAFT_{1D}([14],[16]), les deux matrices frontière ont été citées plus haut. Nous avons ainsi RAFT_{1D}([14]₄) et RAFT_{1D}([16]₄) dont les temps de rétention sont de 11,45 min et 10,55 min respectivement.

Le Tableau 1 représente les temps de rétention *théoriques* de la sous-bibliothèque RAFT_{1D}([14],[16]).

Type de molécule	RAFT _{1D} ([16] ₄)	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[14])	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[14] ₂)	RAFT _{1D} ([16],[14] ₃)	RAFT _{1D} ([14] ₄)
Temps de rétention (min)	10,55	10,78	11	11,225	11,45

Tableau 1 : Temps de rétention théoriques de la sous-bibliothèque RAFT_{1D}([14],[16]).

Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])

Le chromatogramme CLHP de la sous-bibliothèque RAFT_{1D}([14],[16]) confirme la tendance calculée, la légende de la Figure 15 est une hypothèse qui devra être confirmée par une analyse en spectrométrie de masse.

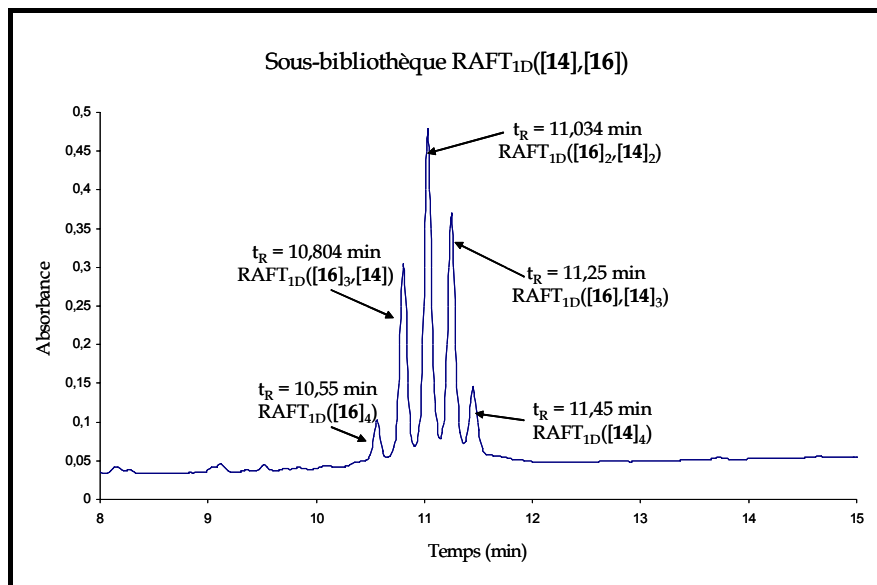


Figure 15 : Chromatogramme CLHP de la sous-bibliothèque RAFT_{1D}([14],[16])

Néanmoins, il est à noter que les intensités relatives théoriques des cinq pics sont en corrélation avec celles obtenues lors de l'expérience. En effet, les sensibles différences d'intensités entre les pics peut être attribué aux différences d'extinction molaires des séquences peptidiques **14** et **16**. Le peptide **14** comporte une phénylalanine qui absorbe plus que les acides aminés présents dans la séquence du peptide **16**.

2. Analyse par LC-MS

Nous avons ainsi obtenu une série de spectres présentés dans la Figure 16.

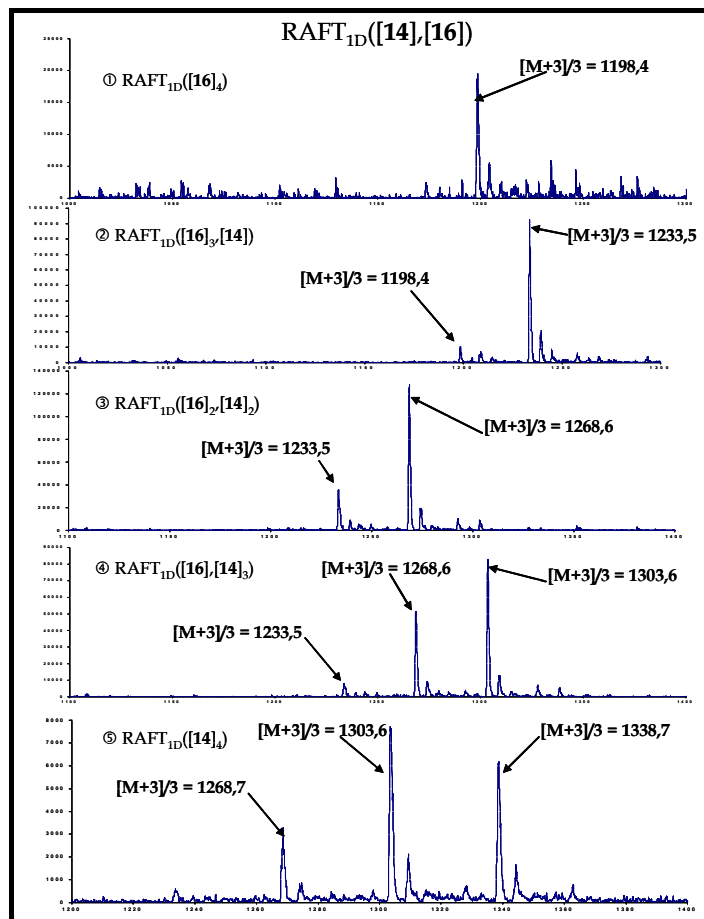


Figure 16 : Spectres de masses obtenus lors de l'analyse LC-MS.

Bien que les différentes masses des produits observés ne soient pas séparées de façon optimale, nous observons tout de même une chronologie dans l'apparition et la disparition des pics confirmant ainsi les suppositions faites par rapport à la distribution du chromatogramme CLHP. On a ainsi :

- ⇒ RAFT_{ID}([16]₄) : t_R = 10,55 min ;
- ⇒ RAFT_{ID}([16]₃,[14]) : t_R = 10,804 min (10,78 min) ;
- ⇒ RAFT_{ID}([16]₂,[14]₂) : t_R = 11,034 min (11 min) ;
- ⇒ RAFT_{ID}([16],[14]₃) : t_R = 11,25 min (11,225 min) ;
- ⇒ RAFT_{ID}([14]₄) : t_R = 11,45 min.

Les temps indiqués entre parenthèses correspondant aux temps prévisionnels.

C. Caractérisation d'une sous-bibliothèque à trois ligands

La sous-bibliothèque RAFT_{1D}([14],[15],[16]) : prévision et analyse CLHP

Afin d'analyser cette sous-bibliothèque à l'aide de chromatogrammes CLHP, nous avons superposé les trois chromatogrammes des sous-éléments constitués de : RAFT_{1D}([14],[15]), RAFT_{1D}([14],[16]) et RAFT_{1D}([15],[16]) et avons essayé d'attribuer un maximum de pics comme le montre la Figure 17.

Par ailleurs, en appliquant la méthode de calcul des temps de rétention des espèces, on peut penser observer les trois nouveaux gabarits aux temps suivants :

$$\text{RAFT}_{1D}([14]_2,[15],[16]) : t_R = [(2*11,45)+15,43+10,55]/4 = 12,22 \text{ min ;}$$

$$\text{RAFT}_{1D}([14],[15]_2,[16]) : t_R = [11,45+(2*15,43)+10,55]/4 = 13,22 \text{ min ;}$$

$$\text{RAFT}_{1D}([14],[15],[16]_2) : t_R = [11,45+15,43+(2*10,55)]/4 = 11,99 \text{ min.}$$

Ces prévisions sont confirmées dans les Figure 17 et Figure 18.

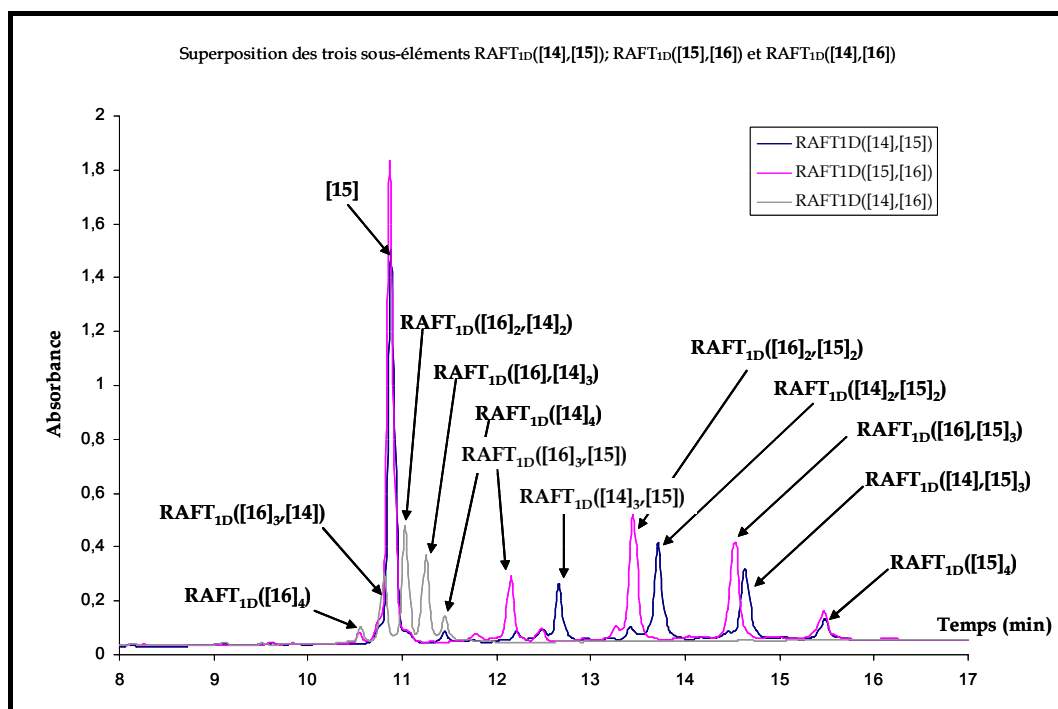


Figure 17 : Superposition des chromatogrammes CLHP des trois sous-éléments.

En observant maintenant le chromatogramme de la sous-bibliothèque RAFT_{1D}([14],[15],[16]), on observe l'apparition de nouveaux pics que l'on pourrait attribuer comme suit :

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

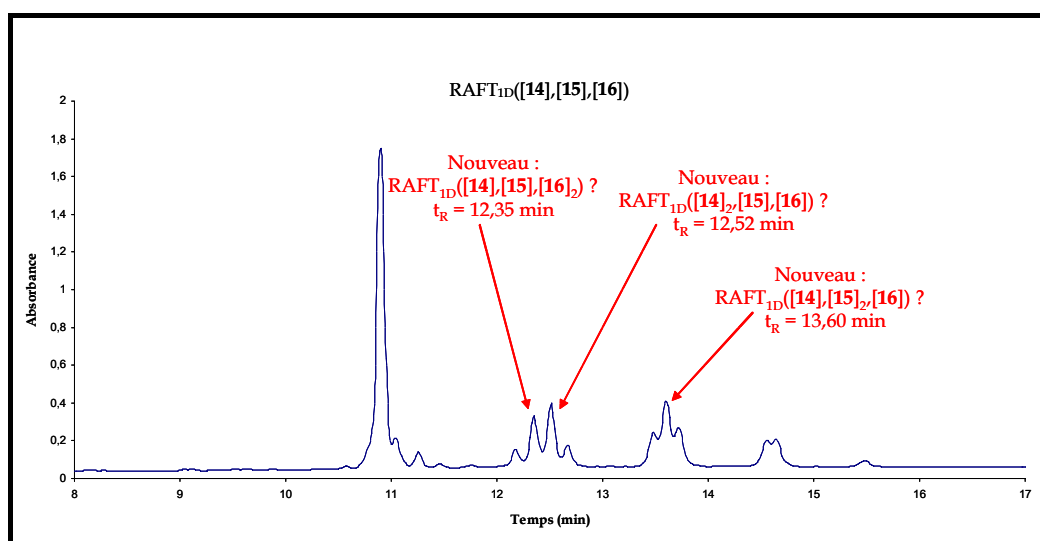


Figure 18 : Supposition de la nature des nouveaux éléments observés.

Ces hypothèses sont vérifiées par l'analyse de spectrométrie de masse LC-MS.

Analyse par LC-MS

Les sous-ensembles formés avec deux ligands ayant été caractérisés de façon certaine, il n'est pas nécessaire de procéder à une analyse complète des spectres de masses obtenus.

Le Tableau 2 présente les masses molaires et m/z des nouveaux produits que nous pensons détecter ainsi celles des produits que nous pensons encadrer, dans l'ordre de migration, les matrices à trois ligands différents.

Produit	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[15])	RAFT _{1D} ([14],[15],[16] ₂)	RAFT _{1D} ([14] ₂ ,[15],[16])	RAFT _{1D} ([14] ₃ ,[15])
M =	3897	4001	4105	4209
[M+3]/3 =	1300	1334,6	1369,3	1404
Produit	RAFT _{1D} ([15] ₂ ,[16] ₂)	RAFT _{1D} ([14],[15] ₂ ,[16])		
M =	4198	4302		
[M+3]/3 =	1400,3	1435		

Tableau 2 : Masses molaires et m/z des produits clés à observer en LC-MS.

A partir de ces données, nous avons effectué l'analyse LC-MS dont seuls les cinq spectres de masse qui nous intéressent sont présentés dans la Figure 19.

*Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{ID}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])*

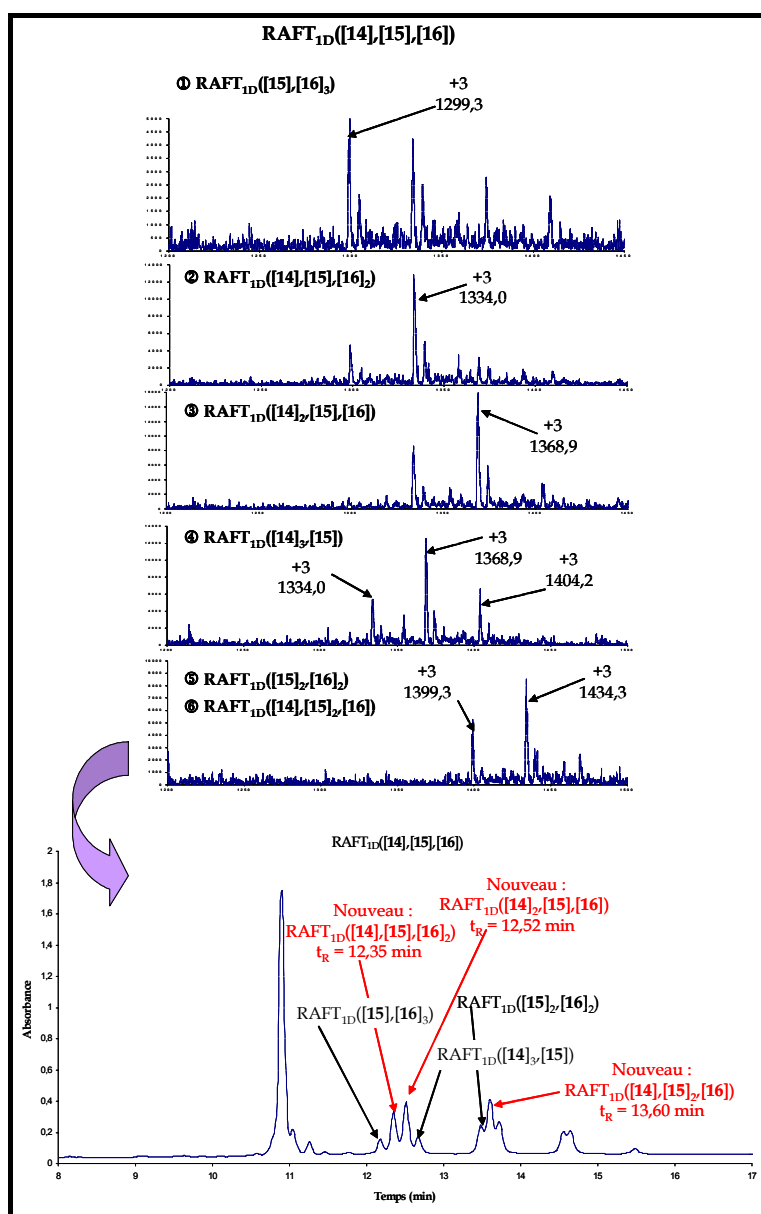


Figure 19 : Caractérisation de la bibliothèque RAFT_{ID}([14],[15],[16]).

L'analyse LC-MS confirme ainsi notre hypothèse nous permettant donc de caractériser les trois types de molécules présentant trois ligands différents et ayant les temps de rétention suivants, pour un gradient de 5 à 60 % B en 15 min :

- ⇒ RAFT_{ID}([14],[15],[16]₂) : t_R = 12,35 min (11,99 min) ;
- ⇒ RAFT_{ID}([14]₂,[15],[16]) : t_R = 12,52 min (12,22 min) et
- ⇒ RAFT_{ID}([14],[15]₂,[16]) : t_R = 13,60 min (13,22 min).

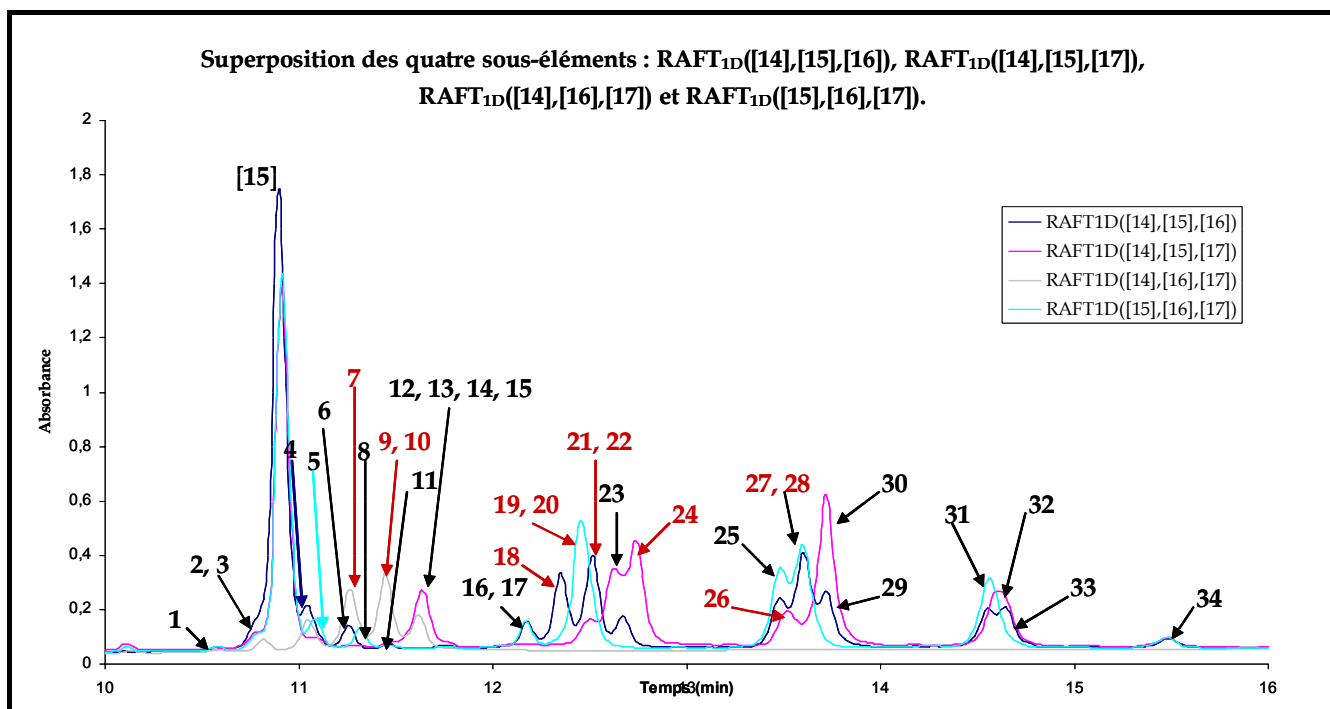
D. Caractérisation de la bibliothèque à quatre ligands

1. La bibliothèque RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) : prévision et analyse CLHP

Nous avons donc superposé les quatre chromatogrammes des sous-éléments constitués de : RAFT_{1D}([14],[15],[16]), RAFT_{1D}([14],[15],[17]), RAFT_{1D}([14],[16],[17]), et RAFT_{1D}([15],[16],[17]) et avons essayé d'attribuer un maximum de pics comme le montrent la Figure 20 et le Tableau 4.

Par le calcul, le temps de rétention du RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) est prévu pour $t_R = 12,21$ min, ce qui sera confirmé par la suite.

D'autre part, notons que dans la Figure 20, nous avons numéroté les pics et non les produits (qui sont par la suite identifiés dans le Tableau 4) dans le but de faciliter la lecture.



**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

Les hypothèses d'attribution des pics sont les suivantes :

Numéro de pic	Nature	Numéro de pic	Nature	Numéro de pic	Nature
1	RAFT _{1D} ([16] ₄)	13	RAFT _{1D} ([14] ₂ ,[17] ₂)	25	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[15] ₂)
2	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[14])	14	RAFT _{1D} ([14],[17] ₃)	26	RAFT _{1D} ([15] ₂ ,[14],[17]) ?
3	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[17])	15	RAFT _{1D} ([17] ₄)	27	RAFT _{1D} ([15] ₂ ,[16],[17]) ?
4	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[14] ₂)	16	RAFT _{1D} ([16] ₃ ,[15])	28	RAFT _{1D} ([15] ₂ ,[14],[16]) ?
5	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[17] ₂)	17	RAFT _{1D} ([17] ₃ ,[15])	29	RAFT _{1D} ([14] ₂ ,[15] ₂)
6	RAFT _{1D} ([16],[14] ₃)	18	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[14],[15]) ?	30	RAFT _{1D} ([15] ₂ ,[17] ₂)
7	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[14],[17]) ?	19	RAFT _{1D} ([16] ₂ ,[15],[17]) ?	31	RAFT _{1D} ([15] ₃ ,[16])
8	RAFT _{1D} ([16],[17] ₃)	20	RAFT _{1D} ([17] ₂ ,[15],[16]) ?	32	RAFT _{1D} ([15] ₃ ,[17])
9	RAFT _{1D} ([14] ₂ ,[16],[17]) ?	21	RAFT _{1D} ([14] ₂ ,[15],[16]) ?	33	RAFT _{1D} ([15] ₃ ,[14])
10	RAFT _{1D} ([17] ₂ ,[14],[16]) ?	22	RAFT _{1D} ([14] ₂ ,[15],[17]) ?	34	RAFT _{1D} ([15] ₄)
11	RAFT _{1D} ([14] ₄)	23	RAFT _{1D} ([14] ₃ ,[15])		
12	RAFT _{1D} ([14] ₃ ,[17])	24	RAFT _{1D} ([17] ₂ ,[14],[15]) ?		

Figure 20 et Tableau 3 : Hypothèses d'attribution des pics du chromatogramme CLHP de la bibliothèque « mère » à travers la superposition des chromatogrammes CLHP de ses quatre sous-éléments.

Si l'on observe maintenant le chromatogramme CLHP obtenu pour la bibliothèque « mère », il est difficile d'y attribuer le pic correspondant au type de molécules à quatre ligands différents (cf. Figure 21). L'analyse LC-MS devient donc indispensable.

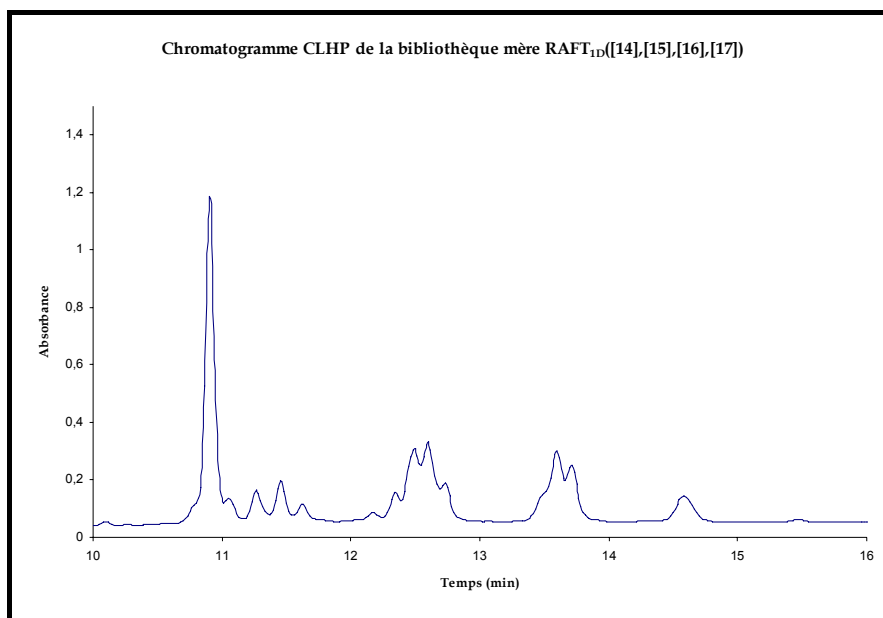


Figure 21 : Chromatogramme CLHP de la banque « mère ».

2. Analyse LC-MS

Afin de confirmer les suppositions précédentes, d'identifier les gabarits à quatre ligands et de les caractériser, nous avons effectué une analyse LC-MS sur la bibliothèque « mère ». La Figure 22 représente ainsi les 25 masses sur 35 observées au cours de cette analyse.

Les dix masse manquantes étant les suivantes :

- ⇒ RAFT_{1D}([15]₄) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([16]₄) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([17]₄) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([15]₃,[17]) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([16]₃,[14]) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([16]₃,[15]) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([17]₃,[14]) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([17]₃,[15]) ;
- ⇒ RAFT_{1D}([17]₃,[16]) et
- ⇒ RAFT_{1D}([15]₂,[17]₂).

*Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{ID}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])*

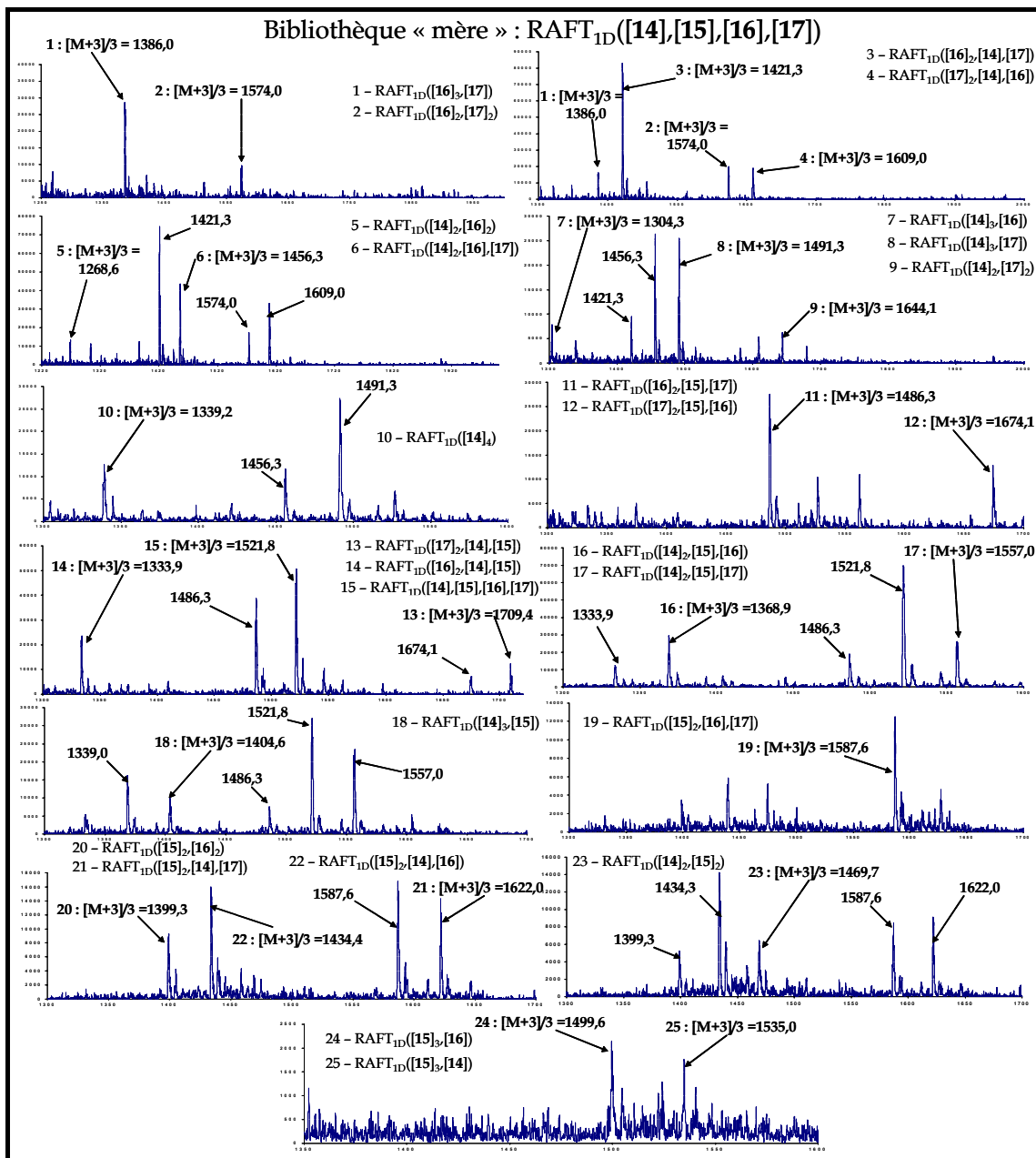


Figure 22 : Analyse LC-MS de la banque « mère ».

On peut ainsi observer quelques inversions quant à la nature des pics entre l'analyse de la superposition des chromatogrammes CLHP et l'analyse LC-MS. Mais, globalement, la tendance est confirmée à savoir que les matrices portant les peptides **16** et **17** sont les plus polaires, viennent ensuite les matrices riches en peptide **14** et enfin celles présentant le peptide **15**. Nous observons que la matrice présentant quatre ligands différents se place entre les RAFT_{ID}([**16**]₂,[**14**],[**15**]) et RAFT_{ID}([**14**]₂,[**15**],[**16**]), on peut donc en conclure qu'elle possède un temps de rétention de l'ordre de 12,5 min ; le temps de rétention calculé était de 12,21 min.

II. Description de la bibliothèque à deux domaines, substituants linéaires

La Figure 23 récapitule la séquence et les temps de rétention des cinq peptides concernés et déjà décrits dans le chapitre I. Par la suite, la séquence du colorant dabsyl ne sera plus explicitée mais simplement notée « dabsyl ».

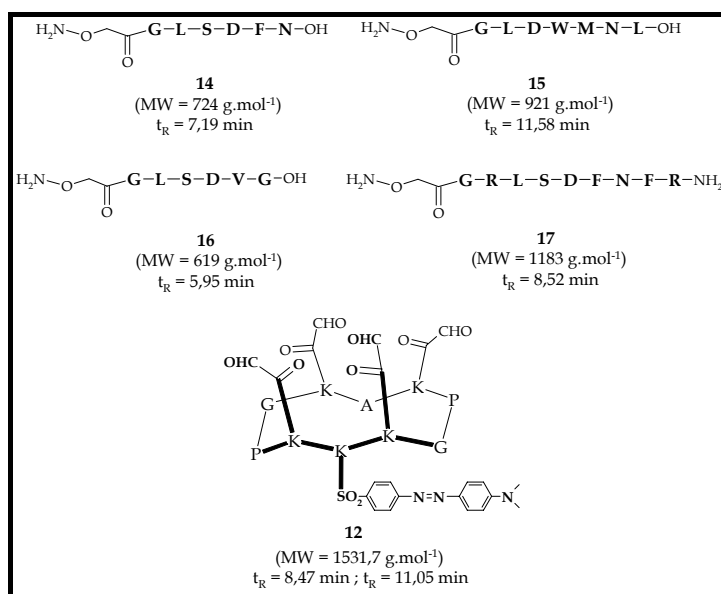


Figure 23 : Séquences des peptides 14, 15, 16 et 17 ainsi que du RAFT 12. Les temps des rétention indiqués ont été relevés pour un gradient de 5 à 60 % de B pour 14, 15, 16 et 17. Pour le RAFT 13 : gradient de 5 à 100 % de B et de 5 à 60 % de B respectivement. (C₁₈, Nucleosil, 30/4, 120 Å, 214 et 250 nm)

A. Synthèse des RAFTs à un ligand (premier sous-ensemble)

La Figure 24 représente schématiquement le produit formé.

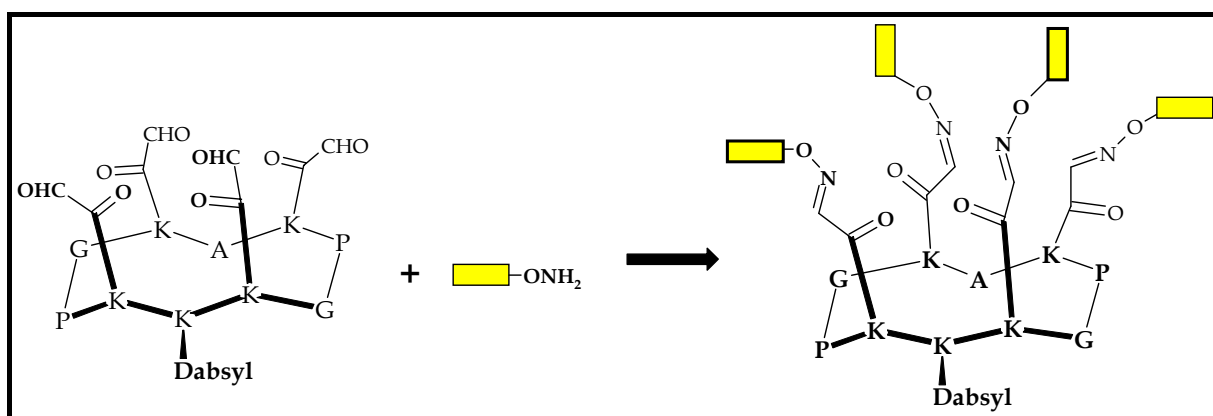


Figure 24 : Représentation de la formation d'un sous-ensemble à un ligand.

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

Après purification, les quatre produits obtenus sont identifiés sans ambiguïté en CLHP ainsi que par spectrométrie de masse (ES-MS positif), cf. Figure 25.

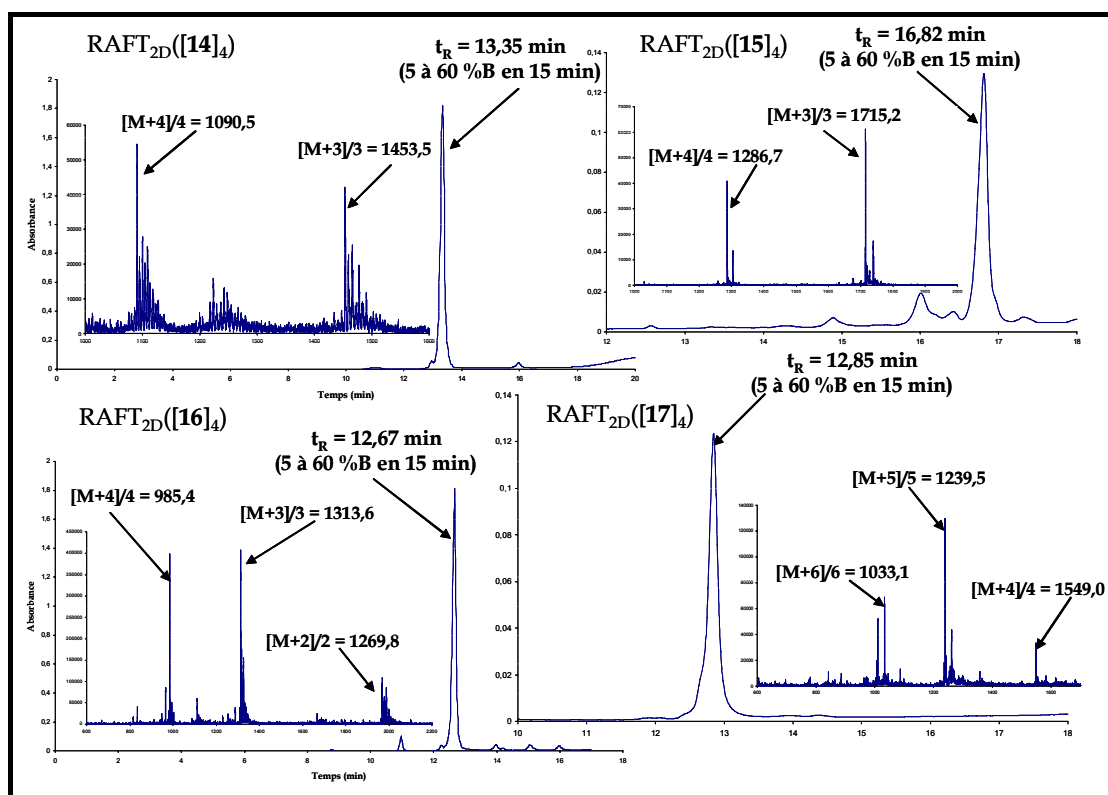


Figure 25 : Caractérisations CLHP et ES-MS des quatre produits ainsi obtenus. Gradient de 5 à 60 % de B ; C₁₈, Nucleosil, 30/4, 120 Å, 466 nm

Afin d'obtenir des chromatogrammes ayant une meilleure résolution pour les bibliothèques à venir, nous avons utilisé le gradient allant de 30 à 50 %B en 20 min. Le tableau ci-dessous résume les temps de rétention des quatre produits décrits plus haut à la fois pour un gradient de 5 à 60 %B en 15 min et pour un gradient de 30 à 50 %B en 20 min.

	RAFT _{2D} ([14] ₄)	RAFT _{2D} ([15] ₄)	RAFT _{2D} ([16] ₄)	RAFT _{2D} ([17] ₄)
t _R (min - 5 à 60 % B – 15 min)	13,35	16,82	12,67	12,85
t _R (min - 30 à 50 % B – 20 min)	10,86	23,08	8,43	10,17

Tableau 5 : Temps de rétention à différents gradients des quatre RAFT à quatre ligands identiques.

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

B. Caractérisation d'une sous-bibliothèque à deux ligands

On obtient par cette méthode 6 sous-bibliothèques d'un total de 16 produits dont une représentation se trouve dans la Figure 26.

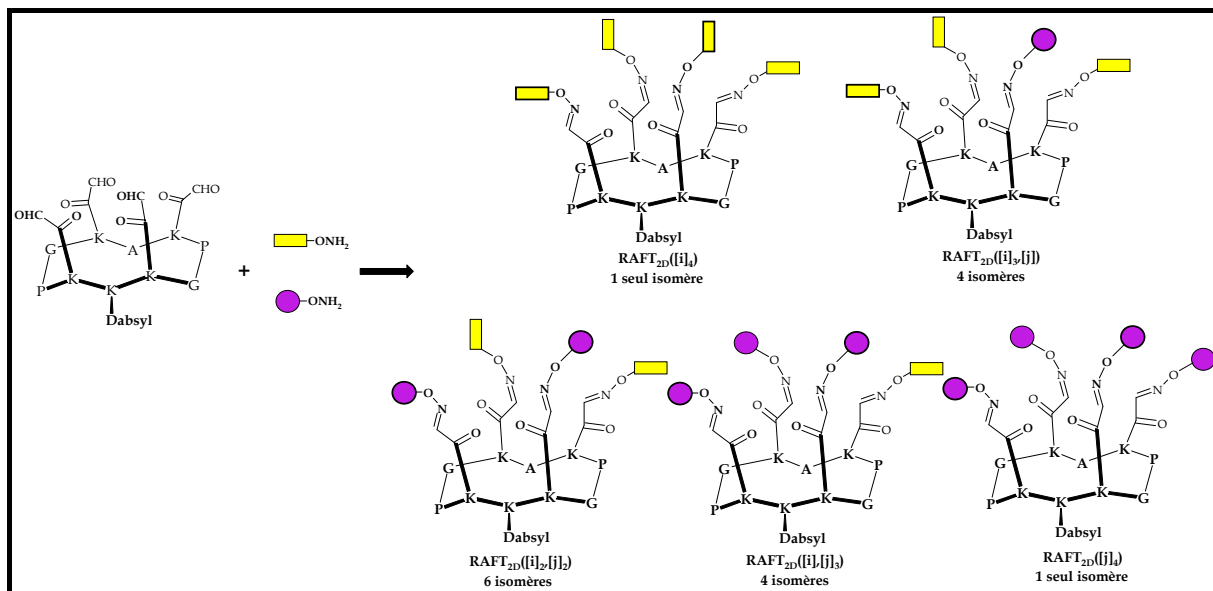


Figure 26 : Représentation des 5 types d'éléments composant une sous-bibliothèque à deux ligands.

Afin de prévoir la distribution des produits sur le chromatogramme CLHP, nous avons utilisé les mêmes méthodes que lors des paragraphes précédents (temps calculés, LC-MS).

1. La sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15]) : prévision et analyse CLHP

Par le calcul des temps de rétention, on obtient ainsi le Tableau 6 qui représente les temps de rétention *théoriques* de la sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15]).

Type de molécule	RAFT _{2D} ([14] ₄)	RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[15] ₁)	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15] ₂)	RAFT _{2D} ([14] ₁ ,[15] ₃)	RAFT _{2D} ([15] ₄)
Temps de rétention (min)	13,35	14,21	15,09	15,95	16,82

Tableau 6 : Temps de rétention théoriques de la sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15]).

Le chromatogramme CLHP de la sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15]) confirme la tendance calculée, tandis que la légende de la Figure 27 est une hypothèse qui devra être confirmée par une analyse en spectrométrie de masse.

Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])

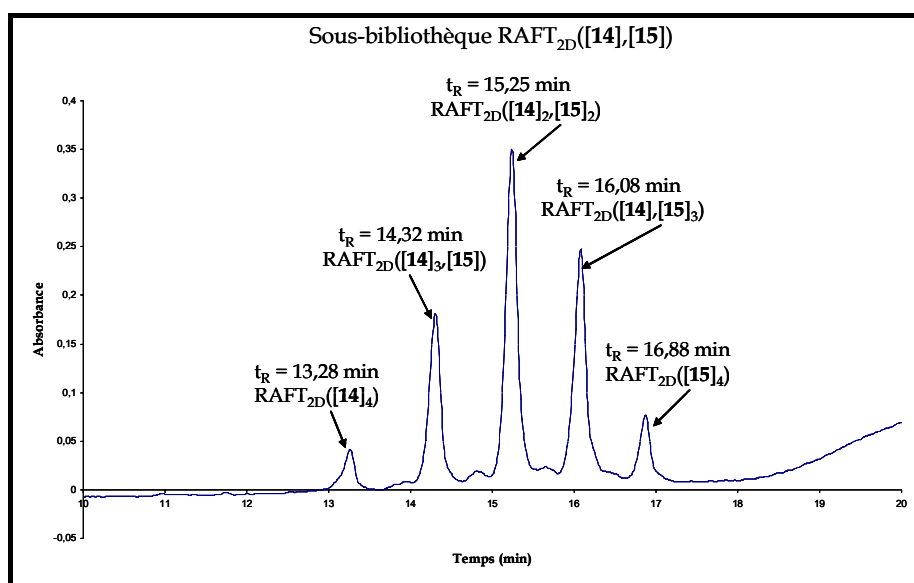


Figure 27 : Chromatogramme CLHP de la sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15]).

Il est à noter que dans ce cas, les intensités relatives des cinq pics sont en corrélation avec celles calculées par la théorie. On peut donc supposer que les deux peptides réactifs **14** et **15** ont des coefficients d'extinction molaires comparables. En conséquence, l'expérience rejoint la théorie, les intensités des pics n'étant pas ou peu biaisées par de fortes différences d'absorbance des réactifs.

2. Analyse LC-MS

Lors de l'analyse, nous avons obtenu la série de spectres présentée dans la Figure 28.

*Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])*

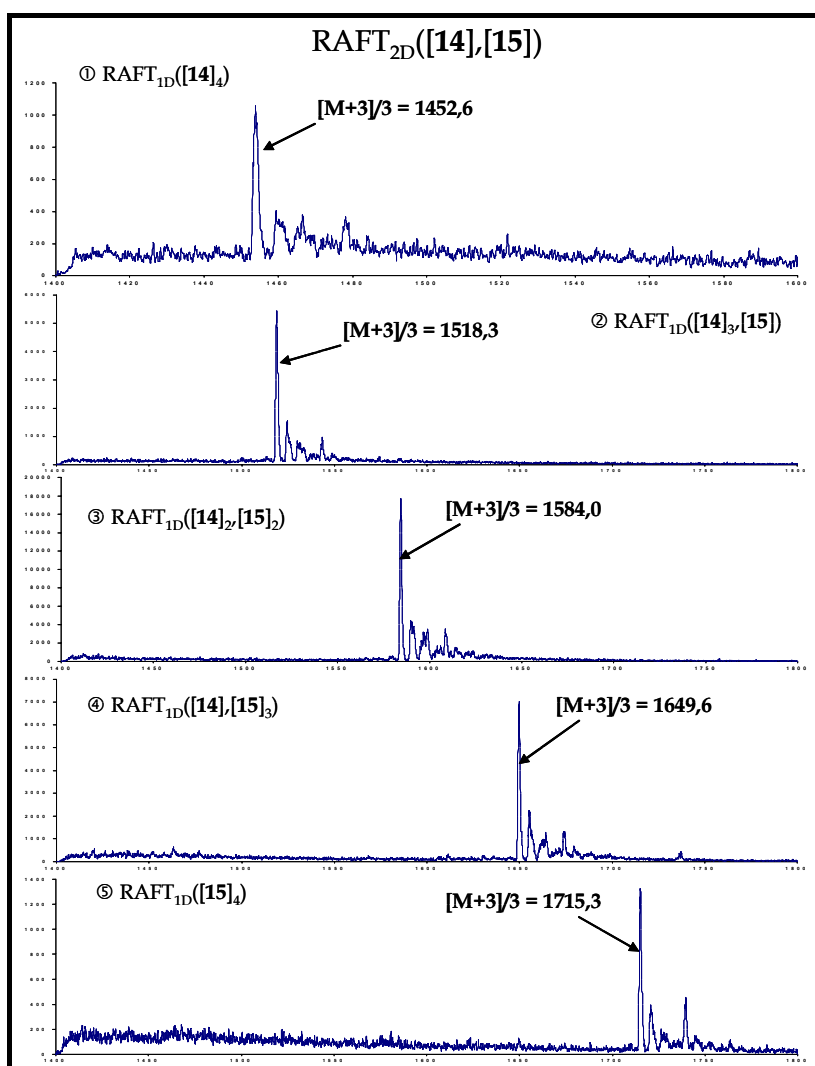


Figure 28 : Spectres de masses obtenus lors de l'analyse LC-MS.

On a ainsi :

- ⇒ RAFT_{2D}([14]₄) : t_R = 13,28 min (13,35 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([14]₃,[15]) : t_R = 14,32 min (14,21 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([14]₂,[15]₂) : t_R = 15,25 min (15,09 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([14],[15]₃) : t_R = 16,08 min (15,95 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([15]₄) : t_R = 16,88 min (16,82 min).

Les temps notés entre parenthèses correspondent aux temps prévisionnels, mis à part pour les matrices à quatre ligands identiques où l'on peut voir un léger décalage entre cette injection CLHP et celles ayant permis de les caractériser.

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

3. La sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[16]) : prévision et analyse CLHP

Cette sous-bibliothèque est mieux résolue avec le gradient allant de 30 à 50 %B qu'avec le gradient allant de 5 à 60 %B. En effet, à cause du chevauchement des pics, il n'aurait pas été possible de caractériser les cinq pics. Le tableau suivant explicite les cinq temps de rétention *théoriques* que nous attendons pour les molécules du mélange tandis que la Figure 29 est une comparaison des chromatogrammes obtenus avec les deux gradients.

Type de molécule	RAFT _{2D} ([16] ₄)	RAFT _{2D} ([16] ₃ ,[14])	RAFT _{2D} ([16] ₂ ,[14] ₂)	RAFT _{2D} ([16],[14] ₃)	RAFT _{2D} ([14] ₄)
Temps de rétention (min)	8,43	9,04	9,65	10,25	10,86

Tableau 7 : Temps de rétention théoriques de la sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15]).

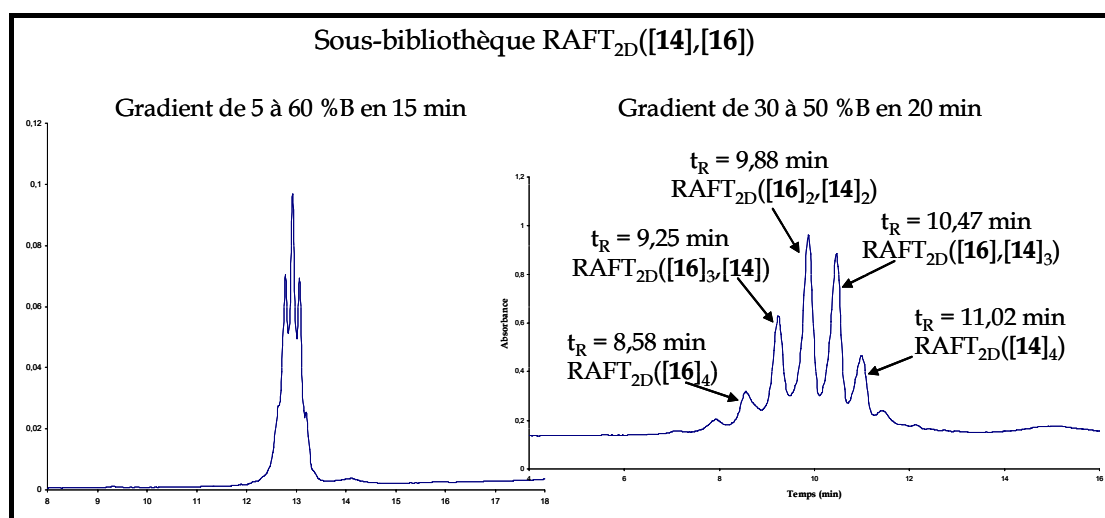


Figure 29 : Comparaison des chromatogrammes obtenus avec les gradients : de 5 à 60 %B en 15 min (à gauche) et de 30 à 50 %B en 20 min (à droite).

L'analyse en spectrométrie de masse des cinq fractions sur chromatogramme de droite a ainsi permis de confirmer la nature des différents types de produits (cf. Figure 30).

*Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])*

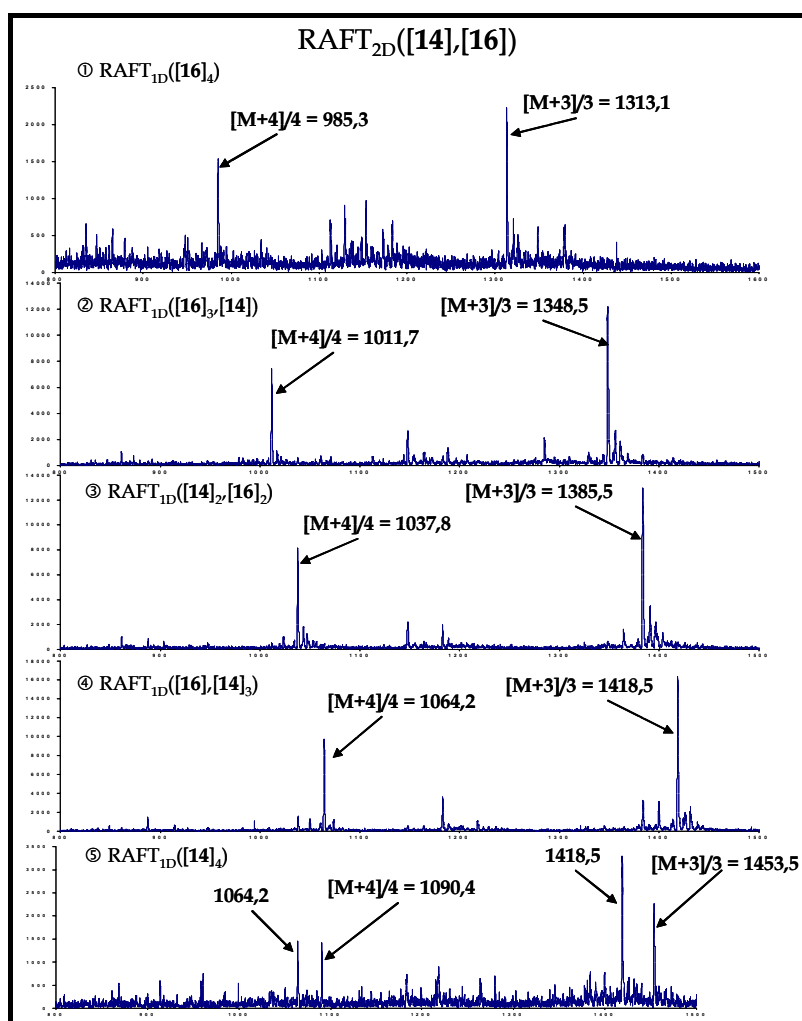


Figure 30 : Analyse en spectrométrie de masse des cinq fractions du chromatogramme obtenu avec le gradient de 30 à 50 %B en 20 min.

On a ainsi :

- ⇒ RAFT_{2D}([16]₄) : t_R = 8,58 min (8,43 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([16]₃, [14]) : t_R = 9,25 min (9,04 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([16]₂, [14]₂) : t_R = 9,88 min (9,65 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([16], [14]₃) : t_R = 10,47 min (10,25 min) ;
- ⇒ RAFT_{2D}([14]₄) : t_R = 11,02 min (10,86 min).

Comme lors du paragraphe précédent, on observe un léger décalage des temps de rétention des matrices frontières.

La caractérisation des sous-bibliothèques à deux ligands et à deux domaines s'effectue de la même manière que pour les sous-bibliothèques à deux ligands et à un domaine : les tendances sont confirmées. De plus, lorsque l'on compare les sous-bibliothèques à un et deux

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

domaines présentant les mêmes ligands, l'ordre d'apparition des types des molécules est le même. On peut donc en conclure qu'il en sera de même pour les sous-bibliothèques à trois ligands ainsi que pour la bibliothèque « mère ». Seuls les temps de rétention seront différents.

C'est la raison pour laquelle la caractérisation des sous-bibliothèques qui suivent s'est faite différemment, car elle peut s'assimiler à celle des sous-bibliothèques à un domaine. Nous avons simplement voulu détecter les espèces par spectrométrie de masse MS ESI sans utiliser la méthode LC-MS.

C. Caractérisation d'une sous-bibliothèque à trois ligands

On obtient 4 bibliothèques d'un total de 81 produits dont une représentation de trouve dans la Figure 31.

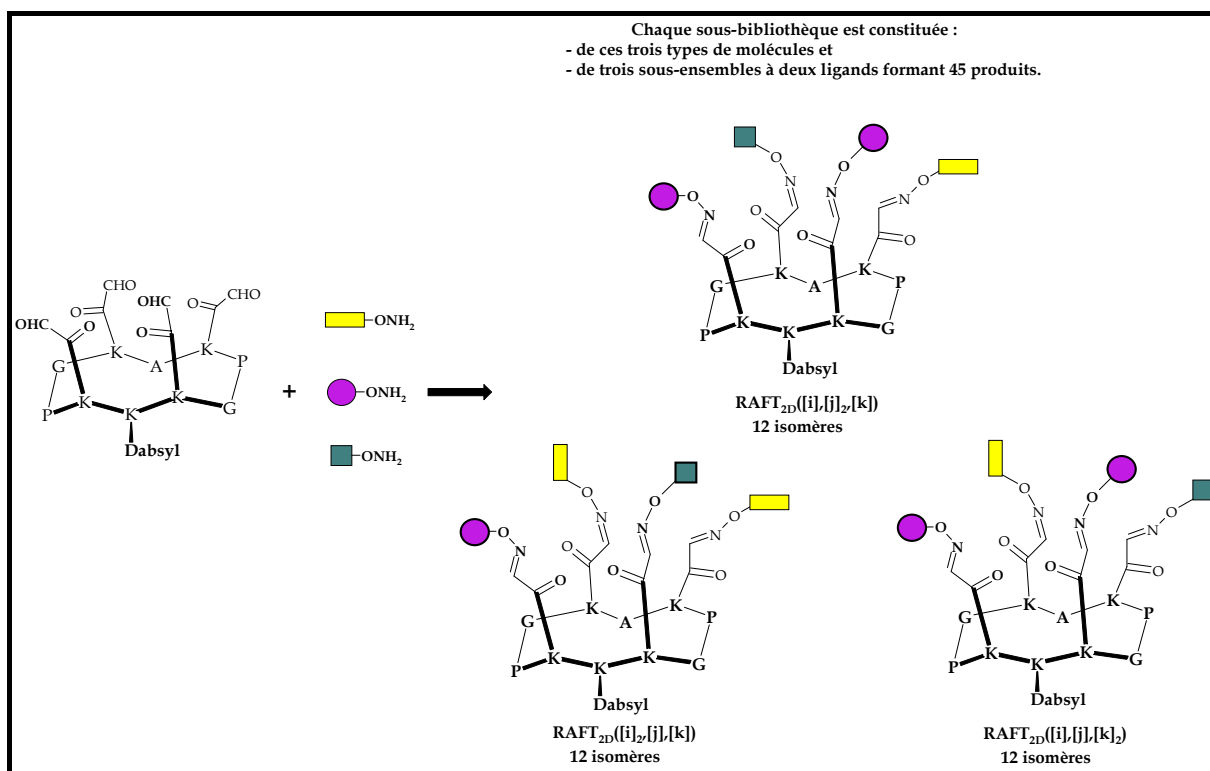


Figure 31 : Représentation schématique d'une sous-bibliothèque à trois ligands.

1. La sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16]) : prévision et analyse CLHP

Nous avons superposé les trois chromatogrammes CLHP (gradient de 5 à 60 %B en 15 min) des sous-éléments constitués de : RAFT_{2D}([14],[15]), RAFT_{2D}([14],[16]) et RAFT_{2D}([15],[16]) et avons essayé d'attribuer un maximum de pics comme le montre la Figure 32.

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

La prévision *théorique* par le calcul des temps de rétention des trois nouveaux gabarits synthétisés est la suivante :

$$\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{14}]_2, [\mathbf{15}], [\mathbf{16}]) : t_R = [(2 \cdot 13,35) + 16,82 + 12,67] = 14,04 \text{ min ;}$$

$$\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{14}], [\mathbf{15}]_2, [\mathbf{16}]) : t_R = [13,35 + (2 \cdot 16,82) + 12,67] = 14,92 \text{ min ;}$$

$$\text{RAFT}_{2D}([\mathbf{14}], [\mathbf{15}], [\mathbf{16}]_2) : t_R = [13,35 + 16,82 + (2 \cdot 12,67)] = 13,88 \text{ min .}$$

Cette tendance et ces temps sont confirmés par la suite.

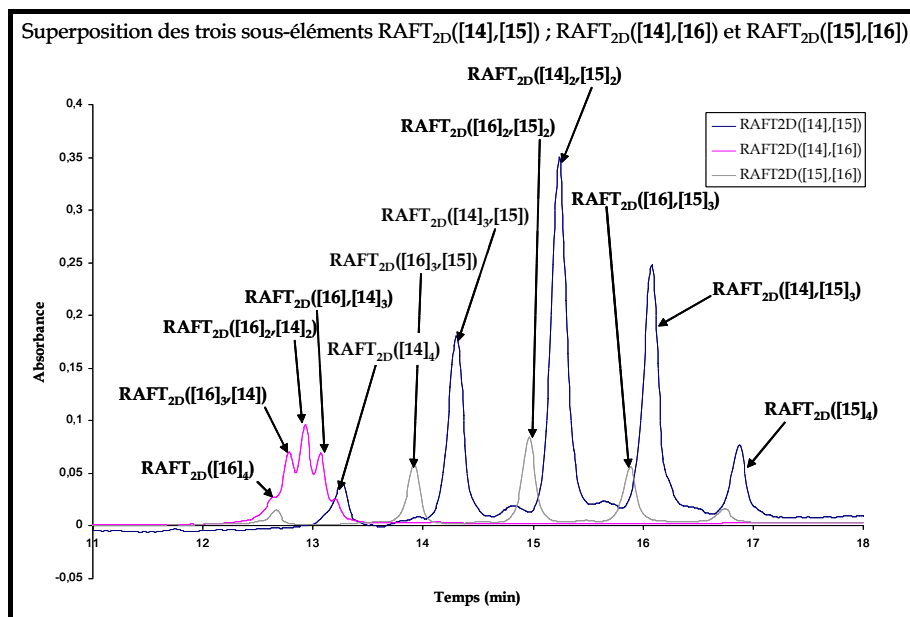


Figure 32 : Superposition des chromatogrammes CLHP des trois sous-éléments.

En observant maintenant le chromatogramme de la sous-bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16]) on peut observer de nouveaux pics que l'on peut attribuer comme le montre la Figure 33 qui présente à gauche la superposition des quatre chromatogrammes et à droite uniquement le chromatogramme de la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16]). En effet, au niveau du second pic où l'on suppose observer quatre types de molécules, on peut voir des épaulement suggérant un chevauchement de plusieurs pics. La même observation peut se faire au niveau du troisième pic du chromatogramme.

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

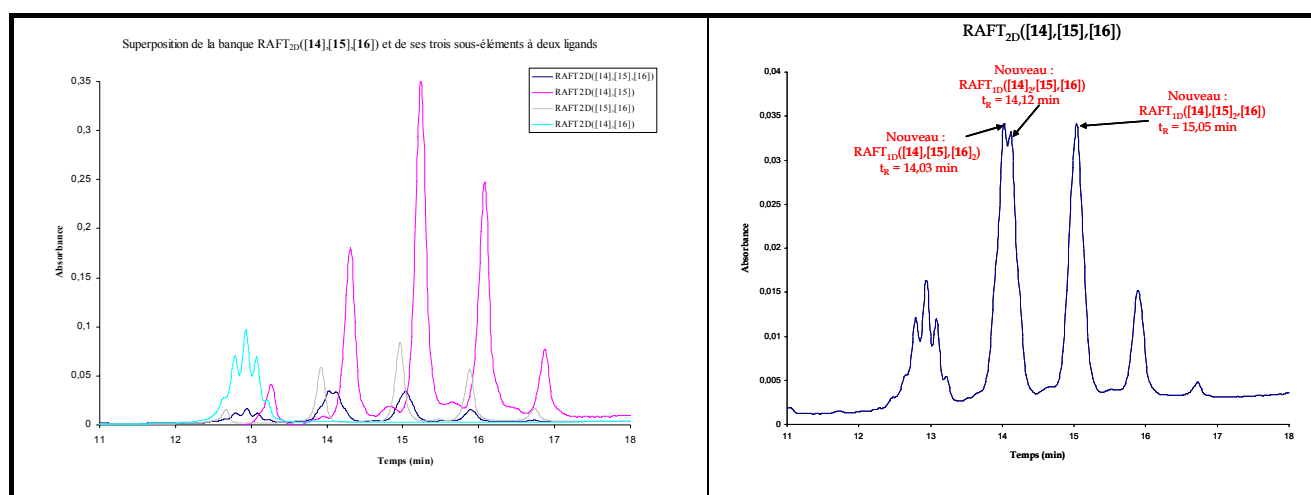


Figure 33 : Superposition des quatre chromatogrammes CLHP (à gauche) ; Supposition de la nature des nouveaux éléments observés (à droite).

2. Analyses ES-MS

L'analyse ES-MS à la fois en modes positifs et négatifs nous a permis d'identifier 9 type de composés sur les 15 attendus. Il apparaît alors que cette méthode est moins performante que la méthode LC-MS dans ce cas. Néanmoins, les produits non observés sont :

- ⇒ Les RAFT_{2D}([14]₄) ; RAFT_{2D}([15]₄) ; RAFT_{2D}([16]₄) qui sont présents en beaucoup plus petites quantités que les autres types de molécules. Ces molécules ont d'autre part été observées dans l'ensemble des sous-bibliothèques précédemment décrites.
- ⇒ Les RAFT_{2D}([14]₃,[16]₂) ; RAFT_{2D}([16]₃,[14]₂) et RAFT_{2D}([14]₂,[16]₂) qui constituent essentiellement le sous-ensemble RAFT_{2D}([14]₃,[16]₂) que nous avons entièrement décrit plus haut. Il s'agit de multichargés de plus petites masses que l'ensemble des autres multichargés observés, ils sont ainsi plus difficiles à identifier de façon formelle.

La Figure 34 représente les spectres de masse obtenus en modes positifs et négatifs ainsi que les multichargés identifiés. Le Tableau 8 nous donne la valeur des différents multichargés observés et aide à caractériser les produits du mélange. Il est intéressant de noter la forme adoptée par le signal. En effet, les multichargés de charge identique sortent dans la même gamme de m/z générant ainsi une sorte d'enveloppe autour des pics qui nous intéressent.

Par souci de clarté, nous avons préféré numéroter les pics des multichargés plutôt que de leur attribuer un numéro de produit. Nous ferons la même démarche lors de l'analyse par spectrométrie de masse de la banque mère.

*Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])*

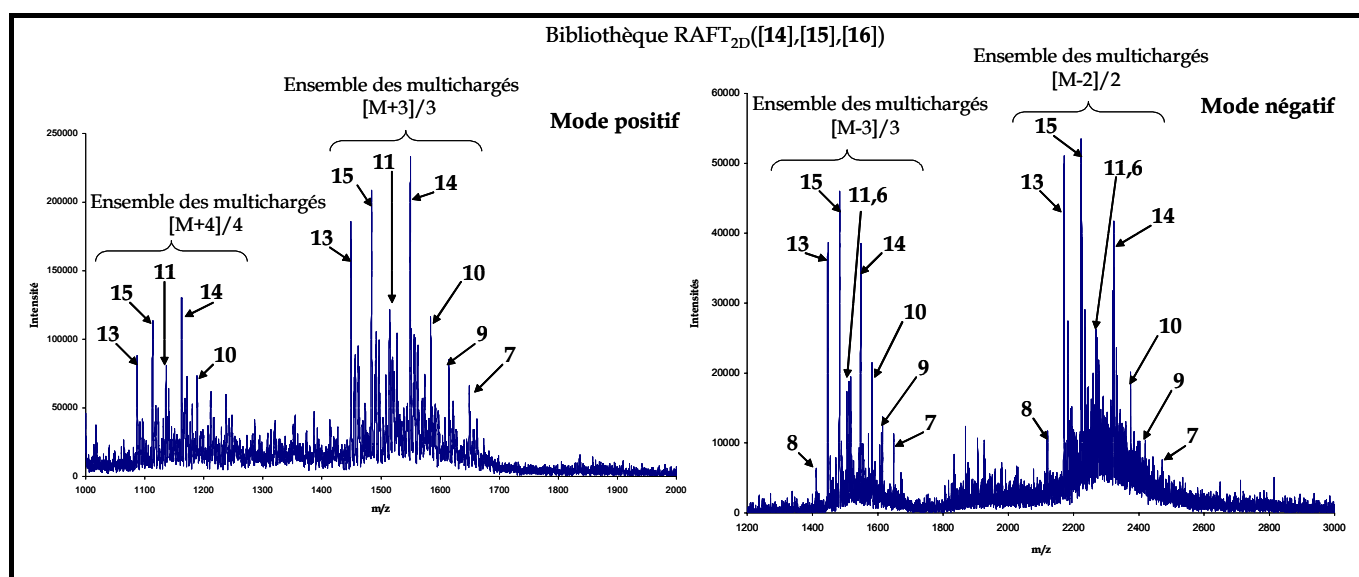


Figure 34 : Spectres obtenus en modes positifs et négatifs pour la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16]).

Produits observés en mode positif :

	7	9	10	11
	RAFT _{2D} ([15] ₃ ,[14])	RAFT _{2D} ([15] ₃ ,[16])	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15] ₂)	RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16] ₂)
M	4946	4842	4749	4541
[M+3]/3	1650,0	1614,7	1584,3	1514,4
[M+4]/4	Non observé	Non observé	1188,6	1136,1
	13	14	15	
	RAFT _{2D} ([14],[15],[16] ₂)	RAFT _{2D} ([14],[15] ₂ ,[16])	RAFT _{2D} ([14],[15],[16] ₂)	
M	4344	4645	4448	
[M+3]/3	1449,4	1549,3	1484,0	
[M+4]/4	1087,1	1162,4	1113,3	

Produits observés en mode négatif :

	6	7	8	9
	RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[15])	RAFT _{2D} ([15] ₃ ,[14])	RAFT _{2D} ([15],[16] ₃)	RAFT _{2D} ([15] ₃ ,[16])
M	4552	4946	4240	4842
[M-2]/2	2276,1	2472,1	2119,1	2420,7
[M-3]/3	1517,7	1648,3	1412,6	1613,3
	10	11	13	14
	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15] ₂)	RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16] ₂)	RAFT _{2D} ([14],[15],[16] ₂)	RAFT _{2D} ([14],[15] ₂ ,[16])
M	4749	4541	4344	4645
[M-2]/2	2374,1	2269,7	2172,1	2322,0
[M-3]/3	1582,6	1513,0	1447,2	1547,2
	15			

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

	RAFT _{2D} ([14],[15],[16] ₂)
M	4448
[M-2]/2	2223,1
[M-3]/3	1481,8

Tableau 8 : Liste des masses et multichargés des produits observés.

D. Caractérisation de la bibliothèque à quatre ligands

Nous avons obtenu une banque d'un total de 256 produits dont une représentation se trouve dans la Figure 35.

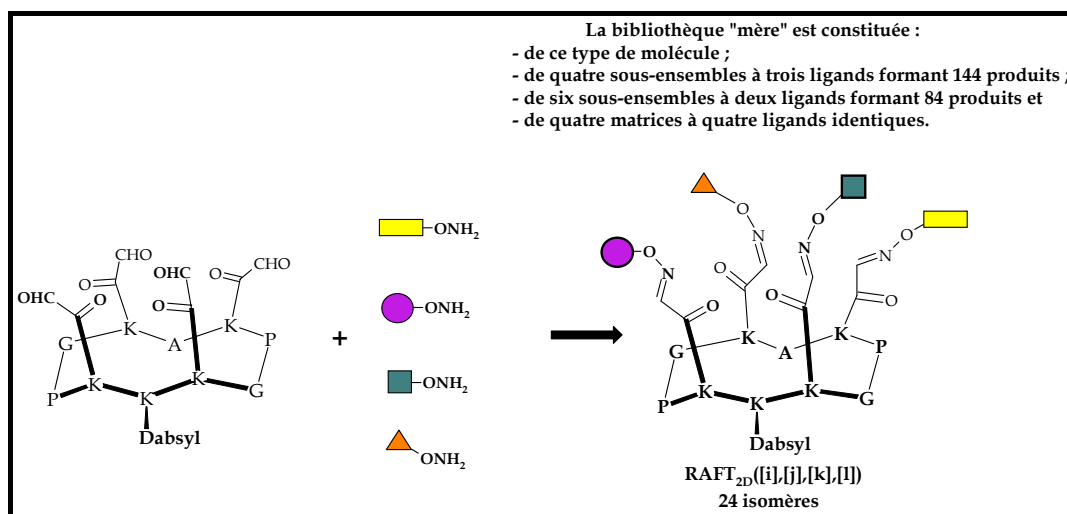


Figure 35 : Représentation du type d'élément à quatre motifs peptidiques différents présent dans la bibliothèque « mère ».

En nous basant sur l'étude de la bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16]), l'ordre d'apparition des espèces est le même pour les bibliothèques à un et deux domaines. Il est donc possible de prévoir la distribution de la bibliothèque « mère » grâce à la caractérisation de la bibliothèque « mère » à un domaine obtenue avec les mêmes ligands. D'autre part, il nous sera aussi possible de prévoir le temps de rétention théorique du nouveau gabarit attendu.

1. La bibliothèque RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]) : prévision et analyse CLHP

En suivant l'ordre de caractérisation LC-MS obtenu pour la bibliothèque RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]), les produits de la bibliothèque « mère » à deux domaines doivent posséder l'ordre d'apparition suivant :

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

1 - RAFT _{2D} ([16] ₄)	10 - RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[16])	19 - RAFT _{2D} ([17] ₄)	28 - RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[14],[17])
2 - RAFT _{2D} ([16] ₃ ,[17])	11 - RAFT _{2D} ([17] ₃ ,[16])	20 - RAFT _{2D} ([17] ₂ ,[14],[15])	29 - RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[14],[16])
3 - RAFT _{2D} ([16] ₃ ,[14])	12 - RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[17])	21 - RAFT _{2D} ([16] ₂ ,[14],[15])	30 - RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[17] ₂)
4 - RAFT _{2D} ([16] ₂ ,[17] ₂)	13 - RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[17] ₂)	22 RAFT _{2D} ([14],[15],[16],[17])	31 - RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15] ₂)
5 - RAFT _{2D} ([16] ₂ ,[14],[17])	14 - RAFT _{2D} ([14] ₄)	23 - RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15],[16])	32 - RAFT _{2D} ([15] ₃ ,[16])
6 - RAFT _{2D} ([17] ₂ ,[14],[16])	15 - RAFT _{2D} ([16] ₃ ,[15])	24 - RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15],[17])	33 - RAFT _{2D} ([15] ₃ ,[17])
7 - RAFT _{2D} ([17] ₃ ,[14])	16 - RAFT _{2D} ([17] ₃ ,[15])	25 - RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[15])	34 - RAFT _{2D} ([15] ₃ ,[14])
8 - RAFT _{2D} ([16] ₂ ,[14] ₂)	17 - RAFT _{2D} ([16] ₂ ,[15],[17])	26 - RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16],[17])	35 - RAFT _{2D} ([15] ₄)
9 - RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[16],[17])	18 - RAFT _{2D} ([17] ₂ ,[15],[16])	27 - RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16] ₂)	

On peut observer que les matrices présentant quatre ligands différents devraient se situer entre les matrices RAFT_{2D}([14],[15],[16]₂) et RAFT_{2D}([14]₂,[15],[16]) que nous avons caractérisées dans le paragraphe précédent. Ces deux espèces ont des temps de rétention de 14,03 min et 14,12 min respectivement pour un gradient de 5 à 60 %B en 15 min. Ces temps de rétention étant extrêmement rapprochés, il est impossible d'identifier le pic de ces matrices uniquement par observation du chromatogramme CLHP. Celui-ci est néanmoins représenté dans la Figure 36.

Par le calcul, le temps de rétention du nouveau gabarit serait de $t_R = 13,92$ min, ce qui confirme nos suppositions.

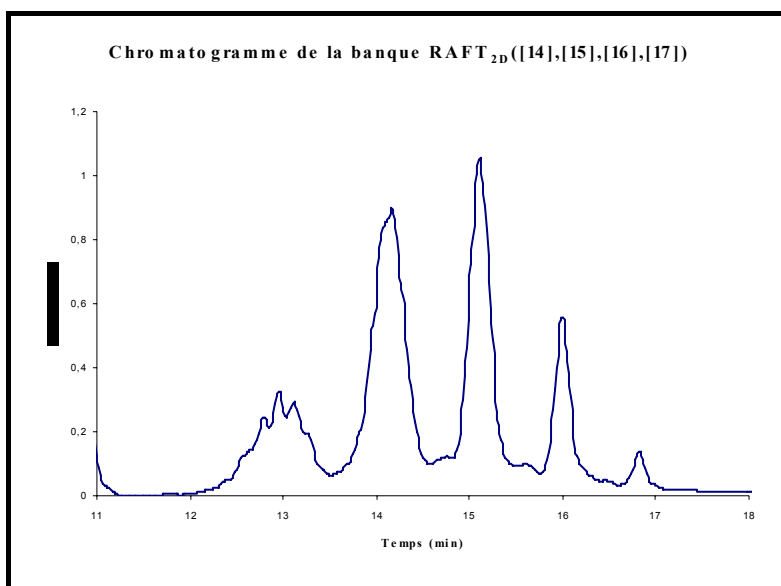


Figure 36 : Chromatogramme CLHP de la bibliothèque « mère ».

**Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])**

2. Analyse ES-MS

L'analyse ES-MS sur la globalité de la banque ne donnant accès à aucune masse, nous avons fractionné le chromatogramme en six échantillons et les avons ensuite analysés. Par cette méthode, nous avons pu observer 19 masses sur les 35 attendues. La Figure 37 représente les spectres obtenus pour trois de ces fractions. Ici, la numérotation est arbitraire, elle ne représente en aucun cas l'ordre d'apparition des produits et la numérotation est explicitée par la suite dans le Tableau 9.

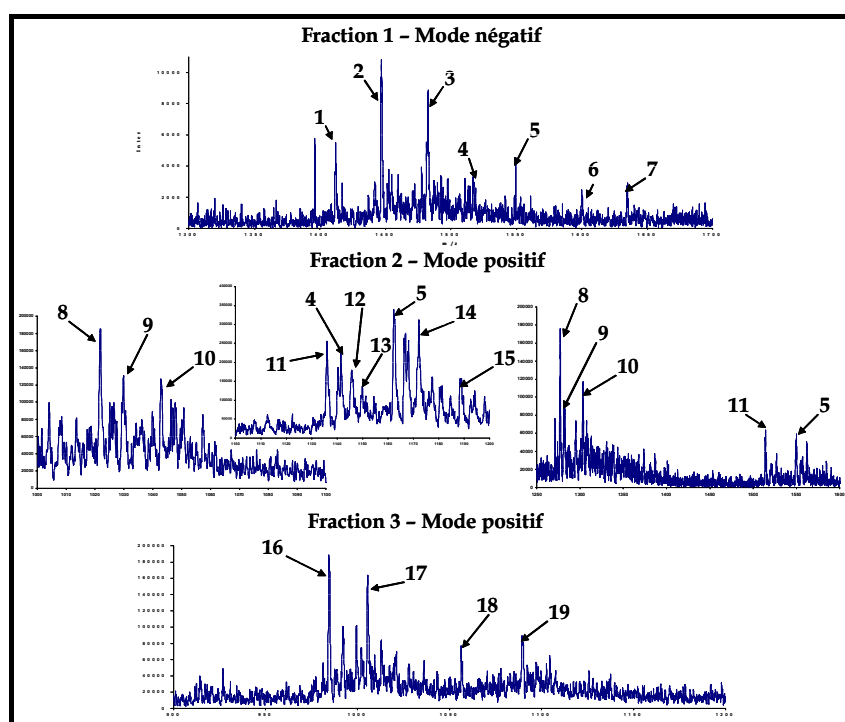


Figure 37 : Représentation des spectres de masse obtenus pour la banque « mère ».

Le Tableau 9 présente les produits observés, leurs masses et multichargés, pour les modes positifs et négatifs.

Fraction 1 – Mode négatif :

	1	2	3	4
	RAFT _{2D} ([15],[16] ₃)	RAFT _{2D} ([14],[15],[16] ₂)	RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15],[16])	RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[15])
M	4240	4344	4448	4552
[M-3]/3	1412,2	1446,6	1482,1	1517,5
	5	6	7	
	RAFT _{2D} ([14],[15] ₂ ,[16])	RAFT _{2D} ([15],[16] ₂ ,[17])	RAFT _{2D} ([14],[15],[16],[17])	
M	4645	4803	4907	
[M-3]/3	1549,6	1600,3	1634,7	

*Annexe II – Caractérisation des banques RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) et
RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17])*

Fraction 2 – Mode positif :

	4 RAFT _{2D} ([14] ₃ ,[15])	5 RAFT _{2D} ([14],[15] ₂ ,[16])	8 RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16],[17])	9 RAFT _{2D} ([15] ₄)
M	4552	4645	5104	5143
[M+3]/3	Non observé	1550,6	Non observé	Non observé
[M+4]/4	1141,7	1162,0	1276,8	1282,4
[M+5]/5	Non observé	Non observé	1021,7	1029,9
	10 RAFT _{2D} ([14],[15] ₂ ,[17])	11 RAFT _{2D} ([15] ₂ ,[16] ₂)	12 RAFT _{2D} ([14],[17] ₃)	13 RAFT _{2D} ([14],[16] ₂ ,[17])
M	5208	4541	5732	4606
[M+3]/3	Non observé	1514,0	Non observé	Non observé
[M+4]/4	1303,5	1136,1	Non observé	1149,9
[M+5]/5	1042,9	Non observé	1145,7	Non observé
	14 RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[16],[17])	15 RAFT _{2D} ([15],[17] ₃)		
M	4710	5929		
[M+3]/3	Non observé	Non observé		
[M+4]/4	1177,4	Non observé		
[M+5]/5	Non observé	1188,9		

Fraction 3 – Mode positif :

	16 RAFT _{2D} ([16] ₄)	17 RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[15],[17])	18 RAFT _{2D} ([14] ₂ ,[17] ₂)	19 RAFT _{2D} ([14] ₄)
M	3939	5011	5273	4375
[M+4]/4	984,5	Non observé	Non observé	1089,6
[M+5]/5	Non observé	1005,6	1056,4	Non observé

Tableau 9 : Nature des produits, masses et multichargés observés.

ANNEXE III

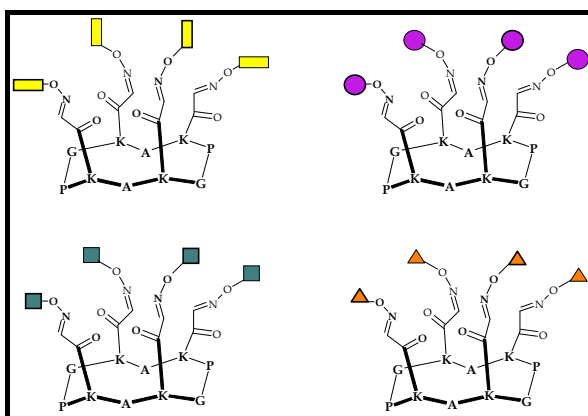
-

REPRESENTATION DES SOUS-BIBLIOTHEQUES

I. Ensemble des produits formés au sein de la banque à un domaine

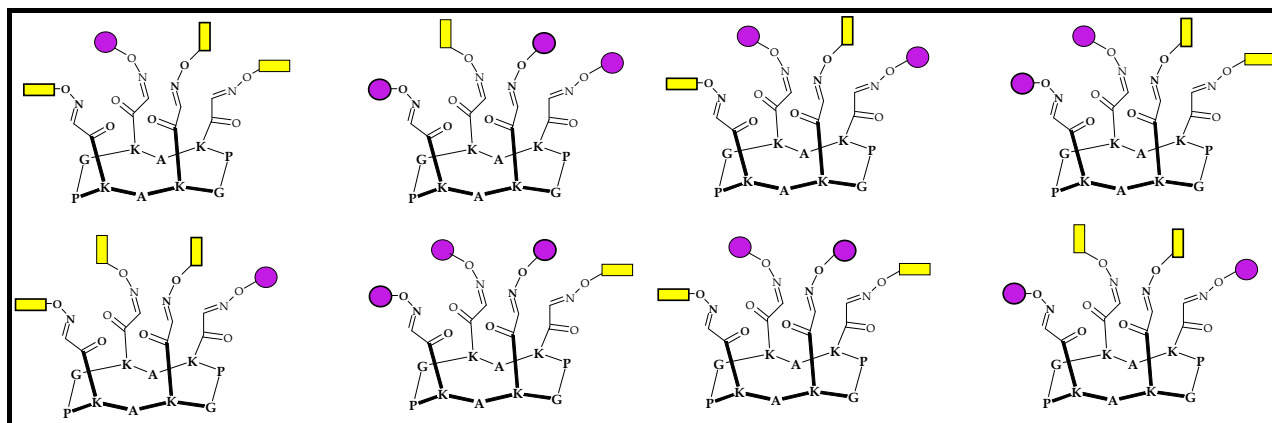
On considère que le châssis est symétrique étant donné qu'il n'est pas fonctionnalisé sur son domaine inférieur.

A. RAFTs à un ligand :



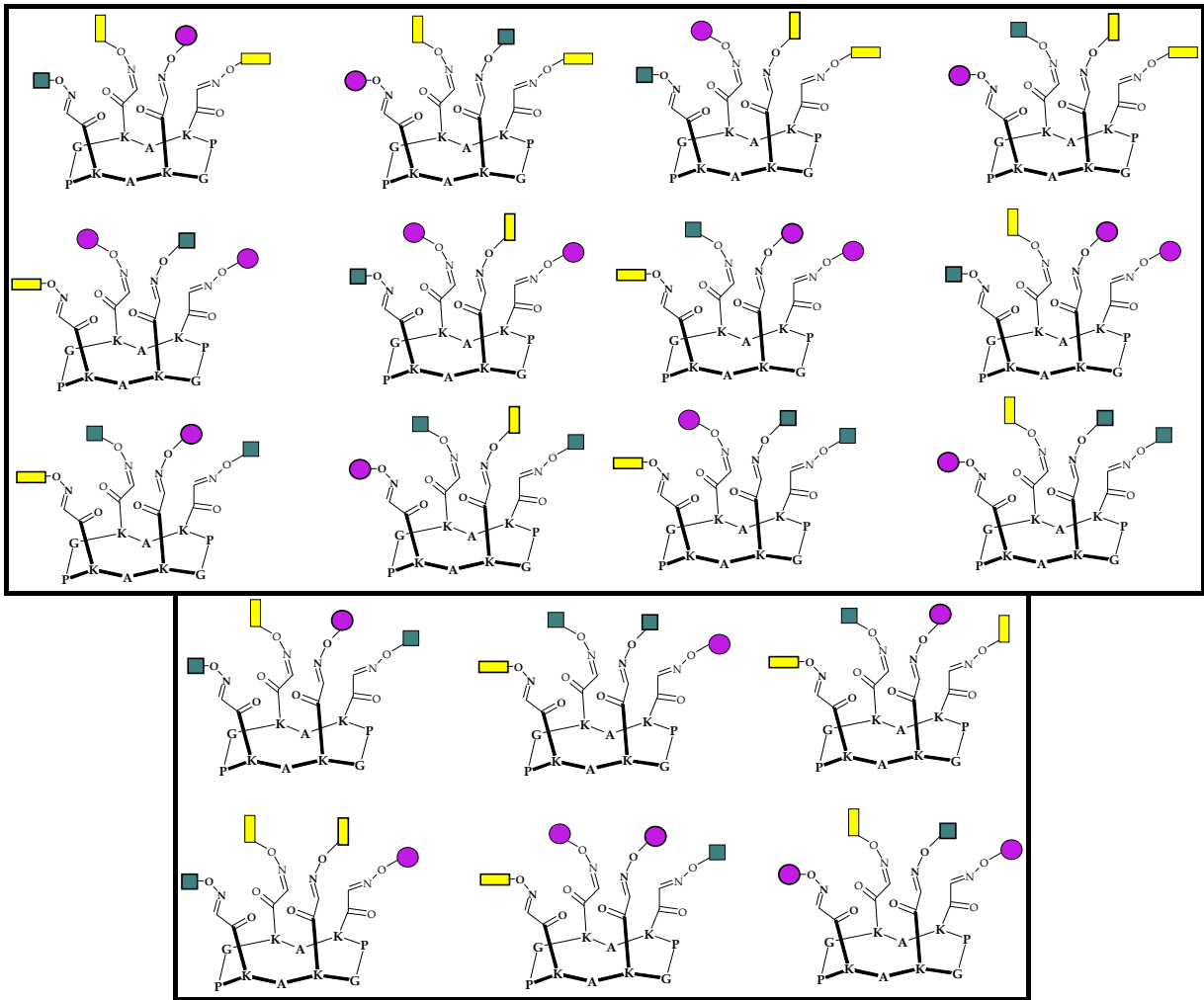
Quatre réactions donnent 4 produits différents

B. Sous-bibliothèque à deux ligands :



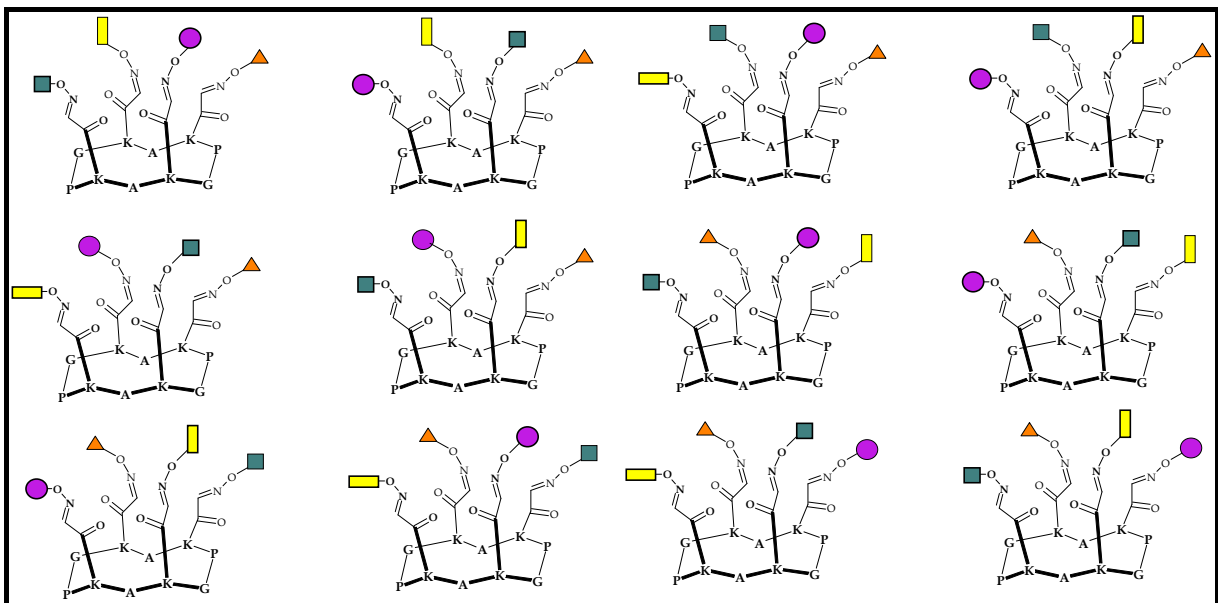
Huit produits ; six sous-bibliothèques : 48 produits différents

C. Sous-bibliothèque à trois ligands :



Dix-huit produits ; quatre sous-bibliothèques : 72 produits différents

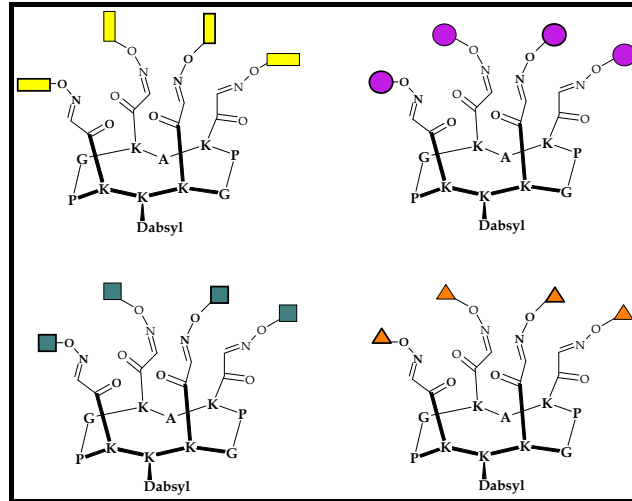
D. Bibliothèque « mère » à quatre ligands :



Douze produits différents

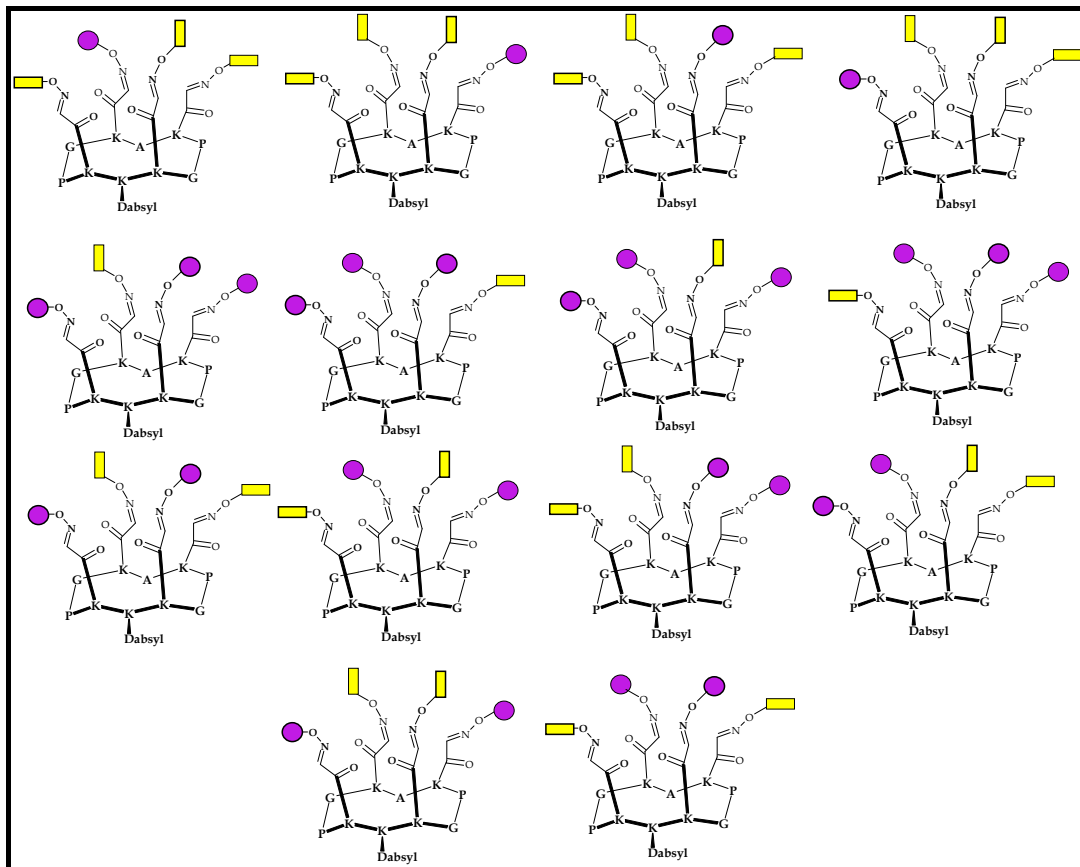
II. Ensemble des produits formés au sein de la banque à deux domaines

A. RAFTs à un ligand :



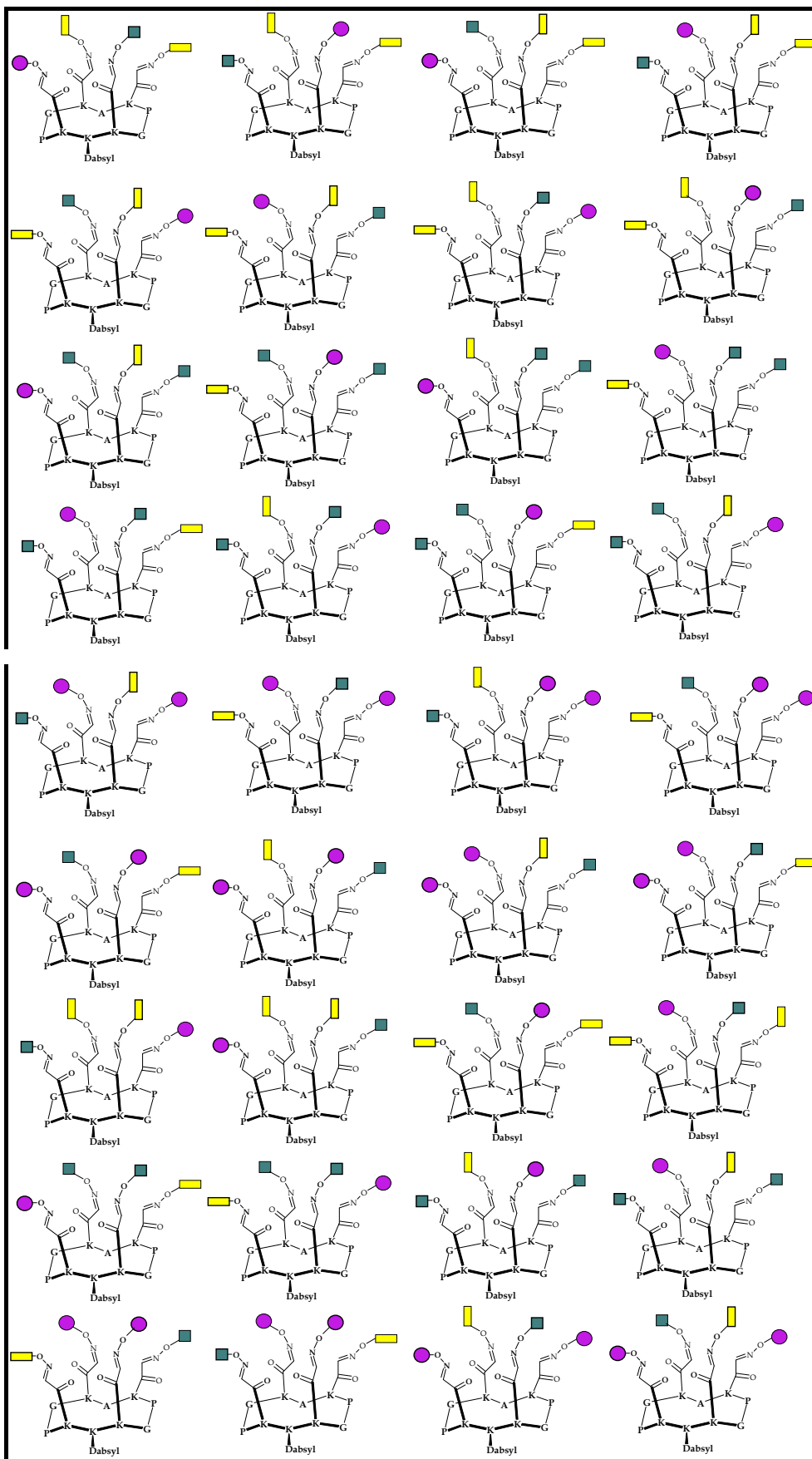
Quatre réactions donnent 4 produits différents

B. Sous-bibliothèque à deux ligands :



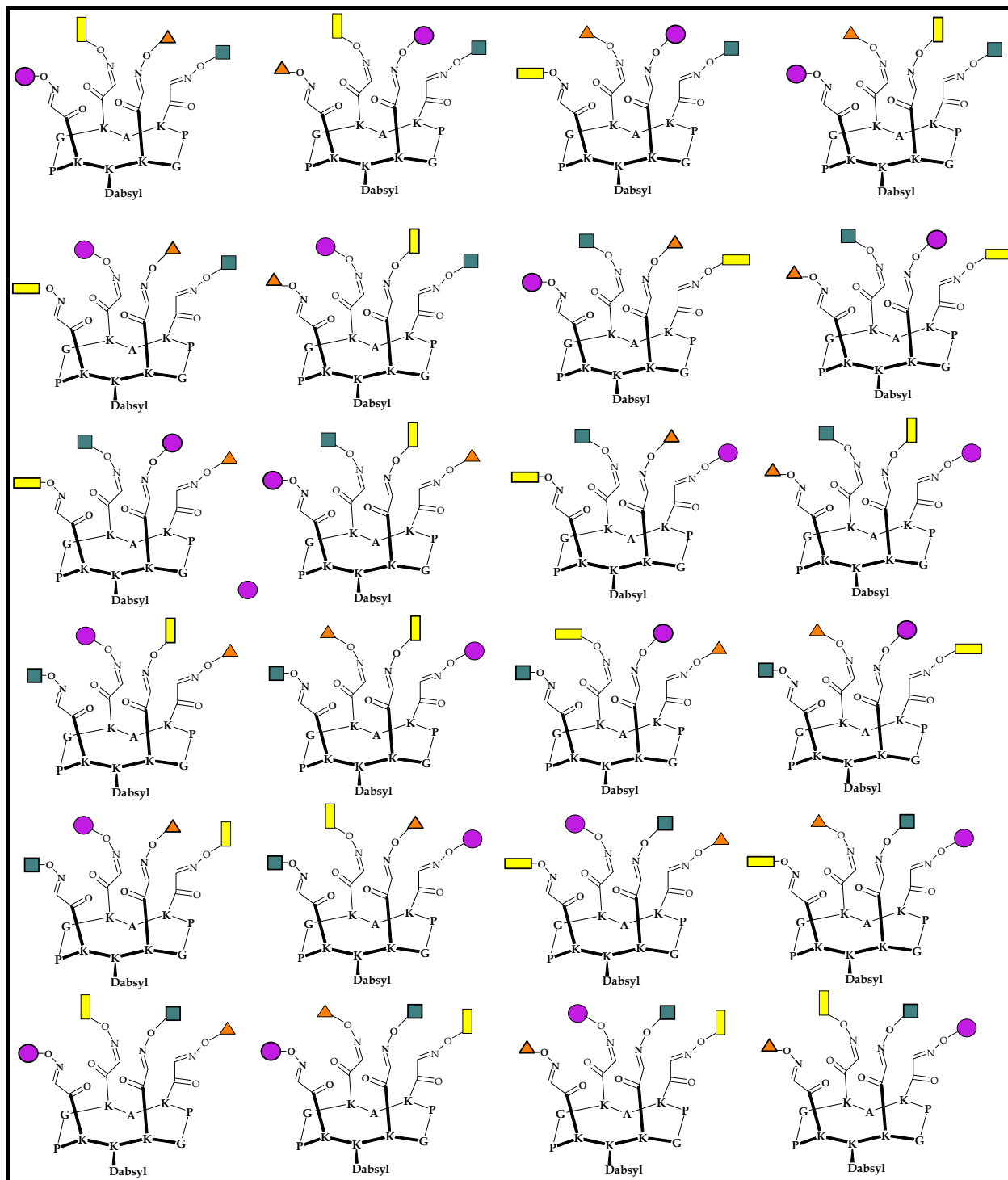
Quatorze produits ; six sous-bibliothèques ; 84 produits différents

C. Sous-bibliothèque à trois ligands :



Trente-six produits ; quatre sous-bibliothèques : 144 produits différents

D. Bibliothèque « mère » à quatre ligands :



Vingt-quatre produits différents

ANNEXE IV

-

**INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES SE RAPPORTANT
AU CHAPITRE III**

I. Inhibition de l'interaction GnRH-récepteur

Cascade de réactions après fixation de la GnRH

Lorsque la GnRH se fixe sur son récepteur, la conformation de ce dernier se modifie lui permettant alors de s'associer à une protéine G. L'interaction avec le récepteur conduit la protéine G à échanger un groupement GDP contre un groupement GTP. La protéine G étant activée, elle se dissocie du récepteur et se lie à une protéine effectrice dont l'activité est modifiée. Des canaux ioniques sont ensuite ouverts (Ca^{2+}) et plusieurs messagers secondaires comme l'AMP cyclique ou le diacyl glycérol DAG, sont synthétisés. Ceux-ci induisent l'action de protéines kinases qui rendent alors actives certaines protéines de la cellule en les phosphorylant et ont finalement une activité biologique.

Enfin, il est à noter que la GnRH agit comme hormone régulatrice paracrine dans les gonades et le placenta mais comme hormone régulatrice autocrine dans les cellules cancéreuses.

II. Ciblage du domaine SH2 de la protéine Grb2

A. Généralités concernant les récepteurs de facteur de croissance de l'épiderme

1. ErbB1 et ErbB2

Ces deux récepteurs sont exprimés dans les tissus mésenchymaux, possèdent le facteur de croissance épithélial (EGF) comme ligand commun et hétérodimérisent ensemble.

De plus, lors de tests effectués sur des souris, ils deviennent oncogéniques lorsqu'ils sont surexprimés dans les fibroblastes et C. I. Bargmann et *coll.*^[15] ont montré que la simple mutation de la Val⁶⁶⁴ pour le Glu⁶⁶⁴ dans la partie transmembranaire du récepteur ErbB2, rend celui-ci oncogénique.

De nombreuses études ont été menées sur des souris afin de connaître l'activité propre de ces récepteurs. En d'autres termes, différents loci de ces récepteurs ont été supprimés sur des gènes de souris afin d'observer les dysfonctionnements résultants.

¹⁵ C. I. Bargmann, M. C. Hung, R. A. Weinberg. "Multiple independent activations of the *neu* oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185." *Cell*, **1986**, 45, 649-657.

Il apparaît qu'un ErbB1 déficient induit des anomalies dans de nombreux organes comme la peau, les poumons, la partie gastro-intestinale et certaines parties du cerveau chez l'embryon de souris. Chez la souris adulte, ce sont différents organes de l'épithélium qui sont touchés : la souris présente alors une peau très fine et aucun poil.

Les études sur ErbB2 ont été effectuées en considérant ErbB2 en tant que corécepteur. Il apparaît ainsi que ErbB2 associé à ErbB3 agit sur le développement du système nerveux périphérique tandis que ErbB2 et ErbB4 agissent principalement au niveau du cœur chez la souris embryonnaire comme chez l'adulte.

Enfin, leur surexpression dans les adénocarcinomes humains est associée avec un faible pronostic, ce qui signifie que le patient présente de faibles chances de survie à la maladie.

2. ErbB3 et ErbB4

Ces deux récepteurs ne sont pas exprimés dans les fibroblastes et exprimés seulement dans les cellules épithéliales de peu d'organes. En revanche, ils sont largement exprimés dans les cellules mésenchymales et sont impliqués dans les interactions mésenchyme-épithélium.

De plus, dans leurs travaux de recherche, X. Chen *et coll.* ont montré que le récepteur ErbB4 pouvait générer des signaux biologiques par homodimérisation tandis que les homodimères de ErbB3 en sont incapables. Au contraire, ErbB3 nécessite une hétérodimérisation avec ErbB2 pour avoir une activité.

3. ErbB3

Ce récepteur est différent des autres en ce qui concerne certains motifs de la portion catalytique. En effet, il présente de nombreux sites d'autophosphorylation de tyrosines qui sont des sites de fixation potentiels de protéines de signalisation possédant un domaine SH2 ("phosphotyrosine-specific binding cleft" appelé "Src homology 2"). C'est à travers ses interactions avec différents domaines protéiques SH2, comme la phosphatidylinositol 3-kinase ou la protéine SHC, que le récepteur ErbB3 devient actif sous forme de protéine kinase et qu'il transmet des signaux de prolifération.

Enfin, on le trouve surexprimé dans le cas de certains adénocarcinomes, mais on ne peut pas encore établir de relation concrète entre sa présence et la valeur du pronostic.

4. Mimes de ces récepteurs

De plus, il est possible que certains anticorps soient capables de mimer un ligand éventuel^[16] : J. A. Drebin et coll.^[17] ont en effet montré que certains mAbs étaient capables d'inhiber son action.

D'autre part, dans leur étude des récepteurs ErbB3 et ErbB4 en interaction avec NDF, X. Chen et coll. ont mis en évidence de nouvelles informations concernant ErbB2. En effet, il apparaît que ce récepteur est un partenaire prédominant de ErbB3 dans les cellules épithéliales et que l'association de ces récepteurs peut générer des signaux de différenciation dans certaines cellules mammaires cancéreuses. Ainsi les hétérodimères ErbB3/ErbB2 sont-ils stabilisés par la présence de NDF. Ceci pourrait signifier que la phosphorylation des tyrosines de ErbB2 serait activée en *trans*, c'est-à-dire par le fait que NDF se lie à ErbB3 ou que EGF se lie à ErbB1. Cette dernière prise en considération peut donc impliquer que les deux récepteurs à NDF ou à EGF soient en compétition pour se lier à ErbB2. Des expériences effectuées à résultat que NDF est capable d'inhiber l'interaction entre EGF et ErbB1, impliquant ErbB2 dans cet effet trans-régulateur, et que les hétérodimères ErbB2/ErbB3 sont favorisés par rapport aux hétérodimères ErbB2/ErbB1.

B. Généralités concernant les domaines SH2 et PTB

1. Domaine SH2

Les domaines SH2 ont été découverts en 1986 par T. Pawson et coll.^[18] par mutagenèse sur la protéine p130^{gag-fps} du virus du sarcome de Fujinami. Ces domaines sont composés d'une centaine d'acides aminés reconnaissant les tyrosines phosphorylées présentes parmi les trois ou six derniers acides aminés de la partie C-terminale des protéines. En se basant sur la structure de leurs surfaces de liaison, des domaines SH-2 peuvent être divisés en trois classes distinctes aux structures apparentées aux phospholipase C- γ 1, aux Src et aux Grb2. D'une façon générale, les domaines SH2 possèdent la même topologie constituée d'un feuillet β central antiparallèle entouré par deux hélices.

¹⁶ Y. Yarden. "Agonistic antibodies stimulate the kinase encoded by the *neu* protooncogene in living cells but the oncogenic mutant is constitutively active." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1990**, *87*, 2569-2573.

¹⁷ J. A. Drebin, V. C. Link, R. A. Weinberg, M. I. Greene. "Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1986**, *83*, 9129-9133.

¹⁸ I. Sadowski, J. C. Stone, T. Pawson. "A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130^{gag-fps}." *Mol. Cell. Biol.*, **1986**, *6*, 4396-4408.

La plupart des interactions protéine-protéine, impliquant les domaines SH2, résultent en une régulation négative des récepteurs à tyrosine kinase. Par exemple, RasGAP est un régulateur négatif de Ras : il participe à son inactivation en transformant son groupement GTP en GDP et contrôle ainsi l'intensité du signal transmis par Ras.

Enfin, les mutations au sein des domaines SH2 de diverses protéines sont impliquées dans de nombreuses maladies chez l'homme. Par exemple, le syndrome de Noonan, caractérisé par une petite taille, une difformité faciale et une insuffisance cardiaque, semble provenir, dans la plupart des cas, d'une mutation au sein du domaine SH2 N-terminal de la protéine SHP-2. Cette mutation provoque la stabilisation de la tyrosine phosphatase dans sa forme active.

2. Domaine PTB

Les domaines PTB diffèrent des domaines SH2 par leur taille d'une part (elle est de l'ordre de 150 acides aminés) et d'autre part à cause du fait que leur liaison à la protéine présentant la tyrosine phosphorylée est déterminée par la nature des trois ou quatre résidus précédant ladite tyrosine.

Par ailleurs, les protéines comportant ces domaines PTB sont décrites comme étant des protéines adaptatrices. Par exemple, la protéine SHC, qui présente à la fois un domaine SH2 et un domaine PTB, se lie au récepteur ErbB phosphorylé via son domaine PTB. Par la suite, elle est elle-même phosphorylée et interagit avec le complexe Grb2/SOS^[19].

C. Précisions sur la cascade de réactions MAPK

Après la liaison de Ras à Raf et leur migration vers la membrane cellulaire a lieu l'activation de Raf. Il est intéressant de noter qu'il existe trois sortes de kinases Raf chez les mammifères : les protéines Raf-1, A-Raf et B-Raf. Malgré tout, ces trois isoformes de protéines possèdent le même activateur et, ce qui est très surprenant, le même substrat, MEK. D'autre part, l'interface Ras/MEK est utilisée pour la régulation du signal. MEK est ensuite activé *via* phosphorylation de deux résidus sérine présents sur sa boucle d'activation.

L'étape suivante constitue en l'activation des protéines ERK-1 et ERK-2, sérine/thréonine kinases, *via* la phosphorylation du motif –Thr-Glu-Tyr- présent sur la boucle d'activation.

Cette cascade de réactions se termine par la phosphorylation par les protéines ERK au sein du noyau d'un facteur de transcription, nommé Elk.

¹⁹ M. B. Yaffe. "Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction" *Mol. Cell Biol.*, **2002**, 3, 177-184.

D. Cancer : généralités

1. Généralités – Données épidémiologiques

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormale des cellules d'un tissu ou d'un organe. Ces cellules proliférant ont ainsi le pouvoir d'envahir localement et de métastaser à distance du foyer primitif. La cancérologie est aujourd'hui face à un double enjeu : le diagnostic précoce des tumeurs et le développement de nouveaux traitements ciblés. Au plan du traitement des tumeurs, la mise au point d'agents anti-cancéreux ciblés, agissant spécifiquement sur les mécanismes de la cancérogenèse, permettra d'en améliorer l'efficacité thérapeutique ainsi que la tolérance.

Les examens complémentaires utilisés à l'heure actuelle pour le diagnostic des cancers relèvent essentiellement des techniques d'imagerie traditionnelles et de l'analyse des prélèvements réalisés sur le patient. Le diagnostic d'une tumeur est toujours confirmé par un examen anatomo-pathologique. Les différentes techniques d'imagerie sont la radiographie, l'échographie, l'IRM, la scintigraphie, la PETscan et l'endoscopie.

En ce qui concerne les principaux traitements des cancers, il est important de préciser que la chirurgie demeure, à ce jour, la thérapeutique pivot du traitement de la majorité des affections tumorales (en dehors des cancers immuno-hématologiques). Les médecins tentent toutefois de l'intégrer dans des plans thérapeutiques comprenant des actes complémentaires adjuvants comme la radio- et la chimiothérapie. Ces deux techniques constituent à ce jour les deux moyens essentiels de la thérapie anti-cancéreuse.

Dans le monde, le cancer touche environ 10 millions de personnes à l'heure actuelle. Les néoplasies les plus fréquentes chez les hommes sont en tout premier les cancers du poumon dont l'incidence dépasse 900 000 nouveaux cas par an, suivis rapidement par ceux de la prostate, de l'estomac, du colon et du rectum, du foie, de l'œsophage puis de la vessie dont les incidences sont de 200 000 nouveaux cas par an. Chez les femmes, les cancers du sein arrivent largement en tête avec plus d'un million de nouveaux cas diagnostiqués chaque année, suivis de ceux du col utérin, du colon et du rectum, du poumon et de l'estomac dont les incidences sont supérieures à 200 000 nouveaux cas par an^[20].

²⁰ Ferlay, J. ; Bray, F. ; Pisani, P. ; Parkin, D. M. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, GLOBOCAN 2002. *IARC Cancer Base, IARC Press Lyon 2004, N°5 version 2.0.*

En France en l'an 2000, les nouveaux cas de cancer ont été estimés à 278 253 et les décès par cancer à 150 045^[21]. De fait, le cancer apparaît comme la deuxième cause de mortalité chez les femmes après les maladies cardio-vasculaires, et la première chez les hommes (en 2000, 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes ont été liés au cancer)^[22].

Chez les hommes, si le cancer de la prostate arrive largement en tête des cancers dépistés (40209 nouveaux cas en 2000)^[23], c'est le cancer du poumon le plus létal avec 22 649 décès en 2000^[2,3,4,524].

Chez les femmes, le cancer du sein est au premier rang à la fois en termes d'incidence et de mortalité (41 845 nouveaux cas et 11 637 décès en 2000).

Enfin, si le cancer du poumon occupe la quatrième place en termes d'incidence, hommes et femmes confondus, son mauvais pronostic lui confère en revanche la première place en termes de mortalité.

Véritable fléau sanitaire, le cancer est un problème majeur de santé publique en France. La lutte contre le cancer a été désignée comme l'une des priorités du secteur santé et fait l'objet du Plan Cancer 2003-2007.

2. Mécanisme de la cancérogenèse

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur prolifération. Elles acquièrent par la suite des propriétés de migration leur permettant d'envahir à terme tout l'organisme. Le développement et l'évolution d'un cancer comporte trois grandes phases :

- ⇒ La transformation maligne d'une cellule normale d'un tissu ou d'un organe en cellule cancéreuse (tumorigène ou carcinogène) et sa prolifération incontrôlée (désordre monoclonal),
- ⇒ L'angiogenèse et l'extension locale de la tumeur,
- ⇒ L'invasion ganglionnaire (invasion régionale) puis métastatique (invasion à distance).

²¹ Rapport de la commission d'orientation sur le cancer 2003.

²² INSERM CépiDC (<http://sc8.vesinet.inserm.fr:1080>).

²³ Réseau FRANCIM : Réseau Français des Registres de Cancer 2000.

²⁴ International Agency for Research on Cancer (IARC). <http://www.iarc.fr>.

Il est aujourd'hui bien établi que le cancer est une maladie liée à des changements dynamiques dans le génome et que la tumorigenèse est un processus multi-étapes mettant en jeu plusieurs altérations géniques successives. Celles-ci affectent principalement les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, dans les phénomènes d'adhérence cellulaire ainsi que dans les processus de réparation des lésions de l'ADN. Les gènes impliqués dans la carcinogenèse sont habituellement classés en deux familles :

⇒ Les oncogènes :

Stimulés lors de la transformation maligne, ils codent pour des facteurs qui entraînent la perte du contrôle de la croissance cellulaire. Leur expression est dominante, la présence d'un seul exemplaire de l'oncogène suffit à l'expression du phénotype altéré de son produit. Ces oncogènes comprennent, entre autres, les oncogènes codant pour des facteurs de croissance ou leur récepteur (ex : sis, erbb), des protéines kinases cytoplasmiques (ex : src, raf), des facteurs de transcription (ex : myc), des protéines inductrices de l'apoptose (ex : bcl-2) ou encore les protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN.

⇒ Les gènes suppresseurs de tumeurs :

Ces gènes sont, à l'inverse, réprimés lors de la transformation maligne. Leur expression étant récessive, les deux exemplaires du gène normal doivent alors être perdus ou mutés pour que disparaisse le rôle protecteur. Le plus connu de ces gènes est le suppresseur de tumeur p53 qui est altéré dans plus de 50% des cancers. Une dizaine d'autres gènes de cette famille sont aujourd'hui connus ou fortement présumés (APC, DCC, NF1, NF2, RB, RET, VHL, WT-1, BRCA-1, BRCA-2).

Dans ce contexte, Hanahan et Weinberg ont décrit six propriétés essentielles acquises (Figure 38) par les cellules cancéreuses et responsables du caractère malin des tumeurs^[25].

²⁵ D. Hanahan, R. A. Weinberg. "The Hallmarks of Cancer." *Cell*, **2000**, 100, 57-70.

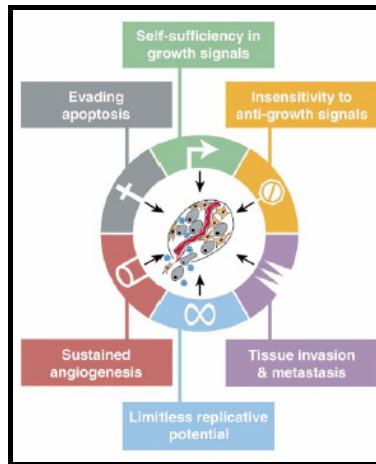


Figure 38 : Les six propriétés principales des cellules cancéreuses leur conférant leur caractère malin.

⇒ Leur autosuffisance en signaux stimulant la croissance cellulaire

Dans le cas des cellules normales, le passage de l'état quiescent à l'état actif de prolifération est gouverné par un ensemble de signaux de croissance mitogènes provenant essentiellement de voies de signalisation hétérotypiques (signaux autocrines et paracrines) et transmis à la cellule par des récepteurs transmembranaires liant différentes classes de molécules signaux comme : des facteurs de croissance diffus, des composés de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhésion/interaction cellule-cellule. Jusqu'à ce jour, aucun type de cellule normale ne peut proliférer en absence de ces signaux stimulants.

La cellule maligne développe, elle, une boucle de stimulation autocrine conduisant à la génération de ses propres signaux de croissance (ex : TGF α dans les sarcomes ; PDGF dans les glioblastomes). Ceci n'exclut pas les stimulations hétérotypiques induisant la production de ces facteurs notamment par le stroma tumoral. Par ailleurs, la surexpression des récepteurs de facteurs de croissance ainsi que leur mutation et activation constitutionnelle rendent la cellule cancéreuse hypersensible à des taux faibles en facteurs de croissance et induisent une signalisation souvent indépendante de la présence ou non du ligand (ex : EGFR/erbB dans les tumeurs de l'estomac, du sein et du cerveau ; HER/neu dans les carcinomes mammaires et gastriques). Les mécanismes les plus complexes conduisant à l'autonomie des cellules tumorales concernent toutefois l'aval des circuits de signalisation, notamment l'altération de certains maillons des chaînes de transduction (e.g. mutation du gène Ras dont le produit est impliqué dans la cascade de signalisation SOS-Ras-Raf-MAP kinase).

La dérivation des stimuli de prolifération et leur dérèglement constitue l'étape primaire du développement tumoral. La reprise de contrôle de ces voies de signalisation via des mimes de ligands ou de récepteurs synthétiques permettrait d'étouffer dans l'œuf cette maladie meurtrière et représente donc une cible thérapeutique convoitée.

⇒ Leur insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire

Dans les tissus sains, il existe de multiples signaux antiprolifératifs afin de maintenir une quiescence cellulaire et l'homéostasie du tissu. Pour cela, deux mécanismes distincts sont possibles. Le premier consiste à forcer la cellule à passer d'un état actif à un état quiescent d'où elle pourra revenir active dans le futur. Le second consiste en une différenciation cellulaire empêchant toute activité proliférative par la suite.

Au contraire, dans les tissus malins, la perte du contrôle de la prolifération cellulaire peut mettre en jeu l'inactivation des mécanismes de contrôle physiologique du cycle cellulaire (e.g. p53, Rb, p16 et autres inhibiteurs de cdk) ainsi que l'inactivation du récepteur ou de la chaîne de transduction de signaux antiprolifératifs comme dans le cas tu TGF β . Elle peut encore intervenir par l'échappement à la différenciation cellulaire finale notamment par la surexpression de la protéine Myc dont le complexe avec Max stimule la croissance au détriment de la différenciation induite par le complexe Mad-Max.

⇒ Leur résistance à la mort cellulaire programmée

Les cellules normales disposent de plusieurs systèmes capables de détecter des situations extra- ou intracellulaires anormales et d'émettre des signaux en conséquence dirigés vers les effecteurs de la mort apoptotique. Les situations extracellulaires sont jugées par des couples ligand/récepteur capables d'induire des signaux de survie (e.g. IGF-1, IGF-2/IGF-1R ou IL-3/IL-3R) ou des signaux de mort (e.g. FAS/FASR ou TNF α /TNF-R1). Les cellules tumorales échappent à l'apoptose par la sécrétion autocrine de facteurs de survie cellulaire (e.g. IGF-1, IGF-2, IL-3) et l'inactivation des récepteurs de facteurs de mort. A l'intérieur de la cellule tumorale, les détecteurs sont éveillés par des dérèglements comme les dommages de l'ADN, l'insuffisance de signaux de survie ou l'hypoxie et activent la voie apoptotique. Les protéines de la famille de Bcl-2 assurent ce rôle de gardien et comprennent des membres anti-apoptotiques (e.g. Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w) et des membres pro-apoptotiques (e.g. Bax, Bak, Bad, Bid, Bim). Ces protéines sont très souvent dérégulées dans les cellules tumorales.

⇒ Leur capacité de réplication illimitée

Lors de la réplication, on a observé qu'à chaque cycle cellulaire, chaque chromosome perdait entre 50 et 100 paires de bases d'ADN en son extrémité. Cette partie du chromosome, nommée télomère, est constituée de milliers de paires de bases répétant une petite séquence de six paires de bases. L'érosion progressive des télomères, à force de réplications, entraîne leur inaptitude à protéger la partie d'ADN codée du chromosome. Les extrémités chromosomiques

non protégées participent alors à une fusion de deux chromosomes conduisant irrémédiablement à la mort cellulaire.

Les cellules tumorales acquièrent une capacité de division illimitée par échappement à la mort par sénescence. L'immortalisation peut provenir de la dérégulation du gène de la télomérase, enzyme impliquée dans l'addition des séquences télomériques ou de l'activation de mécanismes alternatifs permettant la maintenance des télomères.

⇒ Leur capacité d'induire une néo-angiogenèse

La néo-angiogenèse est un processus physiopathologique clef de la progression tumorale. Elle intervient à une étape critique de la croissance de la tumeur. En effet, si dans les phases précoces de la croissance de la tumeur, les phénomènes de diffusion permettent l'alimentation de la tumeur en oxygène et nutriments (phases qualifiées d'avasculaires ou de quiescentes), lorsque la taille de la tumeur dépasse les 2 mm, le simple apport en nutriments par diffusion ne suffit plus. La tumeur entre alors dans une phase dite vasculaire ou angiogénique au cours de laquelle les cellules cancéreuses libèrent des stimuli en direction des vaisseaux sanguins proximaux du tissu hôte. Ces stimuli appellent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et le développement d'un nouveau réseau vasculaire autour de la tumeur^[26]. La formation des ramifications vasculaires rapproche les vaisseaux nourriciers et soutient la croissance de la tumeur. Elle favorise le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine et augmente donc les risques de formation de foyers métastatiques secondaires dans des organes éloignés. La densité de vascularisation tumorale a été associée à l'agressivité des tumeurs, mesurée par l'incidence des métastases et la survie des patients. En effet, de nombreuses études cliniques ont montré une corrélation entre la densité des micro-vaisseaux tumoraux, l'apparition des métastases, la rechute et le faible pronostic des patients.

⇒ Leur capacité d'invasion des tissus et de formation de métastases

La perte de molécules d'adhésion intercellulaires et, dans le même temps, la sur-expression anormale de molécules d'adhésion cellule/tissu interstitiel (e.g. les intégrines) confèrent aux cellules tumorales des propriétés inhabituelles de migration. Libérant par ailleurs des enzymes responsables de la dissolution de la membrane basale (e.g. collagénase, stromyélines, plasmine, cathépsines), les cellules tumorales envahissent peu à peu la membrane basale et pénètrent la membrane des capillaires lymphatiques et sanguins. Le déversement des cellules tumorales dans la circulation sanguine leur permet alors d'envahir des régions éloignées de l'organisme et d'y établir des foyers tumoraux secondaires

²⁶ J. Folkman. "Tumor angiogenesis." In : *The molecular Basis of Cancer*. Editors : J. Mendelson, P. M. Howley, M. A. Israel, L. A. Liotta; Philadelphia Saunders. **1995**, 206-232.

(métastases). L'extension métastatique concerne essentiellement les organes de filtration du volume sanguin et les sites de drainage habituels des organes : les poumons, le foie, les os et le cerveau sont les organes de localisation préférentielle des métastases. Le développement des métastases constitue la gravité du processus cancéreux. Contrairement à une tumeur localisée, un cancer diffus et généralisé est souvent au-delà de toute possibilité curative.

E. Inhibiteurs de Erbin

Erbin appartient à la famille des protéines LAP(LRR and PDZ) car c'est une protéine possédant deux domaines identifiables : LRR et PDZ. Les domaines PDZ sont impliqués dans les interactions mettant en jeu des assemblages de récepteurs membranaires, des canaux ioniques et d'autres molécules intervenant dans la transmission de signaux intracellulaires. Ils sont composés de six feuillets β antiparallèles et de deux hélices α . Quant aux domaines LRR (Leucine Rich Repeat), ils peuvent être à la fois intracellulaires et extracellulaires et font surtout partie de protéines impliquées dans les cascades de réactions intracellulaires. La famille des protéines internalines est la plus grande famille de protéines possédant des régions LRR. Ces régions y sont régulières, les répétitions étant constituées de 22 résidus et les protéines présentant entre 6 et 16 répétitions de ce type. Enfin, les feuillets β sont bien conservés tandis que les hélices α sont plus diversifiées.

La protéine Erbin (Erb-interacting protein) fut tout d'abord identifiée comme interagissant *via* son domaine PDZ avec la séquence EYLGLDVPV, cytoplasmique, du récepteur ErbB2. Des études complémentaires ont montré que l'interaction était beaucoup plus forte lorsque le résidu tyrosine n'était pas phosphorylé^[27,28].

D'autres études plus récentes ont montré que la protéine Erbin inhibait la transcription des récepteurs de l'acétylcholine, ce qui nécessite l'activation de Erk, suggérant ainsi que Erbin joue un rôle dans la régulation de l'activation de Erk. Comme nous l'avons décrit plus haut, Erk est une protéine faisant partie de la cascade de réactions intracellulaires MAPK. L'équipe de L. Mei a donc orienté ses recherches dans ce sens, montrant que Erbin régulait négativement la cascade Ras-Raf-MEK-Erk^[29]. Cette inhibition est dose-dépendante, et spécifique à l'activation de Erk, car Erbin n'a pas d'effet sur la cascade de réactions de la PI 3-kinase. Les chercheurs ont alors étudié la séquence de la protéine ayant un effet sur

²⁷ G. Birrane, J. Chung, J. A. A. Ladias. "Novel mode of ligand recognition by the Erbin PDZ domain." *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 1399-1402.

²⁸ N. J. Skelton, M. F. T. Koehler, K. Zobel, W. L. Wong, S. Yeh, M. T. Pisabarro, J. P. Yin, L. A. Lasky, S. S. Sidhu. "Origin of PDZ domain ligand specificity." *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 7645-7654.

²⁹ Y. Z. Huang, M. Zang, W. C. Xiong, Z. Luo, L. Mei. "Erbin suppresses the MAP kinase pathway." *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 1108-1114.

l'activation de Erk et ont trouvé que le domaine PDZ n'était pas impliqué. Au contraire, une délétion du domaine LRR entraînait la perte d'inactivation de Erk prouvant ainsi que le domaine LRR est responsable de cette régulation. Enfin, ils se sont intéressés à la protéine reconnue par Erbin dans la cascade de réactions et en sont arrivés à la conclusion que Erbin et Ras interagissaient ensemble, empêchant alors Ras et Raf d'interagir et bloquant ainsi la cascade de réactions et, *in fine*, la prolifération cellulaire.

Il apparaît que Erbin est une protéine extrêmement intéressante, capable de se lier à la fois au domaine cytoplasmique de ErbB2 lorsque celui-ci n'est pas phosphorylé et à la protéine Ras bloquant ainsi le système de signalisation MAPK. La synthèse de mimes des deux domaines de cette protéine serait donc extrêmement intéressante pour des applications thérapeutiques du cancer.

F. Représentation « visuelle » du test

Nous avons voulu rendre compte visuellement parlant de l'aspect de la plaque contenant les différents mélanges testés au cours des trois étapes de réaction.

⇒ Incubation des peptides inhibiteurs :

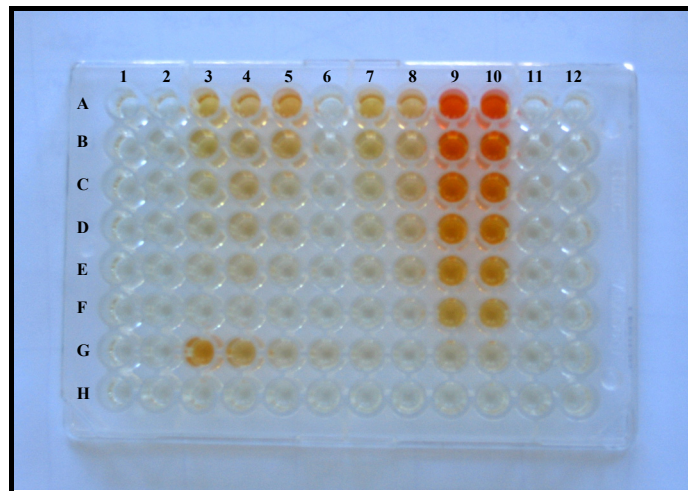


Figure 39 : Après une nuit d'incubation à 4°C.

Sur la Figure 39, la disposition des produits est la suivante :

- A-H 1 : Test négatif et bruit pour 1% DMSO ;
- A-H 2 et A-D 12: Test du bruit pour 10% DMSO ;
- E-H 12 : Test du bruit pour 10% DMSO ;
- A-F 3 et A-F 7 : Test du mélange RAFT_{2D}([15],[17]) ;
- A-F 4 et A-F 8 : Test du mélange RAFT_{2D}([16],[17]) ;
- A-F 5 et G 3-7 : Test du mélange RAFT_{2D}([14],[17]) ;

A-F 6 et H 3-7 : Test du mélange RAFT_{1D}([14],[15],[16],[17]) ;

A-H 9 et A-H 10 : Test du mélange RAFT_{2D}([14],[15],[16],[17]) ;

A-H 11 : Test du peptide de référence.

⇒ Révélation avec H₂O₂ et 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine :

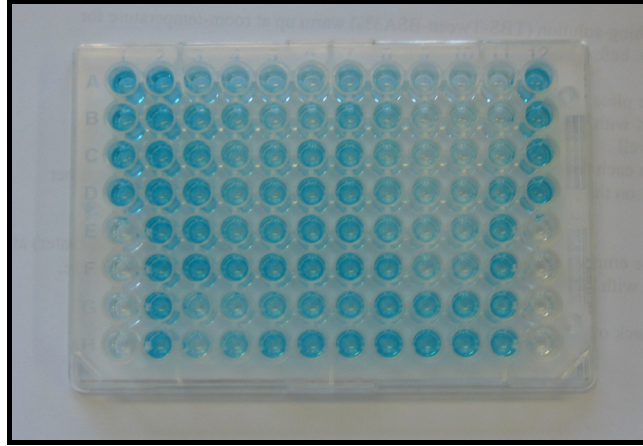


Figure 40 : Après ajout de H₂O₂ et 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine et huit minutes de réaction.

⇒ Quenching avec H₂SO₄ 10% :

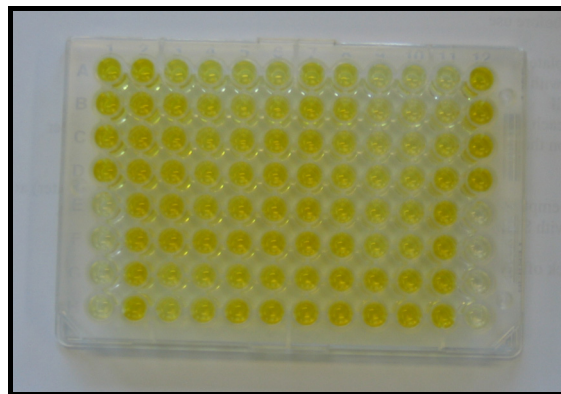


Figure 41 : Immédiatement après ajout de H₂SO₄ 10%

III. Perspectives : ciblage d'une enzyme, l' α -chymotrypsine

A. Importance de l'inhibition des protéases

Par exemple, J. S. Alexander *et coll.*^[30] ont étudié le rôle des protéases dans la maladie pre-eclampsia. Cette maladie touche les femmes enceintes ou venant d'accoucher en altérant les cellules du placenta. Elle a pour conséquence une croissance plus lente chez le bébé et une

³⁰ Y. Wang, Y. Zhang, D. F. Lewis, Y. Gu, H. Li, D. N. Granger, J. S. Alexander. "Protease chymotrypsin mediates the endothelial expression of P- and E-selectin, but not ICAM and VCAM, induced by placental trophoblasts from the pre-eclamptic pregnancies." *Placenta*, **2003**, 24, 851-861.

altération de certains organes comme le foie, le cerveau ou les poumons. Chez la mère, les symptômes sont de forts maux de tête, des vomissements, des problèmes de vision et des gonflements soudains du visage, des mains et des pieds. Cette équipe de chercheurs a ainsi testé des lignées de cellules placentaires normales et atteintes de cette maladie avec différents inhibiteurs de protéases. Il est ainsi apparu que les inhibiteurs de chymotrypsine bloquent la surexpression de la P-selectine et de la E-selectine des cellules placentaires malades suggérant ainsi que la chymotrypsine est responsable de la surexpression de la P-selectine et de la E-selectine dans les cellules endothéliales.

ANNEXE V

-

**VALORISATION DES COMPETENCES – UN NOUVEAU
CHAPITRE DE LA THESE**



Valorisation des compétences – un nouveau chapitre de la thèse

Prénom, Nom du doctorant : Sophie, Plé

Ecole doctorale : Chimie – Sciences du Vivant

Nom du "mentor" : Jean-Christophe Klein

Sujet de thèse :

"Synthèse et étude de mimes de surfaces d'interaction protéine-protéine sur châssis spatialement adressable par voie d'assemblage combinatoire".

Nom du directeur de thèse : Pr. P. Dumy

Date probable de soutenance : Jan. 2006

I. Cadre général et enjeux de ma thèse

A. Présentation succincte

"Synthèse et étude de mimes de surfaces d'interaction protéine-protéine sur châssis spatialement adressable par voie d'assemblage combinatoire."

Mon travail de thèse se situe à l'interface entre la synthèse organique et la biologie et s'intéresse tout particulièrement aux interactions protéine-protéine. Ces dernières jouent un rôle central dans l'essentiel des processus biologiques comme les échanges inter- ou intracellulaires ou les régulations hormonales par un fonctionnement de type clef-serrure. Ainsi, si la clef et la serrure sont adaptées dans l'espace et s'il y a autant de clefs que de serrures disponibles, tout devrait fonctionner normalement. En revanche, si l'on modifie la géométrie de la clef par exemple, cette dernière ne sera plus capable d'entrer dans la serrure ou tout au moins de la faire fonctionner correctement. Ceci peut alors se traduire par des dérèglements hormonaux ou des surcroissances cellulaires à l'origine des cancers.

Ainsi ces dysfonctionnements peuvent-ils toucher une part importante de la population. Face à cela, les laboratoires de recherche, en collaboration avec l'industrie et appuyés par l'état, tentent de trouver de nouvelles approches à visées thérapeutiques. L'état met chaque année des moyens colossaux à la disposition des laboratoires de recherche universitaires (346 millions d'euros en 2005) qui publient de nombreux articles décrivant leurs avancées en la matière et effectuent des essais clinique sur les molécules biologiquement actives. On estime à une cinquantaine le nombre de médicaments présents sur le marché actuel de la thérapie anticancéreuse.

Mon sujet de thèse s'appuie sur différentes techniques novatrices (châssis multivalent augmentant la reconnaissance, approche combinatoire) et présente tout d'abord l'enjeu scientifique de valider l'idée première de l'approche et de démontrer sa faisabilité. D'autre part, comme je l'ai évoqué plus haut, ce travail de recherche peut conduire à des molécules biologiquement actives pouvant entrer dans la lutte contre le cancer ce qui présente donc un enjeu sociétal majeur.

Pour ces études, plusieurs cibles concrètes ont été choisies. Le fait de pouvoir produire des molécules inhibant ces cibles serait un résultat important sortant ainsi ce travail d'un cadre strictement fondamental.

B. Ma thèse dans son contexte

Le laboratoire dans lequel j'effectue ma thèse appartient au **Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité (LEDSS)** qui compte 6 équipes de chercheurs en : chimie organique (LEDSS I, III et IV), chimie biomimétique (LEDSS II), chimie théorique (LEDSS VI) et chimie bioorganique (LEDSS V). Ce bâtiment compte ainsi plus d'une centaine de personnes permanentes et en moyenne une trentaine d'étudiants en thèse.

Le LEDSS V dont je fais partie, développe essentiellement trois grands axes de recherches qui sont les peptides, les oligonucléotides et les acridines. Je travaille ainsi dans le domaine des peptides qui fut initié avec l'arrivée du Pr. P. Dumy en 1998. La technique d'assemblage combinatoire de peptides constitue en revanche une nouveauté pour le laboratoire qui ne subit pas de concurrence majeure pour cette approche aussi bien sur le plan national qu'international.

Afin de mener à bien ce projet, il m'a été permis d'utiliser d'importants moyens matériels :

- 1 lyophilisateur pour la lyophilisation de l'eau ;
- 2 CLHP semi-préparatives pour la purification des produits ;
- 2 CLHP et 1 appareil de masse ESI et LC-MS pour l'analyse des produits.

D'autre part, j'ai eu accès à deux salles d'ordinateurs, la première mise à disposition de tous les étudiants de l'équipe (5 Macintosh et 1 PC) et la seconde à disposition de tout le bâtiment (5 PC). Ces ordinateurs possèdent les licences utiles pour effectuer des recherches bibliographiques, traiter nos données ou rédiger.

Pour ce travail et outre les discussions avec mon directeur de thèse, j'ai pu bénéficier d'un travail en équipe avec deux doctorants pendant une année alors que je me trouvais en première puis en dernière année de thèse. D'autre part, un maître de conférence suit quotidiennement l'avancée de mes travaux depuis le début de ma troisième année.

Enfin, l'équipe dans laquelle je travaille peut être considérée comme étant dynamique au vu de ses nombreux travaux en collaboration. Outre les collaborations inter-LEDSS, mon équipe collabore avec une équipe du Commissariat pour l'Energie Atomique (CEA) de Grenoble pour effectuer de l'électrochimie ; le **Laboratoire Européen Associé (LEA)** situé à Bruxelles pour ses études sur le ruthénium ; cinq laboratoires de biologie : l'**Institut Albert Bonniot (IAB)** de Grenoble ; l'**Institut Curie Recherche** à Orsay (études de cytotoxicité) ; l'**Université de Heidelberg** en Allemagne (études sur le paludisme) ; l'**Institut de Recherche sur le Cancer de Lille** (études d'inhibitions enzymatiques) et le laboratoire du Pr. Millar à **Edinburgh** en Ecosse (études hormonales). D'autre part, mon équipe fait partie du "Centre

Franco-Indien de Synthèse Organique" (CFISO) qui constitue un réseau national de collaborations avec l'Indian Institute of Science de Bangalore en Inde.

C. Moi dans ce contexte

La raison principale pour laquelle j'ai voulu poursuivre mes études avec une thèse est que j'ai beaucoup aimé effectuer le projet de recherche sur lequel j'ai du travailler lors de mon Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA). J'ai effectué ce stage dans un laboratoire de recherche en chimie pharmaceutique de l'Université de Würzburg en Allemagne. Il s'agissait d'une synthèse organique multi étapes d'un produit naturel possédant une forte activité toxique vis-à-vis des larves de moustiques responsables de la propagation du paludisme. Les différentes expériences et résolutions de problèmes m'ont fortement intéressée, mais ce travail restait encore trop éloigné de la biologie. Ainsi ai-je voulu effectuer par la suite un travail de recherche à l'interface chimie et biologie. Différents laboratoires répondaient à mes attentes dont le laboratoire du Pr. P. Dumy au sein de la région Rhône-Alpes. Ayant effectué mon DEA à l'étranger, la nécessité de trouver un financement est apparu comme déterminant dans le choix final du laboratoire de recherche.

II. Déroulement, gestion et coût de mon projet

A. Préparation et cadrage du projet

Le projet de ma thèse fait partie d'une Action Concertée Incitative (ACI) acceptée par le Ministère de la Recherche (150000 € sur 3ans). Il met en jeu la participation de nombreux laboratoires de recherche complémentaires dans leurs spécialités. Ainsi, lors de la préparation de ce projet, les facteurs risques ont été évalués et limités. On a, par exemple, dû me former aux méthodes spécifiques du laboratoire. Ceci a pu être réalisé grâce à la contribution, en particulier, de la doctorante avec laquelle j'ai débuté ce travail de recherche mais aussi grâce à l'aide et la disponibilité de l'ensemble du personnel présent au laboratoire. Face à cela, nous avons estimé les facteurs de succès afin de mener à bien ce projet. On peut prendre ici en compte le fait que les produits centraux avec lesquels j'ai été amenée à travailler constituent l'une des spécialités du laboratoire, que ce sujet s'englobe dans une thématique présente depuis quelques années dans notre groupe sur laquelle travaillent des personnes compétentes. D'autre part, l'apport financier sur trois années dont les laboratoires ont bénéficiés auprès du Ministère de la Recherche ont été d'un grand recours...

D'autre part et dans le but de tester les molécules actives que j'aurai synthétisées, le laboratoire a pris contact avec un homologue parisien et un laboratoire écossais situé à Edinburgh.

Enfin, étant donné que nous ne travaillons pas sur des modèles animaux, les problèmes d'éthiques ne se sont pas encore posés. Par ailleurs, ce travail n'est pas soumis à des clauses particulières de confidentialité.

B. Conduite du projet

Dans ce paragraphe, je développerai plus précisément les différentes étapes de réalisation de ma thèse au cours de ces trois ans de projet.

Après avoir pris connaissance du sujet, j'ai imaginé différentes séquences peptidiques à élaborer et la façon dont il faudrait les assembler pour obtenir de bons résultats. En effet, il a fallu tout d'abord créer plusieurs séquences en veillant à obtenir des produits qui seraient par la suite reconnus par des cibles biologiques. La formation de ces macromolécules d'intérêt nous est apparue comme étant plus efficace en utilisant la technique combinatoire. J'ai ainsi réalisé les synthèses que nous avons décidées et ai dû ensuite procéder à l'identification précise des produits obtenus. Par la suite, ces derniers furent testés biologiquement.

Après un premier bilan, nous nous sommes rendus compte qu'il fallait élargir le sujet. En effet, les tests biologiques ne furent pas aussi positifs que nous l'avions escompté. Afin d'obtenir de meilleurs résultats, j'ai donc envisagé de réaliser de nouveaux peptides, moins ciblés, afin de me permettre de travailler sur une plus large gamme de cibles tout en étant efficace.

Après avoir de nouveau eu recours à la bibliographie, j'ai imaginé différentes séquences aux propriétés complémentaires une fois assemblées. Ainsi, les produits qu'il sera possible d'obtenir présenteront une plus grande flexibilité de reconnaissance biologique. J'ai donc décidé de réaliser ces nouvelles molécules.

L'organisation du travail s'est faite en présence d'un nouveau doctorant qui s'est focalisé sur une mise au point de synthèse et de purification de certains produits tandis que j'effectuais une autre partie de synthèse, de caractérisation et de tests. Ces derniers travaux furent importants car ils ont permis de réaliser de meilleures caractérisations des produits et des tests biologiques complémentaires encourageants.

Enfin, ce travail s'est achevé par la rédaction du manuscrit de thèse récapitulant l'ensemble des travaux réalisés et mettant en lumière l'orientation que le projet doit prendre dans un proche futur.

C. Evaluation et prise en charge du coût de mon projet

Afin de mener à bien ce projet, j'ai bénéficié de nombreuses aides. Aides en ressources humaines tout d'abord par le biais de discussions, de synthèses, de commandes de produits par exemple. Bien évidemment, ces activités en laboratoire ont un coût en produits commerciaux, en matériel et en analyse des produits obtenus. Ce sont ces différents coûts sur trois années que résumant les deux tableaux et le schéma suivants :

✿ Coût en ressources humaines :

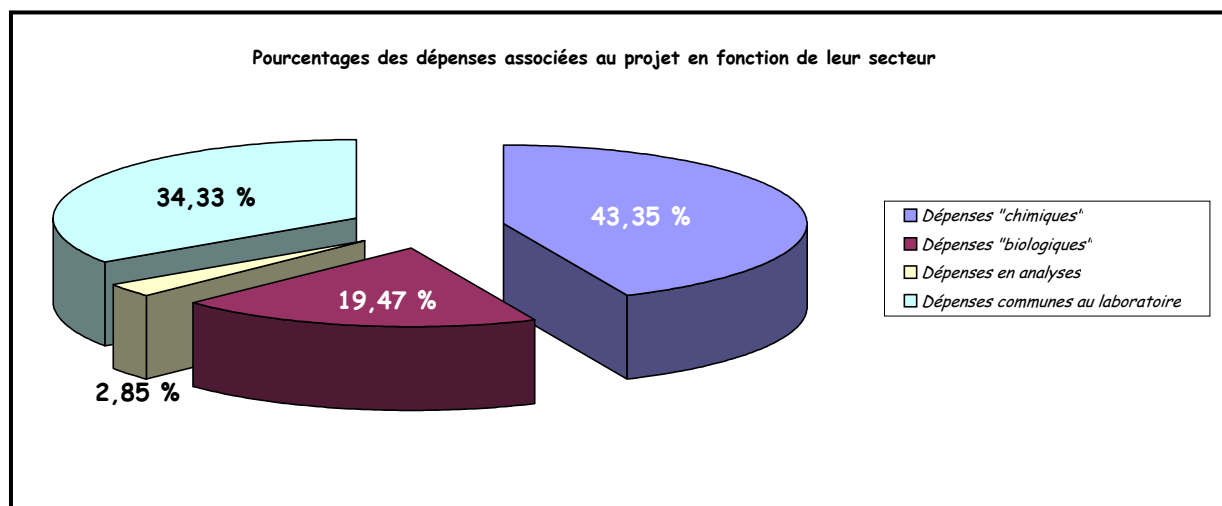
Fonction	Temps passé au projet	TOTAL (€)
Directeur de thèse	10 % pendant 3 ans	23587,20
Maître de Conférences	33 % pendant 1 an	12196,80
Moi-même	100 % pendant 3 ans	91443,24
Doctorante 3 ^{ème} année	100 % pendant 1 an	30481,08
Doctorant 1 ^{ère} année	75 % pendant 1 an	22860,81
Technicien	1% pendant 3 ans	873,23
Technicienne	1% pendant 3 ans	1149,39
Secrétaire I	1% pendant 3 ans	1037,36
Secrétaire II	1% pendant 1,5 ans	470,21
Secrétaire III	1% pendant 1,5 ans	433,22
		184532,54

✿ Coût annuel en dépenses associées :

Dépenses "chimiques"		Dépenses "biologiques"		Dépenses en analyses		Dépenses en matériel	
Nature	Coût (€)	Nature	Coût (€)	Nature	Coût (€)	Nature	Coût (€)
						Papeterie	1516,55
						Technique	3598,36
TOTAL	6459,38	TOTAL	2901	TOTAL	424,50	TOTAL	5114,91
							14899,99

Comme je l'ai expliqué plus haut, mon projet s'inscrit dans le cadre d'une ACI (Action Concertée Incitative) et bénéficie ainsi de subventions sur trois années. Celles-ci sont

allouées par le Ministère de la Recherche et s'élèvent à 150000 euros pour notre laboratoire. Dans le cadre du mode de fonctionnement au laboratoire et selon les allocations fixées par le ministère en fonction du poste du chercheur, 3,26 % de cette somme soit 4892,37 € auraient dû être utilisés pour ce projet. Pour ma part, j'ai bénéficié d'une somme dix fois supérieure. Les autres dépenses furent couvertes par différents contrats et autres subventions. On peut ainsi déterminer les différents pourcentages d'utilisation de ce capital pour les dépenses associées au projet comme le montre le graphique ci-dessous.



III. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles illustrées par des exemples

Je crois avoir bénéficié d'une formation importante lors de ces trois années de travail en laboratoire. Tout d'abord du point de vue scientifique bien sûr mais aussi du point de vue humain par le biais du travail en équipe et du fait qu'il m'a aussi fallu apprendre à travailler et prendre des décisions seule.

Du point de vue scientifique, je crois avoir beaucoup appris dans le domaine de la synthèse peptidique sur support solide et des méthodes d'analyse qui sont propres à ce mode de synthèse. Lorsque je suis arrivée au laboratoire, je n'avais subi qu'une vague formation en biochimie lors d'un cours suivi l'année précédente au sein de l'Institut de Pharmacie de Würzburg en Allemagne. Lors de ce cours, seules la séquence des acides aminés et la particularité de la liaison peptidique avaient été abordées. Lorsque j'ai commencé ma thèse, il m'a donc fallu assimiler rapidement les techniques de synthèse, de purification et d'analyse des produits propres à cette partie de la chimie.

J'ai aussi appris à me servir d'un spectromètre de masse afin de pouvoir analyser moi-même les bibliothèques de produits plus rapidement. D'autre part, j'ai eu recours à

l'utilisation d'un synthétiseur automatique de peptide. J'ai ainsi appris à l'utiliser, le programmer mais ai aussi rédigé un guide d'utilisation qui se trouve en annexe de ce manuscrit.

Outre le travail de synthèse et d'analyse des produits aussi bien en pureté que statistique, j'ai dû réaliser différents tests sur ces bibliothèques. Etant de formation chimiste organicienne, il m'a donc fallu comprendre et assimiler les techniques de test par chromatographie d'affinité, test sur gel ou test ELISA puis effectuer ces tests moi-même.

Une fois les tests réalisés et malgré certains résultats peu encourageants, d'autres tests ont donné des résultats qu'il a fallu analyser et sur lesquels il a fallu conclure concernant l'activité de telle ou telle molécule ou bibliothèque de molécules.

D'autre part, compte tenu des importantes responsabilités de mon directeur de thèse, il m'a fallu me rendre très rapidement autonome sur le sujet. Je pense que cette façon de fonctionner me fut assez difficile au début car j'ai dû apprendre à tenter certaines expériences en ne sachant pas si l'orientation que je prenais était la bonne... Je pense malgré tout que ma formation fut plus complète grâce à cette méthode. Par ailleurs, ce sujet de thèse était nouveau au moment où je suis arrivée au laboratoire, j'ai donc dû travailler sans bénéficier de premiers résultats d'autres chercheurs. Ce travail fut de cette manière plus difficile encore mais je crois que nous pouvons considérer que nous avons atteint les objectifs que nous nous étions fixés.

Du point de vue humain et relationnel, je pense aussi avoir beaucoup appris du travail en équipe. En effet, sa réussite dépend de l'équilibre entre des offres et demandes de services, entre discussions et collaborations. Je pense m'être ainsi améliorée dans la demande d'aide et de conseils auprès des personnes qualifiées, chose que je n'osais pas forcément au début par peur de déranger. En revanche, je pense avoir été active pour les tâches communes au bon fonctionnement du laboratoire comme le remplissage des solvants ; la vidange des pompes ; le lancement de l'injecteur automatique en CLHP ou simplement le service rendu de façon individuel, tentant ainsi de garder une atmosphère détendue entre chacun des chercheurs.

D'autre part, le fait de travailler dans un milieu où l'essentiel de nos lectures se fait en anglais et où la plupart des stagiaires post-doctorants sont étrangers et doivent communiquer en anglais m'a permis d'augmenter mes capacités à m'exprimer dans cette langue. J'ai aussi eu la chance de devoir effectuer des tests, aidée d'une stagiaire allemande, ce qui m'a également permis d'entretenir mon niveau.

En plus de mon travail de recherche au laboratoire, il m'a été permis d'effectuer des heures d'enseignement en tant que vacataire lors de mes deux dernières années de thèse, en IUT Mesures Physique 1^{ère} année puis en chimie organique niveau Licence 2^{ème} année. Cette

expérience d'encadrement et d'explications fut très enrichissante dans le sens où j'ai pris conscience que je pouvais jouer un rôle dans la transmission du savoir d'une part et d'autre part que *via* mon expérience de chercheur, je pouvais donner le goût de la biochimie à des étudiants qui n'étaient pas initialement motivés par cette matière.

En outre, au sein de notre école doctorale, nous avons obligation de suivre des formations, qu'elles soient directement en liaison avec notre sujet de recherche ou transversales. J'ai ainsi pu avoir accès à différents enseignements comme l'étude des macromolécules à l'aide du synchrotron qu'il m'a d'ailleurs été permis de visiter ; une introduction à l'immunologie ; à l'étude des planètes, comètes et astéroïdes ; étudier et mieux comprendre le repliement des protéines et me pencher sur des problèmes d'éthique. D'autre part, afin de mieux pouvoir trouver un emploi après avoir soutenu ma thèse, j'ai suivi une formation CIES de recherche d'emploi et j'ai tenu à effectuer la "Valorisation des compétences – un nouveau chapitre de la thèse".

Enfin, j'ai pris part au quatrième congrès franco-italien nommé **Franco-Italian Meeting on Organic Chemistry (FIMOC IV)** lors duquel j'ai pu présenter l'avancée de mes travaux par le biais d'un poster en 2004. Et cette année, lors de la journée de la **Société Française de Chimie (SFC)** nous avons également pu proposer un nouveau poster. Ceux-ci sont tous deux présentés en annexe de ce rapport de thèse.

IV. Résultat, Impact de la thèse

Pour le laboratoire, je pense que mon travail de thèse a permis de commencer à utiliser une nouvelle technique de synthèse qui est l'assemblage combinatoire de motifs sur un châssis. Jusqu'à présent, seuls des motifs peptidiques furent utilisés lors de cette étude, mais l'on peut tout à fait envisager l'utilisation d'autre molécules produites par les autres sous-groupes de notre laboratoire par exemple. D'autre part, lors de la fin de ma thèse, un étudiant en première année a débuté son sujet en me secondant. Il est tout à fait envisageable qu'il prendra donc sinon la suite de mon sujet, la suite de l'étude combinatoire qu'englobait mon sujet. Enfin, ce travail s'effectuant en collaboration avec de nombreux laboratoires, et si ces études mettent en évidence la présence de molécules biologiquement actives au sein d'une ou plusieurs des bibliothèques synthétisées, il faudra par la suite identifier ces molécules et les produire en plus grand nombre afin de pouvoir mieux les tester et peut-être envisager des essais cliniques.

En ce qui me concerne, je dois tout d'abord dire que ce travail m'a passionnée pendant ces trois années. Il y a bien sûr eu des moments difficiles, de fatigue et de besoin de souffler, mais globalement, ces trois années correspondent à ce que j'attendais lorsque j'ai débuté ma thèse. Tout particulièrement, c'est le changement d'activité qui m'a plu. En effet, lors de ce travail de thèse, j'ai dû alterner plusieurs fois entre la synthèse de produits et leurs tests d'activité biologique. Je crois donc qu'en outre toutes les capacités intellectuelles que cette thèse a pu me faire développer, elle a contribué aussi au fait que je souhaite par la suite m'orienter vers un poste alliant tous ces aspects. Mon projet professionnel est donc un poste de recherche et développement en entreprise pharmaceutique ou cosmétique. Mon souhait dans cet emploi serait de pouvoir travailler en variant différentes choses. Tout d'abord, avoir un poste mobile, que ce soit sur le plan national ou international, ayant donc un aspect relationnel fort et me permettant de mettre à profit mes connaissances en langues étrangères. D'autre part, je vois mon projet professionnel à long terme se placer à l'interface entre la chimie, la biologie et la biochimie car ce sont différents domaines d'activité qui me passionnent. Je fais d'ailleurs évoluer mes études dans ce sens afin d'acquérir les formations nécessaires pour être compétente dans ces divers domaines. Enfin, je souhaite réaliser une évolution vers des fonctions alliant recherche et management.

C'est dans ce but que j'ai déjà commencé une recherche d'emploi active par le biais des annonces de l'ABG (entreprise à Paris, Institut Pasteur, CEA) vers des postes d'ingénieur dans le domaine de l'analyse protéique mais aussi vers des stages post-doctoraux plus spécialisés dans la biologie moléculaire.

ANNEXE VI

-

PUBLICATION



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

C. R. Chimie 8 (2005) 833–839



<http://france.elsevier.com/direct/CRAS2C/>

Account / Revue

Template-directed combinatorial surface assembly for protein–protein interaction mimetics

Sophie Plé, Mélanie Figuet, Pascal Dumy *

LEDSS-UMR5616, ICMG-FR 2607, université Joseph-Fourier, 301, rue de la Chimie, BP53, 38041 Grenoble cedex 9, France

Received 2 November 2004; accepted after revision 17 December 2004

Available online 11 March 2005

Abstract

We propose to develop an approach that may easily provide potentially complementary surfaces with a given recognition interface by assembling chemical groups to a scaffold in a combinatorial manner. In that way, we here present the concept of template-directed combinatorial surface assembly. The principle of the approach, the synthesis of libraries and the methods used to characterize the mixture of peptides obtained are described. Preliminary recognition tests towards avidin showed that some of the mixtures displayed affinity. These first results can be considered as the proof of concept of our approach. **To cite this article:** *S. Plé et al., C. R. Chimie 8 (2005).*

© 2005 Académie des sciences. Published by Elsevier SAS. All rights reserved.

Résumé

Dans le cadre de nos activités de recherche portant sur les interactions protéine–protéine, nous proposons de développer une approche permettant d'obtenir facilement des surfaces potentiellement complémentaires d'interface de reconnaissance par assemblage combinatoire de différents groupes de molécules sur un châssis. Pour cela, nous présentons ici le concept d'assemblage de surfaces sur châssis par voie combinatoire. Nous décrivons ainsi le principe de l'approche, la synthèse des différentes banques de produits ainsi que les méthodes utilisées pour caractériser les mélanges de composés ainsi obtenus. Les premiers tests d'affinité avec l'avidine sont encourageants et apportent la démonstration de principe de la validité de notre approche. **Pour citer cet article :** *S. Plé et al., C. R. Chimie 8 (2005).*

© 2005 Académie des sciences. Published by Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Protein–protein interactions; Scaffold; Combinatorial chemistry; Surface complementarity

Mots clés : Interactions protéine–protéine ; Châssis ; Chimie combinatoire ; Surface d'interaction

* Corresponding author.

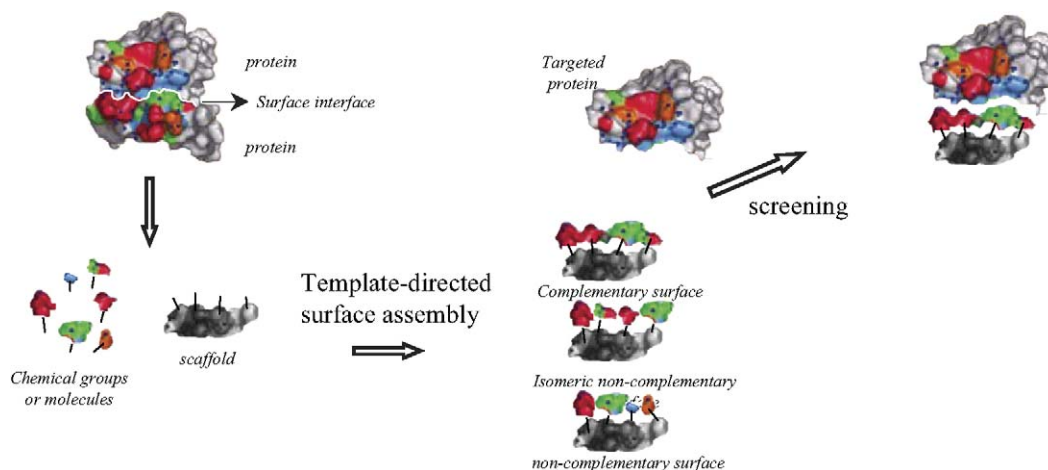
E-mail address: pascal.dumy@ujf-grenoble.fr (P. Dumy).

1. Introduction

There is growing interest in understanding and manipulating protein–protein interactions due to their central importance in many biological processes. Protein–protein interactions are known to play a critical role in the normal function of cellular/organelle structure, immune response, protein enzyme inhibitors, signal transduction, and apoptosis. Rational approaches towards the recognition of protein surfaces may provide better insights into how proteins exactly interact with one another and is an alternative to enzyme inhibitor design as a molecule-based disease therapy [1]. Functional group presentation on the surface of a protein is primarily divergent in nature. In binding protein surfaces, designed molecules must account for the extensive solvation of the protein surface, as well as its topology. Tight binding, therefore requires the involvement of large surface areas and multiple points of functionality. Numerous recent works show that these contact interfaces [2] (functional epitopes) are relatively small (8–12 residues), flat and that the binding affinity and the selective recognition highly depend on precisely located ‘hot spots’ [3], mostly solvent buried [4] and discontinuous, as well as on the plasticity of these interfaces. Despite important breakthrough, most notably in algorithm developments, reliable predictions of these interfaces remain elusive. New experimental approaches are necessary for the search of potential ligands. One of the present difficulties in the design of compounds targeting the surface interface is related to the nature, the size and the orientation of the substitu-

ents. Nowadays, no global approach allows the rational design of such molecules. However, combinatorial approaches have shown that small peptides can efficiently produce good complementary interface for the protein–protein contact surface [5,6]. Natural products such as cyclosporine, FK506 and rapamicine also display contact interfaces, which have been redesigned to alter their binding to cyclophilin or FK506-binding protein respectively [7,8]. We here propose a new approach that may easily provide potentially complementary surface with a given recognition interface. This approach (template-directed combinatorial surface) is founded on the concept of scaffold for tethering and directing chemical groups or molecules as recognition elements (hot spots), whose assembly provides modular molecular surface complementary to targeted binding interfaces (Scheme 1).

This methodology allows to generate various types of surfaces as functional epitopes, in a combinatorial and/or sequential manner, from a subset library of functional groups and molecules that are independent from a structural point of view. It may provide a more global and more precise system to explore targeted surfaces by varying the nature of the scaffold and by adapting in an iterative manner the number and the diversity of the ligands assembled on the scaffold. For instance, from a given scaffold class and a given chemical strategy, the number of sites and the relative geometry can be varied (e.g. n elements on 4 attachment sites $\Rightarrow n^4$ combinations) directly or by amplification following the dendrimer growing principle (e.g. n elements on 4 sites + 4 amplifications $\Rightarrow n^{16}$ combinations).



Scheme 1. Template-directed combinatorial surface assembly principle.

This concept also allows the exploration of discontinuous surface complementarity, which is still difficult to address with classical approaches. In particular, tethering of functional epitopes to a scaffold may help to circumvent the problem of secondary and tertiary structures practiced by proteins to direct hot spots in the correct topology. A multi-entry combinatorial exploration (e.g., within the recognition elements and relative to their repartition on the scaffold) is allowed to adjust and refine the recognition. One can expect from this flexibility to be able to select a molecule capable of distinguishing its target between homologous proteins whose active sites only differ by few amino acids. Furthermore, our approach is evolutive because it will benefit from a *directed chemical evolution* of the hits through iterating of the selection process as well as the choice of the chemical nature of the recognition elements by analogy with phage display screening.

2. Results and discussion

At the crux of the approach is the linking of different components onto the scaffold, which has to be highly efficient as well as versatile (e.g. compatible with a large molecular functionalities). We selected the oxime bond as a chemoselective ligation tool between an oxyamine function and an aldehyde. This ligation technique is highly efficient, compatible with a wide variety of chemical functions and allows the oxime bond formation between unprotected fragment without any coupling reagent and with minimal chemical manipulation [9,10]. We selected Regioselectively Addressable Functionalized Template (RAFT) as a suitable scaffold to direct the combinatorial assembly of the components on one face and to present a reporter group on other face for detection purpose [11,12]. RAFT molecules represent topological cyclic decapeptides containing orthogonally protected attachment sites pointing to opposite faces of the template backbone that are chemically accessible at the gram scale. They display

homogeneous conformation control that has been successfully exploited for protein mimicry [13,14] or surface functionalization [15,16]. In addition, we recently [11,17] reported the successful chemoselective oxime assembly of amino-oxy-carbohydrates or cyclopeptide to RAFT molecule for the presentation of recognition motifs clusters to direct independently and separately the ligands as well as the reporter groups [11,12].

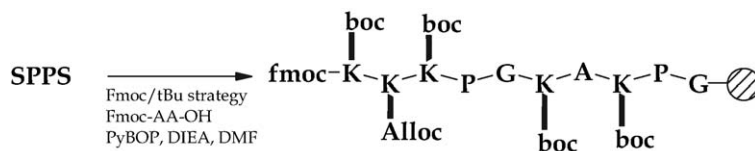
2.1. Synthesis of the RAFT

Synthesis of the RAFT scaffold is performed on the G-Sasrin[®] resin using the Fmoc/*t*Bu strategy [18] (Scheme 2). Glycine at C-terminal end was essential to secure the subsequent cyclization step with the N-terminal lysine α -amino group without epimerization.

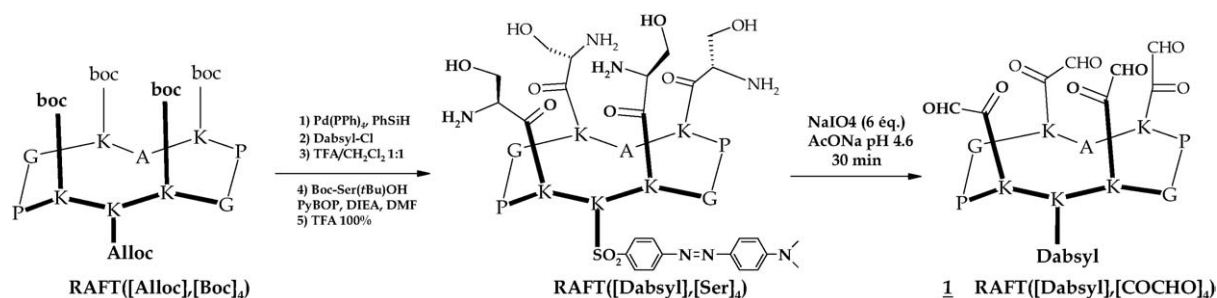
After deprotection of the N-terminal Fmoc protecting group and mild acid cleavage of the resin, the peptide is cyclized [11] in solution in 82% yield. The Alloc protecting group is removed using the well-established Pd⁰/PhSiH₃ procedure [19] and the corresponding free Lysine side-chain sulfonylated with dabsyl chloride in 76% yield. Then, the remaining Boc-protected Lysine side-chains were smoothly cleaved with 50% trifluoroacetic acid in dichloromethane at room temperature and the corresponding amino groups coupled with BocSer(O*t*Bu)OH (Scheme 3) as glyoxylaldehyde precursors. Removal of the Boc/*t*Bu groups was achieved quantitatively by treatment with TFA. Oxidative cleavage of the amino-alcohol moiety of seryl residue with sodium periodate [20] afforded the desired four *N*^ε-glyoxylyl-lysyl containing cyclodecapeptide **1** in 51% overall yield after RP-HPLC purification.

2.2. Design and synthesis of the ligands

As a paradigm, we chose to target the avidin protein surface in order to validate the template-directed combinatorial surface assembly concept and to study the combinatorial ligations on the RAFT-scaffold. Several



Scheme 2. Linear peptide synthesis of the RAFT.



Scheme 3. Dabsyl-functionalization of the RAFT.

streptavidin or avidin binding peptides exhibiting high affinity were isolated using chemical as well as biological combinatorial approaches. From these peptide sequences, we designed four different linear and negative charged-bearing peptides, functionalized with an amino-oxy function for assembly [21].

The four peptide sequences were synthesized via a solid-phase strategy using a Fmoc/*t*Bu chemistry. Those were designed to be of different lengths in order to have different masses and retention times affording an easier detection (HPLC or ES-MS). Moreover, all N-terminal peptide sequences were ended with a glycine residue to provide an identical reactivity during the oxime bond formation and thus avoid such a bias during the generation of the libraries (Scheme 4).

2.3. Study of the combinatorial formation of oxime ligation on a scaffold

In our study, we assembled four different peptides to the four attachment sites of the RAFT scaffold through oxime bond formation. This provided theoretically 256 different molecules. This mixture could be differentiated in four subsets according to the following peptide combinations: one subset containing the four assemblies presenting only one peptide (e.g. RAFT([peptide-*i*]₄)); one subset containing the 84 combinations of the RAFT presenting two different peptides (e.g. RAFT([peptide-*i*], [peptide-*j*])); one subset containing the 144 combinations of the RAFT presenting three different peptides (e.g. RAFT([peptide-*i*], [peptide-*j*], [peptide-*k*])) and one subset containing the 24 combinations of the RAFT presenting four different

peptides (e.g. RAFT([peptide-*i*], [peptide-*j*], [peptide-*k*], [peptide-*l*])).

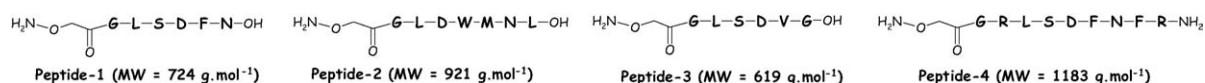
We synthesized the four-peptide-library (one experiment, 256 molecules) and all the possible sub-libraries were then obtained by combining the peptides by 1 (four experiments, one molecule by experiment), 2 (six experiments, 16 molecules by experiment) and by 3 (four experiments, 81 molecules by experiment) (Scheme 5).

Scheme 6 presents an example of one of the simplest libraries containing one component (here peptide-1). This reaction allowed us to set up the best reaction conditions for the oxime coupling, e.g. 6–24 eq. of the amino-oxy peptide to consume all the amount of RAFT present in the reaction medium and make it easier the purification of the mixture after completion of the reaction. An ammonium acetate buffer was chosen and the reaction lasted on average 24 h at r.t.

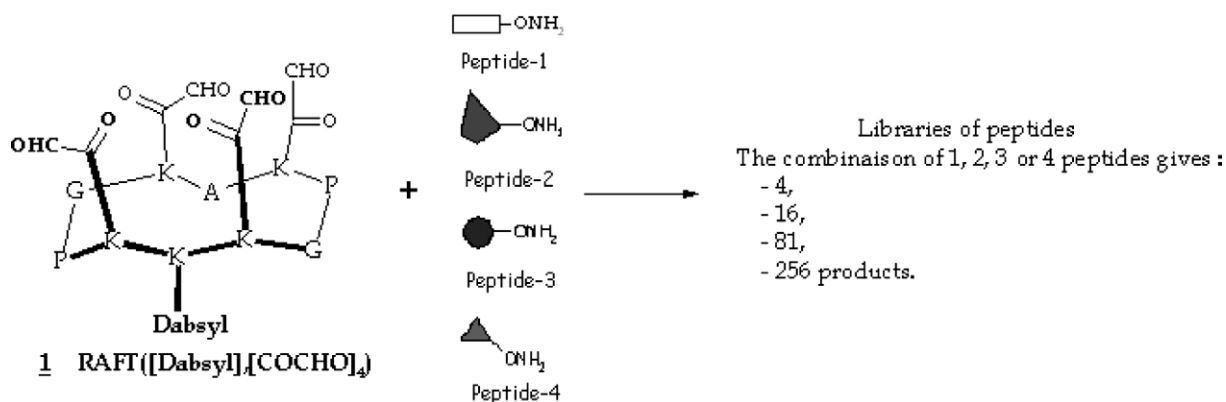
In that way, it was possible to quickly synthesize all the 15 possible combinations (Scheme 5), which could be obtained by combining the four different peptides with 1.

2.4. Characterization of the coupling reaction

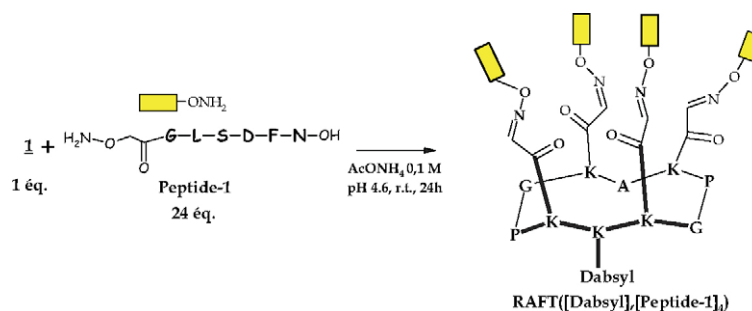
For a better clarity, we present here an illustrative case of library based on the assembly of two components, namely peptide-1 and peptide-3. It is anticipated to obtain 16 different molecules overall corresponding to all the possible compositions statistically possible by assembling the peptides on the RAFT. These molecules can be distributed into five subsets according to their compositions in peptides assembled onto the RAFT molecule:



Scheme 4. The four designed peptides.



Scheme 5. The different libraries synthesized.



Scheme 6. An example of the product of a reaction through chemoselective ligation.

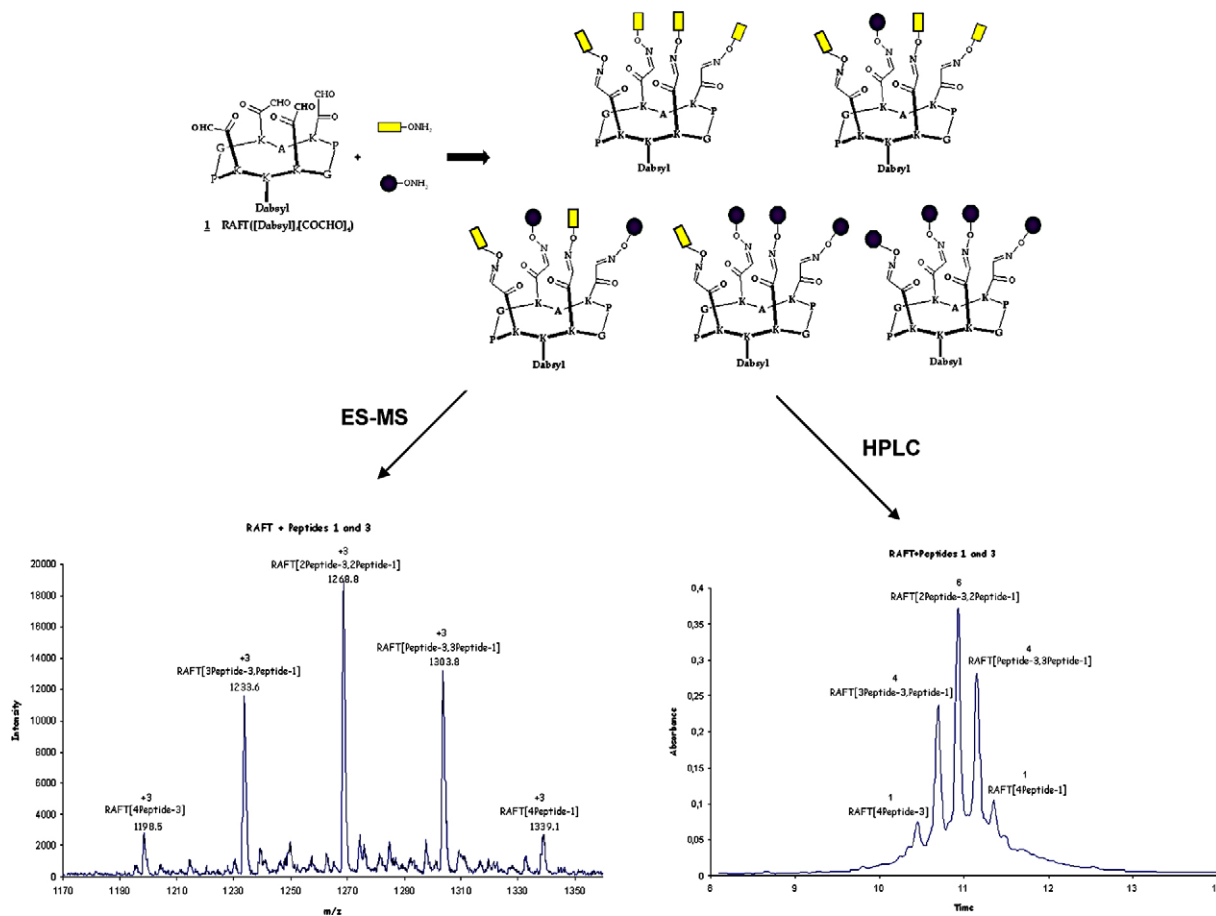
- two subsets, corresponding each to either peptide-1 or peptide-3 assembled alone on the RAFT, namely $\text{RAFT}[(\text{peptide-1})_4]$ and $\text{RAFT}[(\text{peptide-3})_4]$, providing for each subset one molecule;
- two subsets, corresponding each to peptide-1 and peptide-3 assembled by 3 on the RAFT, namely $\text{RAFT}[(\text{peptide-1})_1, (\text{peptide-3})_3]$ and $\text{RAFT}[(\text{peptide-1})_3, (\text{peptide-3})_1]$, providing for each subset four isomeric molecules;
- one subset, corresponding to peptide-1 and peptide-3 assembled by 2 on the RAFT, namely $\text{RAFT}[(\text{peptide-1})_2, (\text{peptide-3})_2]$, providing six isomeric molecules.

Molecules belonging to each five subsets have a different molecular weight and a different HPLC profile. The expected ratio exhibited by each subset is 1:4:6:4:1.

Scheme 7 presents the characterization by HPLC and ES-MS of the libraries. As shown, five signals are obtained as anticipated. The corresponding integrations provide a ratio of 1:4:6:4:1 as expected as well. Moreover, the differences in retention times obtained by HPLC for the different groups are in agreement with

the composition of the molecules (e.g. compounds containing the more polar peptide-1 are more polar compared to those containing peptide-3). From these observations one can conclude that the ratio follows the statistical distribution predicted above. This suggests that the chemical reactivities of the two peptides are the same towards the oxime bond formation and that the library obtained is not biased.

All the libraries composed of two different peptides obtained so far displayed the same behavior. However, it is important to remember that the resolution observed by HPLC relies mainly on the difference in peptide retention time which is not always that much different. For libraries based on the assembly of three and four components, the analysis was more complex but deconvolution could be possible, at least on the basis on the mixture observed with two components. Most of the components were characterized by ES-MS for all the libraries so far but for some of them, LC-MS coupling detection will be required. Work is currently under progress to this extend.



Scheme 7. Example of the characterization of a reaction.

2.5. Test of the libraries

After having synthesized and characterized the different peptide libraries and sub-libraries, we performed tests on affinity chromatography [22]. In order to assess the potential recognition of the libraries to avidin, we used an avidin-agarose bead. The different peptide libraries presenting a dabsyl dye [23] on the lower face of the scaffold were poured on the column where the non-recognized molecules were not retained and the recognized ones were bound giving a red color to the bead. Matrix analysis of the different results obtained with the library and the sub-libraries with their composition should provide the composition in peptides assembled to RAFT required to display affinity towards the target. The preliminary results indicated that some mixtures exhibited a better affinity than others towards avidin or avidin-biotin complex. Work is in

progress to characterize and analyze the corresponding molecules.

3. Conclusion

The chemical part of our project is validated since the reaction mixtures are easy to prepare, to purify and obtained within a day. The oxime bond ligation is well suited to realize combinatorial assembly of chemical groups derivatized by amino-oxy function on a given scaffold-aldehyde. It provides an easy method to obtain all the combinations of the chemical groups in a row as well as all the related sub-composition. The analysis of the libraries using HPLC and ES-MS techniques demonstrated that the libraries are not biased since the product distribution follows the statistical predictions. Finally the preliminary column affinity tests carried out

in this study are encouraging since some libraries displayed recognition properties towards avidin, works are currently in progress to establish the composition of the ligands.

For the future, our aim will be to enlarge the types of molecules used to realize the different surface mimetics like new libraries based on constrained peptides (e.g., cyclopeptides) as well as on organics ligands (e.g., carbohydrates, heterocycles...) targeting proteins for drug discovery.

References

- [1] H.S. Park, Q. Lin, A.D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 8.
- [2] B. Ma, H.J. Wolfson, R. Nussinov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 364.
- [3] W.L. DeLano, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002) 14.
- [4] A.A. Bogan, K.S. Thorn, *J. Mol. Biol.* 280 (1998) 1.
- [5] B.C. Cunningham, J.A. Wells, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 457.
- [6] N.C. Wrighton, F.X. Farrell, R. Chang, A.K. Kashyap, F.P. Barbone, L.S. Mulcahy, D.L. Johnson, R.W. Barrett, L.K. Jolliffe, W.J. Dower, *Science* 273 (1996) 458.
- [7] G.R. Crabtree, S.L. Schreiber, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 418.
- [8] T. Clackson, W. Yang, L.W. Rozamus, M. Hatada, J.F. Amara, C.T. Rollins, L.F. Stevenson, S.R. Magari, S.A. Wood, N.L. Courage, X. Lu, F. Cerasoli Jr., M. Gilman, D.A. Holt, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95 (1998) 10437.
- [9] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 30.
- [10] G.A. Lemieux, C.R. Bertozzi, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 506.
- [11] O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.* 5 (2003) 243.
- [12] D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5730.
- [13] M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razaname, G. Tuchscherer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35 (1996) 1482.
- [14] S. Peluso, P. Dumy, C. Nkubana, Y. Yokokawa, M. Mutter, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 7114 (and references cited therein).
- [15] L. Scheibler, P. Dumy, D. Stamou, C. Duschl, H. Vogel, M. Mutter, *Tetrahedron* 54 (1998) 3725.
- [16] L. Scheibler, P. Dumy, M. Boncheva, K. Leufgen, H.J. Mathieu, M. Mutter, H. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38 (1999) 696.
- [17] O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 65.
- [18] P. Dumy, I.M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 1255.
- [19] N. Thieriet, J. Alsina, E. Giralt, F. Guibé, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* 38 (1997) 7275.
- [20] K.F. Geoghegan, J.G. Stroh, *Bioconjug. Chem.* 3 (1992) 138.
- [21] (a) K.S. Lam, S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, W.M. Kazmierski, R.J. Knapp, *Nature* 354 (1991) 82; (b) B. Gissel, M.R. Jensen, K. Gregorius, H.I. Elsner, I. Svendsen, S. Mouritsen, in: *Peptides 1994, Proc. 23rd Eur. Pept. Symp., Braga, Portugal, 4–10 September 1994*, p. 495; (c) T. Lamla, V.A. Erdmann, *J. Mol. Biol.* 329 (2003) 381; (d) S. Ostergaard, P.H. Hansen, M. Olsen, A. Holm, *FEBS Lett.* 362 (1995) 306.
- [22] E. Hazum, *J. Chromatogr A* 510 (1990) 233.
- [23] D. Parkinson, J.D. Redshaw, *Anal. Biochem.* 141 (1984) 121.

ANNEXE VII

-

**GUIDE D'UTILISATION DU SYNTHETISEUR
AUTOMATIQUE DE PEPTIDES**

Utilisation du robot synthétiseur de peptides

Mettre sous tension :

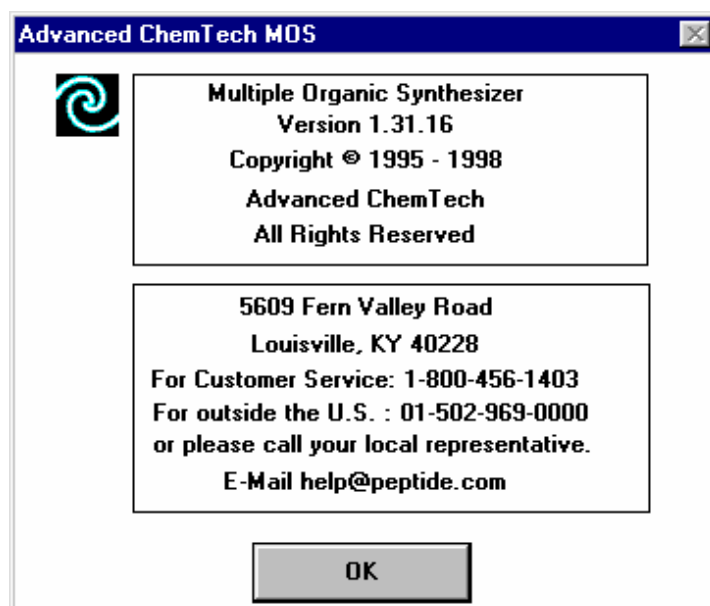
- le robot
- l'ordinateur.

Double cliquer sur l'icône :

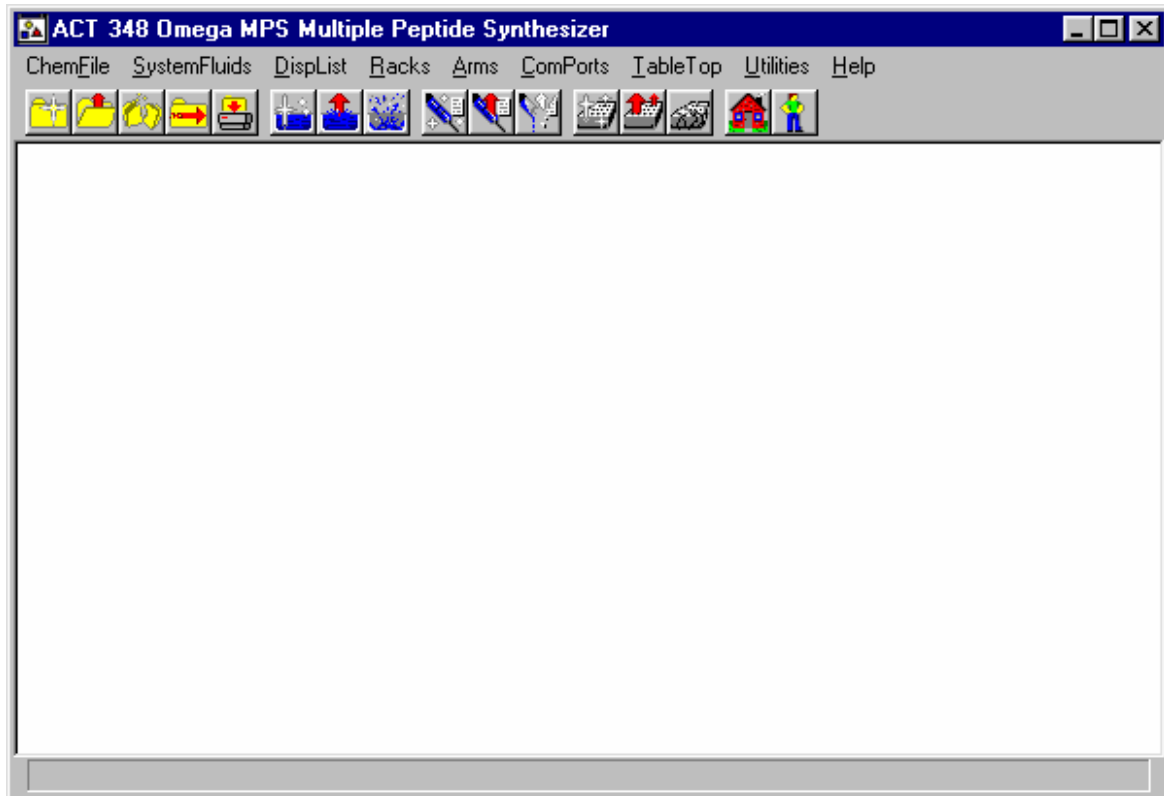


ACT348.Ink

La fenêtre suivante apparaît, "OK" :

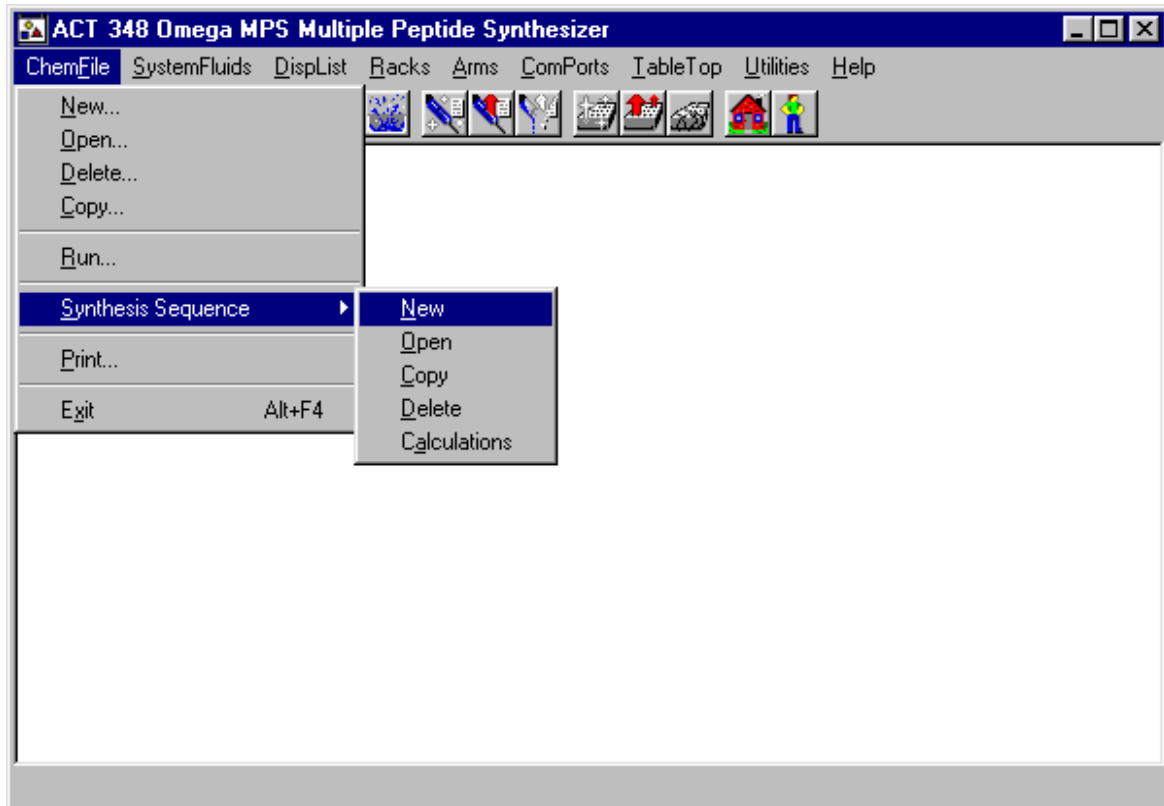


La fenêtre qui apparaît ensuite permet d'avoir accès à toutes les fonctions du programme ACT 348 Omega :

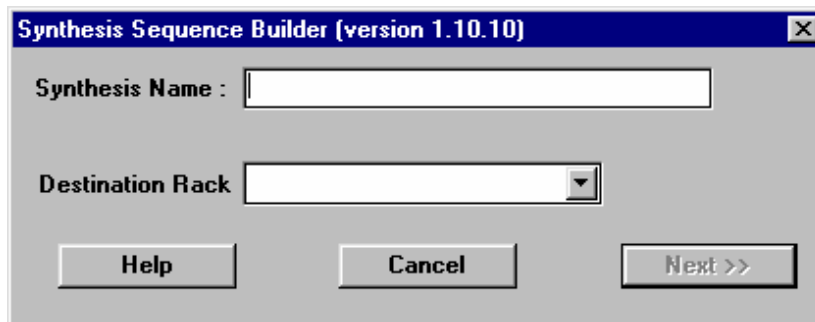


Lancement d'une nouvelle séquence peptidique

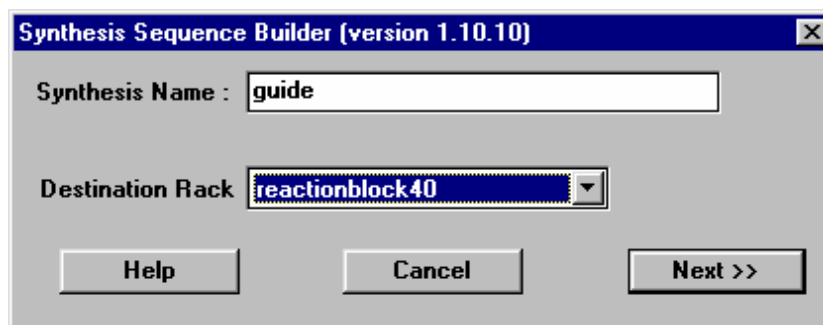
Pour cela, faire "ChemFile", "Peptide Synthesis" puis "New" :



La fenêtre suivante apparaît :



Donner un nom à la nouvelle séquence et préciser le lieu où la synthèse aura lieu ("reactionblock40") puis "Next":



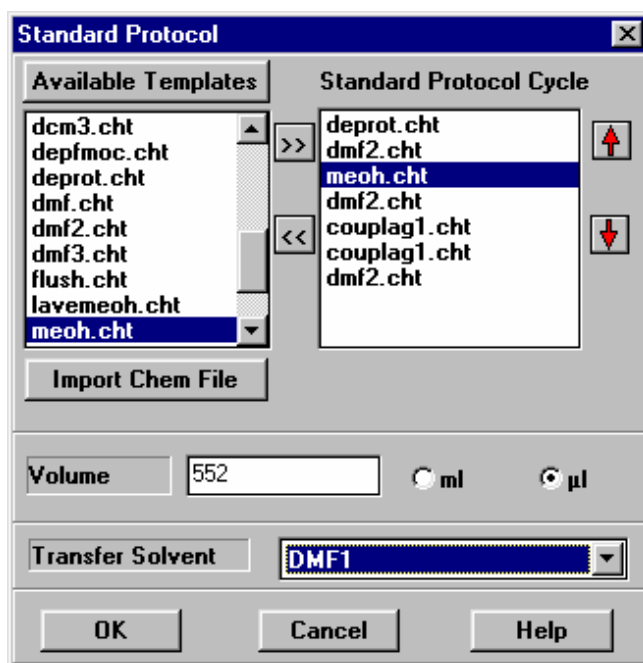
La fenêtre qui apparaît ensuite établit le "Standard protocol" de la synthèse peptidique que l'on va programmer ensuite. Elle se compose de trois parties :

- les deux fenêtres "Available templates" et "Standard Protocol Cycle" qui sont en relation par des flèches >> et <<. Chaque cycle de couplage peptidique implique différents sous-programmes qu'il faut organiser. On programme un protocole standard que l'on pourra modifier ultérieurement pour chaque cycle de façon individuelle.

- le "Volume" qui définit le volume d'acide aminé que le robot prélèvera à chaque couplage. Pour le "reactionblock40", 552 μ L paraît être un bon choix.

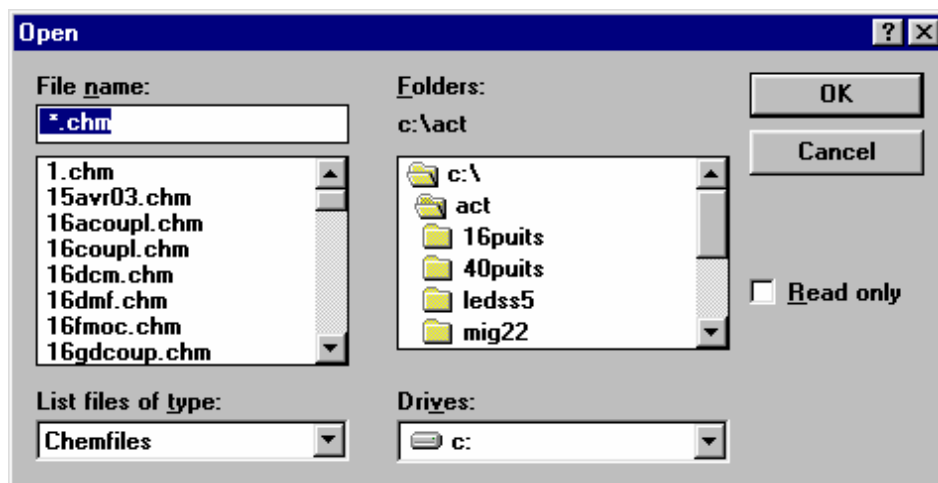
- le "Transfert Solvent" où l'on choisit toujours "DMF1" par défaut.

- "OK" !



On glisse les programmes de "Available Template" vers "Standard Protocol Cycle" à l'aide des flèches >> et << et l'on organise la suite des programmes à l'aide des flèches rouges situées à droite de la fenêtre "Standard Protocol Cycle".

De plus, il est possible d'aller chercher un sous-programme n'apparaissant pas dans "Available Template" en cliquant sur "Import Chemfile" et la fenêtre suivante apparaît, il suffit alors de sélectionner le programme désiré dans l'arbre de l'ordinateur :



Les principaux programmes utilisés sont les suivant :

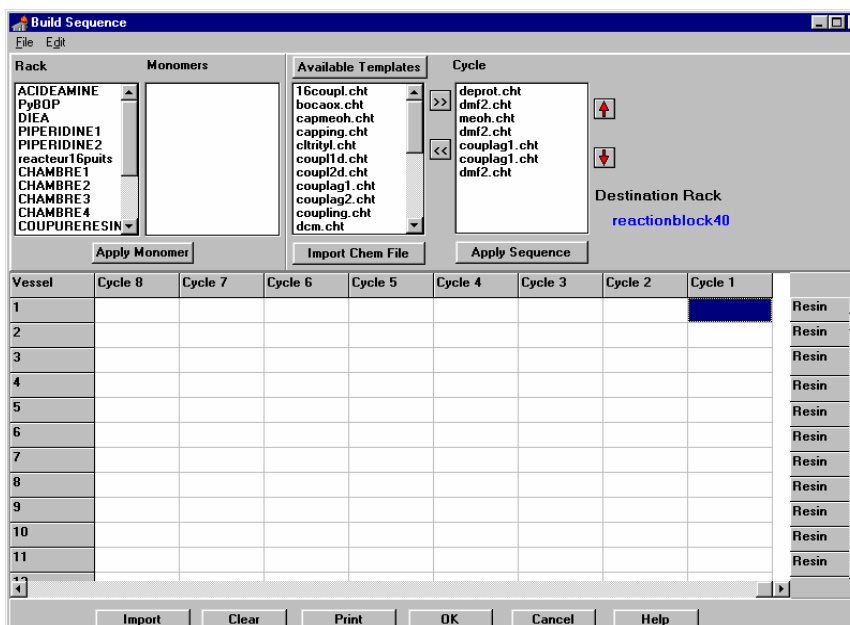
- deprot.cht : déprotection de la fonction Fmoc de l'acide aminé concerné par réaction de la pipéridine,
- dmf2.cht : effectue deux lavages au DMF,
- meoh.cht : effectue un lavage au MeOH (augmente la pureté des produits finaux synthétisés),
- couplag1.cht : effectue le couplage de l'acide aminé correspondant au numéro du cycle en cours.

Il existe d'autres programmes souvent utilisés comme :

- flush.cht : amorce le bras du robot ainsi que les conduites de fluides (à utiliser lors du premier cycle),
- dcm2.cht : effectue deux lavages au DCM
- pause.cht : le robot se met en attente d'une intervention de l'utilisateur.

Consulter l'Annexe 1 pour visualiser tous les sous-programmes.

Ensuite, la fenêtre suivante apparaît :



Elle se compose de deux parties.

- la partie supérieure composée de quatre fenêtres :

@ "Rack" définit l'endroit où le robot va prélever lors du couplage,

@ "Monomers" définit la nature du produit à prélever dans "Rack",

@ "Available Templates" établit la liste des sous-programmes disponibles afin d'individualiser chaque cycle,

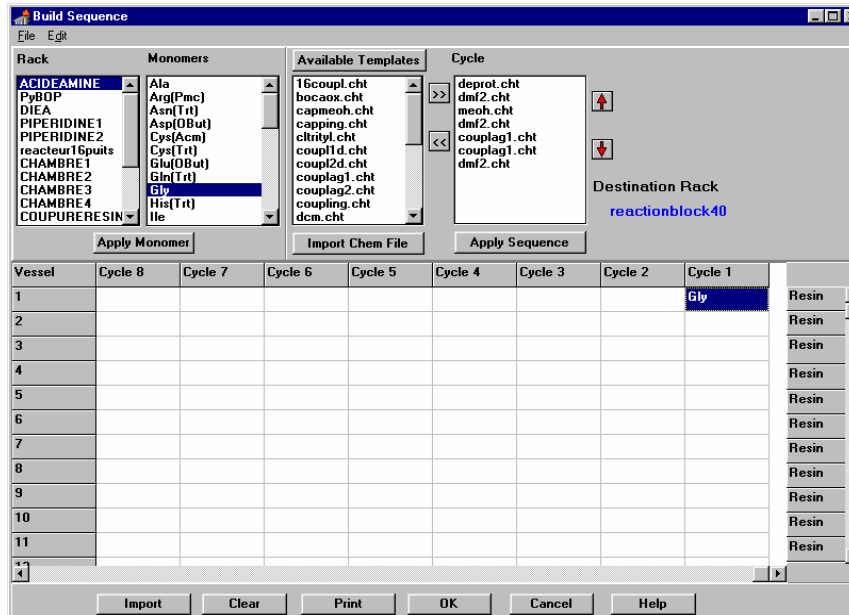
@ "Standard Protocol Cycle" montre les sous-programmes utilisés pour chaque cycle.

- la partie inférieure est une grille opposant les cycles numérotés aux puits disponibles dans le "reactionblock40".

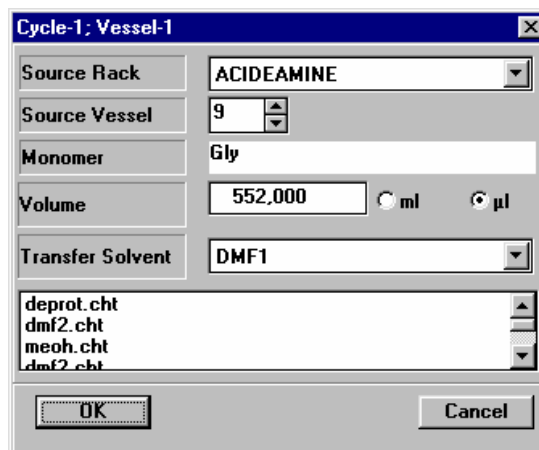
On démarre la synthèse à droite dans le "cycle 1" en sélectionnant la case à l'intersection du "Cycle1" et du numéro de puits adéquat.

Dans "Rack" sélectionner "ACIDEAMINE" puis, dans "Monomers" sélectionner l'acide aminé approprié et "Apply monomer".

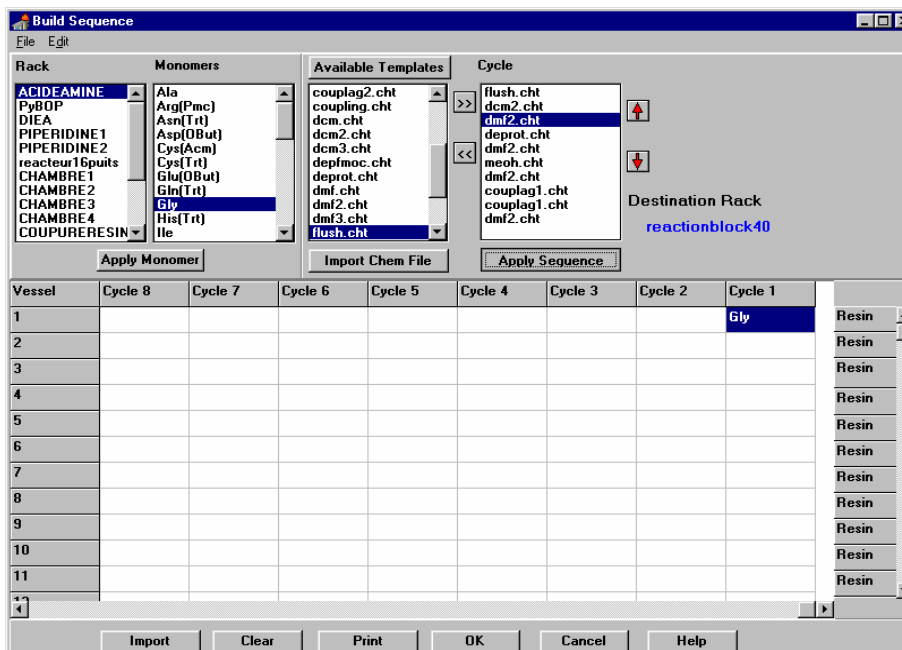
Exemple pour la synthèse d'un RAFT à la séquence : KAKPGKKKPG-Résine



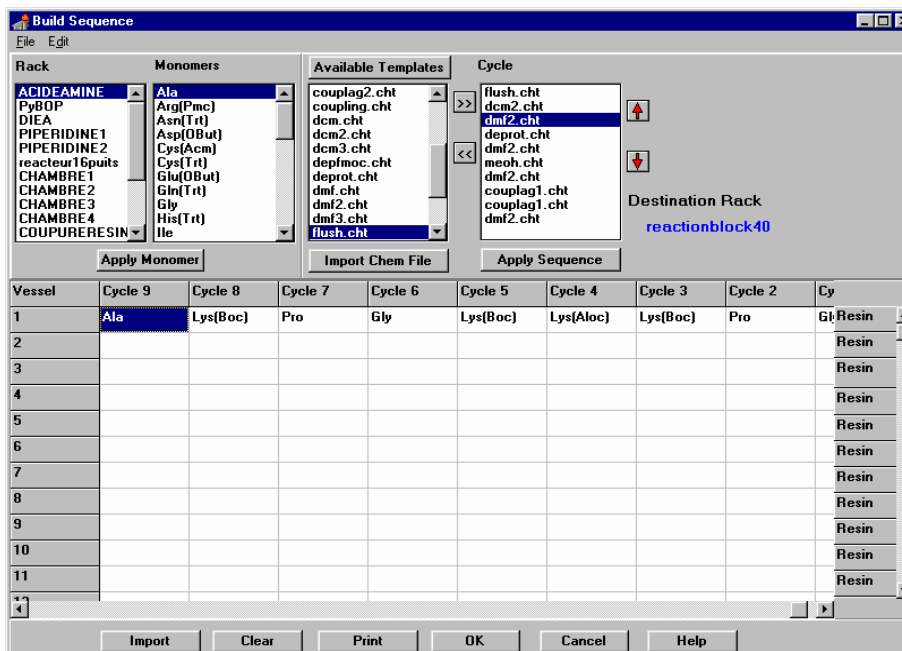
Pour individualiser la série de sous-programmes intervenant lors du "cycle1", double-cliquer sur "Gly", la fenêtre suivante apparaît, "OK" :



Modifier alors les programmes dans "Standard Protocol Cycle" et "Apply Sequence":

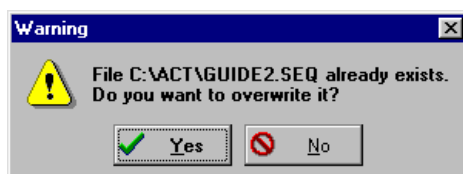


Programmer alors toute la séquence comme précédemment en changeant si besoin est le "Standard Protocol Cycle" :

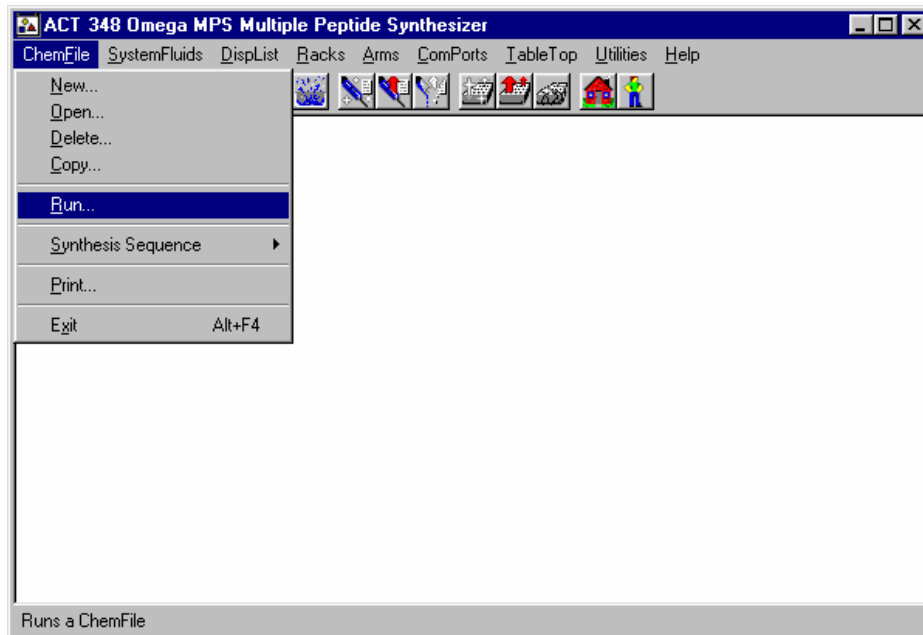


Rmq : Si on effectue deux synthèses en parallèle, les sous-programmes utilisés pour chaque cycle commun seront obligatoirement les mêmes.

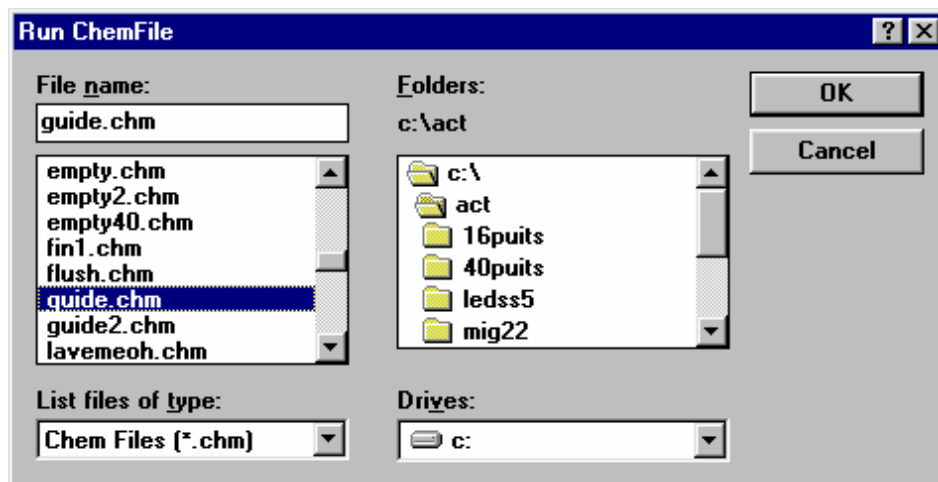
Une fois le programme terminé, faire "File" puis "Save" et "OK", la fenêtre suivante apparaît, faire "Yes" :



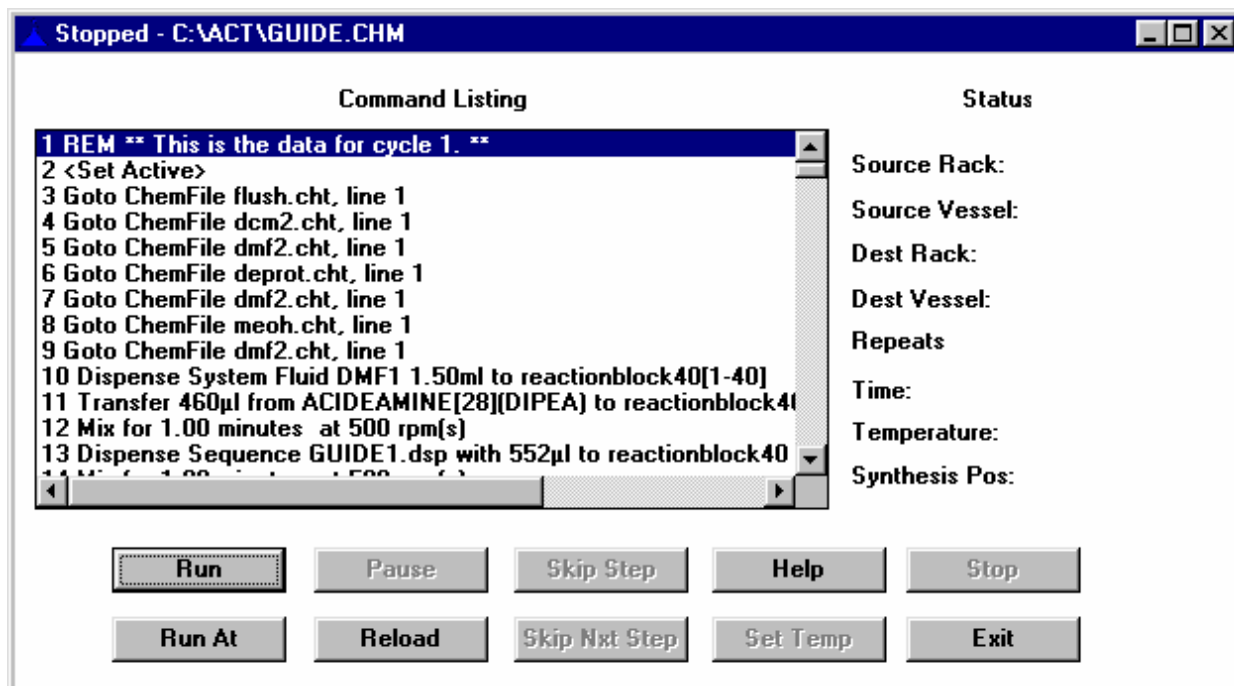
Retour à la fenêtre d'accueil. Dans celle-ci, une fois tous les réactifs préparés, placés aux endroits prédéfinis pour le robot (cf. Annexe 2) et l'azote ouvert, faire "ChemFile" puis "Run..." :



Dans la fenêtre qui suit, aller sélectionner le programme à effectuer puis "OK" :



La fenêtre suivante montre tous les sous-programmes et tous les cycles que le robot va effectuer, faire "Run" :



Rmq : A tout moment, il est possible pour l'utilisateur d'intervenir sur la synthèse par les commandes suivantes :

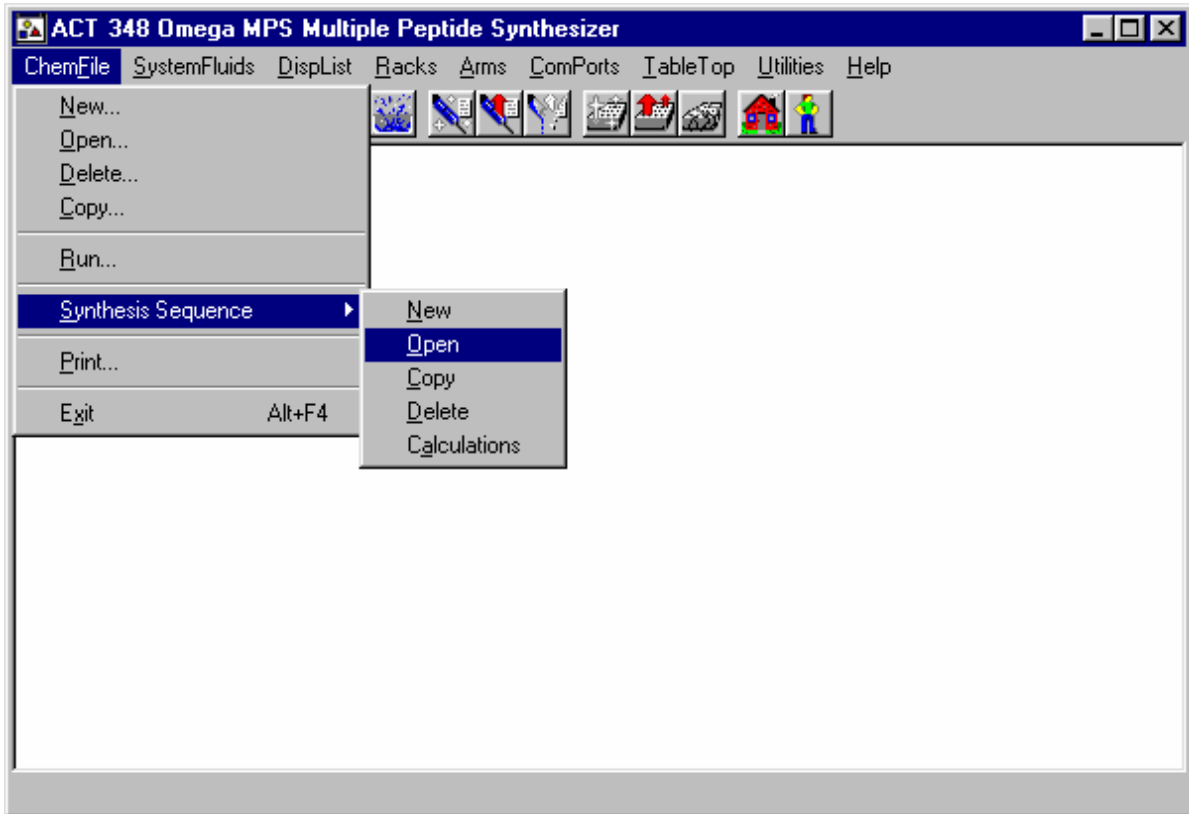
- "Pause" : le robot se met en attente,
- "Skip Step" : le robot saute l'étape en cours,
- "Skip Next Step" : le robot n'effectuera pas l'étape suivante mais passera directement à celle qui la suit,
- "Stop" : arrête la synthèse,
- "Exit" : on sort du programme.

Rmq2 : A la fin de la synthèse, il est possible de lire le fichier .txt du programme sauvegardé sous c:\ACT*nom_du_programme*.

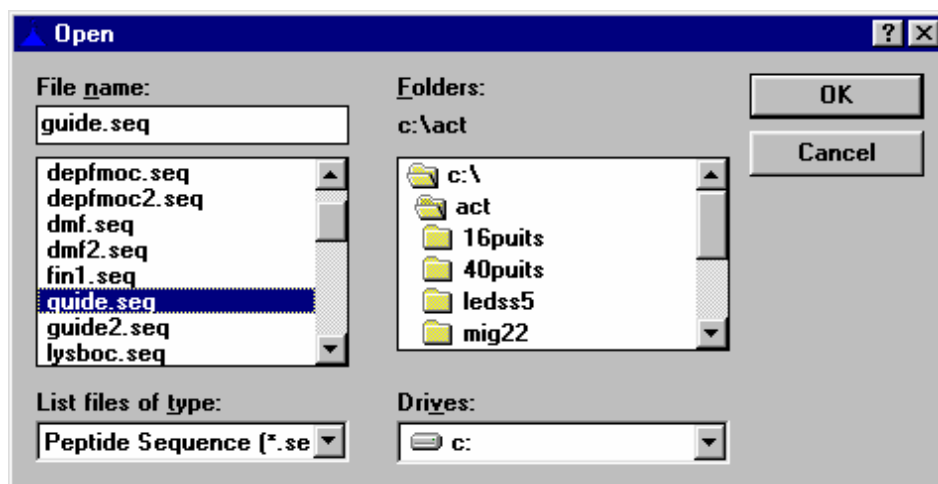
Après chaque synthèse, ranger le programme utilisé sous "ACT" puis le dossier approprié.

Appeler une synthèse peptidique déjà programmée

Pour cela sélectionner "ChemFile", "Peptide Synthesis" et "Open" :



La fenêtre suivante apparaît, sélectionner alors la synthèse désirée puis "OK" :



Modifier alors si besoin est la séquence ou bien lancer la synthèse comme précédemment décrit :

Build Sequence

File Edit

Rack

- ACIDEAMINE
- PyBOP
- DIEA
- PIPERIDINE1
- PIPERIDINE2
- reacteur16puits
- CHAMBRE1
- CHAMBRE2
- CHAMBRE3
- CHAMBRE4
- COUPURERESIN

Monomers

Available Templates

- 16coupl.cht
- bocaox.cht
- capmeoh.cht
- capping.cht
- cltrityl.cht
- coupl1d.cht
- coupl2d.cht
- couplag1.cht
- couplag2.cht
- coupling.cht
- dcm.cht

Cycle

- deprot.cht
- dmf2.cht
- meoh.cht
- dmf2.cht
- couplag1.cht
- couplag1.cht
- dmf2.cht

Destination Rack
reactionblock40

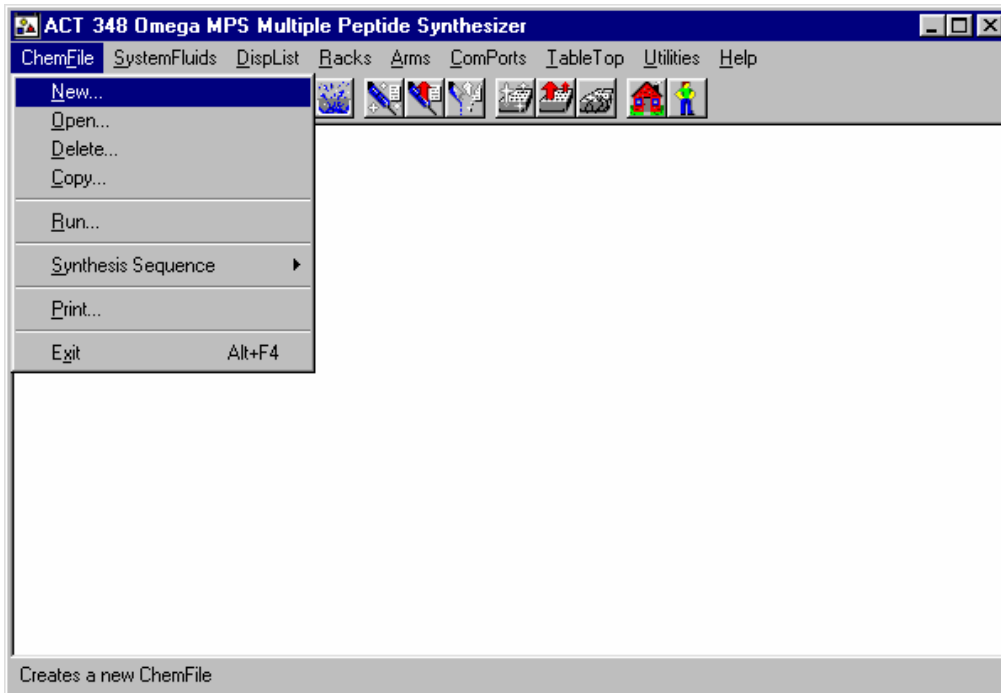
Apply Monomer Import Chem File Apply Sequence

Vessel	Cycle 8	Cycle 7	Cycle 6	Cycle 5	Cycle 4	Cycle 3	Cycle 2	Cycle 1	
1	Lys(Boc)	Pro	Gly	Lys(Boc)	Lys(Aloc)	Lys(Boc)	Pro	Gly	Resin
2									Resin
3									Resin
4									Resin
5									Resin
6									Resin
7									Resin
8									Resin
9									Resin
10									Resin
11									Resin
12									Resin

Import Clear Print OK Cancel Help

Créer un nouveau sous-programme

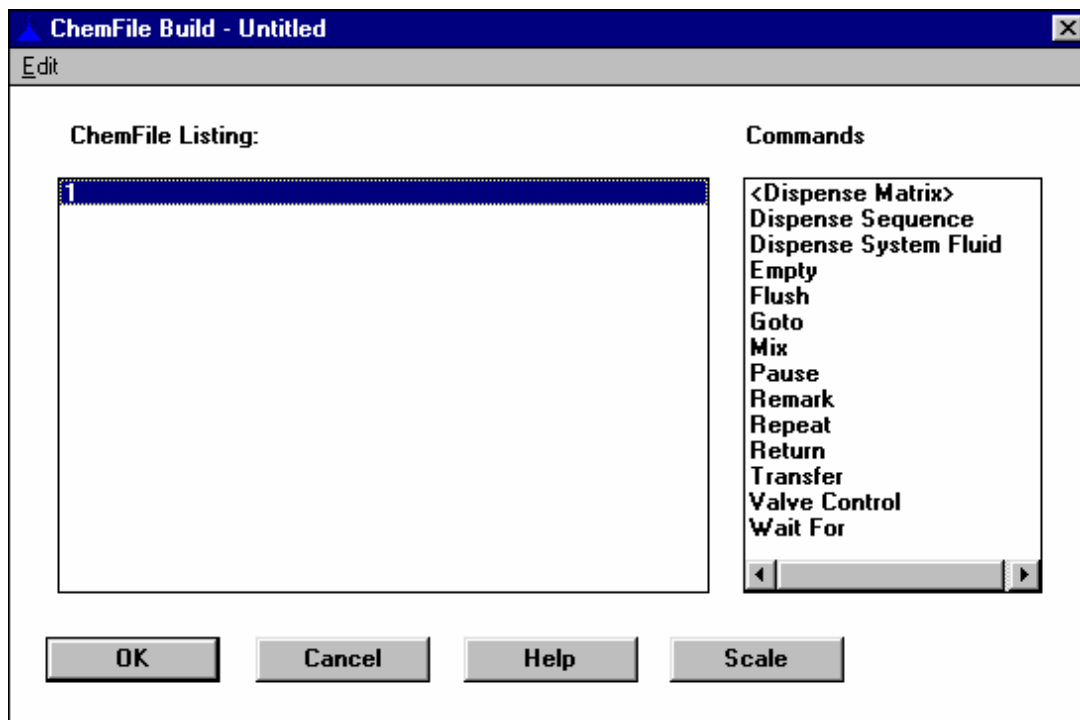
Pour cela sélectionner "ChemFile" puis "New..." :



Une fenêtre s'ouvre alors. Elle se compose de deux parties.

- la partie de gauche est une fenêtre vide, c'est dedans que s'écrira le programme proprement dit.

- la partie de droite comporte toutes les "commands" disponibles afin d'écrire le programme.



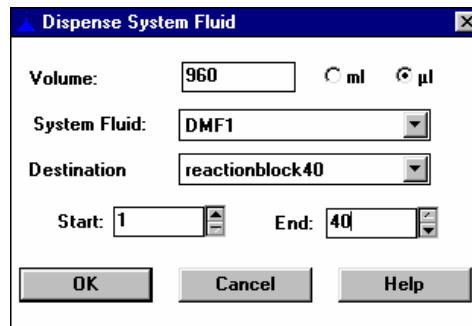
Afin d'utiliser les "commands", double-cliquer sur la "command" désirée, en fonction de celle-ci, il est possible que de nouvelles fenêtres s'ouvrent dans lesquelles il est impératif de préciser les volumes à prélever, à quel endroit, un temps...etc

Ainsi :

- "<Dispense Matrix>" : c'est la commande qui intervient lors du couplage d'acide aminé. Le robot prélèvera l'acide aminé correspondant au numéro du cycle en cours.

- "Dispense Sequence" : effectue la distribution de solvant à partir d'une liste de distribution préalablement programmée.

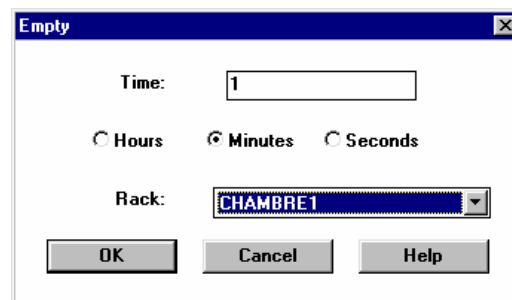
- "Dispense System Fluid": distribue du solvant au système. Préciser la nature du solvant et le lieu de destination("reactionblock40") de "Start" (1) à "End" (40) puis "OK" :



The dialog box titled "Dispense System Fluid" has a blue header bar with a close button. It contains the following elements:

- Volume: 960 (text input), with radio buttons for "ml" and "µl".
- System Fluid: DMF1 (dropdown menu).
- Destination: reactionblock40 (dropdown menu).
- Start: 1 (spin box), End: 40 (spin box).
- Buttons: OK, Cancel, Help.

- "Empty": vide pendant un temps à préciser le lieu de synthèse :

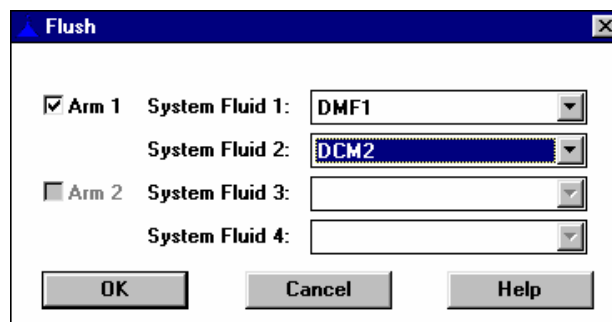


The dialog box titled "Empty" has a blue header bar with a close button. It contains the following elements:

- Time: 1 (text input).
- Radio buttons for "Hours", "Minutes" (selected), and "Seconds".
- Rack: CHAMBRE (dropdown menu).
- Buttons: OK, Cancel, Help.

- "Flush": amorce le bras du robot ainsi que les conduites de fluide.

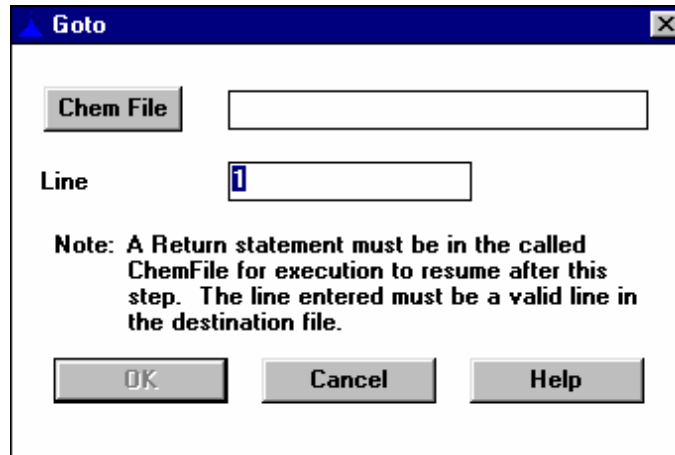
Préciser avec quel solvant l'opération doit être faite :



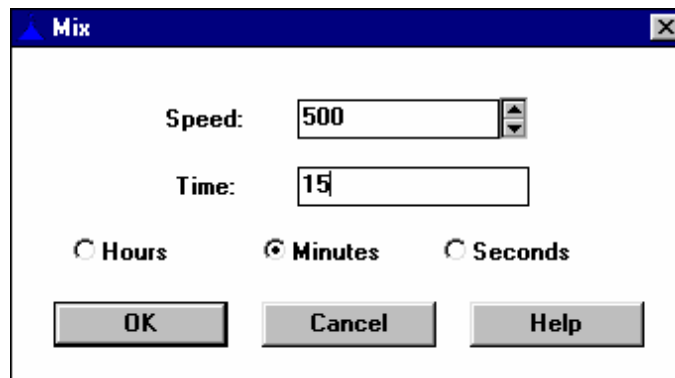
The dialog box titled "Flush" has a blue header bar with a close button. It contains the following elements:

- Arm 1: checked checkbox, System Fluid 1: DMF1 (dropdown), System Fluid 2: DCM2 (dropdown).
- Arm 2: unchecked checkbox, System Fluid 3: (dropdown), System Fluid 4: (dropdown).
- Buttons: OK, Cancel, Help.

- "Goto": appelle un autre sous-programme en cliquant sur "ChemFile" et en le sélectionnant dans l'arbre de l'ordinateur. Préciser à partir de quelle ligne de commande le sous-programme appelé doit être exécuté :

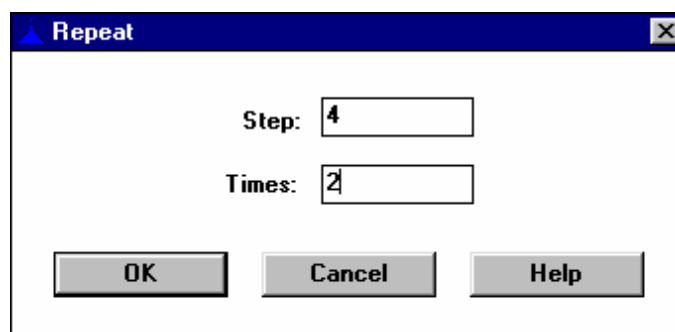


- "Mix": agite à une vitesse à préciser pendant un certain temps :



- "Pause": le robot se met en attente d'une intervention de l'utilisateur.

- "Repeat": répète un certain nombre de fois les étapes à partir d'une ligne de commande à préciser :



- "Return": détermine la fin du sous-programme. Cette commande doit obligatoirement apparaître pour que le robot puisse passer à un autre sous-programme en basculant préalablement dans le programme principal.

- "Transfer": transfère un volume réactif à préciser, d'un lieu à un autre. On assimile le réactif à un solvant connu par le robot, on prend toujours "DMF1" par défaut :

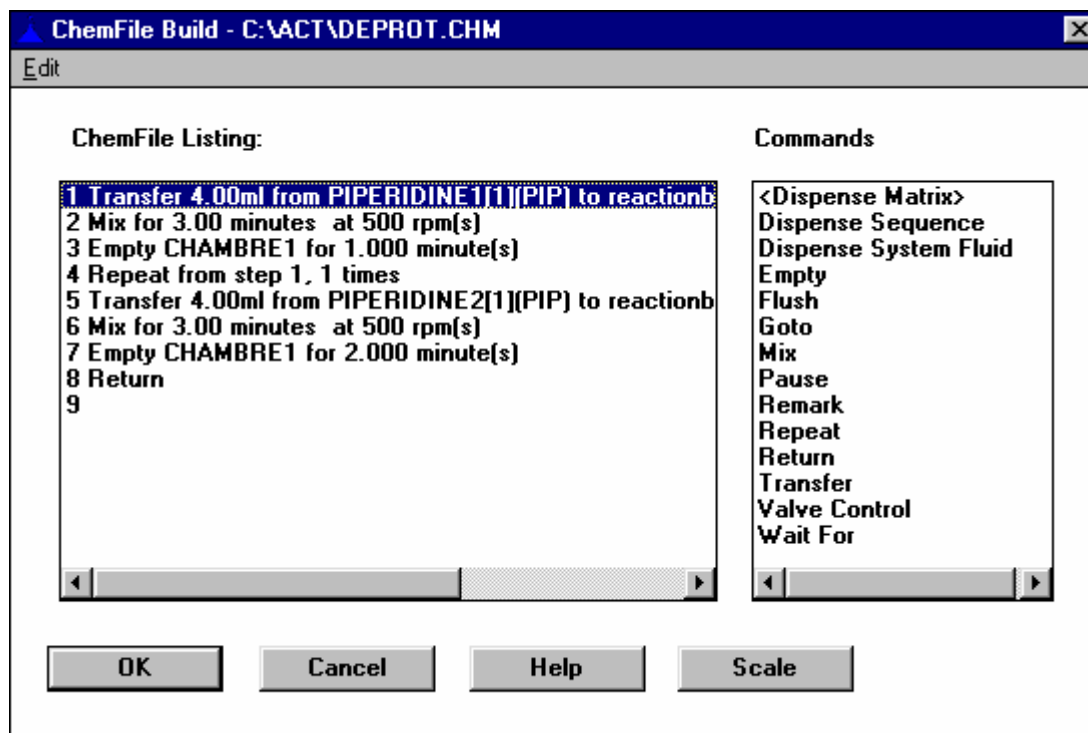
- "Wait For": le robot se met en attente pendant un temps donné :

A la fin, on obtient des lignes de commandes comme suit. Faire "OK", une fenêtre de sauvegarde s'ouvre alors, donner le nom approprié au sous-programme :

Annexe 1

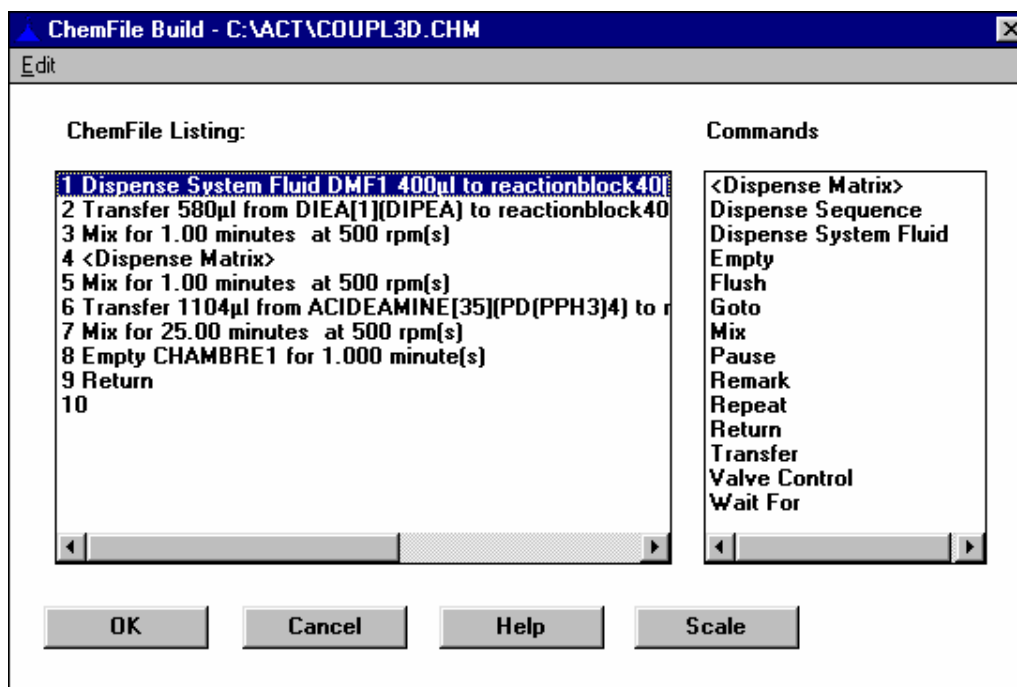
Programmes utilisés avec le 40 puits :

Deprot.chm

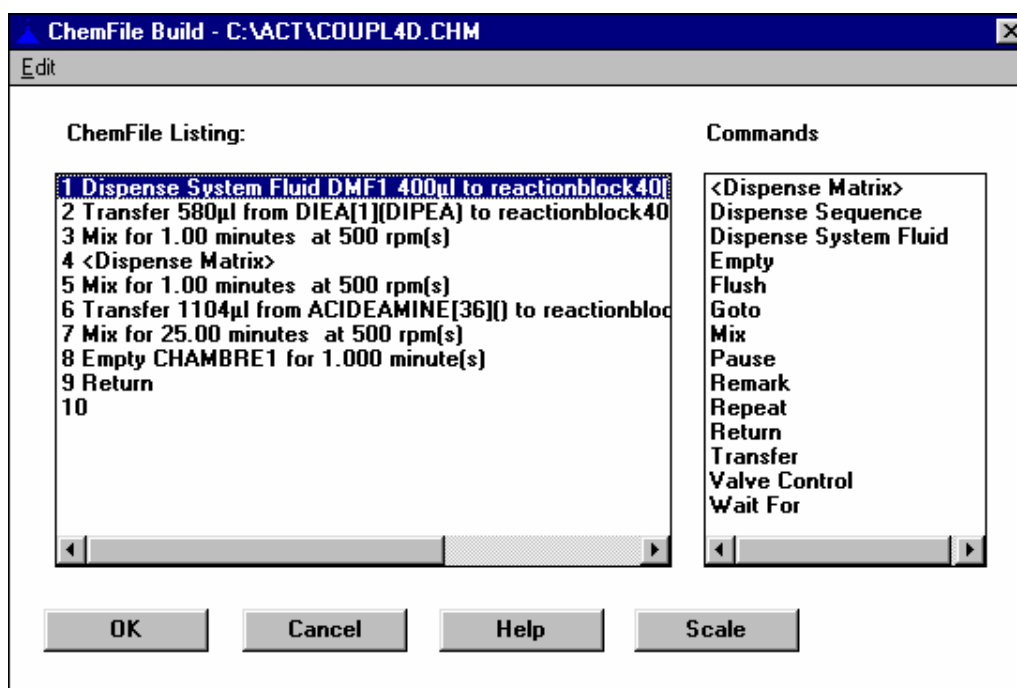


Nota : PIPERIDINE1[1][PIP] et PIPERIDINE2[2][PIP] sont les deux bocaux de pipéridine situés à gauche du bloc de rangement des acides aminés.

Coupl3d.chm

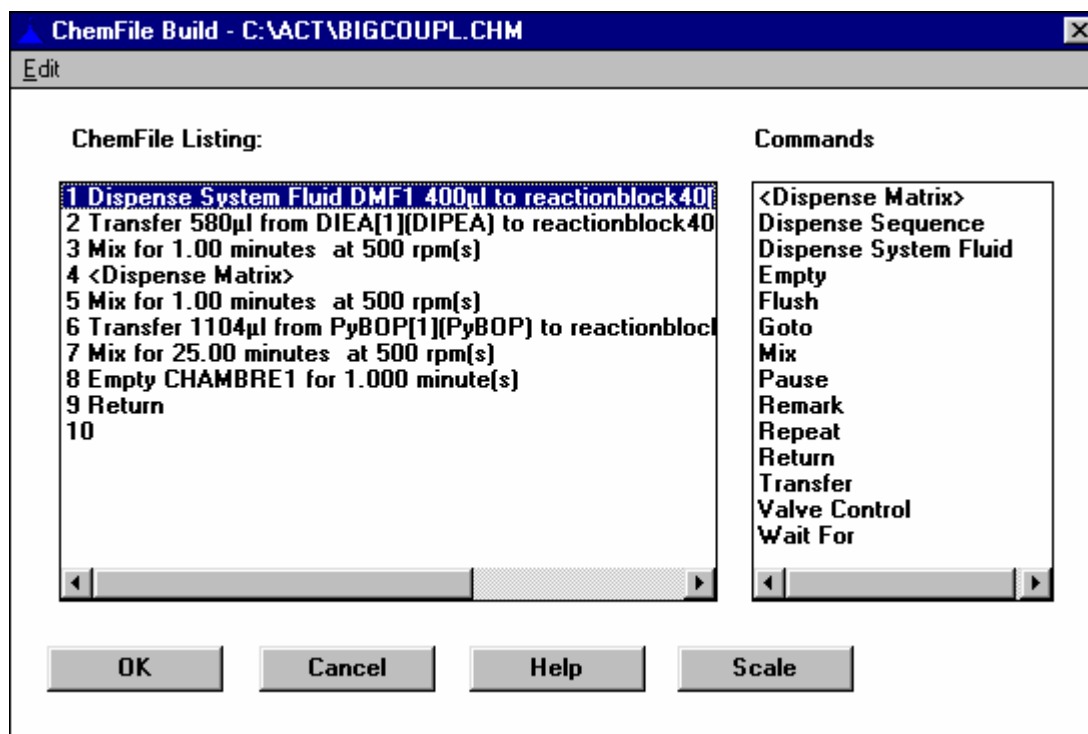


Coupl4d.chm



Concentrations des solutions : PyBOP : 0,25 M
 Acides Aminés : 0,5 M
 DIEA : 1 M

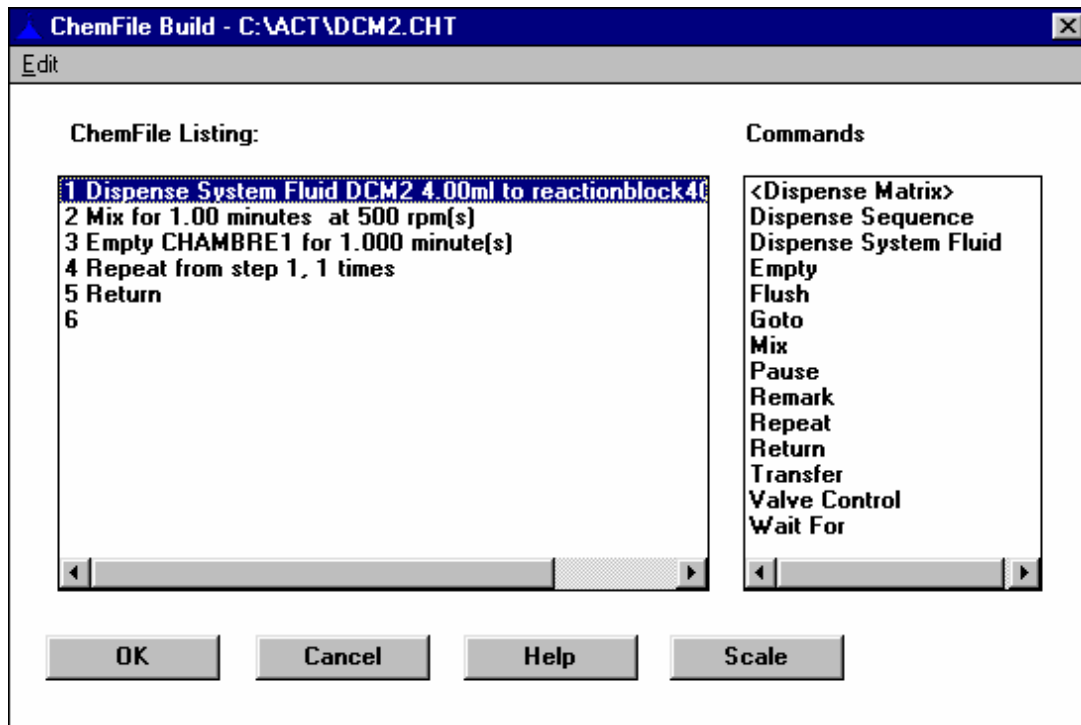
Bigcoupl.chm



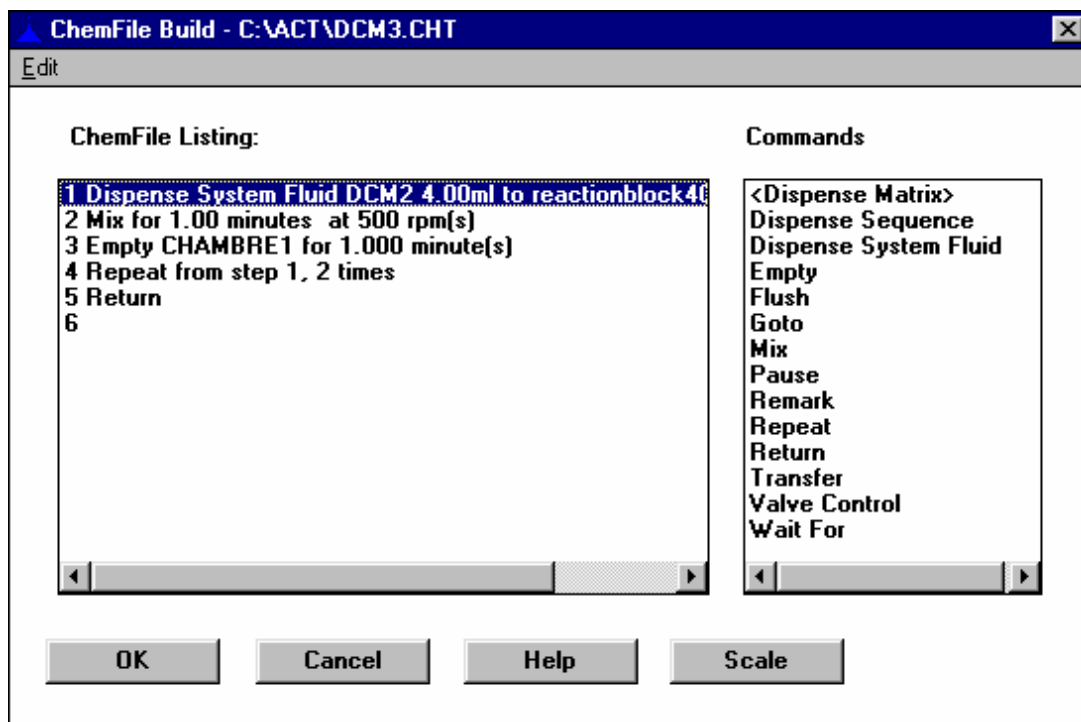
S'utilise pour un grand nombre de couplages nécessitant un volume de PyBOP supérieur à celui contenu dans deux pots d'acides aminés.

Concentrations des solutions : PyBOP : 0,25 M
 Acides Aminés : 0,5 M
 DIEA : 1 M

Dcm2.cht

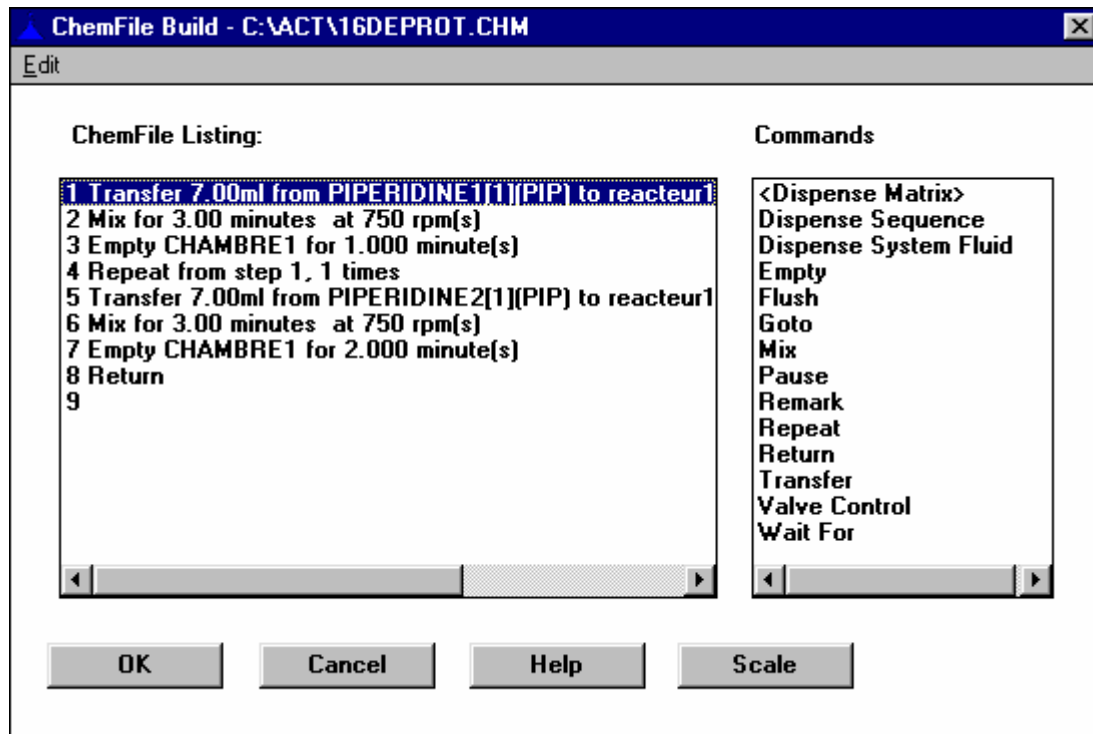


Dcm3.cht

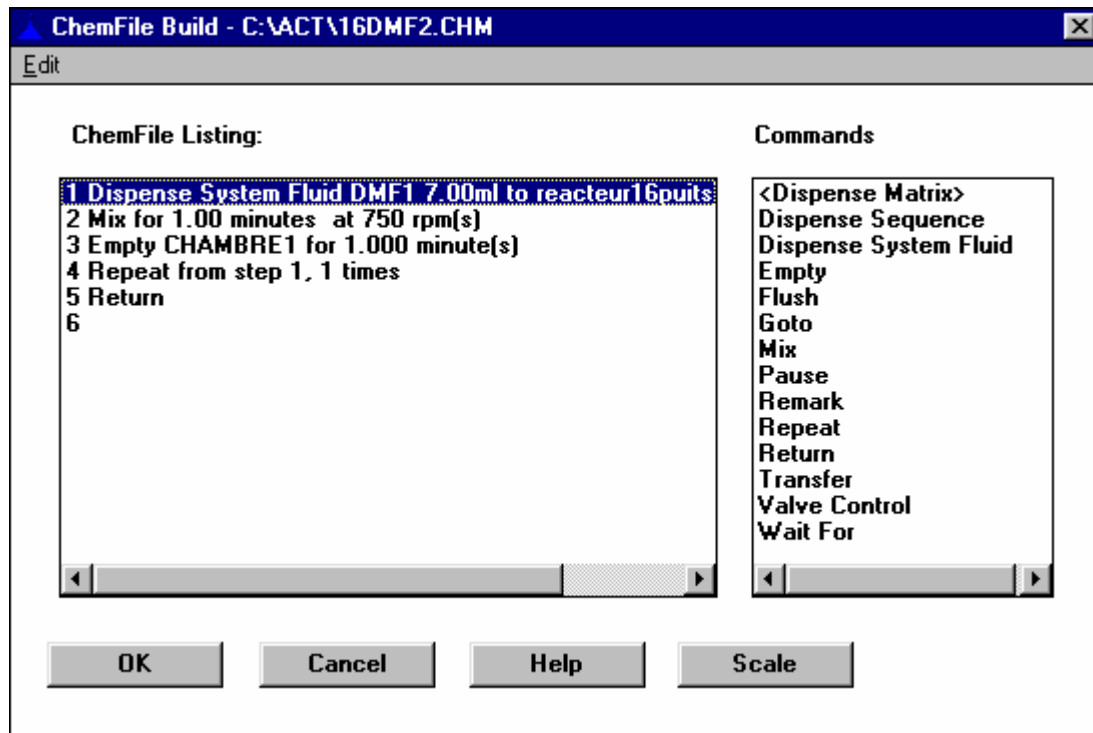


Programmes utilisés avec le 16 puits :

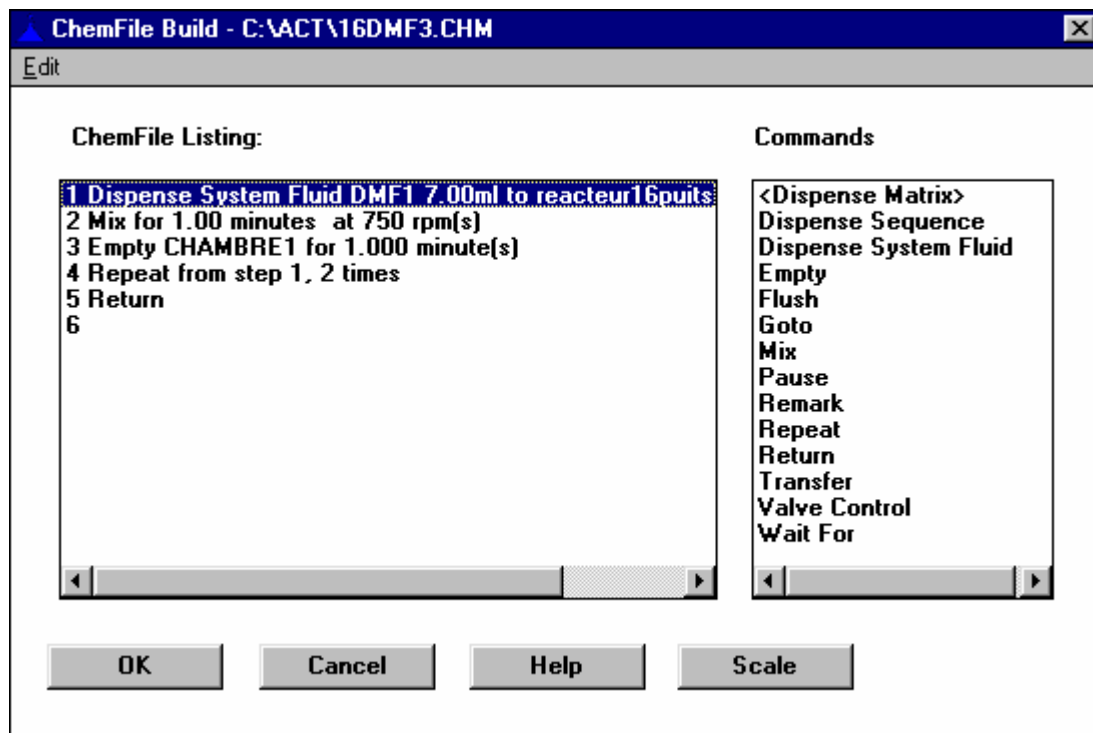
16deprot.chm



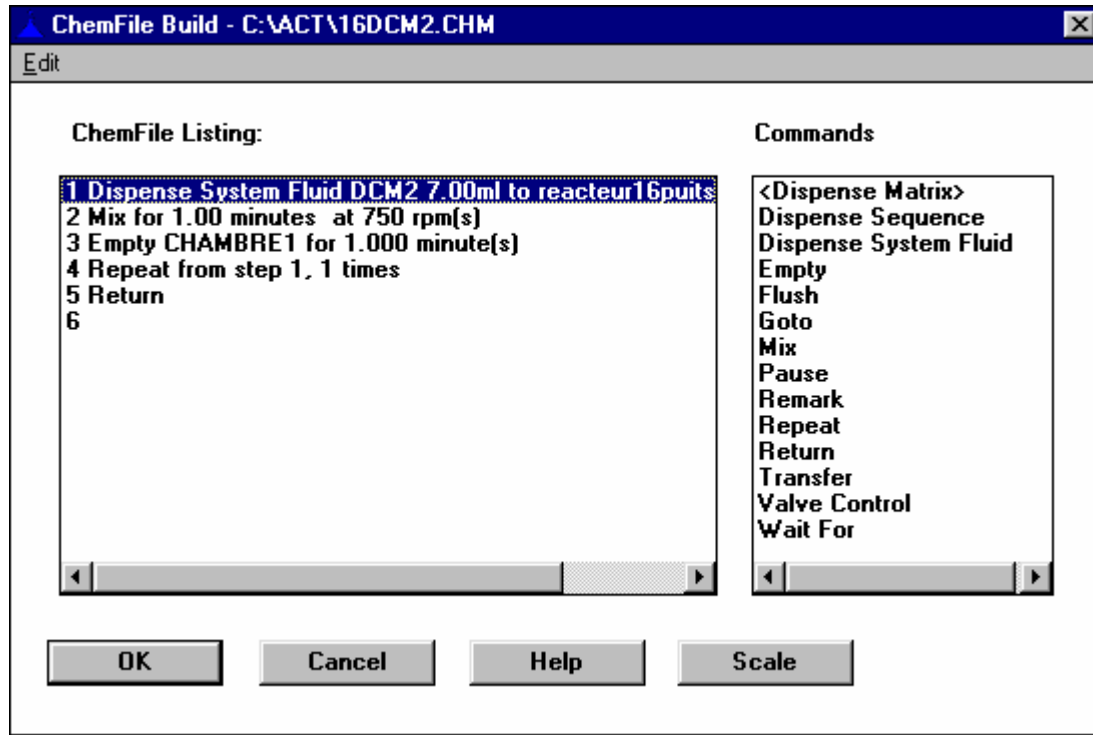
16Dmf2.chm



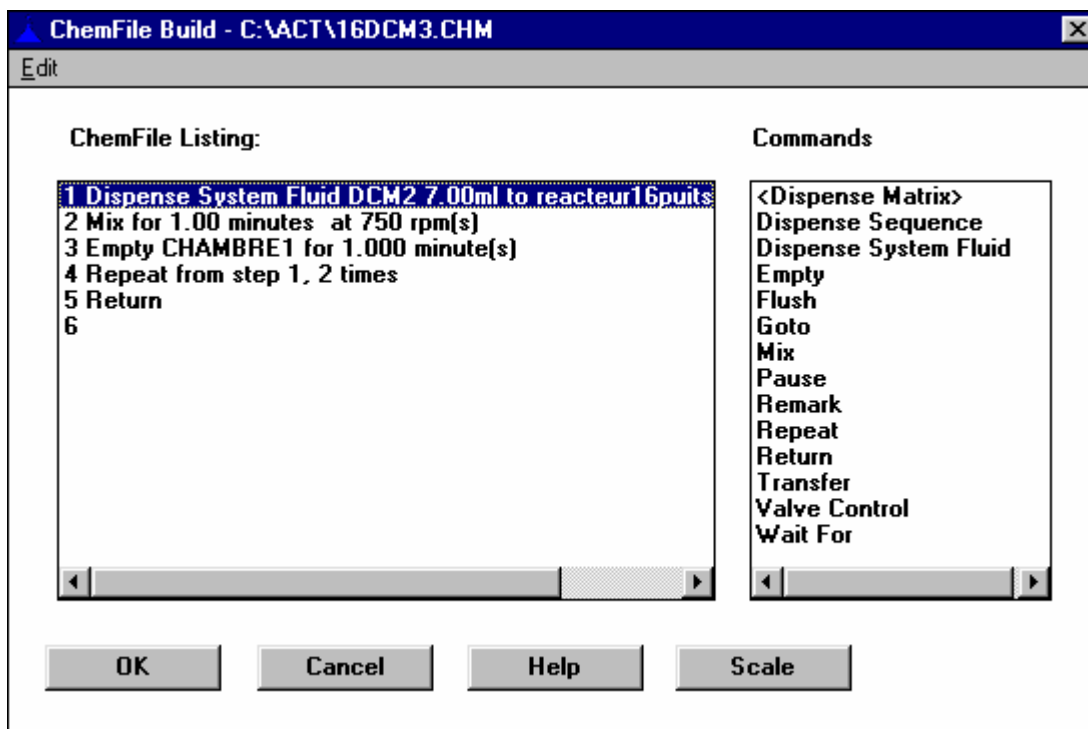
16Dmf3.chm



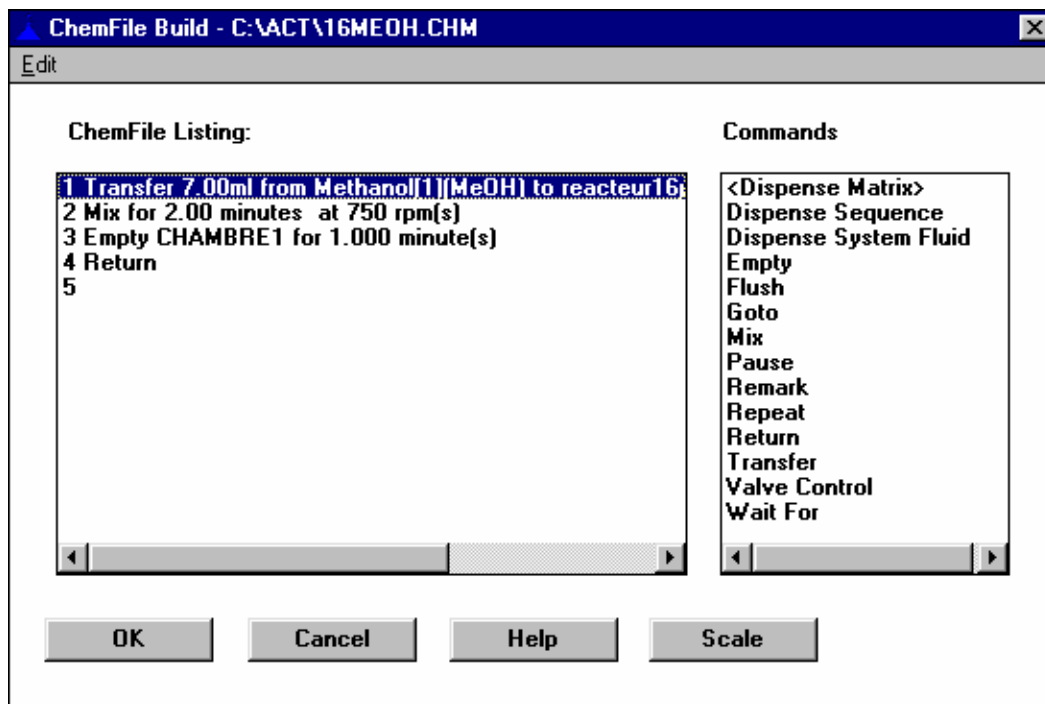
16Dcm2.chm



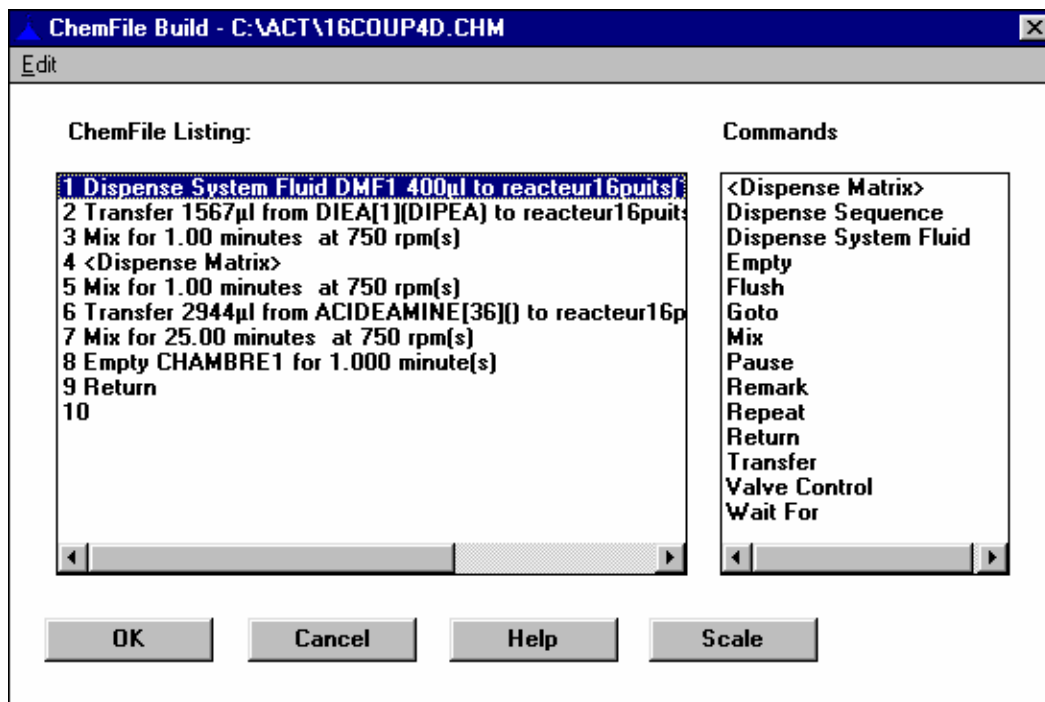
16Dcm3.chm



16meoh.chm

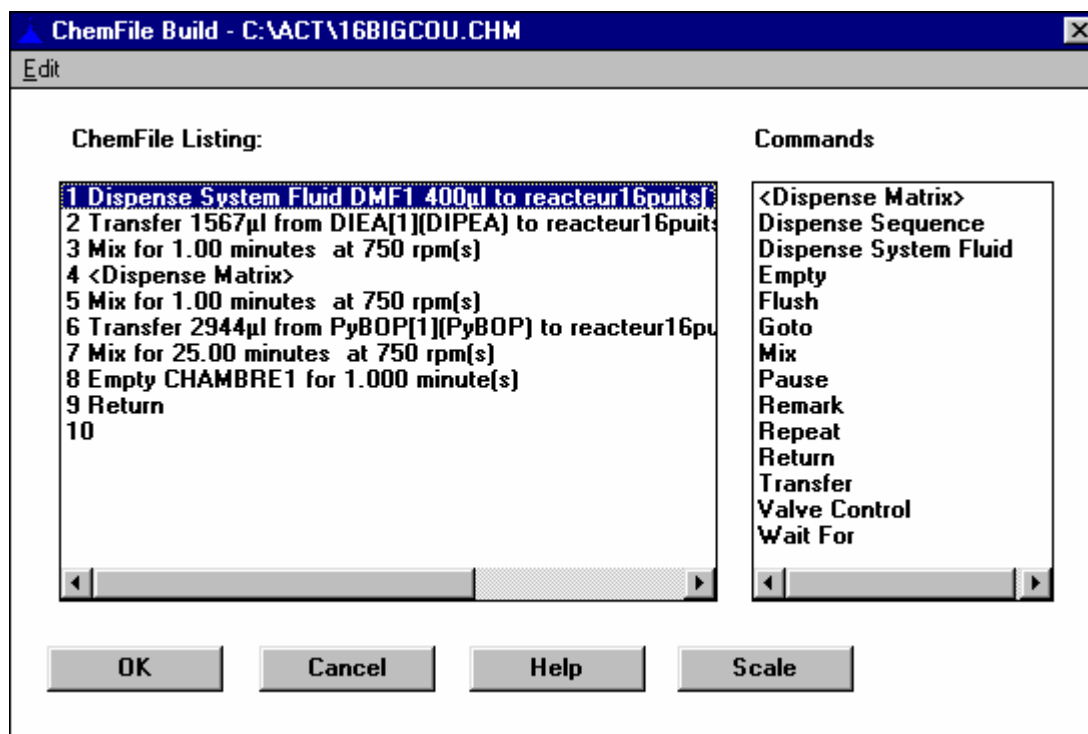


16coup4d.chm



Nota : il existe aussi "16coup3d" où le prélèvement du PyBOP s'effectue dans le pot 35 des acides Aminés.

16Bigcou.chm

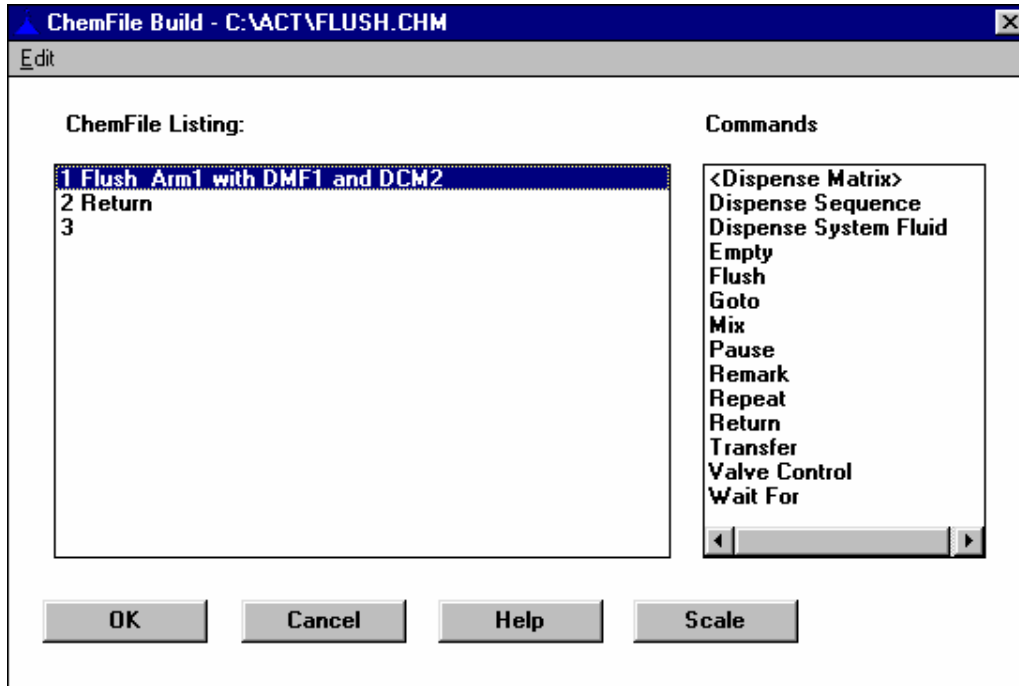


S'utilise pour un grand nombre de couplages nécessitant un volume de PyBOP supérieur à celui contenu dans deux pots d'acides aminés.

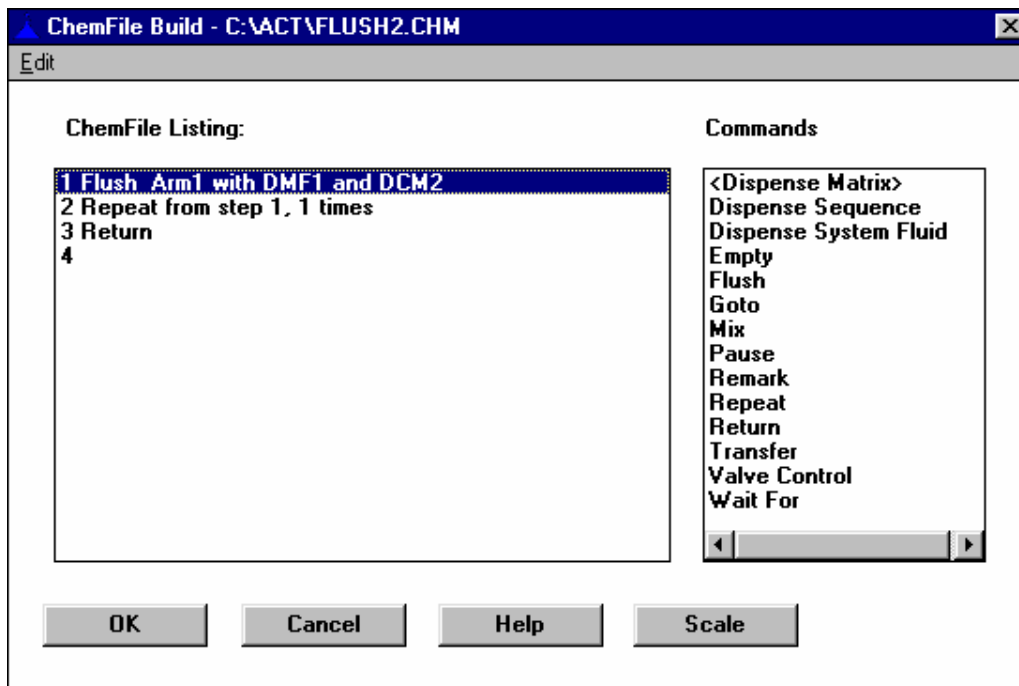
Concentrations des solutions : PyBOP : 0,25 M
 Acides Aminés : 0,5 M
 DIEA : 1 M

Programmes communs aux 16 et aux 40 puits :

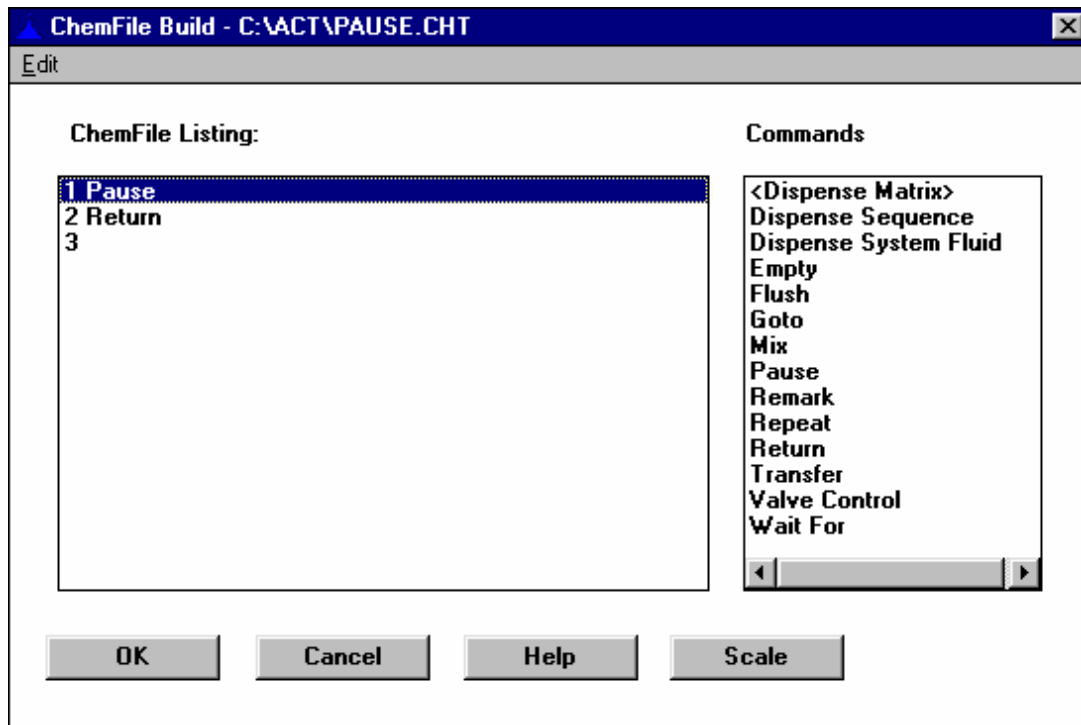
Flush.chm



Flush2.chm



Pause.cht

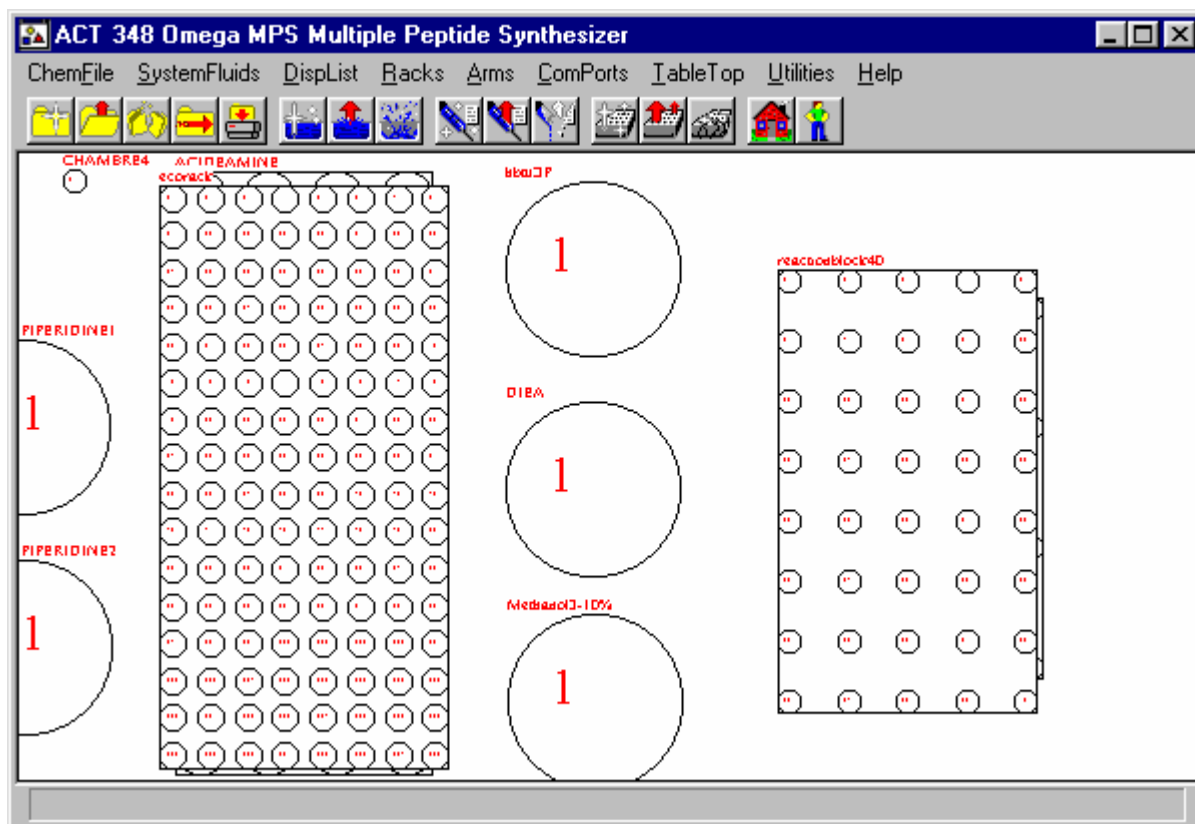


Utilisation en manuel :

- Agitation manuelle : Aller dans "Utilities" puis "Manual...", une fenêtre de dialogue s'ouvre, choisir dans "Interfaceboard" dans "Device" puis "MxxR" dans "Command". X représente la vitesse du moteur en tours par minute.
- Arrêt de l'agitation : x=0

Puis appuyer sur "Send" pour valider la commande.

Configuration de l'espace de travail :



"Goto Z_{max}" :
- ACIDEAMINE
- PyBOP

"Goto Zmax on error" :
- PIPERIDINE1
- PIPERIDINE2
- MeOH

Annexe 2

1	2	3	4
Ala	Arg(PMC)	Asn(TRT)	Asp(OtBu)
5	6	7	8
Cys(ACM)	Cys(TRT)	Glu(OtBu)	Glu(TRT)
9	10	11	12
Gly	His(TRT)	Ile	Leu
13	14	15	16
Lys(Boc)	Lys(Aloc)	Lys(dde)	Met
17	18	19	20
Phe	Pro	Ser(OtBu)	Thr(OtBu)
21	22	23	24
Trp(Boc)	Tyr(OtBu)	Val	Cys(OtBu)
25	26	27	28
d-Phe			
29	30	31	32
33	34	35	36
		PyBOP	PyBOP

Concentrations :

- Acide Aminés : 2,3 éq, on prélève 552 µL (40 puits) ou 1472 µL (16puits) pour chaque couplage, solution à 0,5 M
- PyBOP : 2,3 éq, on prélève 1104 µL (40 puits) ou 2944 µL (16puits), solution à 0,25 M
- DIPEA : 1M

Synthèse et caractérisation de mimes de surfaces d'interaction protéine-protéine par voie d'assemblage combinatoire sur châssis spatialement adressable

Le développement de molécules ciblant les surfaces d'interaction protéine-protéine constitue l'un des enjeux majeurs de la recherche scientifique académique et des industries pharmaceutiques de cette dernière décennie. A ces fins, nos travaux ont été consacrés à la conception, à la synthèse et à la caractérisation de nouveaux mimes de surfaces sur châssis. Le squelette de ce dernier est un cyclodécapeptide RAFT, pouvant présenter deux surfaces d'adressage indépendantes. La fonction de ciblage est assurée par la présentation de quatre peptides greffés par voie d'assemblage combinatoire sur la face supérieure du RAFT. De cette manière, il sera possible d'obtenir toutes les combinaisons de surfaces à partir des éléments constitutifs permettant un ciblage efficace des surfaces protéiques. L'architecture à présentation multiple a été synthétisée de manière convergente par formation hautement chimiosélective de liens éthers d'oximes, stables *in vitro* et *in vivo*. Nous avons synthétisé des substrats linéaires présentant certains motifs identiques ainsi que des substrats cycliques, contraints par la présence d'une liaison dissulfure, de séquences globalement identiques mis à part en deux positions où l'incorporation de résidus (Lys, Asp, Phe, Ser) leur confère des propriétés diverses (charges, natures...). L'utilisation de ces éléments s'inscrit dans deux approches de ciblage distinctes à savoir la réalisation de mimes de la surface de reconnaissance de l'hormone GnRH et la réalisation de surfaces pour un ciblage plus général de surfaces protéiques. L'utilisation des méthodes CLHP et LC-MS pour l'analyse des banques de produits obtenues a permis leur totale caractérisation. Enfin, la réalisation des premières évaluations biologiques sur ces mélanges vis-à-vis de plusieurs cibles (hormone GnRH, avidine, interface SHC-Grb2) a donné des résultats encourageants.

Mots clefs : *interactions protéine-protéine, surfaces d'interaction, châssis cyclodécapeptidique, chimie combinatoire, liaisons éthers d'oxime, liaisons dissulfure, colonne d'affinité, test ELISA.*

Synthesis and characterisation of template-directed combinatorial surface assembly for protein-protein interactions mimics

Targeting the protein-protein interaction surfaces to obtain inhibitors remains one of the most challenging area of the last decade. In that way, we designed and studied a new bi-functional synthetic template named RAFT. The core of the template is composed of a cyclic decapeptide scaffold presenting two distinct adressable domains. These allow the spatial separation of both functions of the template and prevent the molecules from the lower face to interfere with the targeting functions. In order to aim at the protein surfaces, a combinatorial assembly of four peptides on the upper face of the RAFT have been done. Thus, one can get all the possible surface combinations enabling an efficient targeting of the protein surfaces. The multiple presentation of peptides on the template was achieved through a convergent synthesis using efficient chimioselective oxime ligations. Concerning the substituents of the RAFT, four linear and four cyclic peptides, constraints by disulfide bridges, have been synthesized. The last present globally the same sequences except for two positions where the incorporation of different residues (Lys, Asp, Phe, Ser) confer different properties (charge, nature...). The use of those substituents have been done for two distinct purposes : (i) the formation of GnRH-receptor mimetics and (ii) a more general targeting of protein surfaces. The total characterisation of the libraries was done using HPLC and LC-MS methods. Finally, the first biological evaluations on several targets (GnRH, avidine, SHC-Grb2 interface) of those libraries gave encouraging results.

Keywords : *protein-protein interactions, interaction surfaces, cyclodecapeptide scaffold, combinatorial chemistry, oxime ligation, disulfide bridges, affinity chromatography, ELISA test.*