



Synthèse et évaluation pharmacologique de nouveaux peptides biomimétiques et de benzothiadiazines

Nadjib Kihal

► To cite this version:

Nadjib Kihal. Synthèse et évaluation pharmacologique de nouveaux peptides biomimétiques et de benzothiadiazines. Autre. Université Paris Sud - Paris XI; Université de Jijel, 2013. Français. NNT : 2013PA114804 . tel-00940587

HAL Id: tel-00940587

<https://theses.hal.science/tel-00940587>

Submitted on 2 Feb 2014

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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ DE JIJEL
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE :

Innovation Thérapeutique : du Fondamental à L'Appliqué

Pôle : Chimie Pharmaceutique

DISCIPLINE : CHIMIE

ANNÉE 2012 - 2013

SÉRIE

DOCTORAT N°

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/01/2013

par

Nadjib KIHAL

**Synthèse et Évaluation Pharmacologique de Nouveaux Peptides
Biomimétiques et de Benzothiadiazines**

Directeurs de thèse : Professeur Sandrine ONGERI Université Paris-Sud 11
Professeur Smaïl KHELILI Université de Jijel

Composition du jury :

<i>Président du jury</i>	: Jean Daniel BRION	Professeur Université Paris-Sud 11
<i>Rapporteurs</i>	: Philippe KAROYAN	Professeur Univ. Pierre et Marie Curie
	: Samir BENAYACHE	Professeur Université de Constantine
<i>Examineurs</i>	: Gille FAURY	Professeur Université Joseph-Fourier

La thèse est une aventure particulière...

Je suis fier d'avoir quotidiennement réussi à avancer, malgré les obstacles !

À tous ceux et celles qui liront ce mémoire ...
À mes parents !

Quelle chance de vivre entouré comme je le suis, par des gens qui rendent la vie plus
belle, et les pires moments finalement surmontables !

Résumé

Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) jouent un rôle primordial dans plusieurs processus cellulaires. La modulation de ces canaux par des molécules activatrices constituerait des applications pharmacologiques et médicales très intéressantes. À cet effet nous avons conçu et synthétisé de nouvelles molécules hybrides type cromakalim et diazoxide. Nous avons également, évalué l'activité myorelaxante de ces composés sur l'aorte de rates. Les résultats obtenus ne montrent pas un effet myorelaxant significatif. Des études sur d'autres tissus, notamment les cellules β pancréatiques et le muscle utérin, sont envisagées afin d'explorer une éventuelle sélectivité tissulaire.

Par ailleurs, les interactions protéine-protéine jouent un rôle fondamental dans presque tous les processus cellulaires. Par exemple elles sont impliquées dans la formation de la structure dimérique de la protéase du VIH-1 et l'agrégation du peptide β amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer. L'inhibition de ces interactions pourrait donc constituer une approche thérapeutique pour le traitement du SIDA et la maladie d'Alzheimer. Nous avons conçu et synthétisé d'une part, des pinces moléculaires à base de motifs carbonylhydrazides et oligohydrazides (Azatide), et d'autre part, des molécules pentapeptidiques avec un pseudoaminoacide central alcoolfluoré. Enfin, nous avons testé la capacité des pinces moléculaires à perturber le feuillet β terminal de la PR du VIH-1 afin d'inhiber sa dimérisation et donc son activité. Nous avons réalisé de même une étude de relation structure-activité et d'après l'ensemble des résultats obtenus, il semblerait que la flexibilité soit délétère pour l'activité inhibitrice. Nous avons également évalué la capacité des nouvelles molécules peptidomimétiques alcool fluorées à accélérer ou inhiber l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ dans le but de diminuer la présence de petits oligomères neurotoxiques. Les résultats obtenus sont très prometteurs, nous avons réussi à développer d'une part un pentapeptide capable d'inhiber totalement l'agrégation de $A\beta_{1-42}$, et d'autre part des pseudopentapeptides capables d'accélérer son agrégation. Nous avons aussi démontré l'influence de l'atome de fluor sur la structuration d'un pentapeptide. Des études par RMN et DC sont en cours.

Mots Clés

Canaux K_{ATP} , cromakalim, diazoxide, amine, aminoacide, activité myorelaxante, interactions protéine-protéine, protéase du VIH-1, SIDA, peptide β amyloïde, Maladie d'Alzheimer, carbonylhydrazides, Azatide, peptidomimétique, motif alcool fluoré, dimerisation, agrégation, feuillet β .

Abstract

ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) play an important role in many cellular processes. The modulation of these channels by activating molecules may constitute very interesting pharmacological and medicinal applications. For this purpose, we have designed and synthesized new hybrid molecules type cromakalim and diazoxide. We also evaluated the relaxant activity of these compounds on aorta of rats. The obtained results do not show a significant relaxant effect. Studies on other tissues, including pancreatic β cells and uterine muscle, are envisaged to explore the potency of these compounds and their possible tissue selectivity.

Otherwise, Protein-protein interactions play a fundamental role in almost all cellular processes. They are strongly involved in the formation of the dimeric structure of HIV-1 protease and β amyloid peptide aggregation involved in Alzheimer's disease. Inhibition of these interactions would be a therapeutic advantage for the treatment of AIDS and Alzheimer's disease. We designed and synthesized on one hand, molecular tongs based on carbonylhydrazide oligohydrazid (Azatide) fragments and in the other hand, pentapeptide molecules with a central fluorinated and hydroxylated aminoacid. Finally, we tested the ability of molecular tongs to disrupt the terminal β sheet of the HIV-1 PR to inhibit its dimerization and thus its activity. We have also conducted a structure-activity relationship study and According to the results it seems that flexibility is detrimental to the inhibitory activity. We evaluated as well the ability of new fluorinated and hydroxylated peptidomimetics to accelerate or inhibit the aggregation of $A\beta_{1-42}$ peptide in order to reduce the presence of small toxic oligomers. The results are very promising that we succeeded in developing a pentapeptide able to completely inhibit the aggregation of $A\beta_{1-42}$, and in the other hand pseudopentapeptides able to accelerate its aggregation. We also demonstrated the influence of fluorine on the structure of a pentapeptides. Studies by NMR and DC are in progress.

Keywords

K_{ATP} channels, cromakalim, diazoxide, amine, aminoacide, muscle relaxant activity, protein interactions, HIV-1 protease, AIDS, β amyloid peptide, Alzheimer's disease, carbonylhydrazides, Azatide, fluorinated and hydroxylated peptidomimetics, dimerization, aggregation, β sheet.

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

LABORATOIRE MOLÉCULES FLUORÉES ET CHIMIE MÉDICINALE
BioCIS CNRS UMR 8076, LabEx LERMIT

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex
France

Table Des Matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Table Des Matières	VI
Remerciements.....	X
Liste Des Abréviations.....	XIV

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

PARTIE I : DÉRIVÉS BENZOTHIADIAZINES ET MODULATION DES CANAUX KATP

I. Généralités	6
II. Classification et structure des canaux potassiques	8
II.1. Canaux potassiques voltage-dépendant.....	9
II.2. Canaux potassiques à rectification entrante (Kir)	9
II.3. Canaux potassiques à rectification entrante faible	10
III. Structure et principe de fonctionnement d'un canal K_{ATP}	10
IV. Distribution et rôle physiologique des canaux K_{ATP}	13
V. Modulateurs des canaux K_{ATP}	18
V.1. Inhibiteurs des Canaux K_{ATP}	19
V.2. Activateurs des canaux K_{ATP}	20
V.2.1. Benzopyranes	22
V.2.2. Cyanoguanidines	23
V.2.3. Benzo- et pyrido-thiadiazines	24
VI. Travaux réalisés	26
VI.1. Stratégie de conception des molécules cibles	26
VI.2. Objectifs.....	30
VI.3. Stratégies et voies de synthèse.....	31
VI.4. Résultats et discussion	35
VII. Conclusion et perspectives	38
Partie Expérimentale.....	39
I. Modèle aortique	39
I.1. Prélèvement de l'aorte thoracique de rat	39
I.2. Montage des anneaux aortique sur son support.....	39

I.3. Mesure de la contraction isométrique résiduelle d'aorte de rat.....	39
II. Matériels et méthodes.....	40
III. Modes opératoires.....	41
III.1. Synthèse de l'intermédiaire 31.....	41
III.2. Synthèse de l'intermédiaire 32.....	41
III.3. Synthèse de l'intermédiaire 33.....	42
III.4. Synthèse de l'intermédiaire 24.....	43
III.5. Synthèses des composés hybrides diazoxide-cromakalim 36-42	44
III.6. Synthèses des composés hybrides diazoxide-aminoacide/amine 40-60	52
Références Bibliographiques	62

Partie II : PEPTIDOMIMÉTIQUES POUR MODULER LES INTERACTIONS PROTÉINE- PROTÉINE IMPLIQUANT UN FEUILLET BÊTA

I. Introduction	71
II. Interactions protéine-protéine	78
III. Structure des feuillets β	81
IV. Peptidomimétiques :	84
Références Bibliographiques	86

INHIBITEURS DE LA DIMÉRISATION DE LA PROTÉASE DU VIH-1

I. Introduction	89
II. Structure et spécificité de la protéase du VIH-1	98
III. Modulateurs de la protéase du VIH-1	101
IV. Travail du laboratoire	107
V. Objectifs	111
VI. Structure et intérêt des azapeptides.....	114
VII.1. Synthèse.....	115
VII.1.1. Synthèse des bras à base de motifs carbonylhydrazide.....	115
VII.1.2. Synthèse du scaffold central.....	117
VII.1.3. Synthèse de pinces moléculaires	117
VII.2. Résultats biologiques.....	118
VII.3. Modélisation moléculaire	121
VII.4. Estimation des surfaces accessibles et clogP	121

VIII. Conclusion et Perspectives.....	125
Partie Expérimentale	126
I. Tests Biologiques	126
I.1. Matériel utilisé.....	127
I.2. L'activité inhibitrice contre la PR multi-mutées	127
I.3. Méthodes cinétiques et biochimiques d'analyse	128
I.3.1. Propriétés de stabilité, de solubilité et spectrale de composés	128
I.3.2. Détermination de l'activité enzymatique	128
I.3.2.a. Dosage de l'activité fluorométrique	128
I.3.2.b. Activité protéolytique	129
I.3.3. Analyse cinétique de l'inhibition	130
a. Détermination des valeurs IC ₅₀	130
b. Déterminer le mécanisme d'action et la cinétique de l'inhibition	130
b.1. L'inhibition compétitive	131
b.2. Inhibition non compétitive	131
b.3. L'inhibition de la dimérisation	131
I.3.4. Liaison de la sonde fluorescente.....	135
I.3.5. Évaluation de la stabilité métabolique	136
I.3.6. L'inhibition de la rénine et la pepsine	136
II. Matériel et méthodes	137
III. Description des composés.....	138
Références Bibliographiques	151

INHIBITEURS DE L'AGRÉGATION DU PEPTIDE BÉTA-AMYLÖÏDE

I. Introduction	160
II. Cascade Amyloïde.....	164
III. Structure et rôle physiopathologique du peptide β -amyloïde	166
III.1. Formation de fibrilles β -amyloïdes	168
III.2. Rôle physiologique du peptide β -amyloïde	176
IV. Traitements anti-Alzheimer.....	178
IV.1. Stratégies utilisées en clinique	178
IV.2. Traitements étiologiques en cours d'étude.....	179
IV.3. Inhibiteurs d'agrégation du peptide β -amyloïde.....	182
V. Travail antérieur du laboratoire.....	189

VI.Objectifs.....	192
VII. Intérêt du fluor.....	198
VII.1. Métabolisme et stabilité métabolique.....	199
VII.2. Acidité, basicité et liaison hydrogène.....	199
VII.3. Hydrophobie et Lipophilie	200
VII.4. Effets stériques	201
VII.5. Effets du fluor sur les propriétés biologiques.....	201
VIII. Synthèse	202
VIII.1. Synthèse de pseudo-aminoacide trifluorométhylé	204
VIII.2. Synthèse de la sérine trifluorométhylée	205
VIII.3. Synthèse de l'hydroxyproline trifluorométhylée	207
VIII.4. Synthèse des différents pentapeptides.....	208
IX. Résultats biologiques :	211
IX.1. Dérivés de la sérine.....	212
IX.2. Dérivés de la proline	214
IX.3. Dérivés de la tyrosine	215
X. Conclusion et Perspectives :	219
Partie Expérimentale.....	220
I. Méthode d'évaluation de l'activité anti-agrégante des pentapeptides.....	220
I.1. Mode opératoire du suivi de la cinétique d'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ par fluorescence à la Thioflavine T.....	220
I.2. Matériel utilisé.....	220
I.3. Dispositif	220
I.4. Conditions d'utilisation.....	220
I.5. Paramètres de l'analyse.....	221
I.6. Protocole de traitement du peptide	221
II. Description des composés	222
Références Bibliographiques	294

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué dans le cadre d'une **cotutelle de thèse** entre l'Université Paris-Sud 11 « France » et l'Université de Jijel « Algérie ».

La première partie de ce travail « **Dérivés benzothiadiazines et modulation des canaux K_{ATP}** » a été réalisée sous la direction de Monsieur **Smaïl KHELILI**, Professeur à l'Université de Jijel et Directeur de laboratoire de Pharmacologie et Phytochimie à la Faculté des sciences exactes de l'Université de Jijel. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir dirigé dans la réalisation de cette première partie, son écoute, son soutien et pour tout ce que j'ai appris de lui, depuis mes études de graduation jusqu'à ma thèse de doctorat.

La deuxième partie de ce travail « **Conception et synthèse des peptidomimétiques capables de mimer une structure peptidique en brin β afin de moduler/inhiber des interactions protéine-protéine impliquant une structure en feuillet bêta** » a été réalisée sous la direction de Madame **Sandrine ONGERI**, Professeur à l'Université Paris-Sud 11 et Directrice du laboratoire Molécules Fluorées et Chimie Médicinale à la faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud 11. Je tiens à lui exprimer un immense et respectueux merci pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire pour y effectuer une grande partie de ma thèse et encadré tout au long de mes stages à Paris et pour m'avoir accordé de son temps aussi souvent que possible. Un grand merci pour sa disponibilité, son écoute et ses conseils. Une de mes plus grandes satisfactions, à la fin de ces années, est d'avoir essayé d'apprendre un peu d'elle, même si j'ai découvert en même temps la déroutante sensation de se sentir tout petit !

De la même façon, je remercie très chaleureusement « mon leader » **Jean Louis SOULIER**, chargé de recherche au CNRS à l'université Paris-Sud 11. Son regard avisé a permis de guider ce travail d'une main de maître... Quel bonheur de t'avoir rencontré. Merci pour tout ce que tu as apporté au labo, pour m'avoir intégré, m'avoir enseigné, ta joie de vivre, ta patience, ton engagement, ton enthousiasme et ton appui permanent. Merci aussi pour tes petits délires qui pour moi ont imprégné le laboratoire et sont associés à la recherche. Je n'oublie jamais toutes nos discussions scientifiques et personnelles.

Je tiens à remercier Monsieur **Jean Daniel BRION**, Professeur à l'Université Paris-Sud 11 et Directeur du pôle Chimie à la Faculté de Pharmacie, pour l'immense honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ce travail.

Je remercie vivement Monsieur **Philippe KAROYAN**, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie et Monsieur **Samir BENAYACHE**, Professeur à l'Université Mentouri de Constantine pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de l'évaluer en tant que rapporteurs.

Toute ma gratitude va au Monsieur **Gille FAURY**, Professeur à l'Université Joseph Fourier, pour avoir accepté de participer à ce jury, et plus largement pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour y effectuer des tests biologiques sur les modèles aortiques de rats ainsi que pour ses encouragements.

Je remercie également **Julia KAFFY**, Maître de conférences à la faculté de pharmacie de l'université Paris-Sud 11, pour avoir grandement participé à l'évaluation biophysique de mes structures ainsi que pour ses encouragements et ses conseils précieux. Je remercie également Madame **Lucie KHEMTEMOURIAN** et Madame **Michèle REBOUD-RAVAUX** pour avoir participé à l'évaluation biologique de quelques structures.

Je remercie **Jordi RODRIGO** et **Guillaume BERNADAT** pour les études de modélisation moléculaire et pour m'avoir dispensé de conseils précieux.

Un grand merci à Madame **Danièle BONNET-DELPON**, Messieurs **Benoit CROUSSE**, **Thierry MILCENT** et **Julien LEGROS** pour leur disponibilité, leur sympathie et leur implication dans l'organisation du laboratoire.

Je tiens à remercier également Monsieur **Olivier LEQUIN**, Professeur à l'Université Paris-Sud 11, pour avoir accepté de collaborer avec nous concernant l'étude de la structure des molécules par RMN.

Je voudrais plus particulièrement remercier **Claire** et **Estelle** qui nous ont grandement aidés sur la partie analyse spectrale pour l'ensemble des expériences RMN.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont vivement contribuées aux différents projets présentés dans ce manuscrit **en particulier ceux qui m'ont préparé les trois dérivés nitro** des molécules hybrides type cromakalim et **Nafila** pour la synthèse du premier intermédiaire de la série benzothiadiazine ainsi que pour ses encouragements !

Un grand merci s'adresse à Monsieur **Mabrouk BOLGHOSI**, Maître de conférences à l'Université de Jijel et Ex chef de département de chimie, pour toute l'aide qu'il m'a apportée, et pour tout ce qu'il a apporté au département.

Je tiens également à remercier Madame **Naïma MERABET**, Maître de conférences à l'Université de Jijel et Ex chef de département de chimie, pour ces conseils précieux ainsi que pour cette occasion de vivre de si belle expérience à Paris !

Merci aussi à Messieurs **Tayeb IDOUI**, Maître de conférences à l'Université de Jijel et chef de département de biologie moléculaire et cellulaire, et **Eric ESTEVE**, Maître de Conférences à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, pour leurs conseils.

Je n'oublie jamais toute l'équipe du laboratoire de Chimie de la faculté des Sciences Exactes à l'Université de Jijel en particulier **Aïcha, Assia, Naïma et Tawhida**. Merci à vous pour les encouragements, la confiance et toute l'aide.

Je remercie mes collègues **Hadia, Kamel, Moussa, Riad** (Jijel), **Zeimeb et Adama** (Grenoble) pour toute leur aide et leur soutien.

Je remercie chaleureusement **Wassim** le philosophe libanais, **Rocco** le chevalier italien qui ne répond jamais au téléphone ! et **Raoni** le roi du carnaval brésilien. Merci pour votre amitié, vos conseils précieux et vos encouragements.

À tout le groupe de la résidence de Châtenay « en particulier **Dario** » avec qui j'ai partagé d'inoubliables moments. Merci pour les soirées et pour nos petits repas ! Vous m'avez régulièrement rappelé qu'une autre vie se déroulait hors du labo.

Il y a aussi les **amis, collègues de travail et proches de l'extérieur**, présents dans toutes les aventures, et il devient risqué de citer des noms !

J'en viens à remercier toute la fine équipe de jeunes chercheurs dont j'ai fait partie pendant mes stages à Paris et avec qui j'ai passé de très bons moments : **Massaba** et sa belle voie musicale, **Sophie** et son esprit ouvert sans oublier sa petite Kitty ! **Bénédicte**, fait attention à toi et bonne continuation ! **Amalia**, **Roberto**, **Nicolò** et nos fous rires ! **Keno** et sa sympathie ! **Kamel** et son accent oranais ! **Séverine** et son côté très légèrement maniaque, **Sofiane** ! Merci pour cette chouette ambiance, les pauses café, les discussions...

Je tiens à réserver une place particulière à mes adorables italiennes avec qui j'ai partagé la paillasse ! Je remercie chaleureusement ma sorellina **Chiara** pour sa gentillesse et pour son soutien moral. Un grand merci également à ma petite **Claudia** pour son immense bonne humeur et pour son soutien... Merci à vous deux pour nos discussions amicales, pour votre sympathie, pour votre aide, et vos encouragements !

Je tiens à adresser plus particulièrement des remerciements à mon petit Breton **Dimitri** pour toute l'aide qu'il a pu me dispenser. Merci pour ton amitié, pour ta sympathie et ta confiance, pour tes encouragements et tes conseils dans les moments de doutes...

Je voudrais remercier tous mes proches et en particulier mes grands parents, ma tante **Kerenfla** pour ses gâteaux délicieux, mon petit oncle **Ahmed**, et mes cousines **Lila** et **Nadia** qui m'ont beaucoup soutenus dans les moments difficiles. Merci pour toute l'aide.

« Un grand merci au **stress** ! pour m'avoir tenu éveillé les derniers soirs de rédaction ! »

Enfin, je tiens à associer à ces remerciements ma famille pour m'avoir soutenue et toujours cru en moi pendant toutes mes années d'étude et sans qui cette thèse n'aurait pas été accomplie. À mes adorables sœurs **Lamia** et **Abir**. À mes frères, **Lotfi**, **Karim** et **M^{ed} Salah** et leurs moments fous de PES ! À ceux pour lesquels le mot "merci" n'est plus suffisant : **mes parents** ! Cette thèse en particulier, n'existe aujourd'hui que par des années de sacrifices et de soutien permanent de votre part. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir permis d'aller au bout de mes choix, sans restriction, merci pour m'avoir donné cette vie si diverse. Merci pour votre soutien inconditionnel, je ne serai pas ce que je suis sans ce que vous m'avez offert. Vous avez ma gratitude éternelle. Je vous aime tant.

Liste Des Abréviations

°C	: Température en degrés Celsius
3D	: Trois dimensions
Å	: Angström
Aa ou AA	: Acide aminé
ABC	: ATP-Binding-Cassette
Ac	: Groupe acétyle
AcCN	: Acétonitrile
AcOEt	: Acétate d'éthyle
AcOH	: Acide acétique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADP	: Adénosine di-phosphate
Ala	: Alanine (A)
APTS	: Acide para-toluène sulfonique
Arg	: Arginine (R)
ATP	: Adénosine triphosphate
Bn	: Benzyle
Boc	: <i>tert</i> -butyloxycarbonyl
C- terminal	: Extrémité Carboxy terminale d'un peptide ou d'une protéine
Cbz	: Benzyloxycarbonyl
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CDCl₃	: Chloroforme deutérié
Cys	: Cystéine (C)
d	: Doublet
Da	: Dalton
DC	: Dichroïsme circulaire
DCM	: Dichlorométhane
dd	: Doublet dédoublé
DIPEA	: Diisopropyléthylamine
DM	: Dynamique moléculaire
DMF	: <i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	: Diméthylsulfoxyde

DMSO-<i>d</i>₆	: Diméthylsulfoxyde deutérié
Eq	: Equivalent
Et	: Groupe éthyle
Et₂O	: Ether diéthylique
EtOH	: Ethanol
Fmoc	: 9-fluorénylméthoxycarbonyl
g	: Gramme
Glu	: Acide glutamique (E)
Gly	: Glycine (G)
GP	: Groupement protecteur
H	: Heure
HBTU	: <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
His	: Histidine
HOBt	: Hydroxybenzotriazole
Hz	: Hertz
<i>i</i>-Bu	: iso-butyle
IC₅₀	: Concentration d'un composé inhibant 50 % de l'effet observé
<i>i</i>-Pr	: iso-propyle
IR	: Infra-Rouge
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	: Constante de couplage
K_{ATP}	: Canal potassique sensible à l'ATP
KCa	: Canaux potassiques sensibles à Ca ²⁺ (Ca ²⁺ -activated K ⁺ channels)
Kcal/mol	: Kilocalorie par mole
KCOs	: Ouvreurs potassiques (<i>K⁺ Channel Openers</i>)
K_d	: Constante d'affinité
K_i	: Constante d'inhibition
K_{id}	: Constante d'inhibition de la dimérisation
Kir	: Canal K ⁺ rectifiant entrant (<i>K⁺ inward rectifier</i>)
Leu	: Leucine (L)
M	: Molaire
m	: Multiplet
Me	: Groupe méthyle

MeOD	: Méthanol deutérié
MeOH	: Méthanol
mg	: Milligramme
min	: Minute
mL	: Millilitre
mM	: Millimolaire
mmol	: Millimole
mol	: Mole
N- terminal	: Extrémité Amino terminale d'un peptide ou d'une protéine
NBD	: Domaine de liaison des nucléotides (<i>Nucleotide Binding Domain</i>)
n-Bu	: n-butyle
nM	: Nanomolaire
NO	: Nitric oxide
ns	: Non significatif
p	: Para
P	: Pore du canal
Pd/C	: Palladium sur charbon
PDB	: Protein Data Bank
Ph	: Phényle
Phe	: Phénylalanine (F)
ppm	: Partie par million
Pro	: Proline (P)
Py	: Pyridine
q	: Quadruplet
Quant.	: Quantitatif
R	: Groupement alkyle non défini
R^{dt}	: Rendement
R_f	: Rapport frontal
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹³C	: Résonance magnétique nucléaire du carbone
RMN ¹⁹F	: Résonance magnétique nucléaire du Fluor
RMN ¹H	: Résonance magnétique nucléaire du proton
RX	: Rayons X

s	: Singulet
S	: Régions (ségments) transmembranaires
Ser	: Sérine (S)
SIDA	: Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SM	: Spectrométrie de Masse
STM	: Segment transmembranaire
SUR	: Récepteur des sulfonylurées (Sulfonyl urea receptor)
t	: Triplet
ta	: Température ambiante
TBAF	: Fluorure de tétrabutylammonium
t-Bu	: <i>tert</i> -butyle
T_f	: Point de fusion
TFA	: Acide trifluoroacétique
THF	: Tétrahydrofurane
TMD	: Domaine transmembranaire (Transmembrane domain)
TMS	: Triméthylsilyle
UV	: Ultraviolet
Val	: Valine (V)
VDCC	: Canaux calciques voltage dépendant
VIH-1	: Virus de l'Immunodéficience Humaine type 1
δ	: Déplacement chimique
μM	: Micromolaire

Introduction Générale

Introduction générale

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle de thèse, c'est pourquoi je vais présenter mes travaux dans ce manuscrit, en deux parties :

La première a comme objet la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de nouveaux activateurs des canaux potassiques sensibles à l'ATP, des benzothiadiazines substitués en position 3 par un cycle dihydrobenzopyrane et des restes aminés ou acide-aminés. Cette classe de canaux ioniques joue un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques dont la modulation pourrait ouvrir une voie à des applications pharmacologiques et médicinales très intéressantes. Nous avons adopté comme modèle le squelette du diazoxide, un benzothiadiazine connu et activateur des canaux K_{ATP} , auquel nous avons associé des éléments de structure du cromakalim, un autre activateur de ces canaux. Il est connu que les activateurs (et même quelques inhibiteurs) des canaux K_{ATP} possèdent des éléments de structure communs, bien qu'ils appartiennent à des familles chimiques très différentes. Dans une deuxième étape nous avons introduit à la place du cromakalim des restes aminés et acide-aminés. Les molécules ont été testées, dans un premier temps, sur le modèle aortique de rats pour évaluer l'effet vasodilatateur. La première série de molécules (hybrides type cromakalim) a déjà prouvé son efficacité sur l'utérus de rates (relaxation) alors que sur le modèle des cellules β pancréatiques elles étaient inactives (résultats de magister). Le test sur le modèle aortique de rats, lui non plus, n'a révélé aucun effet significatif, ce qui renforce l'idée d'une sélectivité tissulaire de ces molécules, dirigée vers le muscle utérin. Un autre test sur des cellules de gliomes de cerveaux (résultats non encore près vu le délai imposé pour la remise du manuscrit) a été effectué. Les résultats qui viennent de tomber ces jours-ci révèlent un effet antiprolifératif très intéressant. En effet, des travaux récents ont montré cet effet antiprolifératif de la part des activateurs potassiques.

La deuxième série de molécules, hybrides de type diazoxide, a montré un profil d'activité similaire à celui de la première série, ce qui nous amène à envisager, plus tard, l'évaluation de ces molécules sur les autres modèles biologiques, pour pouvoir les comparer aux molécules de la première série.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés aux interactions protéine-protéine. Ces interactions protéine-protéine (IPP) régissent tous les aspects de la fonction des cellules et, à ce titre, sont une cible majeure pour la recherche et l'intervention thérapeutique. Les inhibiteurs d'interactions protéine-protéine sont susceptibles de présenter plusieurs avantages par rapport à d'autres types d'inhibiteurs. L'extrême complémentarité des interfaces protéine-protéine offre la possibilité de développer des inhibiteurs hautement spécifiques, permettant ainsi d'éviter les cibles cellulaires non spécifiques. De plus, les mutations des complexes protéiques ciblés par ces inhibiteurs sont moins lourdes de conséquences que les mutations qui interviennent sur des protéines fixant des inhibiteurs au niveau de leur site actif.

Notre objectif est alors de concevoir et synthétiser de nouveaux peptidomimétiques capables de mimer une structure peptidique en brin β afin de moduler/inhiber des interactions protéine-protéine impliquant une structure riche en feuillet β . Dans ce but, nous avons travaillé sur deux cibles : la première est la protéase du VIH-1 pour laquelle nous avons essayé de développer des pinces moléculaires à base de motifs carbonylhydrazides et oligohydrazides (azatide) capables de mimer un feuillet beta formé par les quatre résidus des extrémités *N*- et *C*-terminales du monomère de la protéase et de ce fait empêcher sa dimérisation. Une étude de modélisation moléculaire pour générer les conformations privilégiées des pinces moléculaires est réalisée. En outre, la stabilité des différentes conformations générées ainsi que le complexe monomère de protéase-pince moléculaire a été étudiée par minimisation moléculaire. Enfin, une évaluation de la capacité des pinces à perturber le feuillet β terminal de la PR du VIH-1 afin d'inhiber sa dimérisation et donc son activité, a été réalisée sur trois types de protéase du VIH-1. Ainsi, une étude comparative nous permet d'établir les relations structure-activité.

Dans une autre phase de la présente étude, nous nous sommes intéressés aux inhibiteurs de l'agrégation du peptide bêta Amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer. À cet effet nous avons conçu et synthétisé de nouvelles molécules peptidomimétiques alcool fluorées mimant la séquence du cœur hydrophobe, KLVFF, du peptide β amyloïde afin de développer des casseurs de feuillet β pour empêcher son agrégation. Nous avons également évalué la capacité des nouvelles molécules peptidomimétiques alcool fluorées à accélérer ou inhiber l'agrégation du peptide $A\beta_{42}$ dans le but de diminuer la présence de petits oligomères neurotoxiques.

Partie I

**Conception, Synthèse et Évaluation pharmacologique de
nouveaux activateurs des canaux potassiques sensibles à
l'ATP : dérivés benzothiadiazines.**



Université de Jijel

**DERIVES BENZOTHIADIAZINES ET
MODULATION DES CANAUX K_{ATP}**



I. Généralités

Les canaux potassiques sont des entités moléculaires qui catalysent la diffusion directionnelle et sélective de 10^6 à 10^8 ions potassium (K^+) par seconde, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, ce qui correspond à un important gradient électrochimique d'ions potassiques de part et d'autre de la membrane plasmatique [Parent *et al.*, 2002].

Des analyses cristallographiques ont bien montré que ces canaux sont pourvus d'une large cavité hydrophile d'un diamètre de 8 Å, qui se trouve au centre du canal potassique en contact avec le milieu cytoplasmique (Figure 1). La cavité interne se rétrécit considérablement au niveau du filtre de sélectivité formé par trois acides aminés Gly, Tyr/Phe, Gly qui lui fait face au milieu extracellulaire. Ainsi, son rôle est d'assurer, uniquement, le passage des ions K^+ à travers le canal avec une très grande sélectivité compatible avec le flux rapide des ions potassiques [Parent *et al.*, 2002].

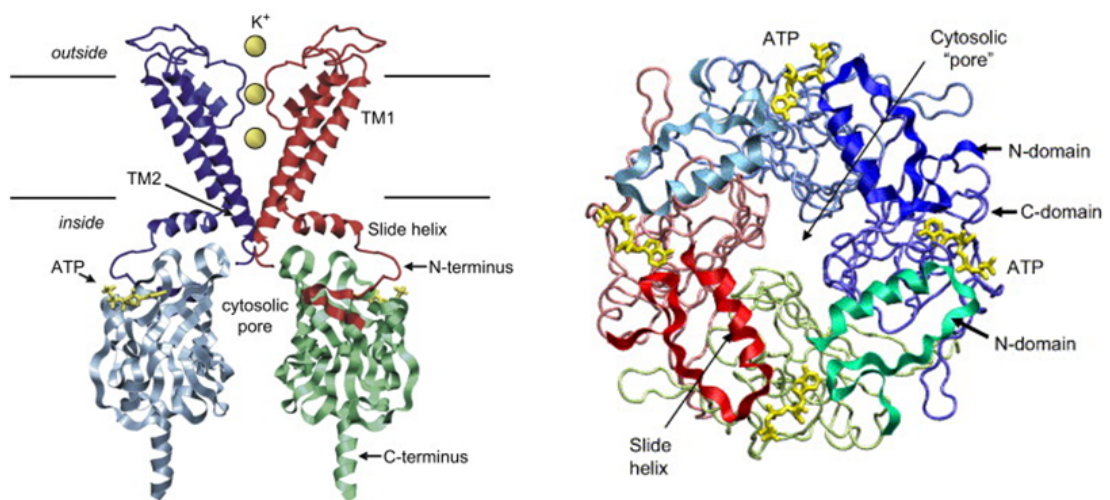


Figure 1 : Structure tridimensionnelle d'un canal potassique [Haider, 2005 ; Prokset Ashcroft, 2009].

La région du filtre de sélectivité, qui se trouve dans la partie étroite du pore, possède des dimensions qui lui permettent d'accommoder parfaitement un ion potassique déshydraté. La projection des groupes carbonyles des acides aminés (Gly, Tyr/Phe, Gly) vers le milieu du canal confère à la région du pore une électronégativité nette qui stabilise les ions K^+ positifs.

Il existe près de six sites de liaison distincts le long de l'axe du canal potassique (en excluant le site de liaison dans la cavité interne) dont la moitié, seulement, serait occupée simultanément par des ions potassiques, l'autre moitié étant occupée par des molécules d'eau afin d'assurer une séparation des ions potassiques de façon à minimiser la répulsion ion-ion dans le canal. Ceci permet la fixation et le passage de plus d'un ion potassium d'un site à l'autre sans réhydratation.

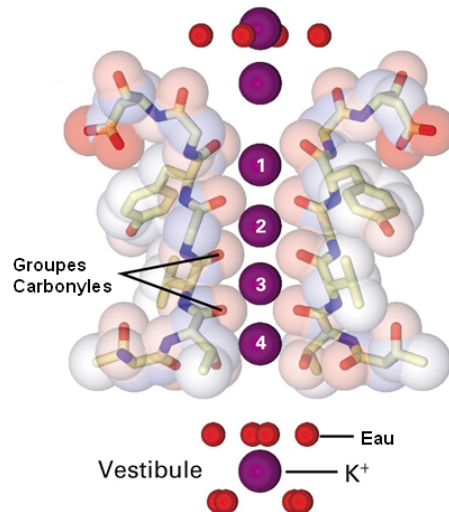


Figure 2 : Filtre de sélectivité d'un canal potassique.

La cavité interne contient en permanence un seul ion potassium coordonné par huit molécules d'eau (Figure 2), elles forment les huit coins d'un cube asymétrique (ou sphère d'hydratation) qui emprisonne l'ion potassium au centre grâce à la projection des atomes d'oxygène vers l'intérieur [Parent *et al.*, 2002].

L'arrangement octaédrique des molécules d'eau, formant la sphère d'hydratation de l'ion potassium dans cette cavité, rappelle la coordination des ions potassiques par les groupes carbonyles dans le filtre de sélectivité et pourrait signaler que la structure des canaux potassiques a évolué de façon à reproduire les conditions optimales de coordination des ions potassiques en solution aqueuse [Parent *et al.*, 2002].

Le rôle important, connu de ces canaux, est celui de la régulation de plusieurs processus physiologiques à savoir le contrôle du volume cellulaire, du potentiel membranaire, de l'excitabilité neuronale, et de la sécrétion des sels, hormones, et des neurotransmetteurs.

II. Classification et structure des canaux potassiques

Les canaux potassiques sont des protéines intégrées dans les membranes cellulaires avec des structures et des mécanismes de régulation très complexes [Miller, 2000]. Elles sont exprimées dans tous types de cellules et dans tous les organismes, ce qui indique leur rôle important dans la signalisation cellulaire. Ces canaux sont probablement la plus large famille des canaux ioniques ayant une grande diversité de modèle d'expression dans différents tissus [Coetzee *et al.*, 1999 ; Jan et Jan, 1992].

L'impressionnante diversité fonctionnelle des canaux potassiques repose en grande partie sur leur très grande diversité génique (Figure 3). En effet, chez l'homme, plus de 46 gènes différents codent pour des sous-unités potassiques [Priori *et al.*, 1999]. Chaque sous-unité possède un ou plusieurs domaines P, qui participent à la formation d'un pore sélectif au potassium, et un nombre variable de segments transmembranaires.

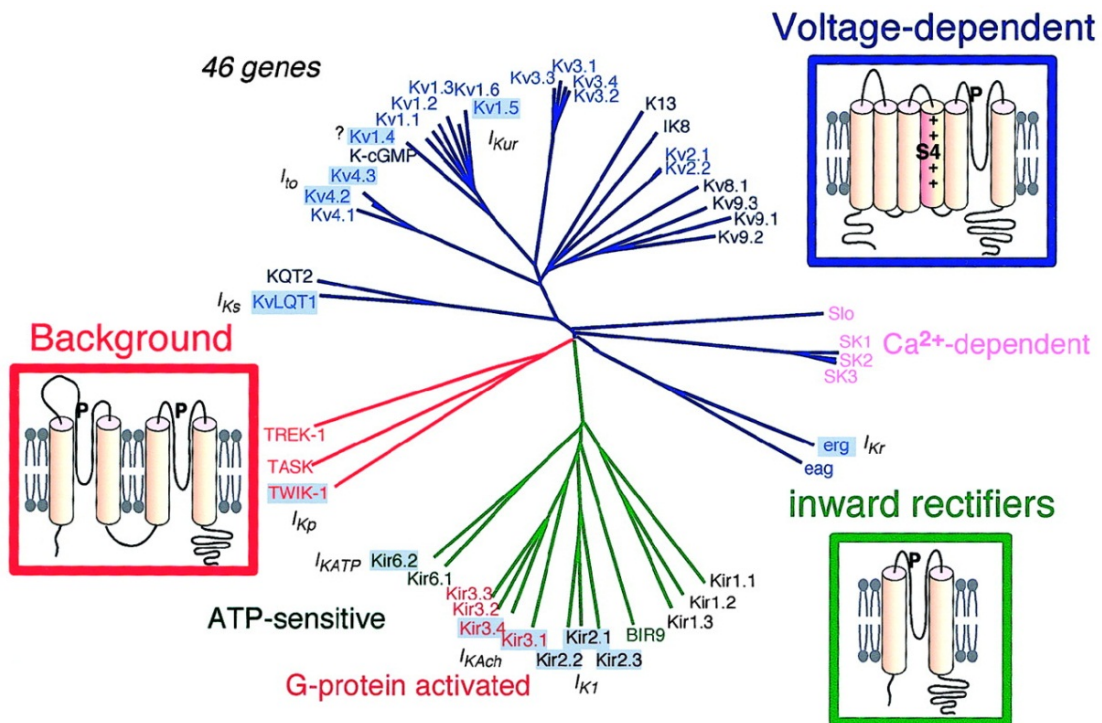


Figure 3 : Gènes codant pour des sous-unités potassiques [Priori *et al.*, 1999].

On distingue trois grandes familles de canaux potassiques sur la base de leur homologie structurale [Miller, 2000].

II.1. Canaux potassiques voltage-dépendant

Ils sont formés de six régions transmembranaires (S1-S6) avec un seul pore, et des mécanismes d'activation et d'inactivation variés (Figure 4). La séquence du motif tri-peptidique (G.F/Y.G) est localisée sur la liaison S5-S6, en outre la partie majeure de la sensibilité du canal au voltage est due au segment transmembranaire S4, contenant des résidus avec des charges positives (lysine ou arginine) exigeant, pour l'activation du canal, des interactions électrostatiques avec les charges négatives des segments S2 et S3 ;

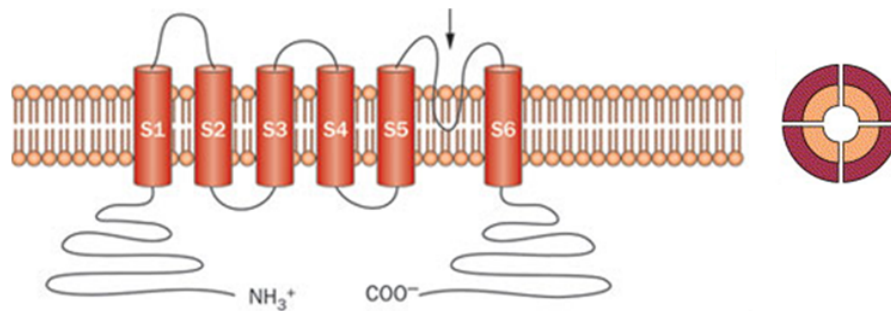


Figure 4 : Structure d'un canal potassique voltage-dépendant [Giudicessi et Ackerman, 2012 ; Xu *et al.*, 2004].

II.2. Canaux potassiques à rectification entrante (Kir)

Ils sont formés par quatre sous-unités contenant deux segments transmembranaires (M1 et M2) (Figure 5). Ce type de canaux potassiques est d'une importance primordiale dans le maintien du potentiel membranaire à l'état de repos. Ils sont organisés en forme tétramérique, bien qu'ils forment des complexes ayant un arrangement octamérique, comme c'est le cas pour les canaux potassiques ATP-dépendants comportent quatre sous-unités Kir, qui contribuent à la conductance du pore, et quatre sous-unités régulatrices des récepteurs sulfonylurées ;

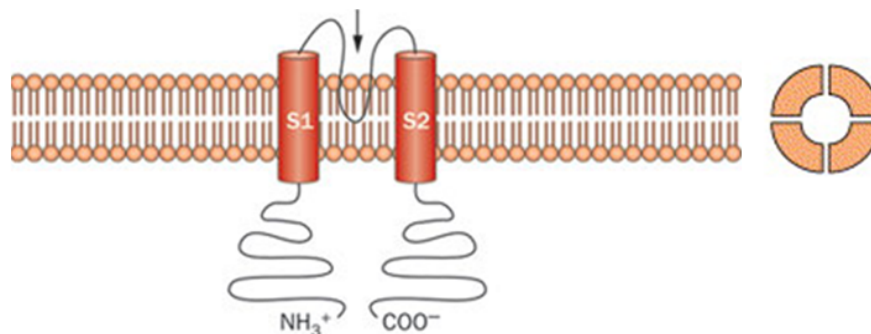


Figure 5 : Structure d'un canal potassique à rectification entrante [Giudicessi et Ackerman, 2012 ; Xu *et al.*, 2004].

II.3. Canaux potassiques à rectification entrante faible

Ils sont formés de quatre domaines transmembranaires et deux pores (P1, P2), dont chacun est formé de sous-unités semblables, probablement disposées de façon à retenir l'arrangement tétramérique du canal (Figure 6). Il semble que ces canaux forment la plus abondante classe de canaux potassiques, d'où les résidus G(Y/F) G du filtre de sélectivité sont conservés au premier pore, et remplacés par les résidus GFG ou GLG dans le deuxième.

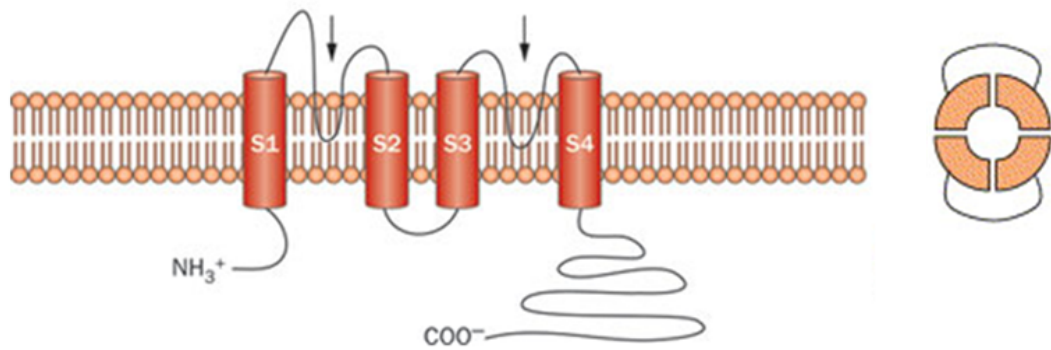


Figure 6 : Structure d'un canal potassique à rectification entrante faible [Giudicessi et Ackerman, 2012 ; Xu *et al.*, 2004].

III. Structure et principe de fonctionnement d'un canal K_{ATP}

Les K_{ATP} sont des complexes protéiques de 950 kDa environ [Clement IV *et al.*, 1997]. Ils adoptent une structure octamérique, résultant d'un assemblage, selon une stœchiométrie 4:4 (Figure 7), de sous-unités Kir (α) délimitant le pore du canal rectifiant entrant, sélectif au potassium, et de sous-unités SUR (β) du récepteur sulfonylurée, appartenant aux systèmes de transport à ATP-Binding Cassette (ABC). Cette dernière constitue une famille extrêmement vaste de protéine que l'on rencontre chez tout le règne vivant [Clement IV *et al.*, 1997 ; Lorenz *et al.*, 1998 ; Miki *et al.*, 1999 ; Giblin *et al.*, 2002 ; Quast *et al.*, 2004 ; Tricarico *et al.*, 2006 ; Burke *et al.*, 2008]. Cette famille de transporteurs actifs lie et transporte leur substrat en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP contre le gradient de concentration du substrat. Ces protéines sont impliquées dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions,...) mais, également, de substances toxiques (métaux lourds, drogues,...). Elles se révèlent donc d'une importance toute particulière dans leur diversité de fonctions [Hambrock *et al.*, 2004 ; Hollenstein *et al.*, 2007 ; Higgins *et al.*, 2001 ; Dean *et al.*, 2001 ; Burke *et al.*, 2008].

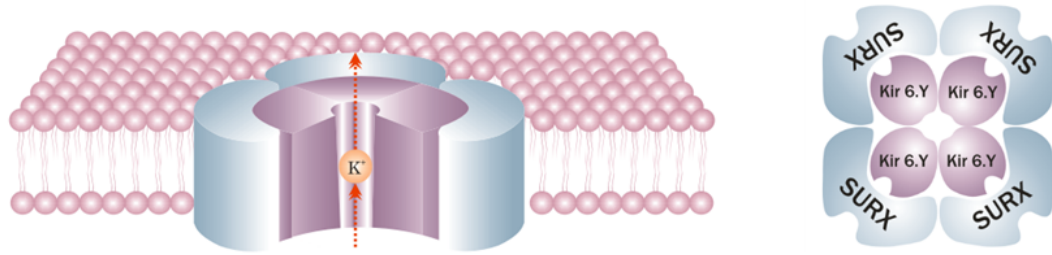


Figure 7 : Structure octamérique des K_{ATP} .

La sous unité SUR interagit rapidement et s'associe fortement, par son domaine N-terminal ou (TMD₀), avec des monomères de Kir6 en stabilisant et modulant leur adressage et leur ouverture (Figure 8) [Burke *et al.*, 2008].

Le récepteur sulfonylurée (SUR) est composé de 17 segments transmembranaires (STM) formant trois domaines transmembranaires (TMD0, TMD1 et TMD2), dont chacun est composé de cinq, six et six hélices transmembranaires respectivement (Figure 8). Deux sites de liaison des nucléotides (NBF1 et NBF2), résultant de deux domaines cytoplasmiques incorporant des motifs de liaison des nucléotides, Walker A et Walker B, ainsi qu'un motif signature ABC (souvent appelé H-loop) qui permet de les identifier [Mikhailov *et al.*, 2001 ; Giblin *et al.*, 2002 ; Hambrock *et al.*, 2004].

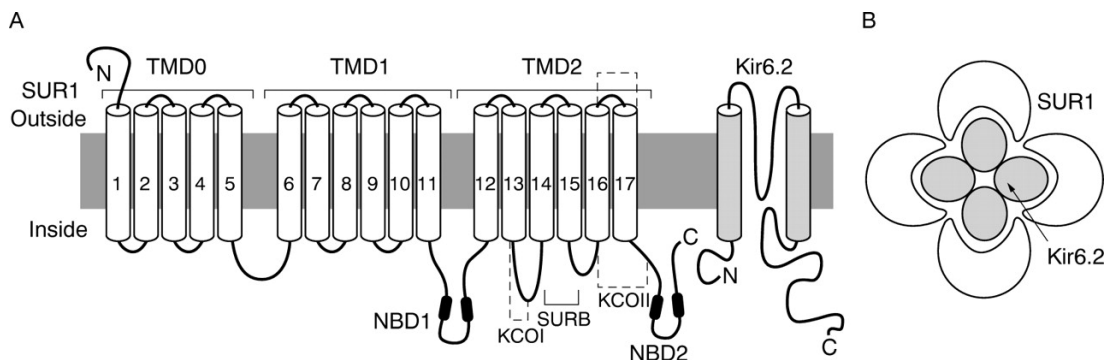


Figure 8 : Structure des récepteurs sulfonylurées (SUR).

Les isoformes du canal rectifiant entrant (Kir) ont deux extrémités cytoplasmiques, *N*- et *C*-terminales (Figure 9) ; ils règlent plusieurs processus physiologiques important avec deux segments transmembranaires M₁ et M₂ reliés par une boucle H5 possédant la séquence signature des canaux potassiques (Gly, Tyr/Phe, Gly) [Minor, 1999 ; Giblin *et al.*, 2002 ; Hebert *et al.*, 2005].

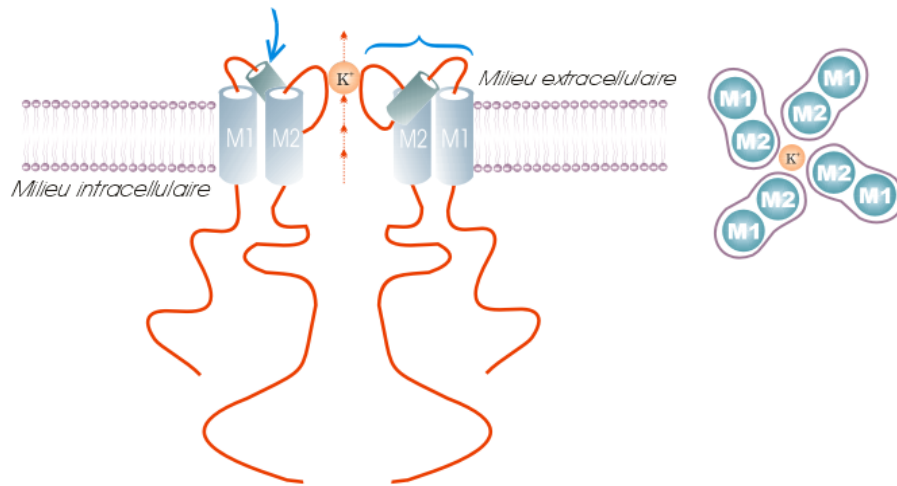


Figure 9 : Structure des isoformes du canal rectifiant entrant (Kir).

Il existe deux types de sous-unités Kir6 (Kir6.1 et Kir6.2) et deux sous-unités SUR (SUR1 et SUR2), la sous-unité SUR2 étant formé de deux isoformes SUR2A et SUR2B. La combinaison de ces différentes sous-unités (Kir avec SUR) conduit à des sous-types spécifiques de canaux K_{ATP} fonctionnels avec des sensibilités différentes aux nucléotides et aux différents agents thérapeutiques (Tableau 1) [Burke *et al.*, 2008]. Par exemple, SUR1 se combine avec Kir6.2 pour former le canal K_{ATP} des cellules β -pancréatiques. Les sous-unités SUR2A et Kir6.2 se trouvent dans le muscle cardiaque et squelettique, tandis que le canal K_{ATP} des muscles lisses est composé des sous-unités SUR2B et Kir6.1 ou Kir6.2 [Minami *et al.*, 2004 ; Burke *et al.*, 2008 ; Terzic *et al.*, 2011].

Tableau 1 : Spécificités tissulaires des assemblages formant les canaux K_{ATP} .

Kir6.x	SURx	Localisation tissulaire
Kir6.1/Kir6.2	SUR1	Neurones [Lee <i>et al.</i> , 1999]
Kir6.2	SUR1	Cellules β pancréatiques [Aguilar-Bryan <i>et al.</i> , 1995]
Kir6.2	SUR2A	Myocytes cardiaques, muscles squelettiques [Inagaki <i>et al.</i> , 1996]
Kir6.1	SUR2B	Muscles lisses vasculaires [Beech <i>et al.</i> , 1993]
Kir6.2	SUR2B	Muscles lisses non vasculaires [Isomoto <i>et al.</i> , 1996]
Kir6.1	SUR2	Mitochondries [Suzuki <i>et al.</i> , 1997, Zhou <i>et al.</i> , 1999]
Kir6.2	SUR2	Épithélium épидидymaire [Lybaert <i>et al.</i> , 2008]

IV. Distribution et rôle physiologique des canaux K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} ont été découverts pour la première fois par Noma dans les cardiomyocytes [Noma, 1983]. Des études ont montré qu'ils sont présents dans de nombreux tissus, y compris les cellules β -pancréatiques, les cellules musculaires squelettiques, les cellules musculaires lisses vasculaires et non vasculaires, les cellules neuronales, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales rénales [Ashcroft, 1996 ; Ashcroft *et al.*, 1990 ; Edwards et Weston, 1993 ; Quast, 1996 ; Terzic *et al.*, 1995, Yokoshiki *et al.*, 1998].

L'activité de ces canaux est proportionnelle au rapport $[ATP]/[ADP]$. Il est admis que l'accroissement de ce rapport, dû au métabolisme cellulaire du glucose (Figure 10), ferme le pore du canal alors que sa décroissance provoque son ouverture [Lu and Halvorsen, 1997 ; SkeeTa *et al.*, 1994 ; Liss and Roeper, 2001; Löffler-Walz *et al.*, 2002].

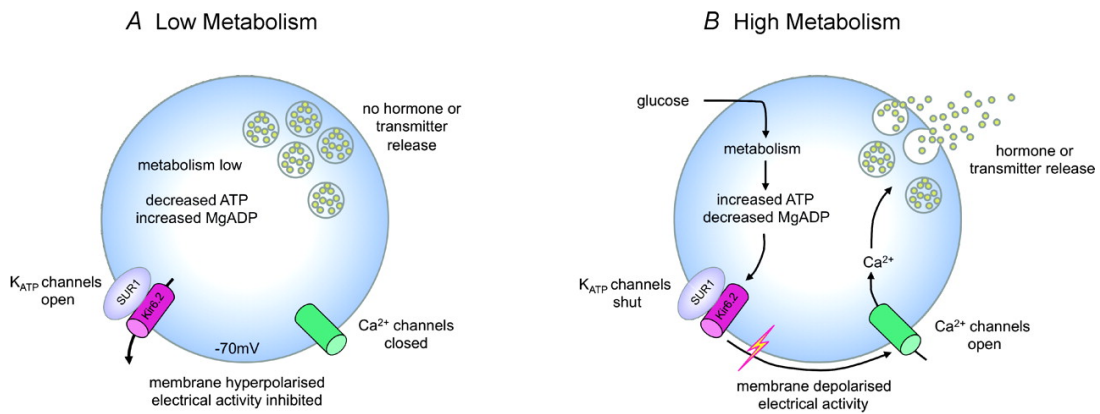


Figure 10 : Mécanisme d'action des canaux K_{ATP} .

Il a été montré que l'inhibition du canal K_{ATP} par l'ATP est due à l'interaction de ce dernier avec les sous-unités Kir, bien que les nucléotides Mg-ADP jouent le rôle médiateur de l'activation du canal potassique par son interaction avec les sites NBF des sous-unités SUR [Mikhailov and Ashcroft, 2000]. Ces canaux assurent un couplage entre le métabolisme cellulaire et le potentiel membranaire, en modulant une variété de fonctions cellulaires des tissus qu'ils occupent. Ces fonctions comprennent, entre autres, la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, l'excitabilité des neurones et des muscles, le recyclage des ions K^+ dans l'épithélium rénal, et la cytoprotection lors de l'ischémie du cœur et du cerveau [Yokoshiki *et al.*, 1998 ; Ammala *et al.*, 1996 ; Miki *et al.*, 1999 ; Ashcroft *et al.*, 2005].

Les canaux potassiques sensibles à l'ATP sont aussi exprimés au niveau de la membrane interne des mitochondries (mitoK_{ATP}), dont ils régulent le potentiel et jouent un rôle cardioprotecteur important [Szewczyk And Wojtczak, 2002 ; Costa *et al.*, 2006].

La fonction des canaux K_{ATP} est mieux connue dans les cellules pancréatiques β , où il y a un certain couplage entre la concentration du glucose plasmatique (Figure 11), l'excitabilité électrique et la sécrétion de l'insuline [Gribble *et al.*, 1998 ; Proks *et al.*, 2004]. L'élévation de la concentration sanguine du glucose augmente l'entrée de ce sucre à travers le Glut-2 et sa métabolisation par les cellules β du pancréas. Ceci entraîne l'accroissement du rapport [ATP]/[ADP], et provoque la fermeture du pore du canal, avec pour résultat la dépolarisation de la membrane cellulaire. Ceci déclenche l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant (VDCCs) et permet le flux du calcium intracellulaire. L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium [Ca²⁺] déclenche l'exocytose des granules de sécrétion et la libération d'insuline [During *et al.*, 1995 ; Lu and Halvorsen, 1997 ; Gribble *et al.*, 1998 ; Minami *et al.*, 2004].

Dans le système nerveux central, les canaux K_{ATP} sont présents dans plusieurs régions et notamment dans les neurones GABAergiques, les neurones de l'hippocampe, les cellules gliales, le cortex, les neurones hypothalamiques, et la substance grise, mais leur rôle physiologique demeurent largement inconnu [During *et al.*, 1995 ; Karschin *et al.*, 1998 ; Liss *et al.*, 1999 ; Liss and Roeper, 2001 ; Minami *et al.*, 2004].

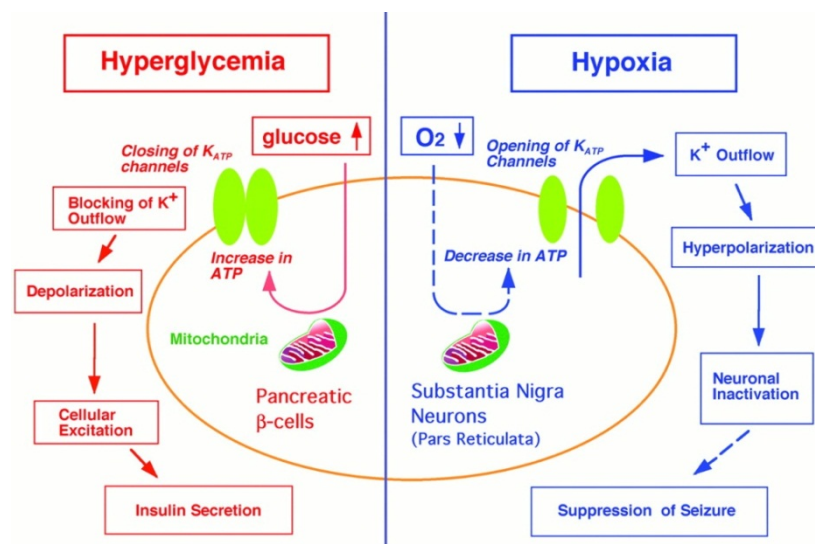


Figure 11 : Rôle des K_{ATP} dans les la cellule pancréatique β et le cerveau.

Les canaux K_{ATP} présents dans les neurones de l'hypothalamus servent de capteurs de glucose [Proks *et al.*, 2004], et jouent donc un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie de ce dernier en régulant la sécrétion du glucagon et des catécholamines. L'ouverture des canaux K_{ATP} de la substance grise protège contre la propagation d'une apoplexie généralisée après une brève hypoxie [Liss *et al.* 1999 ; Liss and Roeper, 2001 ; Yamada and Inagaki, 2002 ; Minami *et al.*, 2004 ; Ballanyi *et al.*, 2004]. Il a été suggéré dès lors que le canal K_{ATP} joue un rôle essentiel dans l'étiologie de la maladie de Parkinson [Murphy and Greenfield, 1992].

Les canaux K_{ATP} sont exprimés au niveau de la membrane des muscles squelettiques, où ils jouent un rôle primordial dans le tonus musculaire. La production du lactate provoque une diminution locale des concentrations d'ATP et du pH, ce qui provoque l'activation des canaux K_{ATP} permettant de réduire l'excitabilité des fibres musculaires, et les protège d'un appauvrissement énergétique excessif en créant une dépolarisation membranaire, qui s'oppose au potentiel d'action excitateur [Forestier *et al.*, 1993 ; Allard *et al.*, 1995 ; Allard and Rougier, 1997 ; Proks *et al.*, 2004 ; Tricarico *et al.*, 2010].

Dans le système cardiovasculaire, les canaux K_{ATP} jouent un rôle protecteur dans le stress métabolique, telle que l'ischémie et l'hypoxie, qui diminue la concentration intracellulaire d'ATP, ce qui peut limiter les risques de la mort cellulaire. Dans le cœur, les canaux K_{ATP} sont donc impliqués dans le raccourcissement de la durée du potentiel d'action conduisant à un phénomène de préconditionnement par lequel une première ischémie transitoire protège les cellules des dommages ischémiques induits par une seconde ischémie successive. La perturbation métabolique associée à l'ischémie initiale conduit à l'ouverture des canaux K_{ATP} qui permettent une repolarisation des cellules en les protégeant de la seconde atteinte ischémique [Minami *et al.*, 2004, Terzic *et al.*, 2011]. Par ailleurs, le mécanisme par lequel l'ouverture des canaux K_{ATP} protège les myocytes cardiaques n'est pas bien élucidé [Yokoshiki *et al.*, 1998].

La majorité des équipes s'accorde à considérer les canaux K_{ATP} mitochondriaux ($mitoK_{ATP}$ ou mK_{ATP}) et sarcolemmaux (sK_{ATP}) comme essentiels dans le préconditionnement cellulaire [Pirou *et al.*, 2000], bien que le rôle respectif joué par les deux types de canaux ne soit pas clairement établi.

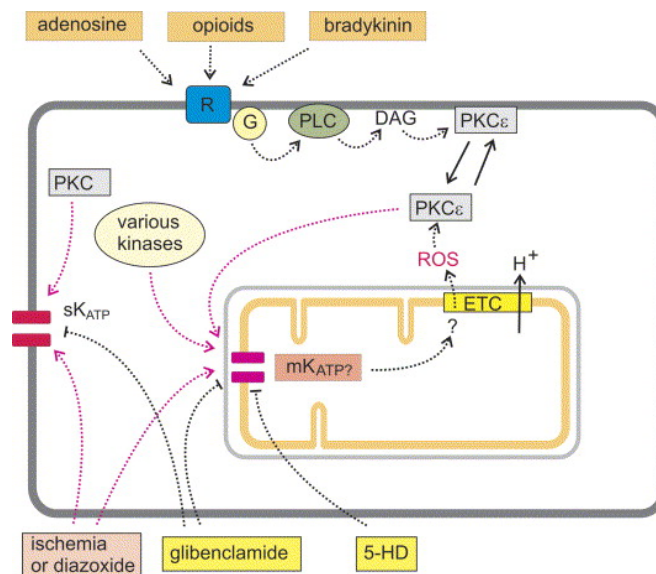


Figure 12 : Schéma de principe de certains des mécanismes considérés comme étant impliqués dans l'activation des canaux mK_{ATP} et sK_{ATP} . Les objectifs de diazoxide, le glibenclamide et le 5-HD sont indiqués. Abréviations : R, récepteur ; G, la protéine G ; PLC, la phospholipase C, PKC, protéine kinase C, ETC, la chaîne de transport d'électrons, 5-HD : 5-hydroxydecanoic acid [Peteret *al.*, 2005].

L'ouverture des canaux K_{ATP} mitochondriaux, conduisant à une hyperpolarisation de la membrane interne mitochondriale, pourrait atténuer l'accumulation de calcium et prévenir l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (MPTP) [Pirou *et al.*, 2004]. Les effets bénéfiques de l'ouverture du canal $mitoK_{ATP}$ par le diazoxide, comme prototype, ont été largement démontrés dans le cœur et d'autres organes et, très récemment, dans des préparations expérimentales neurologiques [Ki *et al.*, 2003].

Au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire, le canal K_{ATP} contribue au maintien du potentiel membranaire de repos et, de cette manière, à la régulation du tonus vasculaire. L'ouverture ou la fermeture de ce canal conduit à une vasodilatation ou vasoconstriction respectivement (Figure 13).

Les canaux K_{ATP} des muscles lisses vasculaires montrent une réponse aux ouvreurs potassiques différente de celles des canaux pancréatiques ou cardiaques [Standen *et al.*, 2003].

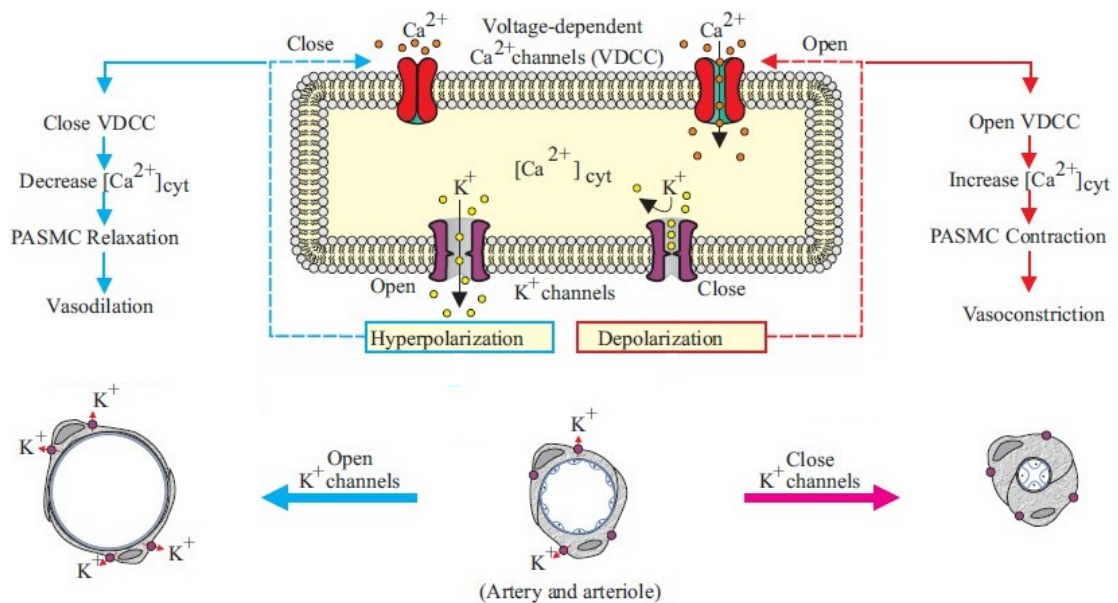


Figure 13 : Rôle des canaux K_{ATP} dans les cellules musculaires lisses.

Des études suggèrent la présence de canaux K_{ATP} de type Kir6.2/SUR2B dans les cellules musculaires lisses non-vasculaires du côlon, de la vessie et de l'urètre [Standen *et al.*, 2003]. L'activation de ces canaux K_{ATP} par différents vasodilatateurs réduit l'excitabilité membranaire des cellules musculaires lisses (CML), conduisant à une vasorelaxation.

Les canaux potassiques ATP-dépendant sont présents au niveau de la membrane basolatérale du tubule proximal rénale, dans l'appareil juxtaglomérulaire, la membrane apicale dans l'anse ascendante large de Henlé, le tube contourné distal et le tubule collecteur cortical [Reeves and Shah, 1994 ; McNicholas *et al.*, 1996 ; Giebisch *et al.*, 2000 ; O'Connell *et al.*, 2005]. Ces canaux, ayant une forte probabilité d'ouverture en conditions physiologiques, jouent un rôle important dans la réabsorption d'électrolytes et de solutés, aussi bien que le recyclage des ions K^+ entrant dans la cellule à travers la pompe Na^+/K^+ -ATPase, où ils assurent un certain couplage entre l'activité du canal et celle de la pompe accumulant activement le potassium dans la cellule et transportant le sodium vers l'extérieur [Reeves et Shah, 1994 ; O'Connell *et al.*, 2005].

Les canaux K_{ATP} sont aussi présents dans les cellules folliculaires entourant les ovocytes de Xénope [Tammaro et Ashcroft, 2009]. Il semble que l'ouverture de ces canaux contrôle la sensibilité à la progestérone, et régule ainsi les processus de division cellulaire en hyperpolarisant l'ovocyte. Ces canaux K_{ATP} sont activés par les gonadotrophines qui jouent un rôle essentiel dans la physiologie ovarienne. Enfin, des travaux sur l'appareil reproducteur masculin ont démontré l'existence de différentes sous-unités formant les canaux K_{ATP} au niveau de plusieurs structures. Dans le cas des spermatozoïdes, ces canaux semblent être fonctionnels et sont impliqués dans le contrôle de l'entrée de calcium.

V. Modulateurs des canaux K_{ATP}

Les canaux potassiques ATP-dépendants sont la plus abondante classe des canaux ioniques qui a été largement étudiée, dont la fonction peut être modulée par une variété de substances synthétiques ou de produits naturels (Figure 14), qui bloquent ou ouvrent le pore du canal, et par conséquent pourraient avoir des applications potentielles en thérapie [Babenko, 1999 ;Mannhold, 2004].

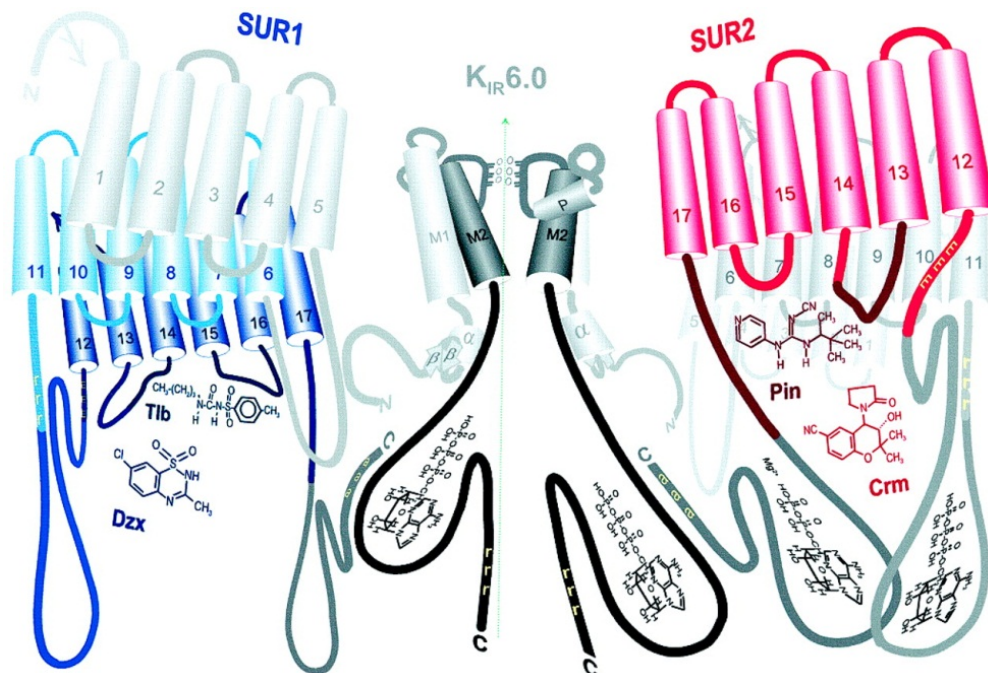


Figure 14 : Schéma récapitulatif montrant les déterminants et les interactions spécifiant une modulation différentielle des canaux $(SURx/Kir6.0)_4$ par des nucléotides, les KCOs et les sulfonylurées [Babenko, 1999].

V.1. Inhibiteurs des Canaux K_{ATP}

L'inhibition du canal K_{ATP} est généralement assurée par des dérivés sulfonylurées, tel que le glibenclamide **01** et le tolbutamide **02**, en favorisant la fermeture du pore du canal (Figure 15) [Tricaric *et al.*, 2006]. Selon leurs affinités préférentielles pour les canaux potassiques des différents organes, les sulfonylurées augmentent la durée du potentiel d'action cardiaque et pourraient augmenter les résistances vasculaires périphériques. Ils stimulent, par leur haute affinité vis-à-vis des cellules pancréatiques β , la sécrétion de l'insuline [Babenko *et al.*, 1999 ; Ashfield *et al.*, 1999].

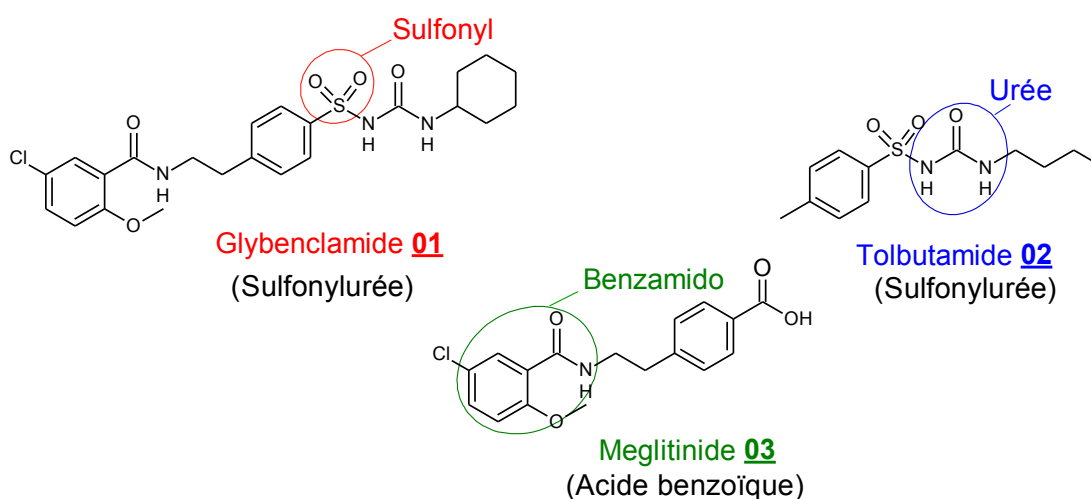


Figure 15 : Bloqueurs des canaux K_{ATP} .

Le site de liaison du Glibenclamide sur les récepteurs sulfonylurées se trouve sur la surface intracellulaire du domaine transmembranaire 2, et notamment sur les segments transmembranaires 14 et 15, ainsi que sur la boucle intracellulaire liant les deux segments transmembranaires 15 et 16 et une partie de la boucle cytosolique qui lie les deux domaines transmembranaires TDM0 et TDM1 (Figure 8) [Mikhailov *et al.*, 2001 ; Stephan *et al.*, 2006]. Il a été suggéré que la boucle entre les hélices transmembranaires 15 et 16 est le site de liaison du groupe sulfonylurée et que la boucle intracellulaire entre les hélices 5 et 6 est le site de liaison du groupe benzamide [Ashfield *et al.*, 1999 ; Babenko *et al.*, 1999 ; Mikhailov *et al.*, 2001]. Par ailleurs, les hélices transmembranaires 14 à 16 pourraient être impliquées dans la transduction de la liaison de la sulfonylurée à l'inhibition du canal. Cependant le mécanisme moléculaire de la fermeture des canaux K_{ATP} par la liaison du sulfonylurée à SUR n'est pas clair.

V.2. Activateurs des canaux K_{ATP}

Le nombre d'agents possédant des propriétés activatrices des canaux potassiques ATP-dépendants (KCOs : K_{ATP} channel openers) a fortement augmenté au cours de ces dernières années. Ces composés sont susceptibles de constituer de nouveaux agents thérapeutiques utiles dans le traitement de très multiples pathologies, touchant différents organes, en stimulant le flux des ions potassium à travers cette classe de canaux ioniques (Figure 16). Ils sont chimiquement hétérogènes et ne présentent pas de pharmacophore commun. Ces composés sont généralement classés en familles suivant leur structure chimique, parmi lesquelles on trouve notamment les benzothiazidines (diazoxide **09**), les benzopyranes (Levcromakalim **05**), les cyanoguanidines (pinacidil **07**), les thioformamides (aprikalim **12**), les nicotinamides (nicorandil **10**), les dérivés pyrimidiniques (minoxidil **11**), ou encore plus récemment les dihydropyridines (ZM-244085), les cyclobutenediones (WAY-151616) et les carbinols tertiaires (ZD-6169) [Mannhold, 2004 ; Jahangir et Terzic, 2005].

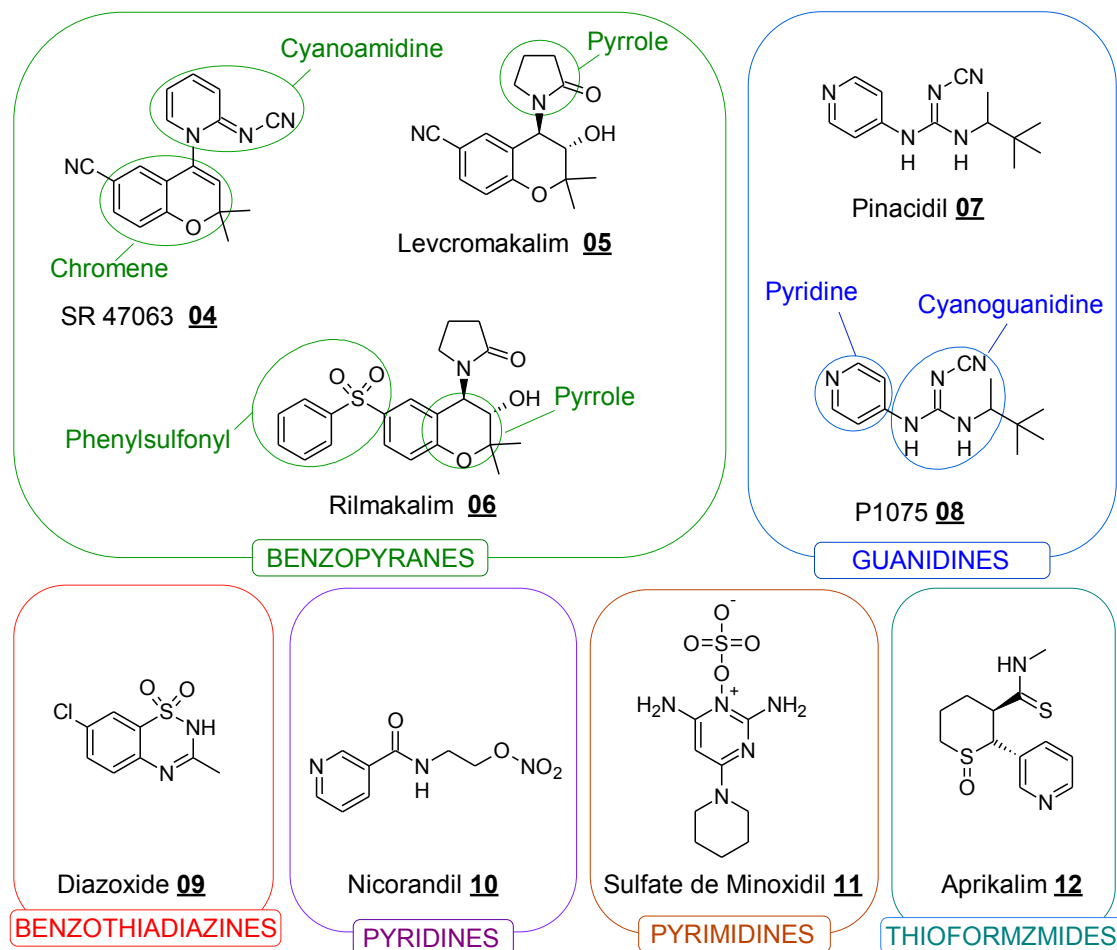


Figure 16 : Quelques ouvreurs des canaux K_{ATP} .

Les ouvreurs du canal potassique (KCOs) exercent leur effet sur les cellules sécrétoires, les neurones, les muscles lisses vasculaires et non vasculaires et les muscles cardiaques et squelettiques par l'ouverture du canal K_{ATP} et le changement du potentiel membranaire à travers l'inversement du potentiel de potassium et en réduisant l'activité électrique cellulaire (Figure 17). Ceci déclenche la fermeture des canaux calciques voltage-dépendants, ce qui entraîne la diminution de l'entrée du calcium. La chute de la concentration du calcium intracellulaire entraîne à son tour l'inhibition de la sécrétion d'insuline, et la relaxation des muscles lisses vasculaires ce qui entraîne une hypotension [Sebille *et al.*, 2004]. Ils entraînent aussi le relâchement des muscles lisses autres que vasculaires tels que les muscles bronchiques, dont seulement les dérivés du benzopyrane ont été profilés à la thérapie de l'asthme [Buchheit *et al.*, 2002 ; Sebille *et al.*, 2008]. D'autre part les KCOs jouent, par leur action sur les canaux K_{ATP} , un rôle primordial dans le traitement de l'ischémie de reperfusion du cœur, dont il a été démontré que le prétraitement par les KCOs (cromakalim et diazoxide) augmente le niveau d'expression des protéines impliquées dans l'apoptose (Figure 17) [Fabiyl, 2003 ; Mannhold, 2004].

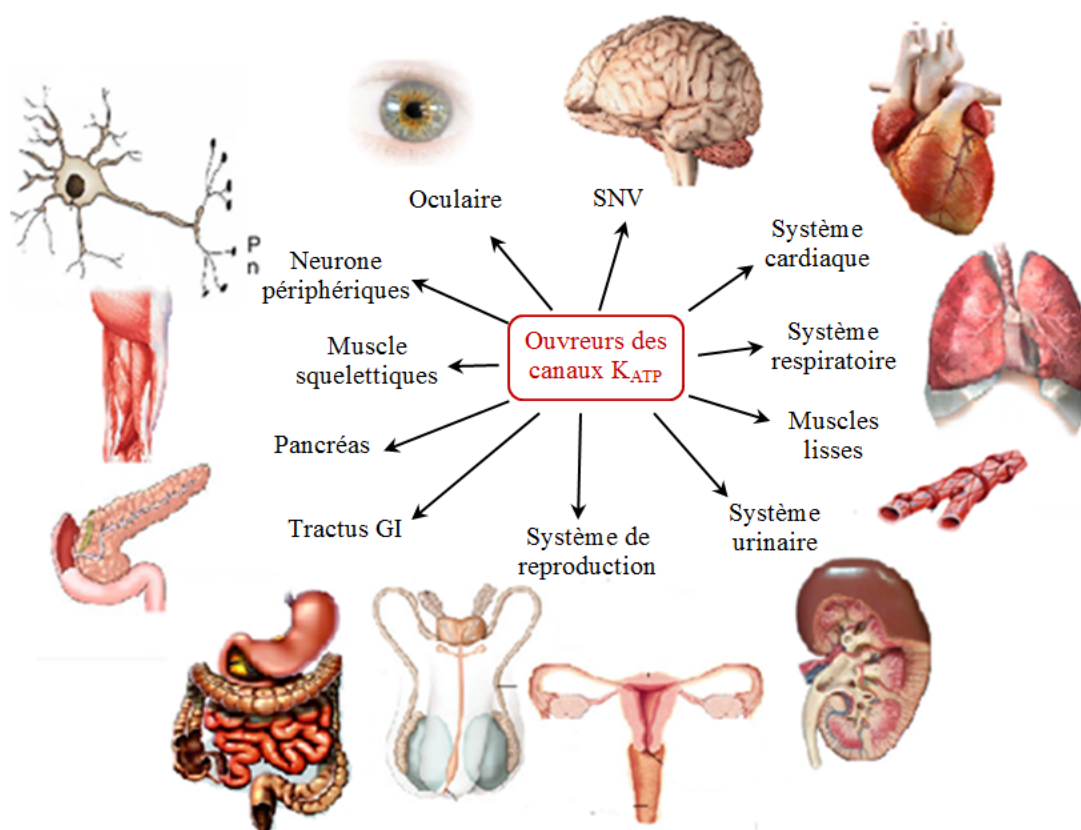


Figure 17 : Sites d'actions des activateurs de canaux K_{ATP} .

Les KCOs ont été aussi proposés dans le traitement de l'incontinence urinaire [Sebille *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009] ou encore comme agents stimulant la repousse des cheveux [Davies *et al.*, 2005]. De plus, les KCOs ciblant les canaux K_{ATP} pancréatiques pourraient devenir de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement ou le contrôle de divers troubles métaboliques comme le diabète de type 1 et/ou de type 2, l'obésité ou l'hyperinsulinisme [Björk *et al.*, 1996 ; Alemzadeh *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.* 2000 ; Zdravkovic *et al.*, 2007 ; Sebille *et al.*, 2008 ; Florence *et al.*, 2009].

Il a été suggéré que les sites de fixation des KCOs se situent sur les SUR. L'hydrolyse de l'ATP et deux NBF étant une condition pour que la fixation se réalise. La région C-terminale des SURs peut être critique car elle affecte l'affinité des KCOs vis-à-vis des isoformes des sous-unités SUR (SUR2B~SUR1>SUR2A) [Löffler-Walz, 2002]. Les ouvreurs des K_{ATP} sont des groupes hétérogènes de composés dérivés de plusieurs classes chimiques décrites ci-dessus

V.2.1. Benzopyranes

Le cromakalim est le prototype de cette famille d'ouvreurs des canaux K_{ATP} . Cette molécule, présentant un effet vasodilatateur des muscles lisses vasculaires, contient deux carbones chiraux avec un groupement OH (alcool) en position 3 et un groupement pyrrolidine en position 4 qui sont arrangées dans une configuration *trans*. L'activité sur les canaux K_{ATP} réside, essentiellement, dans l'énantiomère 3*S*,4*R* (levcromakalim **5**), le groupement carbonyle de pyrrolidone considéré essentiel à l'activité biologique (Figure 18).

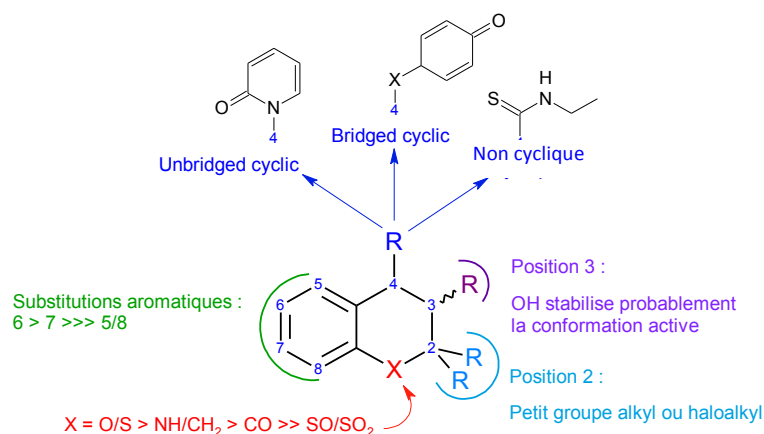


Figure 18 : Structure moléculaire des benzopyranes [Mannhold, 2004].

Le site de liaison des benzopyranes et des cyanoguanidines est formé par les segments transmembranaires 16 et 17 du domaine transmembranaire 2, et une partie de la boucle intracellulaire liant les segments 13 et 14 (Figure 8).

De nombreux analogues des benzopyranes ont été proposés et étudiés notamment ceux substitués en position 4. Le prototype de cette classe est le BMS-180448 résultant d'une hybridation entre un analogue benzopyranique (cromakalim **18**) et les cyanoguanidines, ce qui a conduit à des agents cardioprotecteurs en modulant les canaux K_{ATP} des cellules cardiaques (Figure 19) [Mannhold, 2004].

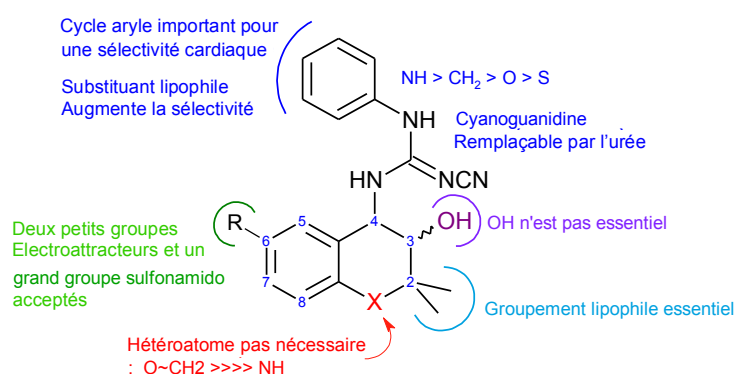


Figure 19 : Structure moléculaire des (benzopyranyl) cyanoguanidines.

D'autres analogues portant des fonctions diverses comme les sulfonylurées, les urées, les thiourées et les amides ont été décrits [Khelili *et al.*, 2008].

V.2.2. Cyanoguanidines

Le prototype de ces ouvreurs, présentant des propriétés hypotensives, est le pinacidil pour lequel l'entomère est l'énantiomère (R). Le remplacement du groupement CN dans la séquence cyanoguanidine par d'autres groupes polaires ne change pratiquement pas leur activité (Figure 20).

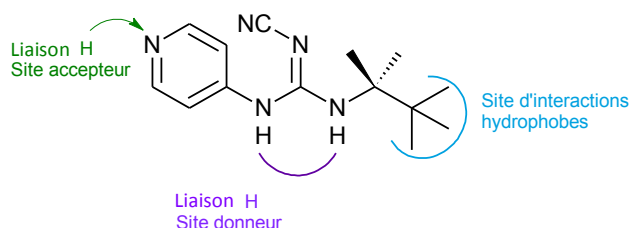


Figure 20 : Structure moléculaire des cyanoguanidines [Mannhold, 2004].

V.2.3. Benzo- et pyridothiadiazines

Le prototype est le diazoxide dont la structure chimique est semblable à celle des diurétiques thiazidiques mais les propriétés pharmacologiques sont différentes (Figure 21). Il diffère des autres activateurs (KCOs) par plusieurs aspects dont son site de fixation sur les protéines SUR, localisé dans une région autre que celle des benzopyranes et des cyanoguanidines. C'est le seul activateur qui se lie avec la même affinité avec les SUR1 et les SUR2B en provoquant la relaxation des muscles lisses vasculaires, inférieure à celle du le cromakalim, ce qui entraîne une hypotension, et exerçant un effet hypoglycémiant pour inhibition de la sécrétion d'insuline via l'ouverture des canaux K_{ATP} des cellules β -pancréatiques [Mannhold, 2004].

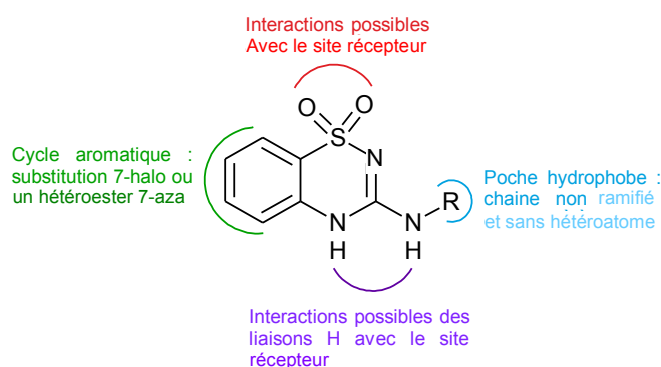


Figure 21 : Structure générale des dérivés Benzo- et pyrido-thiadiazines [D'après Mannhold, 2004].

L'équipe de Pirotte a développé des dérivés du diazoxide efficaces sur le pancréas et sur le muscle lisse vasculaire [Pirotte *et al.*, 1993 ; deTullio *et al.*, 1996 ; Khelili *et al.*, 1999 ; Pirotte *et al.*, 2000]. Ces nouvelles structures résultent en fait d'une association d'éléments structuraux appartenant à la fois au diazoxide et au pinacidil. Une large série de pyridothiadiazinedioxydes portant une variété de chaînes latérales 3- ou 4-alkyle et 3-aminoalkyle a été synthétisée et testée sur les cellules β pancréatiques et des anneaux aortiques de rat. Ces études ont abouti à la proposition d'un modèle d'agoniste des canaux K_{ATP} des cellules β pancréatiques. En particulier, le remplacement du noyau 7-chlorobenzène par son bioisostère pyridinique a considérablement amélioré la sélectivité envers les cellules β pancréatiques, dont l'exemple typique est le BPDZ-44 **13** (Figure 22).

La variation de la position de l'atome d'azote du noyau pyridinique des pyriothiadiazines a donné des composés avec une sélectivité tissulaire opposée : par exemple BPDZ-79 **14** et BPDZ-83 **15** sont plus sélectifs de l'aorte de rat versus les cellules β du pancréas [Pirrotte *et al.*, 2000]. BPDZ-79 **14** diffère structurellement de BPDZ-44 **13** par la position de l'atome d'azote du noyau pyridinique, illustrant comment de simples variations structurales peuvent affecter la sélectivité tissulaire. Nielsen *et al.* a développé des composés plus puissants et plus sélectifs en remplaçant le noyau pyridinique par le bioisostère thiophène [Nielsen *et al.*, 2002].

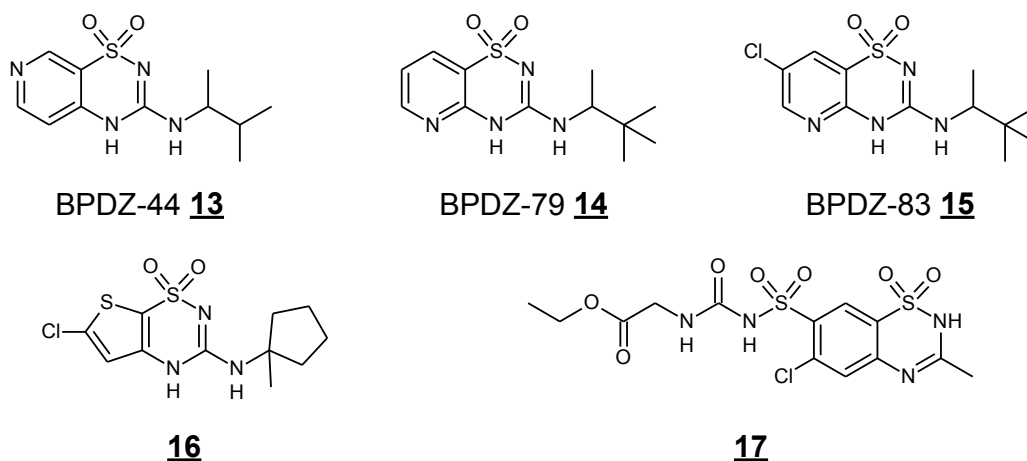


Figure 22 : Quelques dérivés du diazoxide.

Le composé **16** est au moins 1000 fois plus inhibiteur de la libération d'insuline que ne l'est pas le diazoxide [Nielsen *et al.*, 2002]. Des composés hybrides associant le noyau benzothiadiazine (Activateur potassique) avec des groupes sulfonylurées (inhibiteurs potassiques) (composé **17**, figure 22) ont été conçus et synthétisés par Khelili *et al.* ; le composé **17** présente d'intéressantes propriétés vasodilatatrices de l'aorte de rat mais dénué d'effet hypoglycémiant [Khelili *et al.*, 1995 ; Faury *et al.*, 2003].

VI. Travaux réalisés

VI.1. Stratégie de conception des molécules cibles

La chimie et la pharmacologie des benzo-ou pyrido-thiadiazine-1,1-dioxide, ainsi que des dihydrobenzopyranes, en tant qu'ouvrants de canaux potassiques, ont attiré l'attention d'un grand nombre de chimistes, biologistes et pharmacologues.

Le diazoxide **09** et le cromakalim **18** appartiennent à cette classe de molécules et sont actuellement utilisées comme médicament et outil pharmacologique. Ces principes actifs induisent des effets vasodilatateurs en raison de leur activité activatrice des canaux K_{ATP} des muscles lisses [Black et *al.*, 1990 ; Piper et *al.*, 1990]. L'intérêt physiologique de ces composés résulte de leur interaction avec un sous-type particulier de canaux potassiques, à savoir le canal potassique sensible à l'ATP (K_{ATP}) [Standen et *al.*, 1989 ; Quast et Cook, 1989].

Dans un travail antérieur [Kihal., 2007], dont une partie est publiée dans l'article [*Eur J Med Chem.*, **2012**, 54, 873-878], de nouvelles molécules avaient été conçues et synthétisées en combinant le squelette du diazoxide **09** avec celui du cromakalim **18** afin de générer des composés hybrides originaux (Figure 24).

Il est important de signaler que, bien que les activateurs potassiques appartiennent à des familles de composés de structures différentes. Il est possible de distinguer pour chaque molécule, une région aromatique, une zone de haute électronégativité et un fragment lipophile, éléments partagés également avec les sulfonylurées, d'actions opposées (Figure 23).

La différence entre ces composés réside sur l'arrangement relatif des fragments lipophiles et des zones d'électronégativité (également les natures des groupes chimiques constituant ces zones d'électronégativité) autour du cycle aromatique, qui diffèrent d'un composé à un autre, conduisant à un inhibiteur (tolbutamide **02**) soit un activateur (cromakalim **18**, pinacidil **07** et diazoxide **09**). L'impact de ces dispositions pourrait également affecter sur la sélectivité tissulaire des différents activateurs.

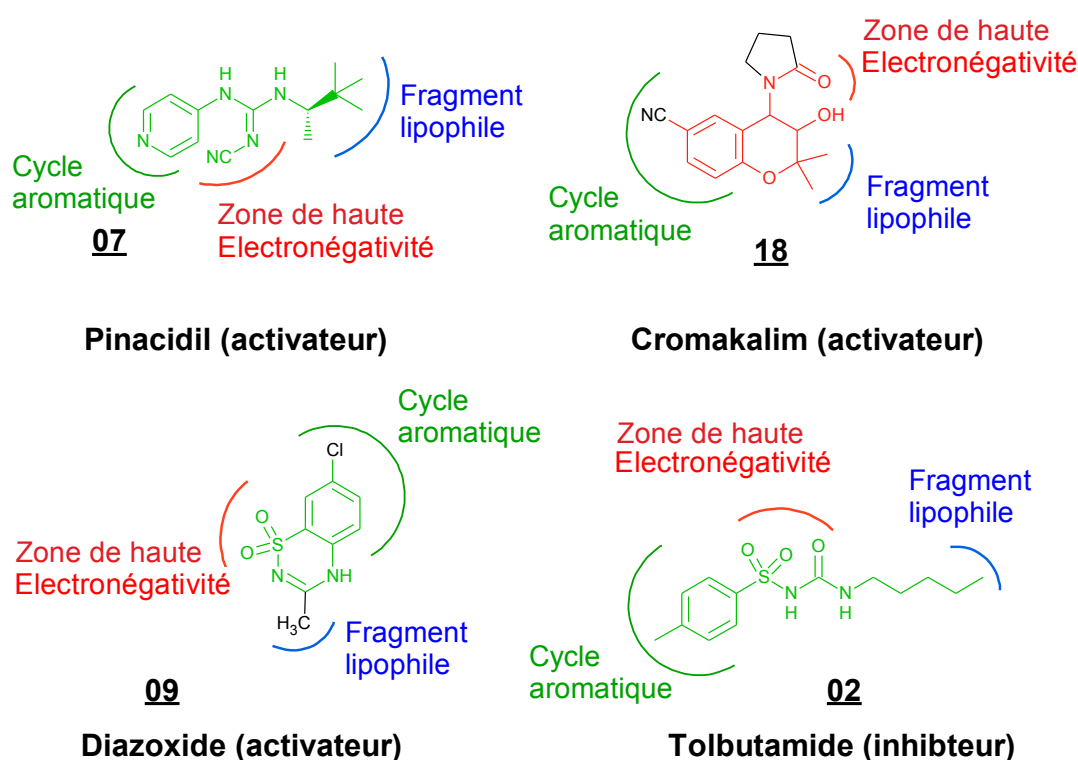


Figure 23 : Analogies structurales entre activateurs et inhibiteurs potassiques.

En se fondant sur ces considérations structurales, il est rationnel de combiner des éléments de structure de deux activateurs différents. Ceci a été décrit dans nos travaux de Magister [Kihal., 2007], où le squelette du diazoxide **07** et du cromakalim **18** ont été combinés (Figure 24).

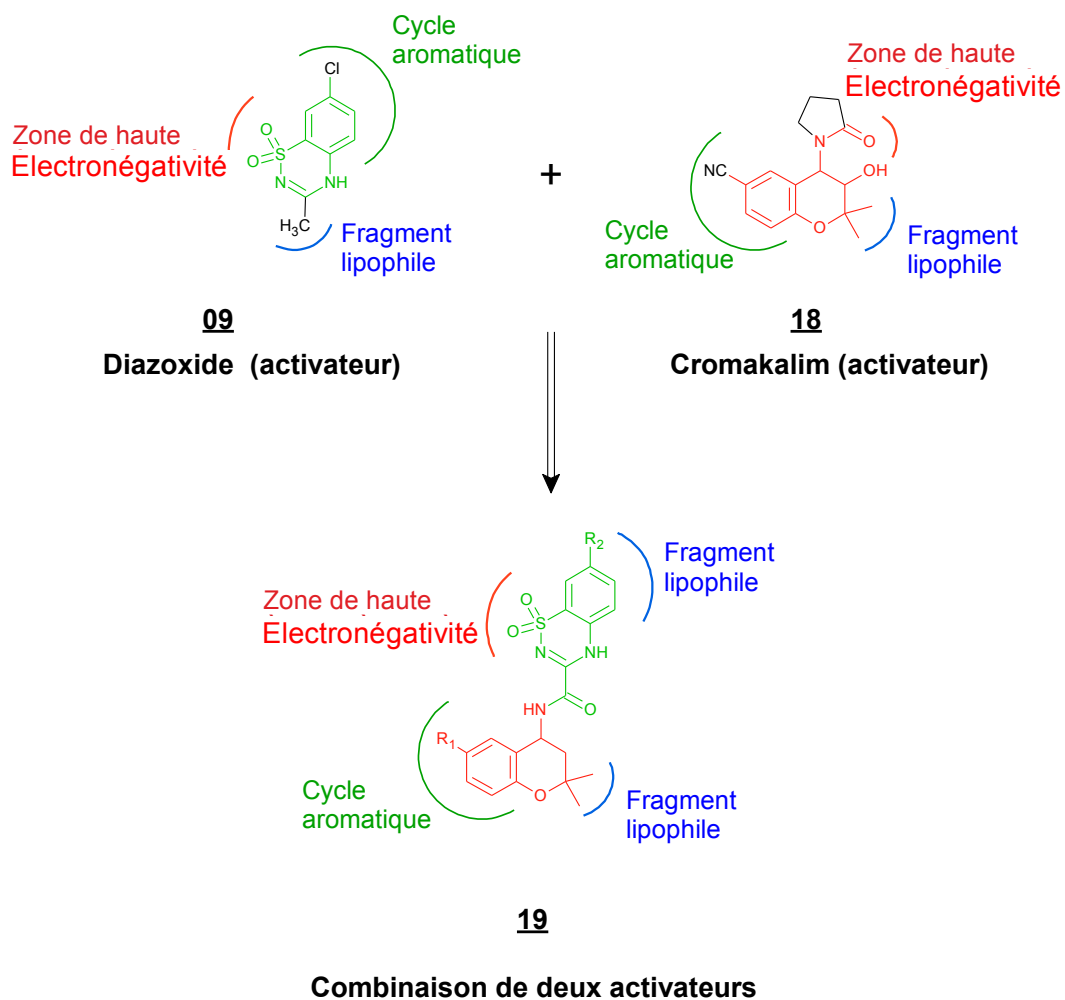


Figure 24 : Combinaison entre deux activateurs potassiques.

Ainsi, l'évaluation pharmacologique *in vitro* de ces composés hybrides (Figure 24) sur des anneaux utérins de rates montre un effet myorelaxant très puissant de certains composés, alors qu'ils sont dénués d'effet sur la sécrétion de l'insuline. Le suivi, *in vivo*, de la glycémie des rats pendant 4 heures n'avait décelé aucun effet hypoglycémique, confirmant ainsi l'absence d'effet sur la sécrétion d'insuline *in vitro*.

D'autres travaux en suivant la même stratégie [Khelili *et al.*, 1999/2006] ont combiné des éléments de structure d'un activateur (cromakalim **18**) et d'un inhibiteur (sulfonylurée, Figure 25).

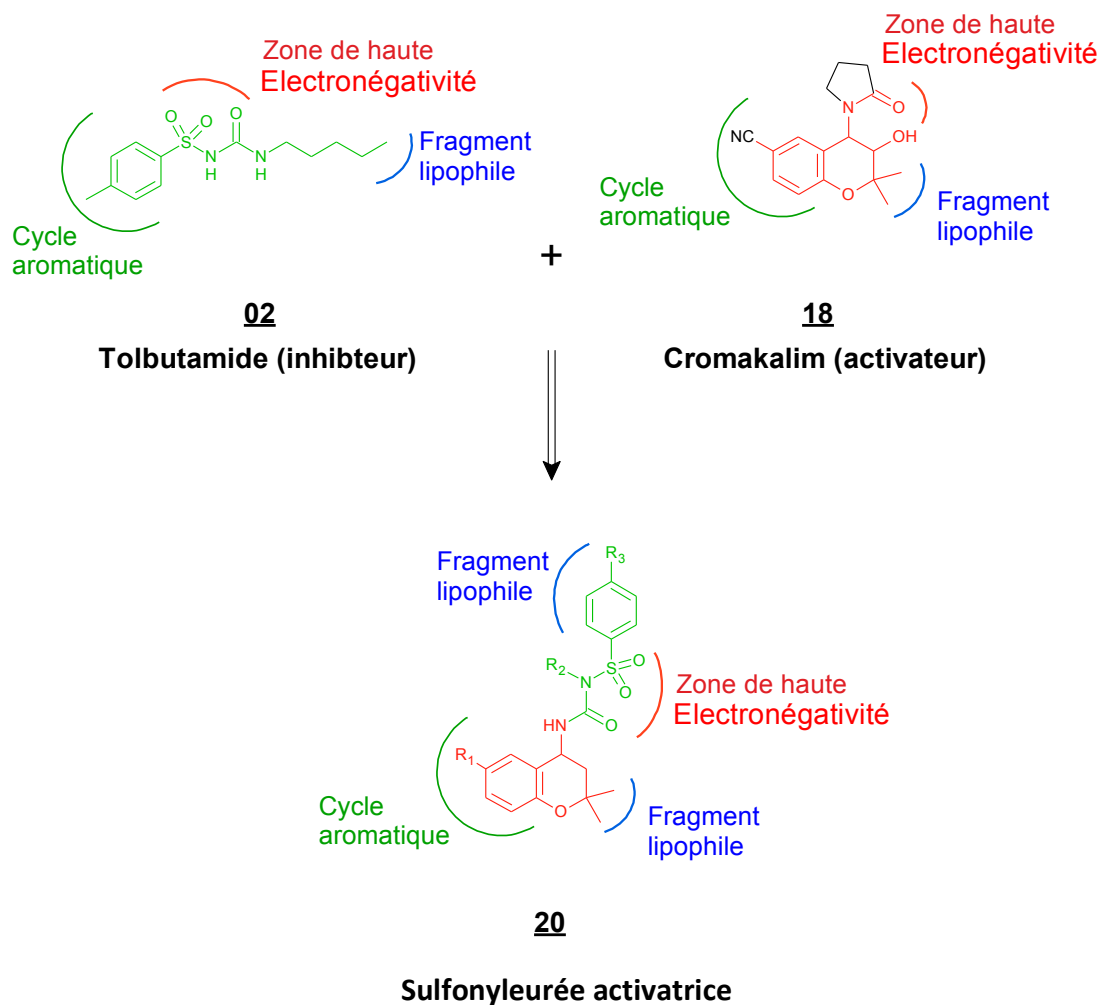
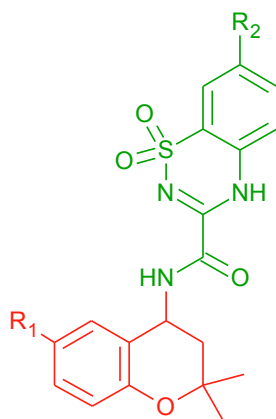


Figure 25 : Combinaison entre un activateur et un inhibiteur potassiques.

Les résultats obtenus montrent que les dérivés possédant en R_2 un méthyle avaient un effet myorelaxant très puissant sur l'aorte et sur le muscle utérin de rates, associé à un effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline. En revanche, les analogues ayant comme groupe R_2 un hydrogène induisent un effet myorelaxant modéré sur l'aorte et sur le muscle utérin de rates, sans effet sur la sécrétion d'insuline.

VI.2. Objectifs

Nous décrivons ici une série des molécules hybrides, diazoxide-cromakalim (Figure 26), sur le modèle d'aorte de rate, pour évaluer leur effet myorelaxant.



19

Figure 26 : Structure générales des molécules hybrides, diazoxide-cromakalim.

Une seconde série de molécules a été conçue au point (Figure 27), en remplaçant la partie dihydrobenzopyrane par un reste amine ou aminoacide, liés en position 3 du noyau benzothiadiazine, *via* un petit bras espaceur, un pont peptidique (fonction amide), dans le but de diminuer le poids moléculaire des molécules et les rendre plus hydrosolubles. Enfin, l'étude pharmacologique précisera l'impact sur l'activité de ces nouvelles molécules, sur le modèle d'aorte de rats, puis dans une autre étape, sur d'autres tissus.

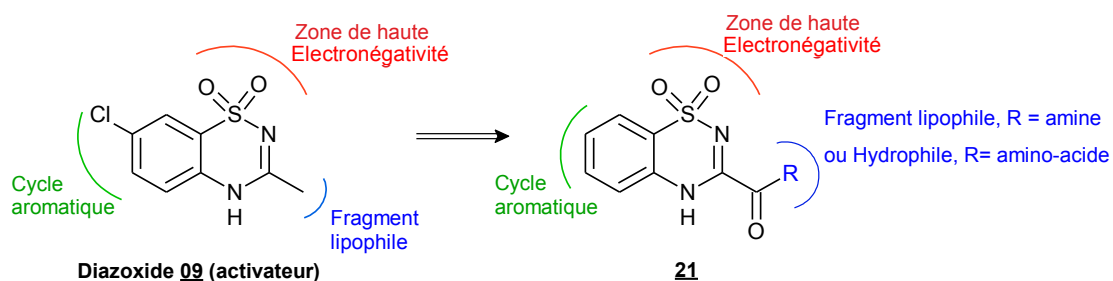


Figure 27 : Introduction d'une amine et d'un aminoacide au lieu d'un dihydrobenzopyrane.

VI.3. Stratégies et voies de synthèse

Le schéma 1 présente la stratégie de synthèse des molécules cibles.

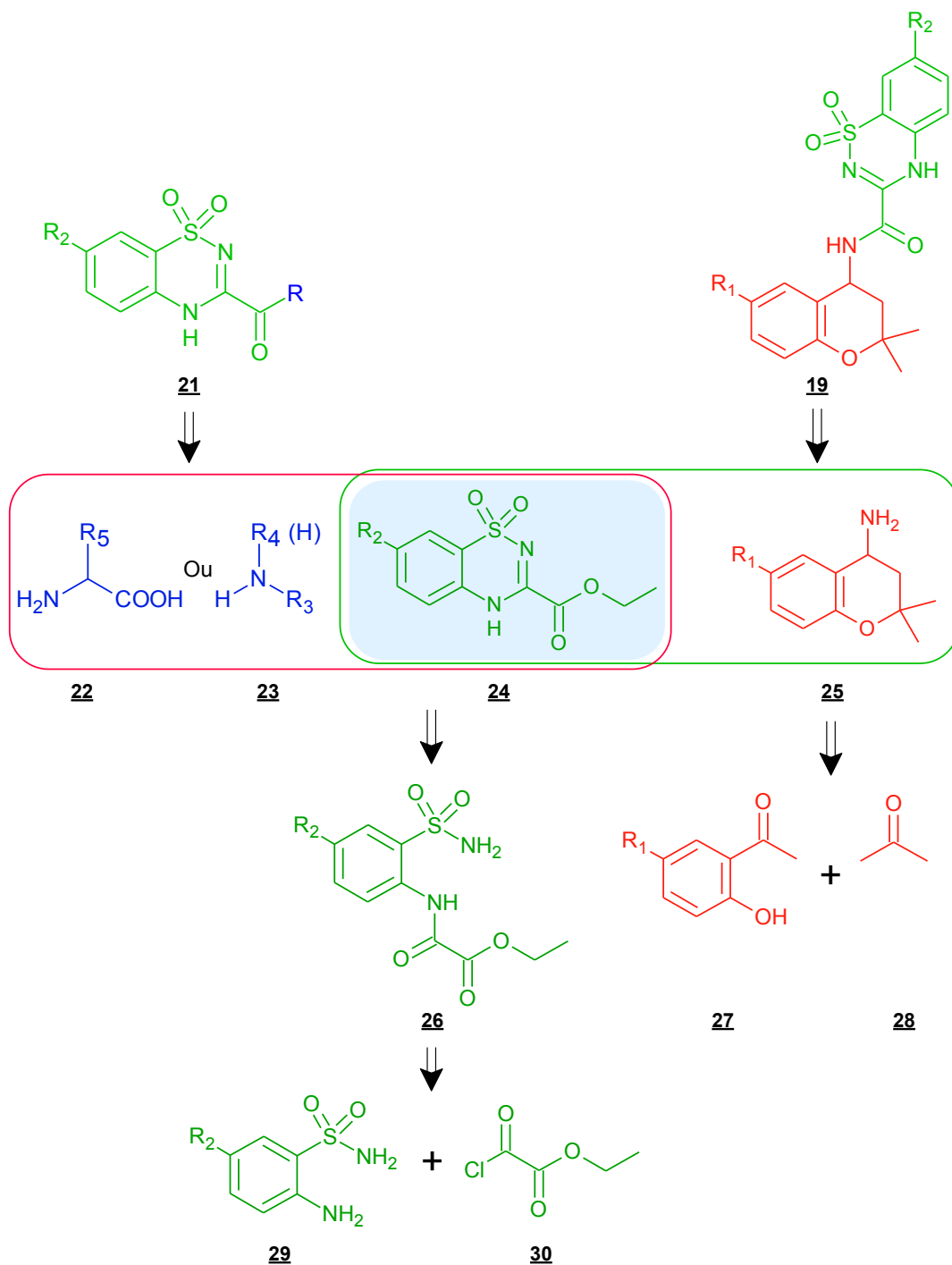


Schéma 1 : Stratégie de synthèse des molécules cibles **19** et **21**.

En se basant sur le schéma de rétrosynthèse 1, nous avons suivi les voies de synthèse ci-après pour la préparation des molécules cibles (Schémas 2, 3 et 4).

Le 2-hydroxyacétophénone **31** se condense avec l'acétone **28** en présence de pyrrolidine pour donner la 3,4-dihydro-2,2-diméthyl-2H-1-benzopyran-4-one **32** correspondante [Shawcross et Sard, 1995]. Cette réaction se déroule en deux étapes successives. Il s'agit d'une aldolisation, suivie d'une addition de Michael. L'alcool **33** est obtenu par réduction du 4-chromanone **32** par le borohydrure de sodium. Au cours de cette étape est créé un carbone asymétrique en position 4 du noyau benzopyrane. La réaction de Ritter permet ensuite la substitution du groupement hydroxyle en position 4 de l'intermédiaire **34** par un groupement acétamide ou benzamide. Cette réaction se déroule en présence d'acétonitrile ou benzonitrile additionné d'acide sulfurique concentré. La réaction d'hydrolyse finale est réalisée par chauffage dans l'acide chlorhydrique concentré pendant 12 h, donnant la 4-aminochromanone **25**.

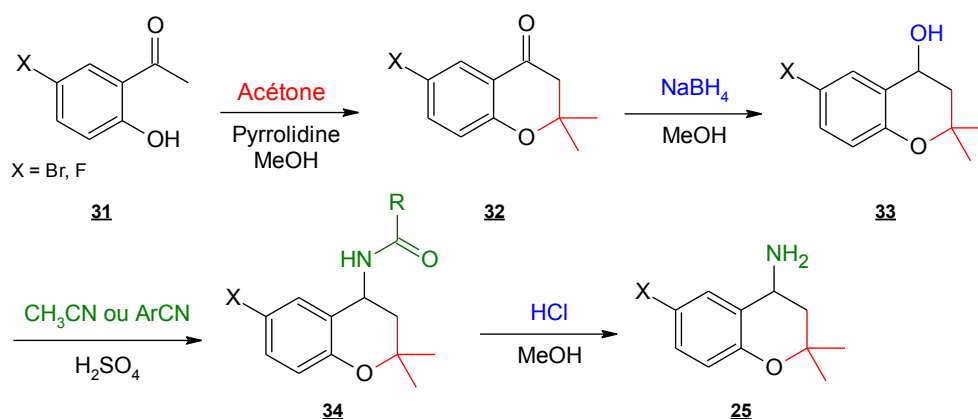


Schéma 2 : Schéma de synthèse des intermédiaires 4-aminochromanone **24**.

La synthèse de la benzothiadiazine **24** est réalisée en deux étapes (Schéma 3). La première étape consiste à faire réagir l'*o*-aminobenzènesulfonamide **29** avec le chlorure d'éthylxalyle, au reflux du toluène pour obtenir le produit **26**. Enfin, sa cyclisation dans l'éthanol en présence d'hydruure de sodium, donne l'ester **24** avec de bons rendements.

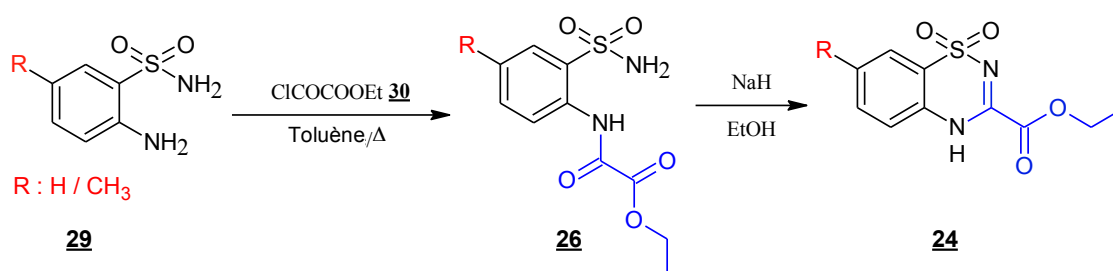


Schéma 3 : Schéma de synthèse de l'intermédiaire **24**.

L'ester **24** est ensuite mis à réagir avec l'amine appropriée.

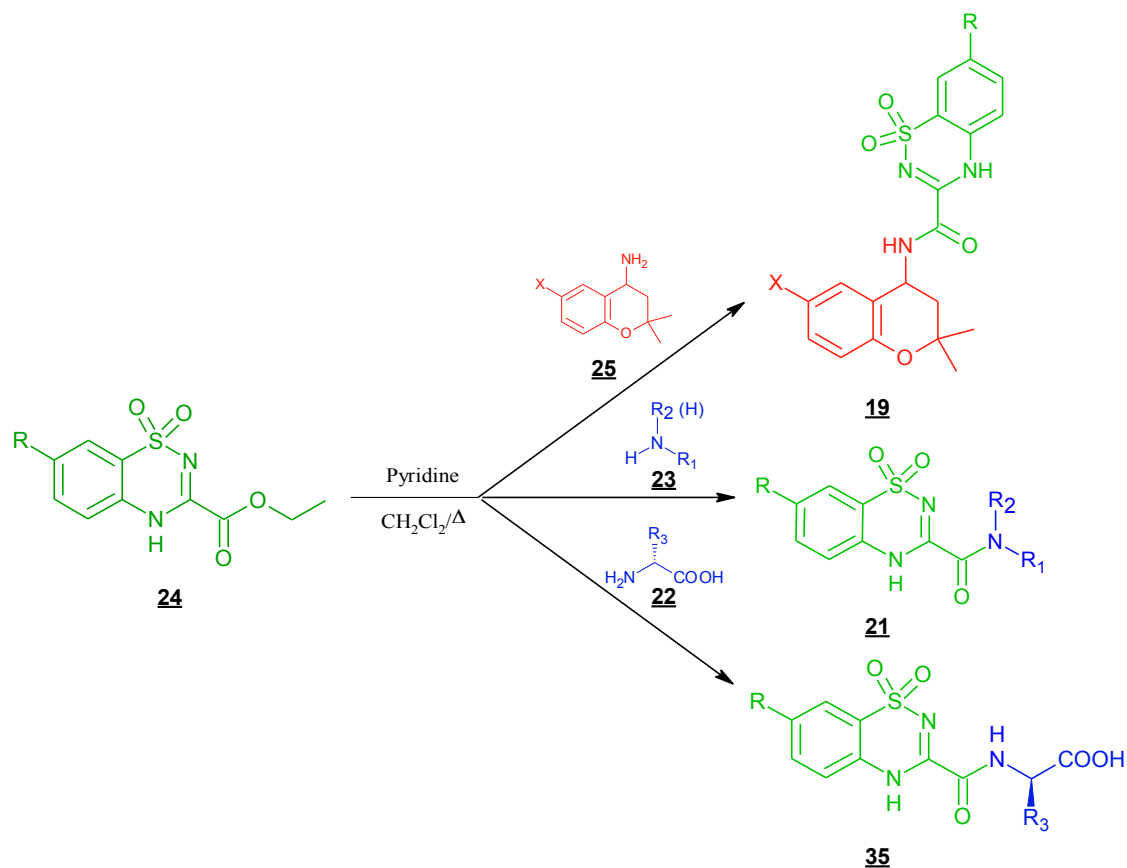


Schéma 4 : Schéma de synthèse des molécules cibles **19**, **21** et **35**.

Les figures 28 et 29 présentent les structures des molécules hybrides, type cromakalim et diazoxide.

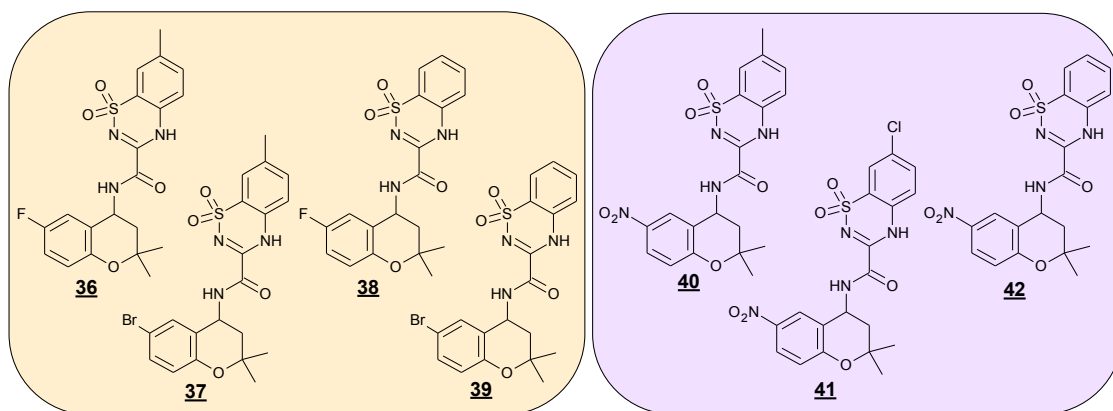


Figure 28 : Structure des molécules hybrides, type cromakalim.

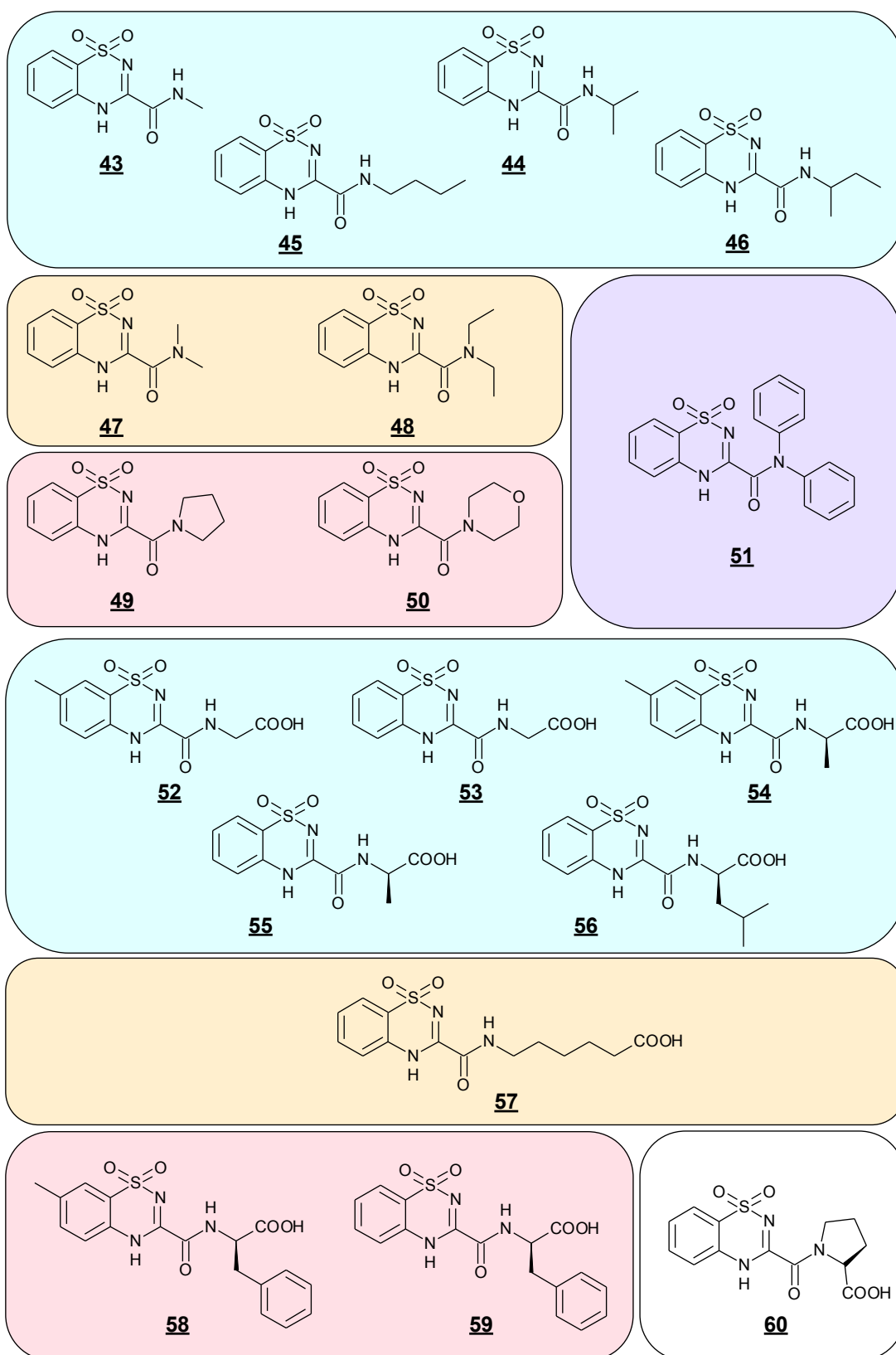


Figure 29 : Structure des molécules hybrides, type diazoxide.

VI.4. Résultats et discussion

Au niveau des muscles lisses, l'activation du canal K_{ATP} se traduit par une hyperpolarisation membranaire engendrant une diminution du flux entrant de Ca^{2+} au travers des canaux calciques potentiel-dépendants, ce qui aboutit au relâchement de la fibre musculaire. Les résultats obtenus sont exprimés sous forme d' EC_{50} (en μM), qui correspond à la concentration de molécule qui induit 50 % de relaxation de la contraction de départ induite par la solution de KCl 30 mM. Plus la valeur d' EC_{50} est faible, plus la molécule est active.

Le tableau 2 indique les effets des composés **36-42** et des composés de référence (diazoxide **09**, pinacidil **07** et cromakalim **18**) sur des anneaux d'aorte de rat précontratés avec une solution hyperpotassique KCl 30 mM. Aucun de ces nouveaux composés n'a montré un effet myorelaxant marqué, comparés au diazoxide **09**, au pinacidil **07** et au cromakalim **18** ($EC_{50} > 30 \mu M$). L'effet de nos molécules plafonne à partir de 30 μM et ne descend pas en deçà de 50% de relaxation, par comparaison à la contraction produite de manière continue par le KCl 30 mM, et contre laquelle agissent nos composés.

Ces résultats, comparés à ceux obtenus sur les cellules β pancréatiques et sur l'utérus de rates [Khelili *et al.*, 2012] révèlent que l'introduction d'un dihydrobenzopyranyle (squelette du cromakalim) en position 3 du noyau benzothiadiazine (squelette du diazoxide) a fourni une nouvelle classe de molécules hybrides exprimant des propriétés myorelaxantes sur le rat, sélectives du tissu utérin.

Tableau 2 : Activité pharmacologique sur les anneaux d'aorte de rates comparée à celle obtenue antérieurement sur les cellules β pancréatique et sur le tissu utérin de rates.

Composés	X/Y	Sécrétion résiduelle d'insuline (%) *	EC ₅₀ aortique (μ M)
		IC ₅₀ (μ M)	
Produit 36	F/CH ₃	96.9 $\pm$ 5.2 (14)	>30.0 (4)
Produit 38	F/H	77 $\pm$ 3.8 (13)	>30.0 (4)
Produit 37	Br/CH ₃	91.4 $\pm$ 4.5 (24)	>30.0 (4)
Produit 39	Br/H	86.7 $\pm$ 5.4 (25)	>30.0 (4)
Produit 40	NO ₂ /CH ₃	75.7 $\pm$ 4.0 (21)	>30.0 (3)
Produit 41	NO ₂ /Cl	77.0 $\pm$ 4.7 (21)	>30.0 (4)
Produit 42	NO ₂ /H	77.9 $\pm$ 4.6 (13)	>30.0 (4)
($\pm$)-Cromakalim 18	/	77.2 $\pm$ 4.3 (22)	>30.0 (4)
($\pm$)-Pinacidil 07	/	92.1 $\pm$ 5.5 (21)	0.35 $\pm$ 0.02 (11)
Diazoxide 09	/	28.8 $\pm$ 2.4 (21)	22.4 $\pm$ 2.1 (11)

Composés	X/Y	Activité contractile sur l'utérus de rate (% $\pm$ SEM (n)) *		
		10 μ M	50 μ M	100 μ M
Produit 36	F/CH ₃	116,6 $\pm$ 5,7 (4)	132.4 $\pm$ 8,5 (4)	124.4 $\pm$ 8,5 (4)
Produit 38	F/H	123,7 $\pm$ 5,1 (4)	97.9 $\pm$ 4,7 (4)	76.8 $\pm$ 4,3 (4)
Produit 37	Br/CH ₃	76,8 $\pm$ 2,8 (4)	44.5 $\pm$ 5,4 (4)	6.6 $\pm$ 1,7 (4)
Produit 39	Br/H	60,1 $\pm$ 4,5 (4)	44.3 $\pm$ 6,9 (4)	19.9 $\pm$ 4,9 (4)
Produit 40	NO ₂ /CH ₃	103,9 $\pm$ 7,4 (4)	94.9 $\pm$ 6,5 (4)	90.6 $\pm$ 4,1 (4)
Produit 41	NO ₂ /Cl	97,9 $\pm$ 9,0 (4)	70.9 $\pm$ 4,7 (4)	34.7 $\pm$ 2,8 (4)
Produit 42	NO ₂ /H	96,8 $\pm$ 3,5 (4)	62.4 $\pm$ 4,4 (4)	34.7 $\pm$ 4,5 (4)
Diazoxide 09	--	93,8 $\pm$ 2,2 (4)	76.3 $\pm$ 4,9 (4)	67.7 $\pm$ 4,0 (4)
($\pm$)-Pinacidil 07	--	58,1 $\pm$ 4,4 (4)	35.5 $\pm$ 2,9 (4)	38.1 $\pm$ 2,2 (4)

* [Khelili *et al.*, 2012].

La figure 30 présente l'effet myorelaxant de la seconde série de molécules, des benzothiadiazines portant en position 3 une fonction carboxamide. Les courbes montrent que ces molécules n'ont pas d'effet relaxant significatif sur les anneaux d'aorte de rates. Les résultats de l'étude sur le tissu pancréatique (cellules β) et le tissu utérin, permettront de juger de l'éventuelle sélectivité tissulaire.

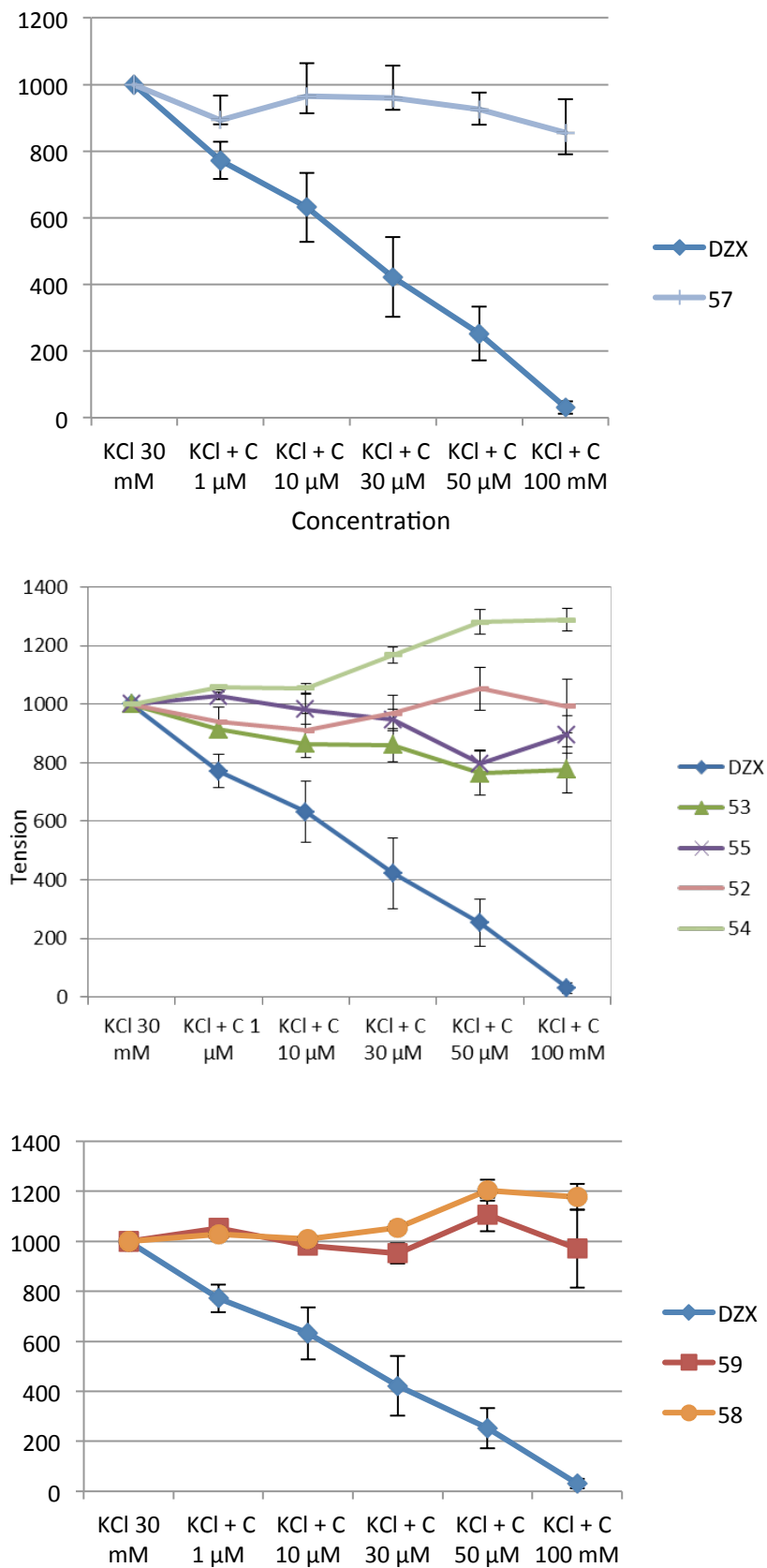


Figure 30 : Résultats obtenus avec le diazoxide (DZX) et la série des composés 52-55 et 57-59.

VII. Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons réussi à développer une série de molécules hybrides de type cromakalim et de diazoxide, possédant une activité myorelaxante très intéressante et une forte sélectivité du tissu utérin. Le développement de ce type de composés sera poursuivi et les relations entre leur activité biologique et la modulation des canaux K_{ATP} devraient être explorées.

La seconde série de molécules sera testée sur d'autres tissus pour évaluer leur efficacité, leur éventuelle sélectivité tissulaire et éclaircir la relation avec les canaux K_{ATP} .

Une autre activité semble être très prometteuse à approfondir : c'est la relation entre les effets de nos molécules et certains types de glioblastomes du cerveau. En effet, des travaux très récents ont révélé que certains modulateurs des canaux K_{ATP} sont *in vitro* inhibiteurs de la croissance de trois lignées cellulaires humaines de gliomes. Effet intéressant, qui semble être sélectif de cellules tumorales gliales d'où l'intérêt d'exploiter cette nouvelle classe de molécules pour une approche thérapeutique innovante dans cette pathologie [Goffin *et al.*, 2012]. Les résultats tout récents concernant nos molécules (série hybride diazoxide-cromakalim) et que malheureusement nous n'avons pas pu inclure ici faute de temps, présente un effet inhibiteur de la prolifération des cellules du gliome de cerveau.

Partie Expérimentale

I. Modèle aortique

I.1. Prélèvement de l'aorte thoracique de rat

Les rats, préalablement anesthésiés avec du phénobarbital, sont disséqués et l'aorte thoracique est prélevée immédiatement, libérée de la graisse et des tissus conjonctifs, et sectionnée en anneaux d'environ 2 à 3 mm de long. Ces dernières manipulations sont réalisées le plus délicatement possible dans une solution de Krebs (en mM : NaCl 118, KCl 5.6, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.4, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, MgCl_2 1.2, glucose 11) à température ambiante. Tous les anneaux sont utilisés immédiatement.

I.2. Montage des anneaux aortiques sur son support

Les anneaux de l'aorte thoracique de rat sont suspendus verticalement dans des bains dans lesquelles circule un courant continu d'une solution de Krebs thermostatée à 37 °C et dans laquelle barbote du carbogène (mélange O_2/CO_2 : 95/5%). Chaque anneau aortique est posé sur deux tiges perpendiculaires, une fixe et l'autre mobile. Cette dernière est reliée par un fil à une jauge de contrainte, qui est reliée à un amplificateur, permet l'enregistrement de toute variation isométrique de la tension dans le muscle qui sera affichée sur l'écran et sauvegardée.

I.3. Mesure de la contraction isométrique résiduelle d'aorte de rat

Les segments d'aorte sont préalablement soumis à une contrainte de 1,5 g, exercée manuellement en écartant légèrement les deux tiges perpendiculaires horizontalement. Cette précontrainte correspond à une tension permettant d'avoir une réponse optimale avec 30 mmol/l de KCl. Après 60 min de détente, les anneaux sont à nouveau soumis à la même contrainte ci-dessus et laissés se détendre pendant 15 min. Ensuite, les anneaux sont contractés par une solution de KCl 30 mM pendant 15 minutes (un plateau est atteint), suivie par une solution d'acétylcholine 5,5 μM qui détend les anneaux (dans le cas contraire il faut changer les anneaux et recommencer l'expérience dès le début). Après 15 minutes, les anneaux sont de nouveau contractés par une solution de KCl 30 mM durant un quart d'heure, puis perfusés par des concentrations croissantes des composés finaux (1, 10, 30, 50 et 100 μM) dont chacune dure 15 minutes. Les courbes de réponses des anneaux sont stockées sous forme de données numériques et analysées statistiquement plus tard.

II. Matériels et méthodes

Les analyses chromatographiques sur couches minces (CCM) sont effectuées sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice (Merck 60 F₂₅₄). Les plaques sont révélées par UV ($\lambda = 254$ ou 365 nm) ou avec une solution de ninhydrine (pour révéler les acides aminés utilisés comme réactifs).

Les points de fusion des différentes molécules synthétisées sont déterminés à l'aide d'un appareil à point de fusion de marque Büchi.

Les spectres IR sont réalisés en phase solide (KBr, 2%) sur un spectromètre FTIR-8400 (SHIMADZU).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisés avec un appareil de marque Bruker[®] Advance 300 (à 300 MHz pour ¹H et 75 MHz pour ¹³C). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par référence au TMS. Les abréviations suivantes sont utilisées pour la RMN ¹H : singulet (s), doublet (d), doublet doublet (dd), triplet (t), quadruplet (q), multiplet ou massique (m) et singulier large (bs). Les constantes de couplage sont exprimés en Hertz.

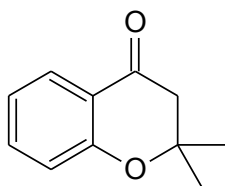
Les poudres sont séchées à l'étuve ventilée à 40 °C.

Les rats utilisés pour les expériences biologiques sont des Wistar Albinos femelles, dont les poids se situent entre 180 et 250 g.

Les mesures de la contraction résiduelle des anneaux d'aorte de rat ont été réalisées à l'aide d'un appareillage composé de quatre cuves à organes reliés à 4 transducteurs de force isométrique, un amplificateur et un logiciel d'enregistrement et d'analyse des résultats "BIOCODAS" fournis par la société BioLogic (Claix, France) permettant la visualisation de la tension des anneaux d'aorte au cours du temps.

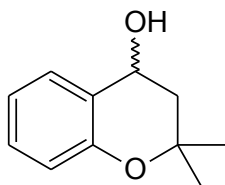
III. Modes opératoires

III.1. Synthèse de l'intermédiaire 32



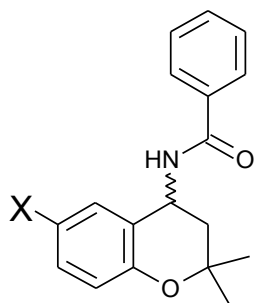
L'hydroxyacétophénone 31 (0.58 mmol) est dissout dans 20 mL de MeOH additionné de pyrrolidine (0.90 mmol). L'acétone (0.90 mmol) est ensuite ajoutée et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est dilué avec de l'eau puis acidifié avec HCl concentré. Le produit 32 est extrait avec du DCM, séché avec MgSO₄ puis récupéré après évaporation du solvant sous pression réduite, sous forme d'huile. Ce dernier est utilisé dans l'étape suivante de synthèse.

III.2. Synthèse de l'intermédiaire 33



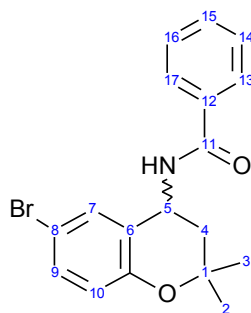
La chromanone 32 (0.23 mmol) est dissoute dans 20 mL de MeOH auquel on ajoute du borohydrure de sodium (0.26 mmol) et le mélange réactionnel est agité pendant 30 min à 0°C. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu est additionné d'eau, puis la suspension obtenue est acidifiée avec HCl concentré. Le produit 33 est extrait avec de l'AcOEt puis récupéré après évaporation du solvant sous pression réduite sous forme d'un solide blanc avec un bon rendement.

III.3. Synthèse de l'intermédiaire 34



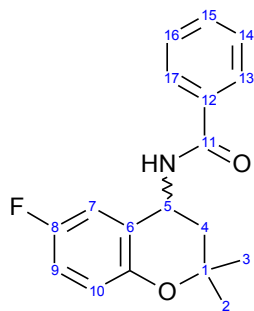
Le 4-hydroxybenzopyrane 33 (0.16 mmol) est dissout dans 10 mL de benzonitrile à 0°C. On ajoute alors de l'acide sulfurique glacial (0.1eq) et le mélange réactionnel est agité pendant 1 h à 0°C. Le précipité formé est filtré puis lavé successivement avec du DCM, AcOH et H₂O puis séché sous vide.

N-(6-bromo-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-4-yl)- Benzamide 34a



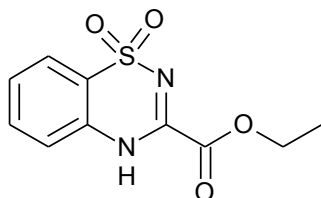
Formule brute	: C ₁₈ H ₁₈ BrNO ₂
Masse molaire (g/mol)	: 360.24
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 80%
T _F (°C)	: 182-180
IR (cm ⁻¹)	: 1640, 3300, 1090, 1250.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 1.35 (3H, s, H ₂), 1.44 (3H, s, H ₃), 1.79 (1H, dd, H ₄), 2.29 (1H, dd, H ₄), 5.48 (1H, m, H ₅), 6.34 (1H, d, NH), 6.69-8.11 (8H, m, H ₇ , H ₉ , H ₁₀ , H _{13/17} , H _{14/16} and H ₁₅).
δ (ppm)	

***N*-(6-fluoro-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-4-yl)- benzamide 34b**



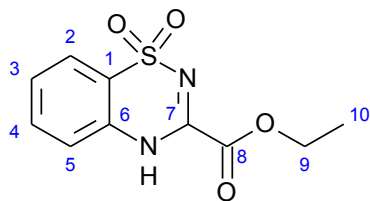
Formule brute	: C ₁₈ H ₁₈ FNO ₂
Masse molaire (g/mol)	: 299.34
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 50%
T _F (°C)	: 194-192
IR (cm ⁻¹)	: 1630, 3300, 1120, 1300.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 1.35 (3H, s, H ₂), 1.44 (3H, s, H ₃), 1.79 (1H, dd, H ₄), 2.30 (1H, dd, H ₄), 5.49 (1H, m, H ₅), 6.28(1H, d, NH), 6.73-7.81(8H, m, H ₇ , H ₉ , H ₁₀ , H _{13/17} , H _{14/16} and H ₁₅)
δ (ppm)	

III.4. Synthèse de l'intermédiaire 24



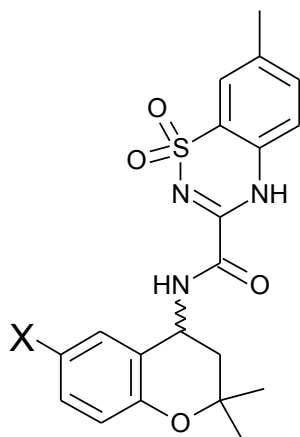
A une solution de 34 (1 g) dans 25 mL de l'EtOH est ajouté du NaH (0.16 g) ; suspension de 60% dans l'huile minérale). Le mélange réactionnel est agité pendant 2h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL). Après avoir acidifié le mélange avec une solution aqueuse d'HCl (4N) et évaporer le solvant sous pression réduite, une recristallisation du produit obtenu est ensuite réalisée dans un mélange EtOH/Eau pour récupérer le produit 24 sous forme de cristaux blancs. D'autre part, le composé 26 est obtenu en ajoutant, à 0°C, la triéthylamine (64 mmol) à une solution de l'*O*-sulfanilamide 29 (61 mmol) dans le THF. Le chlorure d'éthyloxalate (64 mmol) est ensuite additionné goutte à goutte, et le mélange réactionnel est agité 5 h à température ambiante. Le précipité formé est filtré puis recristallisé dans l'AcOEt pour récupérer le composé 26 sous forme de cristaux blancs.

Ethyl 4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide **24**



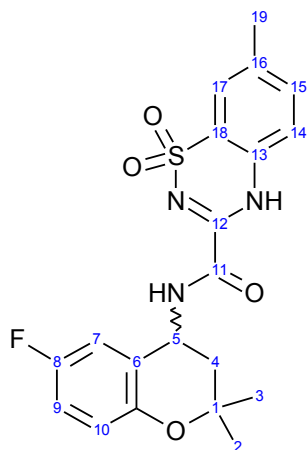
Formule brute	: C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₄ S
Masse molaire (g/mol)	: 254.26
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 35
T _F (°C)	: 182-184
IR (cm ⁻¹)	: 3300, 1730, 1100, 1260.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 7.85-7.40 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 4.45-4.38 (m, 2H, H ₉), 1.35-1.40 (m, 3H, H ₁₀).

III.5. Synthèses des composés hybrides diazoxide-cromakalim **36-42**



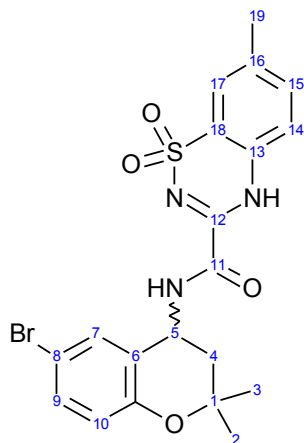
Après hydrolyse de l'amide **34** (0.94 mmol) dans 10 mL d'une solution aqueuse concentrée d'HCL (36%), l'amine **25** récupéré (0.2 g) est mis en solution dans 15 mL de DCM. On ajoute ensuite 1 eq de l'ester **24** et 1.1 eq de pyridine. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 4 h. Le précipité **19** formé est filtré puis lavé successivement avec de l'eau, DCM et AcOH et enfin séché sous vide.

**(R/S)-3-[(6- fluoro-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-benzopyran-4-yl) aminocarbonyl]-
4H -7-methyl-benzothiadiazine 1,1-dioxide 36**



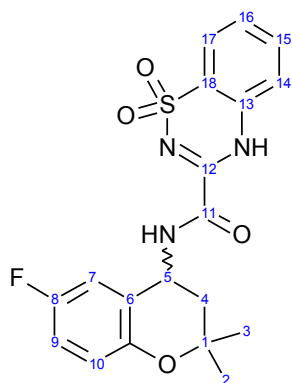
Formule brute	: C ₂₀ H ₂₀ FN ₃ O ₄ S
Masse molaire (g/mol)	: 417.45
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 95
T _F (°C)	: 272-273
IR (cm ⁻¹)	: 1720 (CO), 1260, 1170 (SO ₂).
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 1.3 (3H, s, CH ₃), 1.40 (3H, s, CH ₂), 2.00 (1H, m, CH ₄), 2.15 (1H, m, CH ₄), 2.40 (3H, s, CH ₁₉), 5.20 (1H, m, CH), 6.80 (1H, m, CH _{arom}), 7.00 (2H, m, CH _{arom}), 7.60 (1H, m, CH _{arom}), 7.70 (1H, s, CH _{arom}), 7.75 (1H, m, CH _{arom}), 9.55 (1H, s, NH, échangeable avec D ₂ O).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 20.52, 23.77, 29.41, 37.13, 42.90, 75.36, 113.18, 115.25, 117.98, 118.04, 119.19, 121.50, 122.58, 123.17, 134.23, 137.21, 146.56, 149.62, 159.09.

**(R/S)-3-[(6-bromo-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-benzopyran-4-yl) aminocarbonyl]-
4H -7-methyl-benzothiadiazine 1,1-dioxide 37**



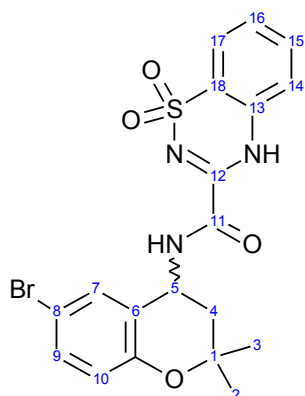
Formule brute	: C ₂₀ H ₂₀ BrN ₃ O ₄ S
Masse molaire (g/mol)	: 478.36
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 95
T _F (°C)	: 265-266
IR (cm ⁻¹)	: 1700, 1265, 1155.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 1.30 (3H, s, CH ₃), 1.42 (3H, s, CH ₂), 2.00 (1H, m, CH ₄), 2.13 (1H, m, CH ₄), 5.20 (1H, m, CH ₅), 6.75 (1H, m, CH _{arom}), 7.30 (2H, m, CH _{arom}), 7.60 (1H, m, CH _{arom}), 7.70 (1H, s, CH _{arom}), 7.75 (1H, m, CH _{arom}), 9.55 (1H, s, NH, échangeable avec D ₂ O).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 23.89, 29.32, 37.11, 42.73, 75.77, 111.19, 119.18, 121.48, 122.59, 124.38, 124.41, 129.61, 131.24, 134.26, 137.27, 146.41, 152.76, 159.00.

**(R/S)-3-[(6- fluoro-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-benzopyran-4-yl) aminocarbonyl]-
4H-benzothiadiazine 1,1-dioxide 38**



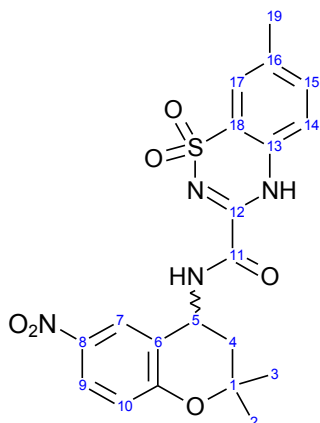
Formule brute	: C ₁₉ H ₁₈ FN ₃ O ₄ S
Masse molaire (g/mol)	: 403.43
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 90
T _F (°C)	: 304-305
IR (cm ⁻¹)	: 3425, 1725, 1260, 1160.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 1.3 (3H, s, CH ₃), 1.40 (3H, s, CH ₂), 2.00 (1H, m, CH ₄), 2.15 (1H, m, CH ₄), 5.20 (1H, m, CH ₅), 6.75 (1H, m, CH _{arom}), 7.00 (2H, m, CH _{arom}), 7.55 (1H, m, CH _{arom}), 7.75 (1H, s, CH _{arom}), 7.85 (2H, m, CH _{arom}), 9.55 (1H, s, NH, échangeable avec D ₂ O).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 23.78, 29.42, 37.14, 42.90, 75.36, 113.20, 115.33, 117.98, 118.04, 119.33, 121.63, 123.16, 123.22, 127.17, 133.27, 146.94, 149.61, 159.08.

**(R/S)-3-[(6-bromo-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-benzopyran-4-yl) aminocarbonyl]-
4H -benzothiadiazine 1,1-dioxide 39**



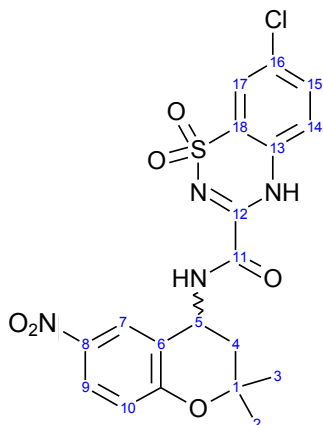
Formule brute	: C ₁₉ H ₁₈ BrN ₃ O ₄ S
Masse molaire (g/mol)	: 464.33
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 90%
T _F (°C)	: 225-226
IR (cm ⁻¹)	: 1715, 1255, 1165.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	:
δ (ppm)	1.25 (3H, s, CH ₃), 1.40 (3H, s, CH ₂), 2.00 (1H, m, CH ₄), 2.15 (1H, m, CH ₄), 5.20 (1H, m, CH ₅), 6.75 (1H, m, CH _{arom}), 7.30 (2H, m, CH _{arom}), 7.55 (1H, m, CH _{arom}), 7.75 (1H, s, CH _{arom}), 7.85 (2H, m, CH _{arom}), 9.60 (1H, s, NH, échangeable avec D ₂ O).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	:
δ (ppm)	23.89, 29.33, 37.15, 42.74, 75.77, 111.20, 119.17, 119.24, 121.59, 123.33, 124.39, 127.26, 129.63, 131.25, 133.33, 134.72, 146.81, 152.76, 159.02.

(R/S)-3-[(6-nitro-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-benzopyran-4-yl) aminocarbonyl]-4H-7-methyl-benzothiadiazine 1,1-dioxide 40



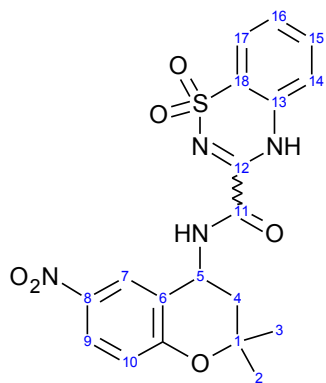
Formule brute	: C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₆ S
Masse molaire (g/mol)	: 444.46
Aspect	: Solide Blanc
R ^{dt} (%)	: 90
T _F (°C)	: 310-312
IR (cm ⁻¹)	: 1700, 1260, 1155.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 1.35 (3H, s, CH ₃), 1.47 (3H, s, CH ₂), 2.20 (2H, m, CH ₄), 2.40 (1H, s, CH ₄), 5.30 (1H, m, CH ₅), 7.00 (1H, m, CH _{arom}), 7.60 (1H, m, CH _{arom}), 7.70 (1H, s, CH _{arom}), 7.75 (1H, m, CH _{arom}), 8.10 (2H, m, CH _{arom}), 9.65 (1H, s, NH, échangeable avec D ₂ O).
δ (ppm)	

(R/S)-3-[(6-nitro-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-benzopyran-4-yl) aminocarbonyl]-4H-7-chloro-benzothiadiazine 1,1-dioxide⁴¹



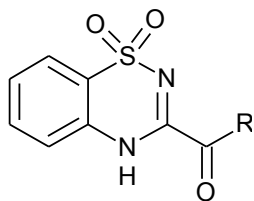
Formule brute	: C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ O ₆ S
Masse molaire (g/mol)	: 464.88
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 95%
T _F (°C)	: 284-287
IR (cm ⁻¹)	: 1710, 1270, 1155.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 1.35 (3H, s, CH ₃), 1.50 (3H, s, CH ₂), 2.20 (2H, m, CH ₄), 5.30 (1H, m, CH ₅), 7.35 (1H, m, CH _{arom}), 7.75 (2H, m, CH _{arom}), 7.80 (1H, s, CH _{arom}), 8.10 (2H, m, CH _{arom}), 9.65 (1H, s, NH, échangeable avec D ₂ O).
δ (ppm)	

(R/S)-3-[(6-nitro-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-benzopyran-4-yl) aminocarbonyl]-4H-benzothiadiazine 1,1-dioxide 42



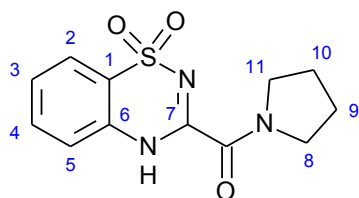
Formule brute	: C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₆ S
Masse molaire (g/mol)	: 430.43
Aspect	: Solide Blanc
R ^{dt} (%)	: 90
T _F (°C)	: 272-273
IR (cm ⁻¹)	: 1715, 1270, 1165.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 1.35 (3H, s, CH ₃), 1.45 (3H, s, CH ₂), 2.2 (2H, m, CH ₄), 7.00 (m, 1H, CH _{arom}), 7.75 (m, 1H, CH _{arom}), 7.90 (2H, m, CH _{arom}), 8.00 (2H, m, CH _{arom}), 9.70 (1H, s, NH, échangeable avec D ₂ O).
δ (ppm)	

III.6. Synthèses des molécules hybrides type diazoxide 43-60



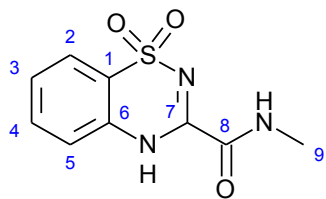
A une solution de **24** (0,79 mmol) et de 1,1 eq de pyridine dans 5 mL de DCM est ajouté l'amine **23** ou l'acide aminé **22** (0,79 mmol). Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 4h. Le précipité formé est filtré puis lavé successivement avec du DCM, AcOH et H₂O puis séché sous vide.

N-butyl-3-carboxamide-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide **40**



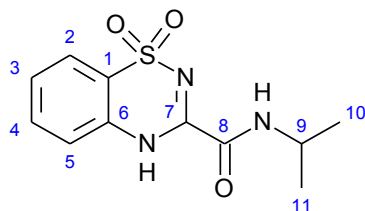
Formule brute	: C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 279.32
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 46
T _F (°C)	: 188-190
IR (cm ⁻¹)	: 3246, 2508, 1597, 1289
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 7.79-7.37 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 3.15 (m,
δ (ppm)	4H, H ₁₁ and H ₈), 1.91-1.81 (m, 4H, H ₁₀ and H ₉).

***N*-methyl-3-carboxamide-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 43**



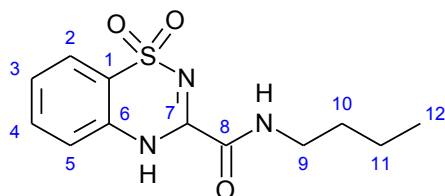
Formule brute	: C ₉ H ₉ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 239.25
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 85
T _F (°C)	: > 265
IR (cm ⁻¹)	: 3226, 1686, 1597, 1293
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 7.75-7.40 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂).
δ (ppm)	
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 168.69, 153.77 (C ₈ and C ₇), 153.77, 148.14 (C ₆),
δ (ppm)	138.57 (C ₄), 132.98 (C ₁), 126.29 (C ₂), 123.55 (C ₃), 119.11 (C ₅), 29.8 (C ₉).

***N*-(propan-2-yl)-3-carboxamide-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 44**



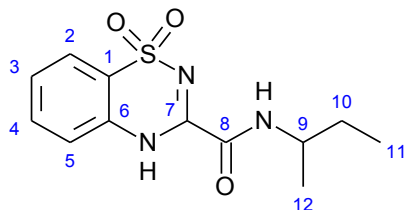
Formule brute	: C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 267.30
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 76
T _F (°C)	: > 265
IR (cm ⁻¹)	: 3227, 1661, 1597, 1294
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 7.74 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 1.20 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 6H).
δ (ppm)	
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 166.11, 158.11 (C ₈ and C ₇), 135.65 (C ₆), 133.65 (C ₁), 133.10 (C ₄), 126.41 (C ₂), 123.60 (C ₃),
δ (ppm)	118.91 (C ₅), 43.31 (C ₉), 20.88 (C ₁₁ and C ₁₀).

***N*-butyl-3-carboxamide-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 45**



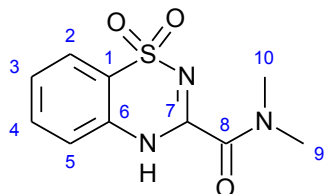
Formule brute	: C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 281.33
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 50
T _F (°C)	: 218-220
IR (cm ⁻¹)	: 3317, 3221, 2920, 1517, 1302
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 9.18 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.77-7.52 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 3.30-3.20 (m, 2H, H ₉), 1.59-1.45 (m, 2H, H ₁₀), 1.30 (m, 2H, H ₁₁), 0.90 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3H, H ₁₂).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 158.65, 147.33 (C ₈ and C ₇), 135.01 (C ₆), 133.79 (C ₄), 127.76 (C ₂), 123.77 (C ₃), 122.03 (C ₁), 119.68 (C ₅), 39.95 (C ₉), 31.16 (C ₁₀), 19.92 (C ₁₁), 14.06 (C ₁₂).

***N*-(butan-2-yl)-3-carboxamide-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 46**



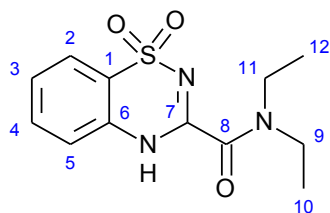
Formule brute	: C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 281.33
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 83
T _F (°C)	: 207-209
IR (cm ⁻¹)	: 3429, 3240, 2973, 1515, 1306
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 8.60 (d, 1H, NH), 7.75-7.40 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 3.84 (m, 1H, H ₉), 1.65-1.40 (m, 2H, H ₁₀), 1.15 (d, 3H, H ₁₂), 0.95-0.80 (m, 3H, H ₁₁).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 160.22, 149.50 (C ₈ and C ₇), 139.15 (C ₆), 132.81 (C ₄), 126.47 (C ₂), 123.34 (C ₃), 123.02 (C ₁), 121.94 (C ₅), 48.60, 47.46 (C ₉), 28.89, 27.64 (C ₁₀), 20.31, 18.15 (C ₁₂), 11.19, 10.11 (C ₁₁).

***N,N*-dimethyl-3-carboxamide-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 47**



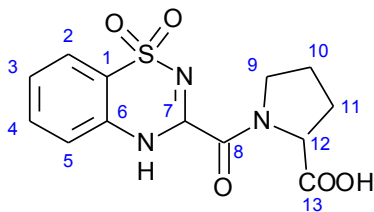
Formule brute	: C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 253.28
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 62
T _F (°C)	: 202-209
IR (cm ⁻¹)	: 3150, 1660, 1690, 1150, 1290
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 7.75-7.4 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 2.5 (s, 6H, H ₁₀ and H ₉)
δ (ppm)	

***N,N*-diethyl-3-carboxamide-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 48**



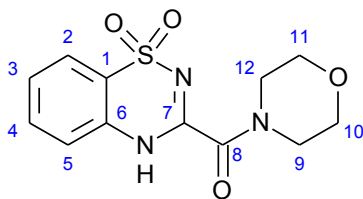
Formule brute	: C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 281.33
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 90
T _F (°C)	: 202-204
IR (cm ⁻¹)	: 3200, 2960, 1650, 1550, 1365.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 7.76-7.41 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 2.97 (q, <i>J</i> = 7.3 Hz, 4H, H ₁₁ and H ₉), 1.18 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 4H, H ₁₂ and H ₁₀).
δ (ppm)	
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 160.47, 153.09 (C ₈ , C ₇), 135.57 (C ₆), 133.20 (C ₄), 126.56 (C ₁), 123.63 (C ₂), 121.37 (C ₃), 118.95 (C ₅), 41.83 (C ₁₁ and C ₉), 11.48 (C ₁₂ and C ₁₀).
δ (ppm)	

**Acide-2-[(1,1-dioxido-4*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)-aminocarbonyl]
cyclopentanoïque 49**



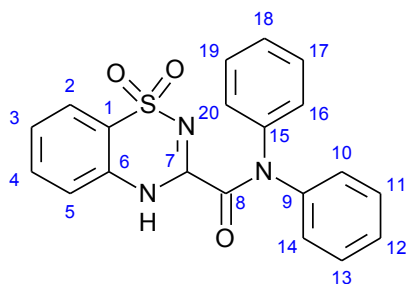
Formule brute	: C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 323.32
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 63
T _F (°C)	: 192-194
IR (cm ⁻¹)	: 3100, 2988, 1678, 1584, 1293
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 9.15 (bs, 1H, COOH), 7.83-7.41 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 4.07-3.93 (m, 1H, H ₁₂), 3.17 (m, 2H, H ₉), 2.14 (m, 1H, H ₁₁), 2.03-1.72 (m, 3H, H ₁₁ and H ₁₀).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 171.09 (C ₁₃), 160.51, 152.97 (C ₈ and C ₇), 135.58 (C ₆), 133.19 (C ₄), 126.54 (C ₁), 123.64 (C ₂), 121.36 (C ₃), 118.92 (C ₅), 60.26 (C ₁₂), 45.65 (C ₉), 29.04 (C ₁₁), 24.01 (C ₁₀).

1-[1,1-dioxido-4*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl]1-[morpholin-4-yl]méthanone 50



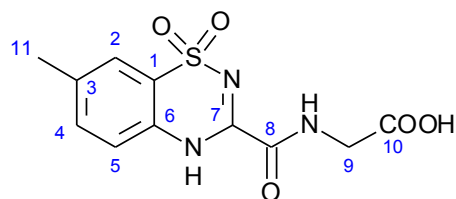
Formule brute	: C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ S
Masse molaire (g/mol)	: 295.31
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 86
T _F (°C)	: 236-238
IR (cm ⁻¹)	: 3215, 2979, 2731, 2498, 1596
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 7.77-7.43 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 3.79 (m, 4H, H ₁₁ and H ₁₀), 3.15 (m, 4H, H ₁₂ and H ₉).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 160.61, 152.91 (C ₇ and C ₅), 135.54 (C ₆), 133.26 (C ₄), 126.65 (C ₂), 123.64 (C ₃), 121.38 (C ₁), 118.99 (C ₅), 63.84 (C ₁₁ and C ₁₀), 43.35 (C ₁₂ and C ₉).

***N,N*-diphényl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide 51**



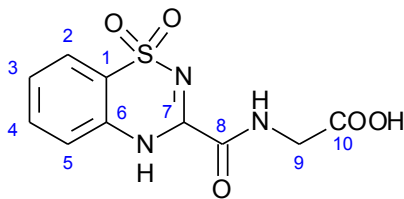
Formule brute	: C ₂₀ H ₁₅ N ₃ O ₃ S
Masse molaire (g/mol)	: 377.4164
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 54
T _F (°C)	: > 265
IR (cm ⁻¹)	: 3450, 1655, 1350.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 8.59 (m, 1H, NH), 7.81-7.44 (m, 14H, H ₅ , H ₄ , H ₃ , H ₂ , H _{20/16} , H _{19/17} , H ₁₈ , H _{14/10} , H _{13/11} , and H ₁₂).
δ (ppm)	
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 158.48, 150.77.0 (C8 and C7), 140.53, 140.42, 133.43, 133.29, 126.78, 123.66, 121.50, 119.01, 117.36 (C ₆ , C ₅ , C ₄ , C ₃ , C ₂ , C ₁ , C _{20/16} , C _{19/17} , C ₁₈ , C _{14/10} , C _{13/11} and C ₁₂).
δ (ppm)-	

Acide 2-[(7-méthyl-1,1dioxido-4*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)amino-carbonyl] méthanoïque 52



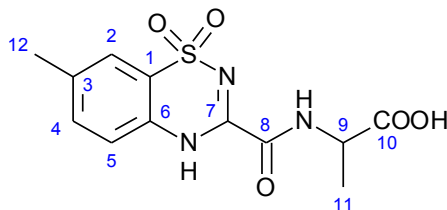
Formule brute	: C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 297.29
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 96
T _F (°C)	: >268
IR (cm ⁻¹)	: 3220, 1535, 1530, 1245, 1210.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 11.87 (bs, 1H, COOH), 8.58-8.28 (m, 2H, NH), 7.69-7.35 (m, 3H, H ₅ , H ₄ and H ₂), 3.70 (bs, 2H, H ₉), 2.37 (s, 3H, H ₁₁).
δ (ppm)	
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 169.52 (C ₁₀), 160.68, 152.03 (C ₈ and C ₇), 136.45 (C ₆), 134.18 (C ₄), 133.24 (C ₁), 124.41 (C ₃), 122.96 (C ₂), 118.89 (C ₅), 50.0 (C ₉), 20.93 (C ₁₁).
δ (ppm)	

Acide 2-[(1,1dioxido-4*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)aminocarbonyl]-éthanoïque
53



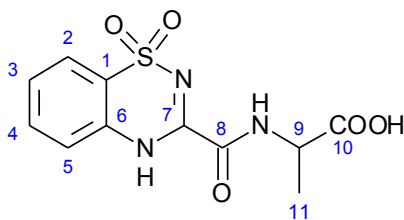
Formule brute	: C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 283.26
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 92
T _F (°C)	: 259-261
IR (cm ⁻¹)	: 3240, 1530, 1505, 1230.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 11.98 (bs, 1H, COOH), 8.62-8.30 (m, 2H, NH),
δ (ppm)	7.82-7.37 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 3.72 (bs, 2H, H ₉).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 169.53 (C ₁₀), 160.71, 152.15 (C ₈ and C ₇), 135.50
δ (ppm)	(C ₆), 133.28 (C ₁), 126.71 (C ₄), 123.67 (C ₂), 121.42, 118.98 (C ₃ and C ₅), C ₉ (39.98).

Acide 2-[(7-méthyl-1,1dioxido-4*H*-1,2,3-benzothiadiazin-3-yl)amino-carbonyl]propanoïque
54



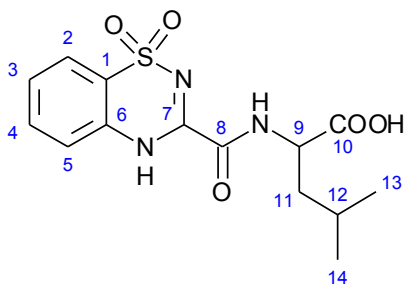
Formule brute	: C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 311.31
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 90
T _F (°C)	: >268
IR (cm ⁻¹)	: 3240, 3150, 1750, 1532, 1230
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 11.92 (bs, 1H, COOH), 8.62-8.08 (m, 2H, NH),
δ (ppm)	7.70 – 7.32 (m, 3H, H ₅ , H ₄ and H ₂), 3.96 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, H ₉), 2.37 (s, 3H, H ₁₂), 1.40 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, H ₁₁).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 172.12 (C ₁₀), 160.59, 152.15 (C ₈ and C ₇),
δ (ppm)	149.94(C ₆), 136.41 (C ₂), 134.16 (C ₁), 124.41 (C ₃), 121.28 (C ₂), 118.87 (C ₃ and C ₅), 48.46 (C ₉), 20.93 (C ₁₂), 16.35 (C ₁₁).

**Acide 2-[(1,1dioxido-4H-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)aminocarbonyl]
propanoïque 55**



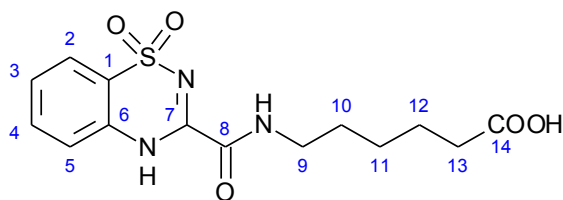
Formule brute	: C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 297.29
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 91
T _F (°C)	: 245-247
IR (cm ⁻¹)	: 3290, 3100, 1740, 1590, 1230.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 12.02 (s, 1H, COOH), 8.66-8.07 (m, 2H, NH), 7.83-7.36 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 3.97 (q, 1H, H ₉), 1.40 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, H ₁₁).
δ (ppm)	
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 172.13 (C ₁₀), 160.55, 152.41 (C ₈ and C ₇), 135.53 (C ₆), 133.24 (C ₄), 126.64 (C ₁), 123.67 (C ₂), 121.41, 118.94 (C ₃ and C ₅), 48.45 (C ₉), 16.35 (C ₁₁).
δ (ppm)	

**Acide 2-[(1,1dioxido-4H-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)aminocarbonyl]-4-
methylpropanoïque 56**



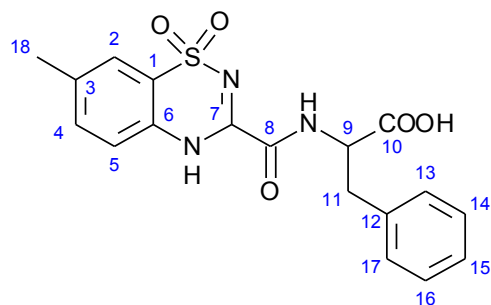
Formule brute	: C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 339.37
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 97
IR (cm ⁻¹)	: 3252, 3050, 2966, 1669, 1589, 1294
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 11.80 (bs, 1H, COOH), 8.58 (m, 1H, NH), 7.89-7.34 (m, 6H, H ₅ , H ₄ , H ₃ , H ₂ and NH), 4.40 (m, 1H, H ₉), 1.85-1.52 (m, 3H, H ₁₂ and H ₁₁), 0.90 (m, 6H, H ₁₄ and H ₁₃).
δ (ppm)	
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 171.94 (C ₁₀), 160.23, 159.99 (C ₈ and C ₇), 145.07, 135.28, 133.84, 127.90, 119.65, 118.86 (C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅ and C ₆), 51.21 (C ₉), 22.73 (C ₁₄ and C ₁₃), 22.37 (C ₁₂).
δ (ppm)	

**Acide 6-[(1,1dioxido-4H-1,2,3-benzothiadiazin-3-yl)aminocarbonyl]-
h  xano  que 57**



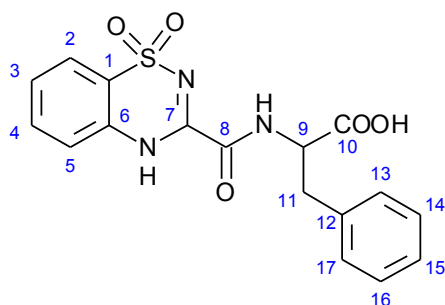
Formule brute	: C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 339.37
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 96
T _F (��C)	: 246-244
IR (cm ⁻¹)	: 3160, 1680, 1530, 1245
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 7.80-7.33 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 2.79 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H, H ₉), 2.20 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, H ₁₃), 1.62-1.43 (m, 4H, H ₁₂ and H ₁₀), 1.38-1.24 (m, 2H, H ₁₁).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 174.80 (C ₁₄), 153.28 (C ₈ and C ₇), 135.61 (C ₆), 133.16 (C ₄), 126.48 (C ₁), 123.65 (C ₂), 121.38, 118.88 (C ₃ and C ₅), 39.86 (C ₉), 33.89 (C ₁₃), 27.23 (C ₁₀), 25.83 (C ₁₁), 24.43 (C ₁₂).

**Acide 2-[(7-m  thyl-1,1dioxido-4H-1,2,3-benzothiadiazin-3-yl)amino-carbonyl]-3-
ph  nylpropano  que 58**



Formule brute	: C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 387.41
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 90
T _F (��C)	: 230-232
IR (cm ⁻¹)	: 3210, 1530, 1320, 1140.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 11.92 (bs, 1H, COOH), 8.58 -7.79 (m, 2H, NH), 7.69-7.19 (m, 8H, H ₅ , H ₄ , H ₂ , H _{17/13} , H _{16/14} and H ₁₅), 4.13 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 1H, H ₉), 3.10 (m, 2H, H ₁₁), 2.37 (s, 3H, H ₁₈).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 170.94 (C ₁₀), 160.58, 152.44 (C ₈ and C ₇), 149.99 (C ₁₂), 136.68 (C ₆), 135.72 (C ₄), 133.30 (C ₁), 129.94, 128.96, 127.52, 124.39, 122.95 (C ₂ , C ₃ , C _{17/13} , C _{16/14} and C ₁₅), 118.86 (C ₅), 54.00 (C ₉), 36.49 (C ₁₁), 20.93 (C ₁₈).

Acide 2-[(1,1-dioxido-4*H*-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl)aminocarbonyl]-3-phenylpropanoïque 59



Formule brute	: C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₅ S
Masse molaire (g/mol)	: 373.38
Aspect	: Solide blanc
R ^{dt} (%)	: 89
T _F (°C)	: 221-223
IR (cm ⁻¹)	: 3280, 3090, 1530, 1310, 1145.
RMN ¹ H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 11.92 (bs, COOH), 8.58-8.29 (m, 2H, NH), 7.86-7.59 (m, 4H, H ₅ , H ₄ , H ₃ and H ₂), 7.49-7.20 (m, 5H, H _{17/13} , H _{16/14} and H ₁₅), 4.16 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H, H ₉), 3.21-3.06 (m, 2H, H ₁₁).
RMN ¹³ C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	: 171.01 (C ₁₀), 160.78, 152.39 (C ₈ and C ₇), 149.85 (C ₆), 136.84 (C ₁₂), 135.70, 135.54 (C ₄ and C ₁), 133.26 (C ₂), 129.96, 128.94, 127.50, 126.68 (C ₃ , C _{17/13} , C _{16/14} and C ₁₅), 118.99 (C ₅), 53.99 (C ₉), 36.47 (C ₁₁).
δ (ppm)	

Références Bibliographiques

- Ammälä C, Moorhouse A, Ashcroft FM, The sulphonylurea receptor confers diazoxide sensitivity on the inwardly rectifying K⁺ channel Kir6.1 expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol.*, **1996**, 494, 709-714.
- Ashcroft FM, ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion, *J Clin Invest.*, **2005**, 115(8), 2047-2058.
- Ashcroft FM., Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas. *Horm Metab Res.*, **1996**, 28, 456-463.
- Ashcroft SJH, Ashcroft FM., Properties and function of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.*, **1990**, 2, 197-214.
- Bataille D., Mécanismes moléculaires de l'insulinosécrétion. *Diabetes & Metabolism*, **2002**, 28(6), 7-13.
- Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP, Aguilar-Bryan L., Toward Linking Structure With Function in ATP-Sensitive K⁺ Channels, *Diabetes.*, **2004**, 53(3), 104-112.
- Burke MA, Mutharasan RK, Ardehali H., The Sulfonylurea Receptor, an Atypical ATP-Binding Cassette Protein, and It's Regulation of the K_{ATP} Channel, *Circ Res.*, **2008**, 102(2), 164-176.
- Clement IV JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J., Association and Stoichiometry of K_{ATP} Channel Subunits. *Neuron.*, **1997**, 18(5), 827-838.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B., Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci.*, **1999**, 868, 233-285.
- Costa ADT, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD., The direct physiological effects of mitoK_{ATP} opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **2006**, 290(1), H406-H415.
- Dean M., The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily, Andrey Rzhetsky and Rando Allikmets, *Genome Res.*, **2001**, 11(7), 1156-1166.
- deTullio P, Pirotte B, Lebrun P, Fontaine J, Dupont L, AntoineMH, Ouedraogo R, Khelili S, Maggetto C, Masereel B, Diouf O, Podona T, Delarge J., 3- and 4-Substituted 4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel

- openers: Synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity relationships. *J Med Chem.*, **1996**, 39(4), 937-948.
- During MJ, Leone P, Davis KE, Kerr D, Sherwin RS., Glucose modulates rat substantia nigra GABA release in vivo via ATP-sensitive potassium channels. *J Clin Invest.*, **1995**, 95(5), 2403-2408.
 - Edwards G, Weston AH., The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **1993**, 33, 597-637.
 - Gally F., Etude structure/fonction d'une protéine ABC : sur le récepteur des sulfonylurées. Docteur es science en Génie Biologique et Médical. novembre **2005**. Sous la direction de Vivaudou M., Université Joseph Fourier - Grenoble 1, UFR de Biologie.
 - Giblin JP, Quinn K, Tinker A., The cytoplasmic C-terminus of the sulfonylurea receptor is important for K_{ATP} channel function but is not key for complex assembly or trafficking. *Eur J Biochem.*, **2002**, 269(21), 5303-5313.
 - Giebisch G., Canaux potassiques et rein. *Néphrologie*, **2000**, 21(5), 223-228.
 - Faury G., Nicolle E., Verdetti J., Leclerc G., Synthesis and pharmacological evaluation of 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides bearing 5- or 7-sulfonylurea moieties. *Med Chem Res.*, **2003**, 12(9), 457-470.
 - Giudicessi JR, Ackerman MJ., Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias diagnosis and therapy. *Nat Rev Cardiol.*, **2012**, 9(6), 319-332.
 - Gribble FM, Tucker SJ, Haug T, Ashcroft FM., MgATP activates the β cell K_{ATP} channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1998**, 95(12), 7185-7190.
 - Guanghua T., Modulation of ATP-sensitive potassium channels by hydrogen sulfide and hydroxylamine. Thesis of Doctor of Philosophy in Physiology. December **2004**. Under the supervision of Rui W., University of Saskatchewan.
 - Hambrock A, Kayar T, Stumpp D, Osswald H., Effect of Two Amino Acids in TM17 of Sulfonylurea Receptor SUR1 on the Binding of ATP-Sensitive K-Channel Modulators. *Diabetes.*, **2004**, 53(3), 128-134.
 - Higgins CF., ABC transporters : physiology, structure and mechanism - an overview. *Res Microbiol.*, **2001**, 152(3-4), 205-210.
 - Black JL, Armour CL, Johnson PR, Alouan LA, Barnes PJ., The action of a potassium channel activator, BRL 38227 (lemakalim), on human airway smooth muscle. *Am Rev Respir Dis.*, **1990**, 142(6 Pt 1), 1384-1389.

- Jan LY, Jan YN., Tracing the roots of ion channels. *Cell.*, **1992**, 69(5), 715-718.
- Karschin A, Brockhaus J, Ballanyi K., K_{ATP} channel formation by the sulphonylurea receptors SUR1 with Kir6.2 subunits in rat dorsal vagal neurons in situ. *J Physiol.*, **1998**, 509(Pt 2), 339-346.
- Karschin C, Ecke C, Ashcroft FM, Karschin A., Overlapping distribution of K_{ATP} channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS Lett*, **1997**, 401(1), 59-64.
- Khelili S, deTullio P, Lebrun P, Fillet M, Antoine M-H, Ouedraogo R, Dupont L, Fontaine J, Felekidis A, Leclerc G, Delarge J, Pirotte B., Preparation and pharmacological evaluation of the R- and S-enantiomers of 3-(20-butylamino)-4H- and 3-(30-methyl-20-butylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, two tissue selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg Med Chem.*, **1999**, 7(8), 1513-1520.
- Khelili S, Florence X, Bouhadja M, Abdelaziz S, Mechouch N, Mohamed Y, de Tullio P, Lebrun P, Pirotte B., Synthesis and activity on rat aorta rings and rat pancreatic beta-cells of ring-opened analogues of benzopyran-type potassium channel activators., *Bioorg Med Chem.*, **2008**, 16(11), 6124-6130.
- Khelili S, Kihal N, Yekhllef M, de Tullio P, Lebrun P, Pirotte B., Synthesis and pharmacological activity of N-(2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-yl)-4H-1,2,4-benzothiadiazine-3-carboxamides 1,1-dioxides on rat uterus, rat aorta and rat pancreatic β -cells. *Eur J Med Chem.*, **2012**, 54, 873-878.
- Khelili S, Lebrun P, de Tullio P, Pirotte B., Synthesis and pharmacological evaluation of some N-arylsulfonyl-N-methyl-N'-(2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-4-yl)ureas structurally related to cromakalim. *Bioorg Med Chem.*, **2006**, 14(10), 3530-3534.
- Khelili S, Leclerc G, Faury G, Verdeti J., Synthesis and vasodilator effects of 3- and 7-sulfonylurea-1,2, 4-benzothiadiazin-1,1-dioxides on rat aorta. *Bioorg Med Chem.*, **1995**, 3(5), 495-503.
- Khelili S, Leclerc G, Faury G, Verdeti J., Synthesis and vasodilator effects of 3- and 7-sulfonylurea-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxides on rat aorta. *Bioorg Med Chem.*, **1995**, 3(5), 495-503.
- Kihal N., Synthèse et évaluation pharmacologique d'analogues de dihydrobenzopyranes portant un reste benzothiadiazinyl-1,1-dioxyde en position

4. Mémoire de magister en chimie pharmaceutique. Juillet **2007**. Sous la Direction de Khelili S., Département de Chimie, Université de Jijel.
- Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E., Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, **2004**, 286(5), L1027-1037.
 - Liss B, Bruns R, Roeper J., Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.* **1999**, 18(4), 833-846.
 - Liss B, Roeper J., Molecular physiology of neuronal K-ATP channels. *Mol Membr Biol.*, **2001** 18(2), 117-127.
 - Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U., Interaction of K_{ATP} Channel Modulators with Sulfonylurea Receptor SUR2B : Implication for Tetramer Formation and Allosteric Coupling of Subunits. *Mol Pharmacol.*, **2002**, 2(61), 407-414.
 - Lorenz E, Alekseev AE, Krapivinsky GB, Carrasco AJ, Clapham DE, Terzic A., Evidence for direct physical association between a K⁺ Channel (Kir6.2) and an ATP-Binding Cassette Protein (SUR1) which affects cellular distribution and kinetic behavior of an ATP-sensitive K⁺ channel. *Mol Cell Bio.*, **1998**, 18(3), 1652-1659.
 - Loussouarn G, Pike LJ, Ashcroft FM, Makhina EN, Nichols CG., Dynamic Sensitivity of ATP-sensitive K⁺ Channels to ATP. *J Bio Chem.*, **2001**, 276(31), 29098-29103.
 - Lu C, Halvorsen SW., Channel activators regulate ATP-sensitive potassium channel (KIR6.1) expression in chick cardiomyocytes. *FEBS Lett.*, **1997**, 412(1), 121-125.
 - Lybaert P, Vanbellinghen AM, Quertinmont E, Petein M, Meuris S, Lebrun P., K_{ATP} channel subunits are expressed in the epididymal epithelium in several mammalian species. *Biol Reprod.*, **2008**, 79(2), 253-261.
 - Mannhold R., K_{ATP} Channel Openers: Structure-Activity Relationships and Therapeutic Potential. *Med Res Rev.*, **2004**, 24(2), 213-266.
 - McNicholas CM, Gugginot WB, Schwiebert EM, Hebertt SC, Giebisch G, Egani ME., Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator (subunit

- interaction/ATP-sensitive K⁺ channel/phosphorylation). *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1996**, 93(15), 8083-8088.
- Mikhailov MV, Ashcroft SJH., Interactions of the Sulfonylurea Receptor 1 Subunit in the Molecular Assembly of β -Cell KATP Channels. *J Bio Chem.*, **2000**, 275(5), 3360-3364.
 - Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJH., Molecular structure of the glibenclamide binding site of the L-cell K_{ATP} channel, *FEBS Lett.*, **2001**, 499(1-2), 154-160.
 - Miki T, Iwanaga T, Nagashima K, Ihara Y, Seino S., Roles of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Cell Survival and Differentiation in the Endocrine Pancreas. *Diabetes*, **2001**, 50(Suppl. 1), S48-S51.
 - Miki T, Nagashima K, Seino S., The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic β -cells. *J Mol Endocrinol.*, **1999**, 22(2), 113-123.
 - Miller C., An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, **2000**, 1(4), 1-5.
 - Minor DL Jr, Masseling SJ, Jan YN, Jan LY., Transmembrane Structure of an Inwardly Rectifying Potassium Channel. *Cell.*, **1999**, 96(6), 879-891.
 - Murphy KP, Greenfield SA., Neuronal selectivity of ATP-sensitive potassium channels in guinea-pig substantia nigra revealed by responses to anoxia. *J Physiol.*, **1992**, 453, 167-183.
 - Nichols CG, Lederer WJ., Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol.* **1991**, 261(6 Pt 2), H1675-H1686.
 - Nielsen FE, Bodvarsdottir TB, Worsaae A, MacKay P, Stidsen CE, Boonen HCM, Pridal L, Arkhammar POG, Wahl P, Ynddal L, Junager F, Dragsted N, Tagmose TM, Mogensen JP, Koch A, Treppendahl SP, Bondo Hansen J., 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic β -cells. *J Med Chem.*, **2002**, 45(19), 4171-4187.
 - Noma A., ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, **1983**, 305(5930), 147-148.
 - O'Connell AD, Leng Q, Dong K, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC., Phosphorylation-regulated endoplasmic reticulum retention signal in the renal outer-medullary K₊ channel (ROMK). *PNAS*, **2005**, 102(28), 9954-9959.

- Parent L, Sauvé R, Bernèche S, Roux B., A bas les barrières... d'énergie dans les canaux potassiques. *MedSci.*, **2002**, 18(5), 605-609.
- Piper I, Minshall E, Downing SJ, Hollingsworth M, Sadraei H., Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br J Pharmacol.* **1990**, 101(4), 901-907.
- Pirotte B, deTullio P, Lebrun P, AntoineM-H, Fontaine J, Masereel B, SchyntsM, Dupont L, HerchuelzA, Delarge J. 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine-1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic β -cells: A new class of potassium channel openers? *J Med Chem.*, **1993**,36(21), 3211-3213.
- PirotteB, OuedraogoR, deTullio P, Khelili S, Somers F, Boverie S, Dupont L, Fontaine J, Damas J, Lebrun P. 3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells: Design, synthesis, and pharmacological evaluation. *J Med Chem.*, **2000**, 43(8), 1456-1466.
- Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, McKenna WJ, Roden DM, Rudy Y, Schwartz K, Schwartz PJ, Towbin JA, Wilde AM., Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management part III. *Circulation.*, **1999**, 99(5), 674-681.
- Proks P, Antcliff JF, Lippiat J, Gloyn AL, Hattersley AT, Ashcroft FM., Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *PNAS*, **2004**, 101(50), 17539-17544.
- Quast U, Cook NS., In vitro and in vivo comparison of two K^+ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther.* **1989**, 250(1), 261-271.
- Quast U., ATP-sensitive K1 channels in the kidney. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **1996**, 354(3), 213-225.
- Quast U, Stephan D, Bieger S, RussU., The Impact of ATP-Sensitive K^+ Channel Subtype Selectivity of Insulin Secretagogues for the Coronary Vasculature and the Myocardium, *Diabetes.*, **2004**, 53(3), 156-164.
- Reeves WB, Shah SV., Activation of Potassium Channels Contributes to Hypoxic Injury in Proximal Tubules. *J Clin Invest.*, **1994**, 94(6), 2289-2294.
- Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience.*, **1988.**, 25(3), 729-749.

- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M., Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *PharmacolRev.*, **2000**, 52(4), 557-594.
- SkeeTa JM, DCganob P, Colesa B, Potier M, Ashcroftaq FM, Ashcroftb SJH, Determination of the molecular mass of the native P-cell sulfonylurea receptor. *FEBS Lett.* **1994**, 338(1), 98-102.
- Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT., Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science.*, **1989**, 245(4914), 177-1780.
- Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, et al., Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**, 241(3), 693-697.
- Szewczyk A, Wojtczak L., Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol Rev.*, **2002**, 54(1), 101-127.
- Tammara P, Ashcroft FM., A cytosolic factor that inhibits KATP channels expressed in *Xenopus* oocytes by impairing Mg-nucleotide activation by SUR1. *J Physiol.* **2009**, 587(Pt 8), 1649-1656.
- Terzic A, JahangirA, KurachiY., Cardiac ATPsensitive K1 channels: regulation by intracellular nucleotides and K1 channel-opening drugs. *Am J Physiol.*, **1995**, 269(Cell Physiol. 38), C525-C545.
- Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y. Maxi-KCa, a unique member of the voltage-gated K channel superfamily. *News Physiol Sci.*, **1998**, 13, 112-117.
- Tricarico D, Mele A, Lundquist AL, Desai RR, George ALJr, Conte CamerinoD., Hybrid assemblies of ATP-sensitive K_channels determine their muscle-type-dependent biophysical and pharmacological properties. *PNAS*, **2006**, 103(4), 1118-1123.
- Xu J, Chen Y, Li M., High-throughput technologies for studying potassium channels progresses and challenges. *Drug Discov Today : Targets.*, **2004**, 3(1), 32-38.
- Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, Sakabe K, Anzai M, Izumida I, Inoue T, et al., Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/uK(ATP)-1) in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.*, **1999**, 74(1-2), 15-25.

Partie II

**Conception et Synthèse des peptidomimétiques capables
de mimer une structure peptidique en brin β afin de
moduler/inhiber des interactions protéine-protéine
impliquant une structure en feuillet β**

**PEPTIDOMIMETIQUES POUR MODULER LES
INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE
IMPLIQUANT UN FEUILLET BETA**



I. Introduction

Présentes chez tous les êtres vivants, des bactéries à l'homme, et participant à toutes les fonctions cellulaires (immunité, régulation, transport, mouvement, énergie, catalyse, structure, ...), les protéines sont de très gros biopolymères formés à partir de 20 monomères différents [Weinman, 2004 ; Reichmann, 2007]. Ces monomères sont des α -aminoacides dont deux d'entre eux, l'acide aspartique et l'acide glutamique, peuvent être également considérés comme un β - et γ -aminoacides respectivement (Tableau 3). Tous les acides aminés possèdent la même structure de base : un atome de carbone central est lié à un atome d'hydrogène, à un groupement amine ($-\text{NH}_2$), à un groupement carboxylique ($-\text{COOH}$) et à un groupe d'atomes « R » qui diffère d'un acide aminé à l'autre (Figure 31). L'azote des groupements amine fait des protéines notre principale source alimentaire d'azote [Silverthorn, 2007].

Tous les α -aminoacides protéiques sont de configuration stéréochimique L cela signifie qu'ils ont tous la même configuration relative autour de leurs atomes C_α . En 1949, une nouvelle technique de cristallographie par les rayons X permit de démontrer que le choix arbitraire de Fischer était correct : la désignation de la configuration relative des centres chiraux est la même que celle de leur configuration absolue. La configuration absolue des résidus de L- α -aminoacides peut être facilement retrouvée grâce au vocable mnémotechnique « CORN » comme représenté à la Figure 31 **CO-R-N** sont respectivement le groupe carbonyle, la chaîne latérale et l'atome d'azote de la chaîne principale [Richardson, 1981; Voet and Voet, 2005].

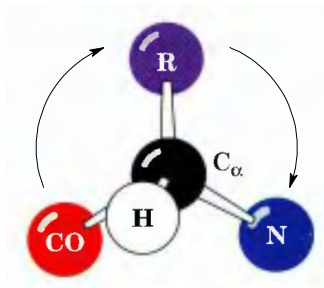
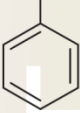
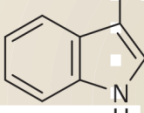
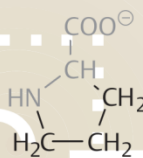
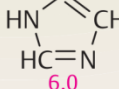


Figure 31: Procédé mnémotechnique « CORN » pour retrouver la configuration des acides aminés de la série L «Lorsqu'on aligne le carbone alpha derrière son atome d'hydrogène on obtient, en parcourant dans le sens des aiguilles d'une montre, le groupement carboxylique CO, la chaîne latérale R et le groupement aminée N, d'où la règle de CORN. Cette règle s'applique aux acides aminés de la forme stéréochimique L » [Biochimie : Voet et Voet, 2005 ; d'après Richardson, 1981].

Tableau 3 : Les acides α -aminés naturels « Chaque α -aminoacide porte un nom, d'abord abrégé selon un code à trois lettres puis à une lettre qui permet d'écrire et de comparer les séquences des protéines » [Color Atlas of Biochemistry : Koolman, 2005].

A. The proteinogenic amino acids						
Aliphatic					Sulfur-containing	
Glycine (Gly, G)	Alanine (Ala, A)	Valine ☆ (Val, V)	Leucine ☆ (Leu, L)	Isoleucine ☆ (Ile, I)	Cysteine (Cys, C)	Methionine ☆ (Met, M)
H	CH ₃	H ₃ C-CH CH ₃	CH ₂ H ₃ C-CH CH ₃	H ₃ C-CH-CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ SH 8.3 pK _a value	CH ₂ CH ₂ S CH ₃
-2.4	-1.9	-2.0	-2.3	-2.2	-1.2	-1.5
Polarity						
Aromatic			Cyclic		Neutral	
Phenylalanine ☆ (Phe, F)	Tyrosine (Tyr, Y)	Tryptophan ☆ (Trp, W)	Proline (Pro, P)		Serine (Ser, S)	Threonine ☆ (Thr, T)
CH ₂ 	CH ₂  OH 10.1	CH ₂  Indole ring	 Pyrrolidine ring		CH ₂ OH	H ₃ C-CH-CH ₂ OH
+0.8	+6.1	+5.9	+6.0		+5.1	+4.9
☆ Essential amino acids						
□ Chiral center						
Neutral		Acidic		Basic		
Asparagine (Asn, N)	Glutamine (Gln, Q)	Aspartic acid (Asp, D)	Glutamic acid (Glu, E)	Histidine (His, H)	Lysine ☆ (Lys, K)	Arginine (Arg, R)
CH ₂ CONH ₂	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	CH ₂ COO ⁻ 4.0	CH ₂ CH ₂ COO ⁻ 4.3	CH ₂  Imidazole ring 6.0	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺ 10.8	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH C H ₂ N ⁺ NH ₂ 12.5
+9.7	+9.4	+11.0	+10.2	+10.3	+15.0	+20.0

Les α -aminoacides diffèrent par leurs chaînes latérales **R** (Figure 31 et tableau 3). Les groupements **R** sont très variables, ils diffèrent par leur taille, leur forme et leurs capacités à former des liaisons ioniques ou hydrogène ; chaque acide aminé réagit donc de façon unique avec les autres molécules. La structure des chaînes latérales détermine la réactivité de chaque α -aminoacide. L'ensemble de ces réactivités confère aux protéines la possibilité d'effectuer les interactions discriminatives qui constituent leur fonction.

Les α -aminoacides s'unissent par des liaisons peptidiques pour former des chaînes polypeptidiques linéaires (Figure 32).

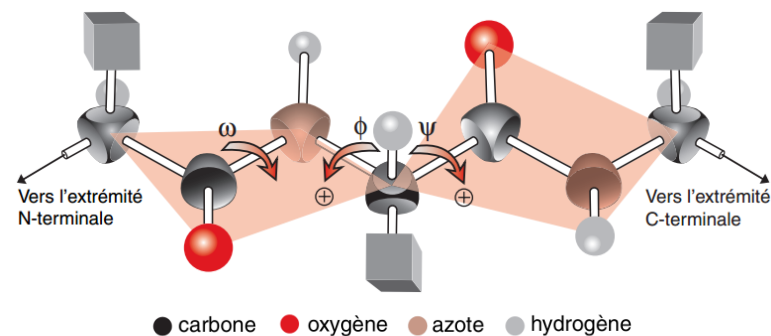


Figure 32 : Les angles de torsion ψ , ϕ , ω de la chaîne principale « *Un angle de torsion se mesure à partir de quatre atomes ; on aligne l'un sur l'autre les deux atomes centraux puis on mesure l'angle formé entre les deux atomes terminaux* [Toute la biochimie : Weinman, 2004].

La liaison peptidique est plane, rigide et polaire : C, O, N, H et les deux $C\alpha$ voisins sont dans un plan où ils constituent une unité peptidique. L'angle de torsion ω autour de la liaison C-N ne peut prendre que la valeur 0° , configuration *cis* où O et H sont d'un même côté de l'axe C-N, ou $+180^\circ$, configuration *trans* où O et H sont de part et d'autre de l'axe C-N. Pour toutes les liaisons peptidiques des protéines, la configuration *trans* est énergétiquement la plus favorable, sauf dans celles où intervient la proline. Ces caractères résultent du fait que la liaison peptidique est un hybride de résonance où les électrons sont localisés dans une orbitale moléculaire π qui recouvre les atomes O, C et N et empêche la libre rotation autour de l'axe C-N. Par ailleurs, l'oxygène étant plus électronégatif que l'azote, les électrons sont déplacés vers O. La liaison peptidique possède donc une géométrie fixe et les longueurs et les angles de liaison peuvent être représentés comme présenté dans la figure 33 [Weinman, 2004].

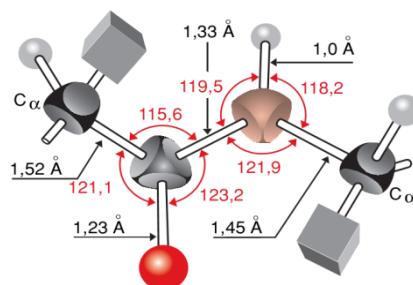


Figure 33 : Le groupement peptidique *trans* « les dimensions standard de ce groupement planaire ont été calculées en faisant les moyennes des résultats de déterminations de structure par rayons X d'acides aminés et de peptides [Toute la biochimie : Weinman, 2004 D'après Marsh and Donohute, 1967]

Dans une chaîne polypeptidique, la séquence des α -aminoacides, c'est-à-dire l'ordre dans lequel ces derniers sont unis, détermine la structure primaire. Notons que ces α -aminoacides sont classés selon la structure ou les propriétés physico-chimiques de leur chaîne latérale qui conditionne leur caractère hydrophile ou hydrophile, en distinguant ainsi les acides aminés polaires, non polaires, chargés ou non chargés qui jouent un rôle capital dans le repliement et la conformation des chaînes polypeptidiques au sein des cellules [Weinman, 2004 ; Silverthorn, 2007].

Les protéines ont donc une structure d'ensemble imposée par la nature et la séquence de leurs α -aminoacides qui toutes deux déterminent des actions morphogénétiques internes décisives, même si des interactions avec le milieu peuvent moduler certaines conformations. Des régions du squelette peptidique adoptent une conformation régulière, en hélice α , en feuillet β plissé ou en coudes β , dite structure secondaire [Weinman, 2004 ; Silverthorn, 2007]. Cette dernière caractérise le premier degré de repliement de la chaîne polypeptidique, en ne considérant que la disposition dans l'espace prise par ce qu'on appelle « l'épine dorsale de la protéine », c'est-à-dire la succession des carbones α et des liaisons peptidiques [Borel *et al.*, 1997].

Les hélices et les feuillets plissés reliés par des boucles de conformation non régulière, se reploient en des unités compactes et globulaires appelées domaines dont l'organisation tridimensionnelle constitue la structure tertiaire de la chaîne polypeptidique (Figure 34). Cette structure confère à la protéine une forme propre dans l'espace et une surface extérieure caractéristique. Certaines protéines ont une seule chaîne polypeptidique, d'autres en contiennent plusieurs disposées en une structure quaternaire spécifique [Borel *et al.*, 1997 ; Weinman, 2004].

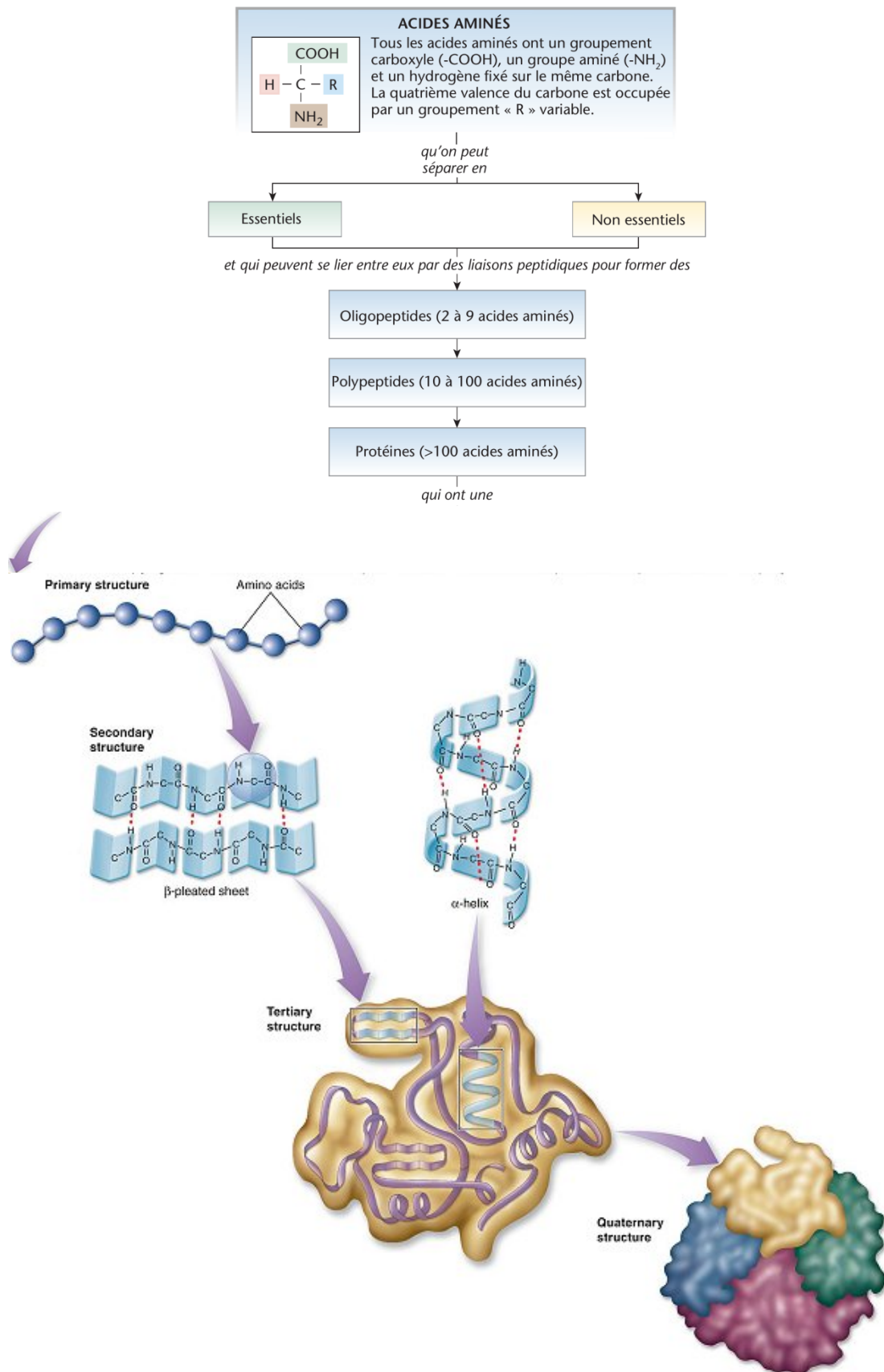


Figure 34 : Structures des protéines« Niveaux d'organisation des molécules protéiques » [Modifiée à partir de Physiologie humaine : Silverthorn, 2007]

Le repliement de la chaîne polypeptidique est stabilisé par de multiples interactions [Silverthorn, 2007] entre les chaînes latérales d'acides aminés éloignés les uns des autres : les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes, de van der Waals, ioniques, et les ponts disulfure (Figure 35).

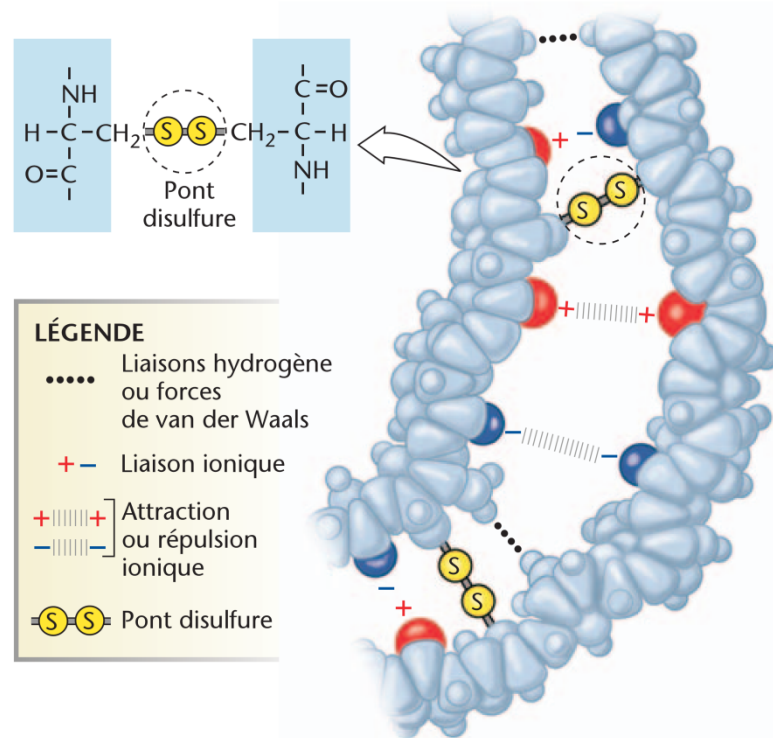


Figure 35 : Ensemble des interactions intervenant dans le repliement d'une chaîne polypeptidique« *Des liaisons non peptidiques créent des liens entre les molécules ou entre des parties de molécules. Les liaisons hydrogène, les ponts disulfures, les forces de Van der Waals et les liaisons ioniques favorisent l'édification de la structure tertiaire des protéines* ». [Physiologie humaine : Silverthorn, 2007, D'après Lodish *et al.*, 2004].

La fonction biologique d'une protéine est intimement liée à la conformation adoptée. Sa rigidité structurale est suffisante pour préserver sa forme native spécifique. De même, sa flexibilité interne permet son bon fonctionnement. La stabilité et la flexibilité des protéines sont affectées non seulement par les liaisons de faible énergie mais aussi par les conditions environnementales (température, pH...). En outre, pour ces mêmes raisons, ainsi qu'à cause de l'encombrement stérique, ou des phénomènes de répulsion ou d'attraction électrostatique, la protéine ne présente généralement qu'une ou quelques conformations privilégiées, correspondant à la plus grande stabilité thermodynamique possible.

II. Interactions protéine-protéine

De nombreuses fonctions biologiques impliquent la formation de complexes protéine-protéine où deux protéines se lient pour former un complexe stable qui est une condition préalable à la fonction biologique est dépendante de la conformation tridimensionnelle des protéines [Jones and Thornton, 1996]. Les interactions protéine-protéine jouent alors un rôle fondamental dans tous les processus cellulaires. Elles sont fortement impliquées dans la formation de structures macromoléculaires, la signalisation, la régulation, la reconnaissance immunologique, la réplication, la transcription, la traduction, l'épissage, la sécrétion, le contrôle du cycle cellulaire, la transduction du signal la synthèse des protéines et dans les différentes voies métaboliques [Phizicky and Fields, 1995 ; Bock and Gough, 2001 ; Karimova *et al*, 2002 ; Benyamini and Friedler, 2010].

La classification des interactions protéine-protéine a reçu beaucoup d'attention ces dernières années, parce que ces interactions sont au cœur du domaine émergent des systèmes biologiques, où différents réseaux d'associations sont cartographiés et leur rôle physiologique est scruté [Reichmann, 2007].

Bien que les principes structuraux et fonctionnels qui gouvernent ces interactions soient d'une grande diversité, les interfaces protéine-protéine sont, dans de nombreux cas, larges et leurs surfaces compactes, hydrophobes, et relativement planes [Lo Conte *et al.*, 1999 ; Nooren and Thornton, 2003]. La combinaison des analyses cristallographiques et de mutagenèse dirigée a révélé la présence, au niveau de ces interfaces, d'acides aminés essentiels pour l'interaction « hot spots ou points chauds ». Clackson et Wells [Clackson et Wells, 1995] ont introduit ce concept de liaison hot spots avec leur constat de base que la majorité de l'énergie de liaison est apporté par seulement quelques résidus. Ce travail a été étendu à d'autres systèmes par Bogan et Thorn [Bogan and Thorn, 1998] qui, en utilisant une approche bioinformatique, ont constaté que les points chauds sont entourés par des résidus énergétiquement moins importants et servent très probablement à occulter le solvant des hot-spots. Il a été trouvé que cette occlusion de solvant est une condition nécessaire pour des interactions très énergétiques, par ailleurs pas toutes les interfaces de liaison semblent avoir des hot spots [Reichmann, *et al.*, 2007].

La résolution de la structure tridimensionnelle de différents complexes protéiques a permis de mettre en évidence l'existence de régions centralisées et accessibles, constituées d'acides aminés cruciaux pour l'interaction des protéines composant ces complexes [Bogan et Thorn, 1998]. Ces hot spots sont présents sur les deux côtés de l'interface protéine-protéine. Les structures cristallographiques montrent que ces régions sont hautement complémentaires l'une de l'autre, avec des résidus hydrophobes d'une surface s'engageant précisément dans des « puits » présents sur la face opposée [Kussie *et al.*, 1996]. De nombreuses études suggèrent que la présence de ces hot spots confère à ces régions les propriétés nécessaires à la liaison de ligands [Teague, 2003]. L'apparente complémentarité entre les deux surfaces créée par ces hot-spots se traduit par un certain degré de flexibilité et d'adaptabilité, qui permet la fixation séquentielle, sur une même protéine, de multiples partenaires [DeLano *et al.*, 2000].

Les protéines interagissent avec d'autres protéines avec des affinités différentes. Malgré cette grande différence d'affinité, toutes les interactions protéine-protéine maintiennent un degré élevé de spécificité pour leurs partenaires. Il est maintenant clair que de nombreuses protéines interagissent avec de multiples partenaires, simultanément ou séparément, en fonction de la disponibilité et de l'environnement. La capacité de se lier aux plusieurs partenaires est à la base de la complexité du réseau qui, à son tour, est lié à la mesure de l'évolution d'un organisme particulier [Reichmann, 2007].

Les interactions protéine-protéine peuvent être définies sur la base de la durée de vie des complexes qui sont soit très stables et permanents, soit transitoires, s'associant ou se dissociant constamment *in vivo* [Kim *et al.*, 2005]. En outre, il existe de nombreuses maladies dans lesquelles l'inhibition des interactions protéine-protéine serait un avantage thérapeutique, mais il n'y a pas de méthodes générales pour résoudre ces problèmes. Les molécules peptidiques et/ou peptidomimétiques basés sur les séquences d'acides aminés présents sur les sites d'interactions protéine-protéine font d'excellentes pistes pour le développement et la conception d'inhibiteurs des interactions protéine-protéine (IPP).

Les interactions protéine-protéine font intervenir les trois éléments structuraux secondaires, hélice α , feuillet β et coude β . Les molécules mimant ces trois structures secondaires présentent un intérêt dans l'inhibition des interactions protéine-protéine [Dewal *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2010 ; Davis *et al.*, 2007 ; de Vega *et al.*, 2007]. Mimer des structures en hélice α a été plus largement développé [Dewal *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2010 ; Davis *et al.*, 2007 ; de Vega *et al.*, 2007]. Les mimes de feuillet β présentent également un grand intérêt ; néanmoins cette stratégie a été beaucoup plus récemment étudiée [Remaut et Waksman, 2006 ; Loughlin *et al.*, 2010 ; de Vega *et al.*, 2007].

Pour concevoir et développer des molécules qui miment, un brin β , feuillet β , coude β et hélice α il faut tenir compte des différences entre la taille, la forme et la composition de ces structures (Figure 36) [Loughlin *et al.*, 2010].

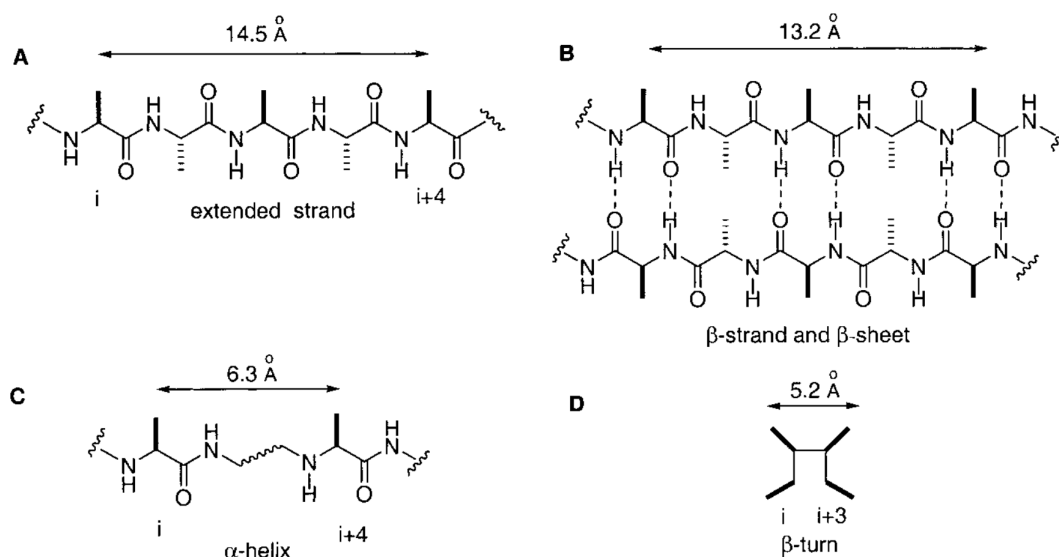


Figure 36 : Tailles comparatives en Å pour (A) un brin β étendu ($\Phi = \Psi = 180^\circ$), (B) Feuillet β antiparallèle ($\Phi = -139^\circ$, $\Psi = -135^\circ$), (C) hélice α (distance $\alpha C_i - \alpha C_{(i+4)}$), et (D) coude β ($C_{(i+1)} - C_{(i+2)}$) [Loughlin *et al.*, 2010].

Dans cette seconde partie de thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux interactions protéine-protéine impliquant un feuillet β .

III. Structure des feuillets β

La structure secondaire résulte d'un repliement local de la protéine créé par des interactions stériques et électrostatiques et stabilisée par des liaisons hydrogène. Une liaison hydrogène est une liaison électrostatique établie entre d'une part un atome d'hydrogène lié à un atome très électronégatif de type azote ou oxygène et, d'autre part, un atome possédant un doublet non liant comme le soufre, l'azote ou l'oxygène. Ces liaisons hydrogène sont récurrentes dans les phénomènes biologiques. Cette structure a été découverte en 1951 par Pauling, Corey et Branson qui ont déterminé plusieurs motifs structuraux caractéristiques, les hélices α et les feuillets β résultant de différents échafaudages de liaisons hydrogène qui se créent entre les groupement amine (-NH) et carbonyle du squelette peptidique [Pauling *et al*, 1951, Voet et Voet, 2005]. Cette structure résulte de l'organisation spatiale d'une séquence d'acides aminés qui interagissent entre eux, provoquant des repliements locaux caractéristiques et énergétiquement favorables.

Chaque polypeptide d'un feuillet β adopte une configuration étalée, mais plissée. Les plis résultent de la localisation des carbones α au-dessus et en dessous du plan du feuillet. Les chaînes latérales successives font saillie au-dessus et en dessous du squelette. Les chaînes polypeptidique formant un feuillet β s'unissent les unes aux autres par une rangée régulière de liaisons hydrogène formées entre les groupements carbonyle et amine des squelettes proches. Les segments voisins du squelette polypeptidique peuvent être parallèles ou antiparallèles selon la direction des chaînes [Karp G., 2010].

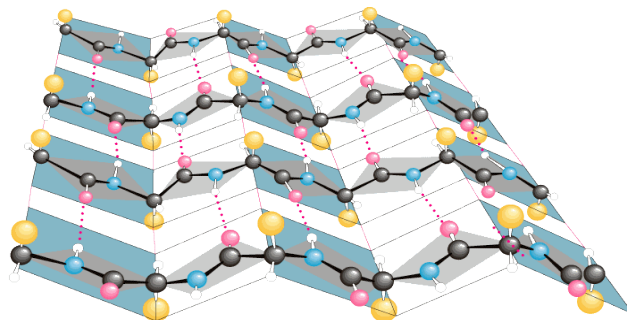


Figure 37 : Structure d'un feuillet β plissé.

La direction des angles de torsion (Φ et Ψ) alterne dans un feuillet β (un positif, l'autre négatif), donnant à la chaîne une allure en zigzag (Figure 37).

On peut noter qu'un feuillet bêta peut en fait être constitué d'un seul brin en épingle à cheveux. La distance projetée entre deux carbones α consécutifs est de 3,5 Å (c'est donc une structure très étirée). La périodicité du feuillet bêta est de 7 Å. Les acides aminés stabilisant le feuillet bêta sont les petits acides aminés hydrophobes qui sont flexibles et insolubles. Plusieurs feuillets plissés bêta peuvent s'empiler. Tout cela sera stabilisé par des interactions hydrophobes. La distance moyenne entre deux polypeptides est de 4.85 Å [Pauling et Corey, 1953].

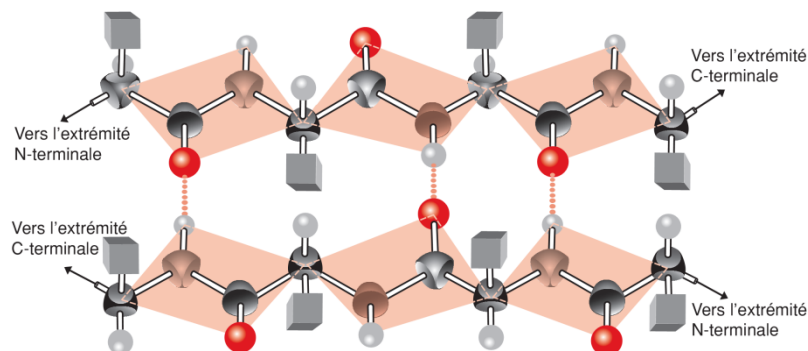


Figure 38 : Liaisons hydrogène stabilisant un feuillet β [Weinman, 2004].

En moyenne, 20 % des résidus dans les protéines sont en feuillet β . Un seul brin β n'est pas particulièrement stable ; par contre, plusieurs brins le sont grâce aux liaisons hydrogène existantes entre les groupes CO et NH des brins voisins (Figure 38).

Les feuillets β parallèles et anti-parallèles se distinguent par l'alternance des brins au sein du feuillet. On parle de feuillets β parallèles (Figure 39) lorsque les brins qui composent le feuillet ont la même orientation. Il se forme un réseau de liaisons hydrogène formant des cycles à 12 atomes.

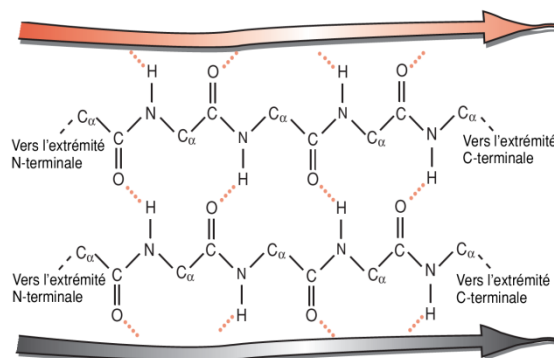


Figure 39 : Structure d'un feuillet- β parallèle « Dans le feuillet plissé bêta parallèle, les liens hydrogène sont équidistants mais non parallèles entre eux » [Weinman, 2004].

Le feuillet β est dit antiparallèle (Figure 40) lorsque l'orientation des brins est alternée. Les feuillets antiparallèles sont les plus répandus. Dans ce cas, les liaisons hydrogènes sont dans le plan du feuillet, ce qui stabilise la structure. Il se forme un réseau de liaisons hydrogène alternant les cycles à 10 et 14 atomes.

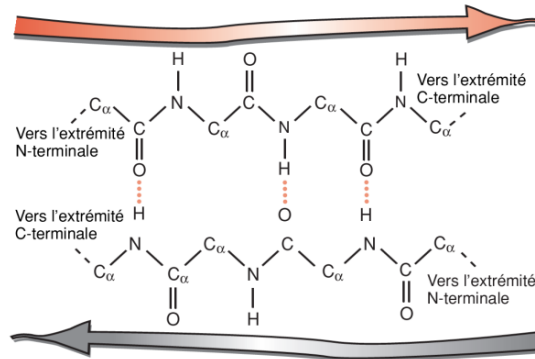


Figure 40 : Structure d'un feuillet- β antiparallèle « Dans le feuillet plissé bêta antiparallèle, les liens hydrogènes sont parallèles entre eux »[Weinman, 2004].

Il existe également des feuillets mixtes comportant à la fois des chaînes parallèles et antiparallèles (Figure 41.A). La connexion des différents brins se fait grâce à quelques acides aminés qui ont une structure secondaire particulière ; on nomme cependant ces régions coudes β (β -turns) (Figure 41.B).

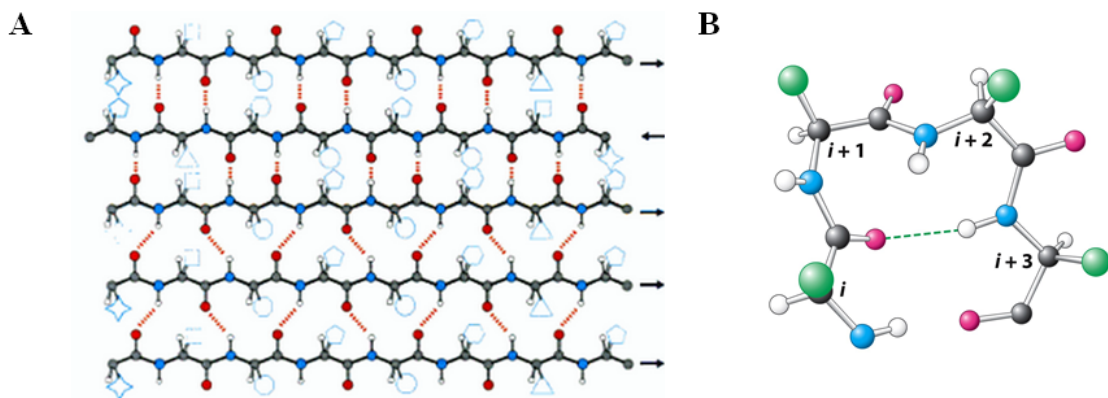


Figure 41 : (A) Structure d'un feuillet β mixte [Petsko et Ringe, 2008] et (B) structure d'un coude β [Berg *et al.*, 2012].

IV. Peptidomimétiques :

Les applications potentielles des peptides en tant qu'agents thérapeutiques paraissent évidentes. En 2004, entre 600 et 700 peptides étaient en stade de développement et plus de 150 faisaient l'objet d'études cliniques dans différents domaines, du traitement de maladies neurodégénératives aux cancers [McGee, 2005 ; Lien *et al.*, 2003].

Les peptides représentent souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine qui offre théoriquement une efficacité, une sélectivité et une spécificité plus avantageuses par rapport aux petites molécules qui constituent la majorité des principes actifs [Hummel *et al.*, 2006]. De même, les métabolites résultant de la dégradation des peptides sont des acides aminés, ce qui limiterait les risques de toxicité [Loffet, 2002].

La conception de peptides à usage thérapeutique reste toutefois extrêmement compliquée et soulève un grand nombre de défis. Mise à part le coût de production élevé [Marx, 2005], les peptides n'obéissent pas aux fameuses règles des cinq [Lipinski *et al.*, 2001] c'est pourquoi leur utilisation pharmaceutique se heurte toutefois à de nombreuses limites, qu'elles soient liées à leur administration difficile, à leur faible capacité à traverser les membranes ou encore à leur faible durée de vie. Afin de minimiser ces inconvénients, la recherche en chimie des peptides s'est orientée vers la conception et la synthèse de peptides modifiés. Ces modifications mènent à des molécules qui s'apparentent de moins en moins à des peptides naturels et portent les fonctions chimiques essentielles mises en lumière par l'utilisation des peptides. On parlera de pseudo-peptides ou de peptidomimétiques.

Les **peptidomimétiques** sont des molécules définies comme étant des molécules présentant des caractéristiques structurales similaires, identifiables ou non, à celles des peptides naturels capables d'inhiber ou de reproduire l'effet biologique du peptide original [Gante, 1994]. On distingue deux types de peptidomimétiques : Les molécules isostères de la liaison amide qui présentent une structure secondaire similaire au peptide natif, et les molécules non peptidiques possédant les groupements fonctionnels nécessaires pour réaliser les mêmes interactions que le peptide natif avec la protéine [Wiley and Rich 1993.].

La conception des peptidomimétiques est avant tout basée sur la compréhension des forces qui mènent aux interactions protéine-protéine. Cela implique de connaître l'ensemble des caractéristiques structurales et fonctionnelles du peptide endogène étudié. Deux facteurs structuraux sont particulièrement importants pour la synthèse de peptidomimétiques à haute activité biologique. Tout d'abord, le mime doit pouvoir respecter parfaitement la complémentarité conformationnelle et d'autre part, les éléments structuraux de la molécule (groupes fonctionnels, régions polaires et hydrophobes) doivent pouvoir se positionner dans des endroits strictement définis afin de permettre les interactions adéquates. Ceci souligne les avantages indéniables que peuvent présenter les peptidomimétiques : une stabilité *in vivo* et une affinité accrue, une meilleure absorption par voie orale, une distribution facilitée ainsi qu'une meilleure sélectivité [Spatola, 1983].

Classiquement, la conception d'un peptidomimétique se déroule en plusieurs étapes allant de l'identification de la protéine cible et de l'effecteur (ligand, peptide bioactif ou protéine partenaire) suivie de la recherche du segment bioactif le plus court et l'utilisation d'analogues peptidiques structurellement contraints jusqu'à l'établissement d'un pharmacophore et le criblage de banques de petites molécules respectant les propriétés chimio-spatiales du pharmacophore.

Une des voies les plus utilisées pour préparer des peptidomimétiques est celle ayant recours à la modification des parties C- et N- terminales, en général par N-acétylation ou N-amidation, des peptides pour empêcher l'action des exopeptidases [Grauer A, König, 2009 ; Ko *et al.*, 2011]. De même, l'utilisation d'acides aminés D non-naturels, moins sujets à l'action de ces enzymes, est aussi envisageable [Fauchère et al., 1992]. Certains groupes ont par ailleurs montré qu'il est possible de conserver la fonction d'un peptide alors qu'il est partiellement composé d'acides aminés D [Benkirane *et al.*, 1993] ou même qu'il est possible de modéliser un peptide de fonction donnée avec des acides aminés non-naturels [Lins *et al.*, 2006]. Enfin, les cyclisations, que ce soit par des ponts disulfures, la formation de noyaux lactame ou des liaisons entre les deux extrémités N- et C- terminales, sont également utilisées pour contrecarrer l'action des protéases [Werle *et al.*, 2006].

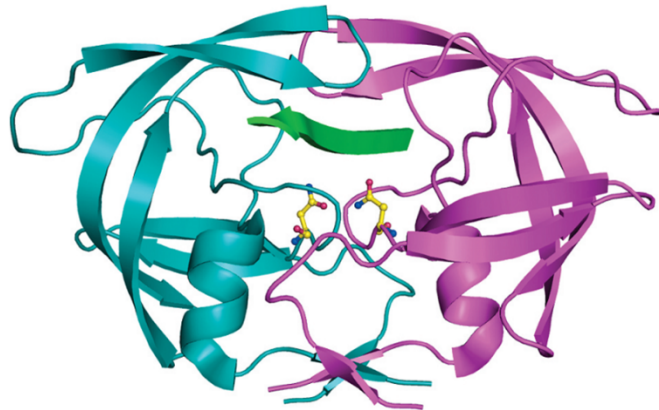
Références Bibliographiques

- Benkirane N, Friedeij M, Guichard G, Briand JP, Van Regenmortel MHV, Muller S., Antigenicity and immunogenicity of modified synthetic peptides containing D-amino acid residues. Antibodies to a D-enantiomer do recognize the parent L-hexapeptide and reciprocally. *J Biol Chem.*, **1993**, 268(35), 26279-85.
- Benyamini H, Friedler A., Using peptides to study protein-protein interactions, *Future Med Chem.*, **2010**, 2(6), 989-1003.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L., Biochemistry. W H Freeman, 7th ed., **2012**.
- Bock JR, Gough DA., Predicting protein-protein interactions from primary structure. *Bioinformatics*, **2001**, 17(5), 455-460.
- Bogan AA, Thorn KS., Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol.*, **1998**, 280, 1-9.
- Borel JP, Maquart FX, Le Peuch C, Randoux A, Gillery P, Bellon G, Monboisse JC., Biochimie dynamique, 2^{ème} édition, De Boeck Supérieur **1997**.
- Davis JM, Tsou LK, Hamilton AD., Synthetic non-peptide mimetics of α -helices. *Chem Soc Rev.*, **2007**, 36(2), 326-334.
- de Vega MJ, Martín-Martínez M, González-Muñiz R., Modulation of protein-protein interactions by stabilizing/mimicking protein secondary structure elements. *Curr Top Med Chem.*, **2007**, 7(1), 33-62.
- Decaffmeyer M, Thomas A, Brasseur R., Les Médicaments Peptidiques : Mythe ou Réalité ? *Biotechnol Agron Soc Environ.*, **2008**, 12(1), 81-88.
- DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, Wells JA., Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science.*, **2000**, 287, 1279-1283.
- Dewal MB, Firestine SM., Non-peptidic α -helical mimetics as protein-protein interaction inhibitors. *Curr Med Chem.*, **2011**, 18(16), 2420-2428.
- Fauchere JL, and Thurieau C., Evaluation of the stability of peptides and pseudopeptides as a tool in peptide drug design. *Adv Drug Res.*, **1992**, 23, 127-59.
- Gante J., Peptidomimetics-Tailored Enzyme Inhibitors. *Angew Chem Int Ed.*, **1994**, 33(17), 1699-1720.
- Grauer A, König B., Peptidomimetics - A Versatile Route to Biologically Active Compounds. *Eur J Org Chem.*, **2009**, 30, 5099-5111.
- Hummel G, Reineke U, Reimer U., Translating peptides into small molecules. *Mol Biosyst.*, **2006**, 2, 499-508.

- Jones S, Thornton JM, Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996,93,13-20.
- Karimova G, Ladant D, Ullmann A., Two-hybrid systems and their usage in infection biology, *Int J Med Microbio.*, **2002**, 292(1), 17-25.
- Karp G., Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. 3^{ème} édition, *De Boeck Supérieur* **2010**.
- Kim C, Xuong NH, Taylor SS., Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science.*, **2005**, 307, 690-696.
- Ko E, Liu J, Burgess K., Minimalist and universal peptidomimetics. *Chem Soc Rev.*, **2011**,40(8), 4411-4421.
- Koolman, Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition, *Thieme* **2005**.
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, et al., Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science.*, **1996**, 274, 948-953.
- Lien S, Lowman HB., Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.*, **2003**, 21(12), 556-562.
- Lins L., Charletoaux B., Heinen C., Thomas A., Brasseur R., De novo design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys J.*, **2006**, 90(2), 470-479.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. *Adv Drug Deliv Rev.*, **2001**, 46(1-3), 3-26.
- Lo Conte L, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol.*, **1999**, 285, 2177-2198.
- LodishH, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA., Molecular Cell Biology. 5th Edition,*Macmillan Higher Education* **2004**.
- Loffet A., Peptides as drugs : is there a market ? *J Peptide Sci.*, **2002**,8(1), 1-7.
- Loughlin WA, Tyndall JD, Glenn MP, Hill TA, Fairlie DP., Update 1 of : Beta-strand mimetics. *Chem Rev.*, **2010**, 110(6), PR32-69.
- Marsh RE, Donohute J., Crystal Structure Studies of Amino Acids and Peptides. *Adv Protein Chem.*, **1967**, 22, 235-256.
- Marx V., Watching peptide drugs grow up. *Chem Eng News.* **2005**, 83(11), 17-24.
- McGee P., Tracking Drug Safety From the Ground Up. *Drug Discovery Dev.*, **2005**, 4, 20-28.

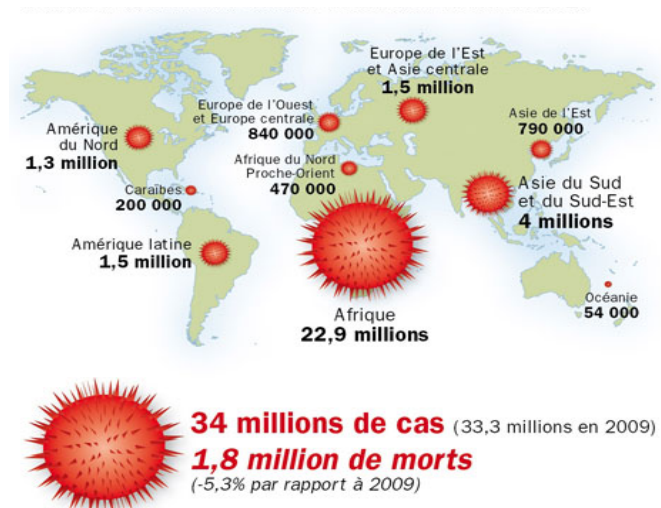
- Nooren IMA, Thornton JM., Structural Characterisation and Functional Significance of Transient Protein-Protein Interactions, *J Mol Biol.*, **2003**, 325(5), 991-1018.
- Pauling L, Corey RB, Branson HR., Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc Natl Acad Sci.*, **1951**, 37, 205-11.
- Pauling L, Corey RB., Two Rippled-Sheet Configurations of Polypeptide Chains and a Note about the Pleated Sheets. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1953**, 39, (4), 253-256.
- Petsko GA, Ringe D., Structure et fonction des protéines, De Boeck Supérieur **2008**.
- Phizicky EM, Fields S., Protein-Protein Interactions : Methods For Detection and Analysis, *Microbiol. Rev.*, **1995**, 59(1), 94-123.
- Reichmann D, Rahat O, Cohen M, Neuvirth H, Schreiber G., The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr Opin Struct Biol.*, **2007**, 17, 67-76.
- Remaut H, Waksman G., Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends Biochem Sci.*, **2006**, 31 (8), 436-444.
- Richardson JS., The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, *Adv Protein Chem.*, 34, **1981**, 167-339.
- Ross NT, Katt WP, Hamilton AD., Synthetic mimetics of protein secondary structure domains. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* **2010**, 368 (1914), 989-1008.
- Silverthorn DU., Physiologie humaine : Une approche intégrée, 4^{ème} édition, *Pearson* **2007**.
- Spatola AF., In Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins, Weinstein B., Ed. *Marcel Dekker*, New York **1983**.
- Teague SJ., Implication of protein flexibility for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, **2003**, 2, 527-541.
- Voet D, Voet JG., Biochimie, 2^{ème} édition, De Boeck Supérieur **2005**.
- Weinman S., Toute La Biochimie. Dunod, Paris **2004**.
- Werle M, Bernkop-Schnurch A., Strategies to improve plasma half-life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*, **2006**, 30(4), 351-367.
- Wiley RA, Rich DH., Peptidomimetics derived from natural products. *Med Res Rev.*, **1993**, 13(3), 327-384.

INHIBITEURS DE LA DIMERISATION DE LA PROTEASE DU VIH-1



I. Introduction

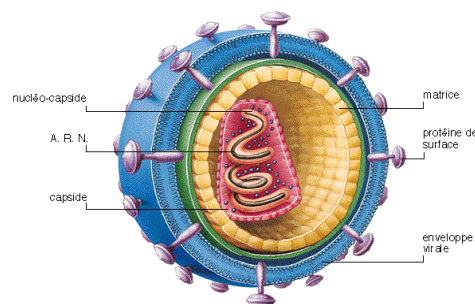
Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent étiologique responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) et demeure une des principales causes de mortalité dans le monde entier [Fauci, 2003, Moir *et al.*, 2011]. Le VIH-1 est un problème de santé publique majeur qui touche environ 40 millions de personnes dans le monde (Figure 42). Depuis sa découverte dans le début des années 80, l'épidémie de SIDA a dramatiquement évolué, et aucun vaccin efficace n'est à ce jour disponible.



Source : Onusida 2010 (<http://www.unaids.org>)

Figure 42 : Carte estimative de progression du VIH/Sida en 2010 dans le monde.

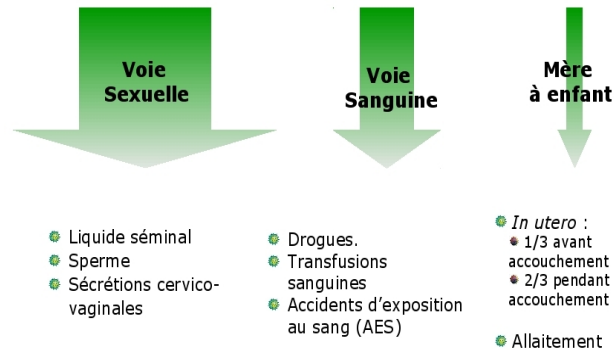
Le VIH-1 est un rétrovirus qui infecte spécifiquement le système immunitaire [Desrosiers and Letvin, 1989]. Il est constitué d'une enveloppe externe, de forme sphérique, comportant des sites de fixation, d'une capsid interne contenant deux molécules d'ARN constituées de milliers de nucléotides (Figure 43). Celui-ci contient l'information nécessaire pour que la cellule hôte humaine T-CD4 synthétise les éléments nécessaires à la multiplication intracellulaire du VIH-1.



[<http://library.thinkquest.org/26644/fr/virusSIDA.htm>]

Figure 43 : Structure du VIH-1.

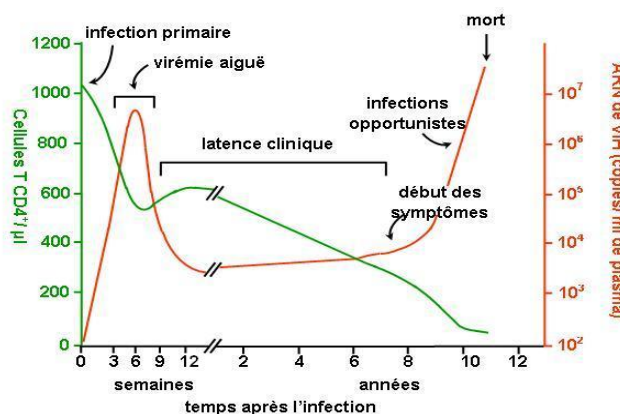
Le VIH-1 est transmis par des liquides physiologiques contenant une quantité élevée de virus. En font partie le sang, le sperme, le liquide vaginal et le lait maternel [Chakraborty, 2005]. Les modes de transmission à haut risque d'infection du VIH-1 sont alors les rapports homo et/ou hétérosexuels, la toxicomanie par voie intraveineuse, les transfusions sanguines, la grossesse et l'allaitement (Figure 44)



[http://frontal.univ-angers.fr/unspf/2010_Lille_Goffard_VIH/co/vih_transmission_jpg.html]

Figure 44 : Les possibilités de transmission du VIH-1 « *Le principal mode de contamination par le VIH, en France, est la voie sexuelle. Ensuite, par ordre de fréquence, viennent la voie sanguine et la transmission mère-enfant* ».

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine se caractérise par une destruction progressive du système immunitaire par le biais d'une destruction des cellules lymphocytaires T-CD4. Les premières semaines suivant l'infection se traduisent par une augmentation extrêmement rapide de la charge virale parallèlement à un déficit à la fois quantitatif et qualitatif des lymphocytes T-CD4 menant le patient au stade de SIDA (Figure 45) [Fauci A.S., 1988 ; Weber, 2001 ; Moir *et al.*, 2011].



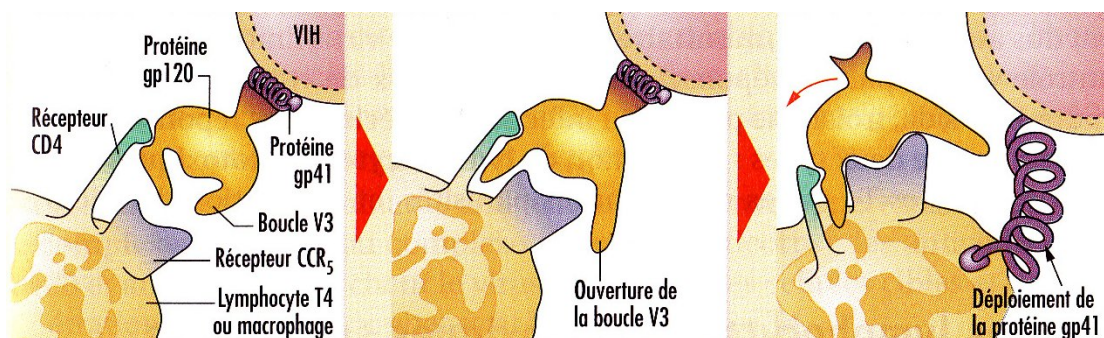
<http://www.ulb.ac.be/info/sida/16quefautil.html>

Figure 45 : Evolution typique de l'infection par VIH-1 « *Courbe verte : évolution du taux des lymphocytes T CD4+ de la personne infectée. Courbe rouge : évolution du taux de VIH-1 (mesure de son ARN) circulant dans le sang* » [Adapté de Fauci et Desrosiers, 1997].

En absence de traitements efficaces et après une période dont la durée peut varier entre les patients, de quelques mois à plusieurs années, le virus se multiplie en provoquant une baisse inexorable de la concentration de T-CD4. Le système immunitaire finit par s'effondrer au point d'apparition de maladies opportunistes, puis le décès du malade [Pantaleo *et al.*, 1993 ; Simon *et al.*, 1994].

Le VIH-1 pénètre dans l'organisme grâce à la glycoprotéine de l'enveloppe extérieure, gp 120, qui reconnaît les récepteurs CD4 présents sur la surface de la membrane cellulaire des lymphocytes T et s'y fixent [Kwong *et al.*, 1998 ; Zaitseva *et al.*, 2003]. Le virus fusionne alors sa membrane avec celle de la cellule, faisant ainsi entrer son matériel génétique et certaines enzymes.

C'est la glycoprotéine gp 41 qui se charge de réaliser la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire après ancrage (Figure 46). Des changements conformationnels de cette glycoprotéine renforcent la fusion virus-cellule via des interactions supplémentaires de la gp120 au niveau de la boucle V3 avec les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 existant à la surface des cellules humaines [Kwong P.D. *et al.*, 1998 ; Zaitseva *et al.*, 2003 ; Nzounza, 2012].



<http://flt75.ovh.org/biotechno/s/immuno/entree.vih.jpg>

Figure 46 : Mécanisme de fusion virus-cellule.

Suite à la fusion virus-cellule, la nucléocapside virale pénètre à l'intérieur de la cellule hôte et se libère par décapsidation. Après décapsidation, l'ARN viral monocaténaire est relargué dans le cytoplasme cellulaire. Ce dernier forme un complexe avec la transcriptase inverse qui catalyse la rétrotranscription de cet ARN simple brin en ADN complémentaire double brin. La présence d'une activité transcriptase inverse est d'ailleurs une caractéristique des rétrovirus, à l'origine de leur dénomination.

Une fois transformé en ADN, le patrimoine génétique du virus entre dans le noyau du lymphocyte grâce à une autre enzyme, l'intégrase, où il s'intègre au génome de la cellule (Figure 47).

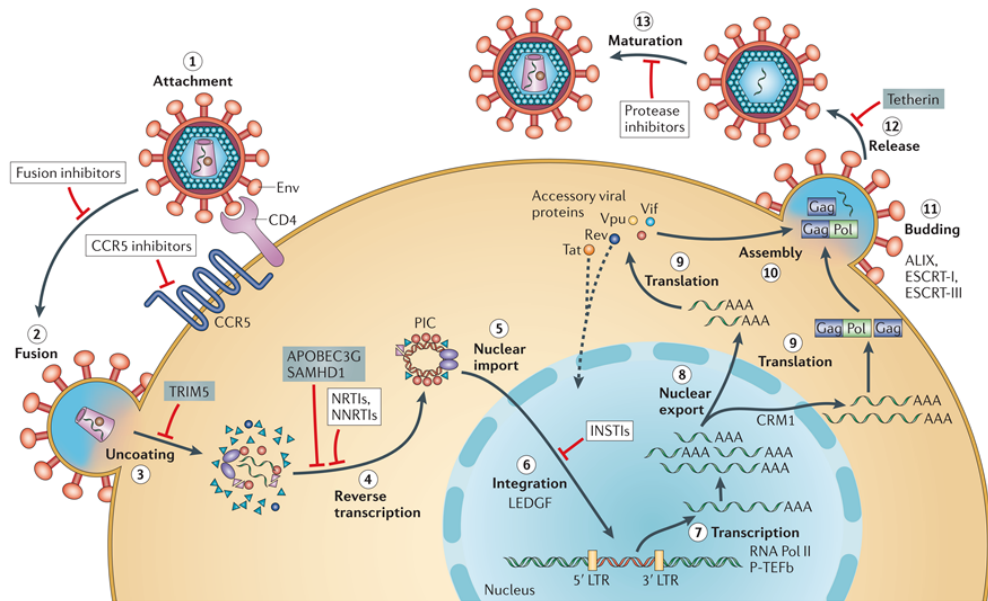


Figure 47 : Vue schématique de l'ensemble du cycle de réplication du VIH-1 [Engelman et Cherepanov, 2012].

Grâce à la machinerie cellulaire, le génome du virus est traduit en ARN et transcrit en protéines. Une autre enzyme virale, la protéase, se charge de terminer la fabrication des protéines nécessaire à la fabrication de nouveaux virus (protéines de l'enveloppe, enzymes, etc.), ce processus est appelé « maturation » (Figure 47). Ces nouveaux virus sont ainsi libérés dans l'organisme et vont infecter d'autres cellules. Cette prolifération se fait au détriment des lymphocytes, dont le nombre chute. Les défenses immunitaires ne sont plus assurées. L'organisme n'est plus capable d'empêcher la prolifération de certaines bactéries ou virus, ni l'apparition de tumeurs. Le développement de ces maladies opportunistes finit par entraîner la mort de la personne infectée.

Les médicaments anti-rétroviraux actuels ralentissent la multiplication du virus et donc conservent un système immunitaire suffisant pour retarder l'entrée dans le stade SIDA. Chacune des étapes du cycle de réplication du VIH-1, décrites plus haut, offre une cible thérapeutique potentielle.

En fonction de leur structure chimique, du mécanisme d'action et du profil de résistance, les molécules anti-VIH sont classées en six classes thérapeutiques distinctes (Figure 48) : (1) les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), (2) les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), (3) les inhibiteurs de l'intégrase, (4) les inhibiteurs de la protéase (IP), (5) les inhibiteurs de fusion et (6) les antagonistes des corécepteurs [Arts et Hazuda, 2012].

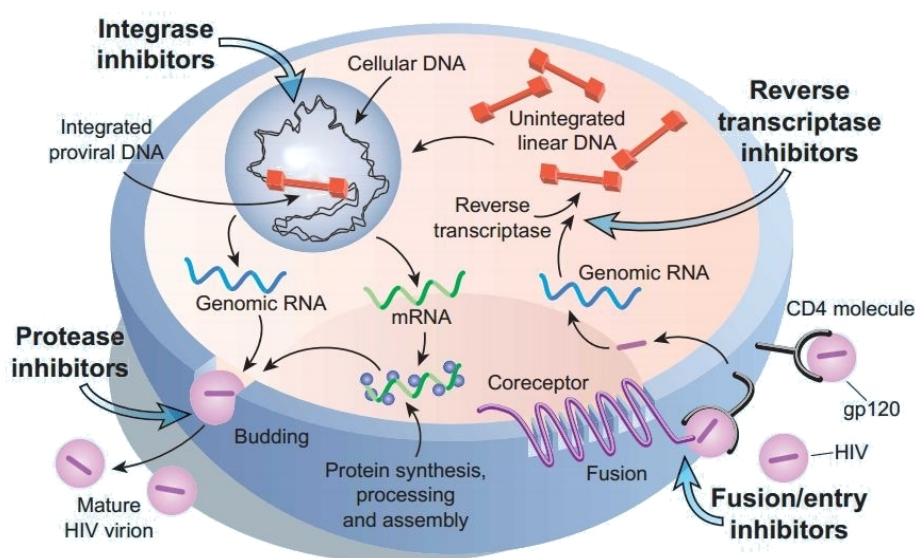


Figure 48 : Étapes d'actions des traitements anti-VIH [Fauci, 2003].

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse, bloquent la transcription de l'ARN viral en ADN. Ils empêchent ainsi le développement d'un processus aboutissant à ce que le patrimoine génétique viral soit inclus dans le patrimoine génétique de la cellule hôte. Deux classes d'inhibiteurs ont été découvertes :

La première **nucléosidique**, qui mime le substrat du site actif de la transcriptase. Ces inhibiteurs sont administrés en tant que pro-médicaments ce qui nécessite l'entrée dans la cellule hôte et une phosphorylation par des kinases cellulaires avant de donner un effet antiviral. [Mitsuya *et al.*, 1985; Furman *et al.*, 1986; Mitsuya et Broder 1986; St Clair *et al.*, 1987; Hart *et al.*, 1992].

Actuellement, huit inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) sont utilisés en thérapie anti-SIDA (Figure 49) : l'abacavir (ABC, Ziagen[®]), la didanosine (ddI, Videx[®]), l'emtricitabine (FTC, Emtriva[®]), le lamivudine (3TC, Epivir[®]), Stavudine (d4T, Zerit[®]), la zalcitabine (ddC, Hivid[®]), la zidovudine (AZT, Retrovir[®]) et le ténofovir disoprovil fumarate (TDF, Viread[®]) [Arts et Hazuda, 2012].

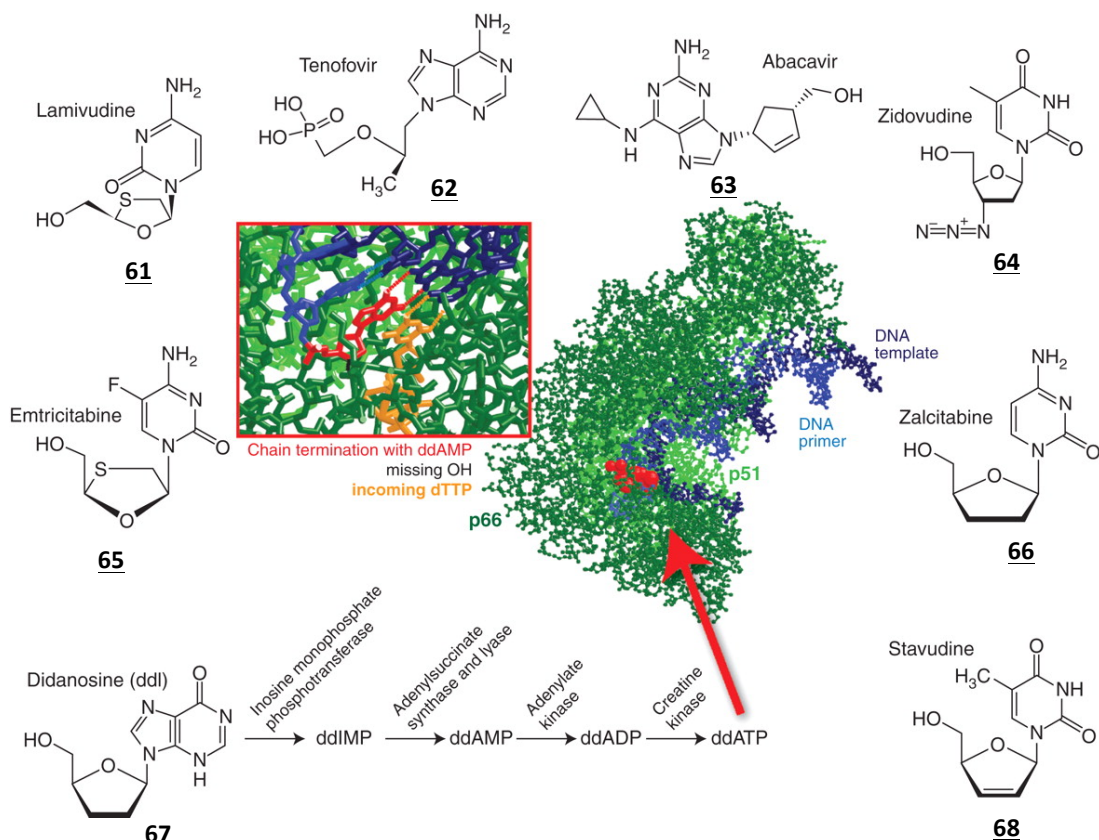


Figure 49 : Inhibiteurs nucléosidique/nucléotidique de la transcriptase inverse et la structure cristalline de la transcriptase inverse du VIH-1 en complexe avec l'ADN [Arts et Hazuda, 2012 d'après Huang *et al.*, 1998].

La seconde classe est constituée de molécules **non nucléosidiques** qui se lient à une poche hydrophobe sur la transcriptase. Cet événement contraignant modifie la conformation des résidus du site actif ce qui entrave l'activité enzymatique normale [Kohlstaedt *et al.*, 1992 ; Tantillo *et al.*, 1994 ; Spence *et al.*, 1995]. La poche de liaison aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) n'existe qu'en présence de ces derniers [Rodgers *et al.*, 1995 ; Hsiou *et al.*, 1996] et se compose de résidus hydrophobes (Y181, Y188, F227, W229 et Y232), et hydrophiles résidus comme K101, K103, S105, D192, E224 et de la sous-unité p66 et E138 de la sous-unité p51 (Figure 50) [Sluis-Cremer *et al.*, 2004].

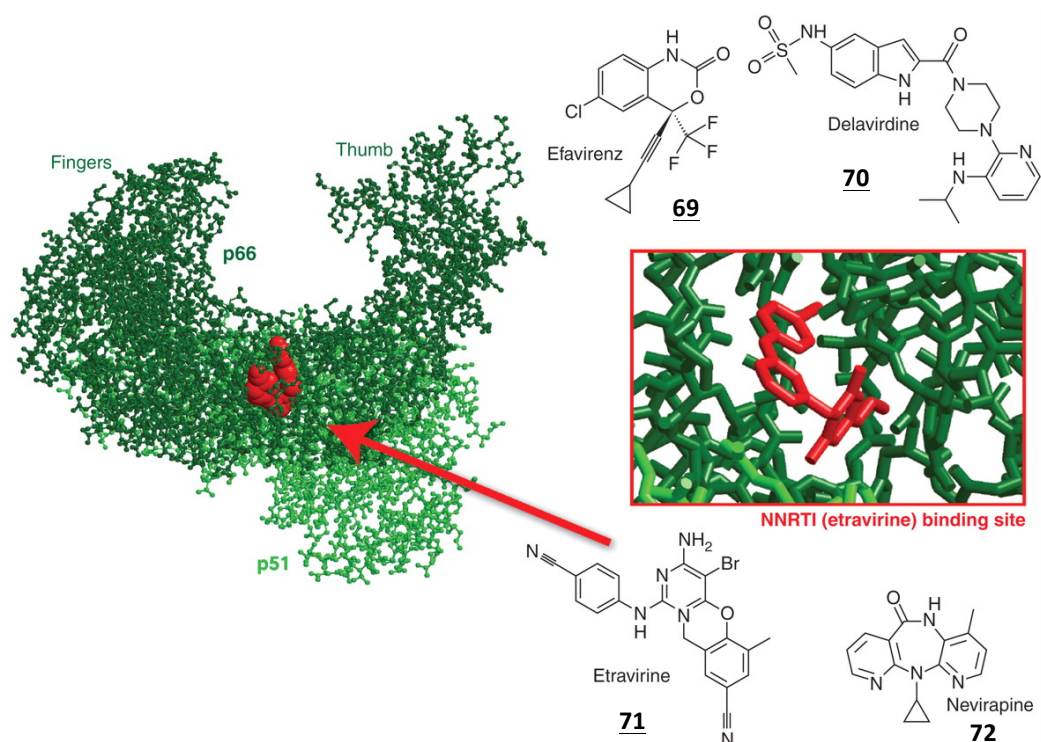


Figure 50 : Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse et la structure cristalline de cette enzyme du VIH-1 complexée avec l'Etravirine 71.
[Arts et Hazuda, 2012 d'après Lansdon *et al.*, 2010].

Les inhibiteurs d'entrée/fusion empêchent la pénétration du VIH-1 dans la cellule, et par là même la contamination. L'entrée du VIH-1 exploite plusieurs protéines de l'hôte pour un ensemble d'événements complexes menant à la fusion membranaire et la libération du noyau viral dans le cytoplasme. Les Inhibiteurs d'entrée du VIH-1 peuvent donc être subdivisés en classes distinctes basées sur les inhibitions des étapes distinctes du processus [Arts et Hazuda, 2012].

Les Inhibiteurs peptidiques de fusion ont été conçus en se basant sur des études qui ont montré que les deux domaines homologues de la protéine *gp41* virale doivent interagir les uns avec les autres pour favoriser la fusion, et que les protéines mimant ces domaines peuvent se lier et perturber les interactions intramoléculaires de la protéine virale [Wild *et al.*, 1993/1994].

Les petites molécules antagonistes du CCR5 se lient à la poche hydrophobe dans les hélices transmembranaires des CCR5 [Dragic *et al.*, 2000 ; Tsamis *et al.*, 2003] sans compétition avec le site de liaison sur le co-récepteur CCR5 de l'enveloppe du VIH-1. Jusqu'à présent, trois antagonistes : le vicriviroc (VCV), le maraviroc (MVC) et l'aplaviroc sont capables d'inhiber la réplication du virus chez l'Homme [Dorr *et al.*, 2005].

Enfin, les CXCR4 sont aussi des corécepteur du VIH-1, mais les tentatives de développer des antagonistes de CXCR4 (par exemple, AMD3100 ou Plérixaforr[®]) ont échoué en phase clinique [Hendrix *et al.*, 2004].

Other integrase in dimer

N-term domain

N-term extension domain

C-term domain

Host chromosomal DNA

Catalytic core domain

Prototype human foamy virus integrase

Proviral DNA

Raltegravir binding site

73

74

75

Raltegravir

GSK1349572

Elvitegravir

~ 97 ~

Les inhibiteurs de la protéase empêchent que le virus puisse disposer de certaines protéines indispensables à sa maturation, à la formation de virions matures et infectieux et donc à la contamination de nouvelles cellules.

La trithérapie a permis d'allonger l'espérance de vie des patients, en essayant de maintenir la charge virale à un niveau faible, et ainsi d'augmenter la concentration de T-CD4. Cependant, à cause des mutations extrêmement fréquentes du virus, finissent par émerger une ou plusieurs nouvelles formes du virus résistantes aux différents traitements. Ces résistances provoquent l'augmentation de la charge virale, la diminution de la concentration de T-CD4, et le décès du patient par perte de sa protection immunitaire. Ceci impose une recherche et un développement de nouveaux traitements fondés mécanismes d'action originaux.

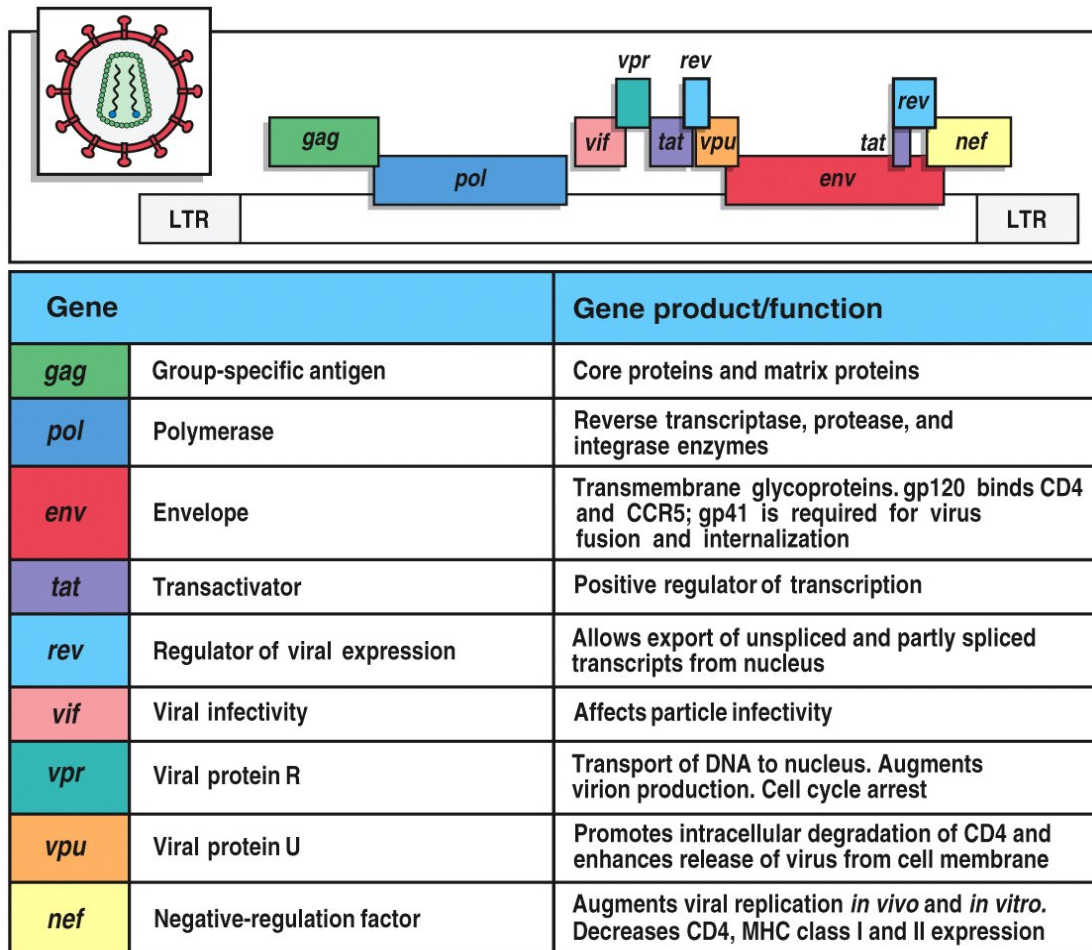
Dans cette partie, de thèse, nous décrivons les travaux qui nous ont permis de proposer de nouveaux inhibiteurs capables de perturber des interactions protéine-protéine indispensables à la stabilité de la structure de cette enzyme en vue d'explorer les paramètres physicochimiques et structuraux responsables de l'activité inhibitrice.

II. Structure et spécificité de la protéase du VIH-1

Toutes les protéases rétrovirales appartiennent à la famille des protéases aspartiques qui partagent les mêmes structures tertiaires et des séquences d'acides aminés. Elles ne sont actives que sous forme homodimérique pour laquelle chaque unité contribue par un aspartate catalytique au site actif [Ingr *et al.*, 2003].

Durant le cycle de vie normale, les protéines structurales virales (**p17**, **p24** et **p15**), les protéines de la matrice (**p18**), les protéines de la capsid (**p25**), les protéines de la nucléocapsid (**p7-p9**), la protéase, la transcriptase inverse, l'intégrase et les deux protéines de l'enveloppe **gp41** et **gp120** sont synthétisées, puis assemblés à la membrane cellulaire pour le bourgeonnement et la formation des particules virales immatures [Kohl *et al.*, 1988].

La protéase du virus de l'immunodéficience humaine (PR-VIH) est responsable du clivage des précurseurs polyprotéiques viraux **Gag** et **Gag-Pol**, en enzymes et des protéines structurales virales matures et fonctionnelles. Ce processus, appelé maturation virale, conduit à des changements morphologiques finaux et indispensable pour la production des particules virales infectieuses [Park et Morrow, 1993 ; Miller, 2001 ; Kohl *et al.*, 1988].



<http://flt75.ovh.org/biotechno/s/immuno/genome.vih.jpg>

Figure 52 : Organisation génomique du VIH-1.

À partir des gènes **gag**, **pol** et **env** (Figure 52), des précurseurs polyprotéiques sont synthétisés dans la cellule infectée, où ils sont clivés en protéines internes par la protéase virale et en protéines d'enveloppe par des protéases cellulaires. Ainsi les protéines virales à activité enzymatique sont codées par le gène **pol** et proviennent de la polyprotéine **Pr160 gag-pol**. Les produits du gène **env** dérivent d'un précurseur **Gpr160 env**, glycosylé et clivé par des enzymes cellulaires en glycoprotéine externe (**gp120**) et glycoprotéine transmembranaire (**gp41**) [Kohl *et al.*, 1988].

La forme active de la protéase du VIH-1 est une structure homodimère (Figure 53) dans laquelle deux sous-unités identiques, de 99 acides aminés par unité, sont reliées entre elles par un feuillet β antiparallèle constituée de deux brins *N*- et *C*-terminaux de chaque monomère. Les deux sous-unités, conventionnellement étiquetées comme résidus 1-99 et 1'-99', présentent deux plis (folds) identiques et la structure secondaire comprend essentiellement des brins bêta et une courte hélice alpha. Le triplet du site actif (Asp₂₅-Thr₂₆-Gly₂₇) est hautement conservée parmi les protéases aspartiques.

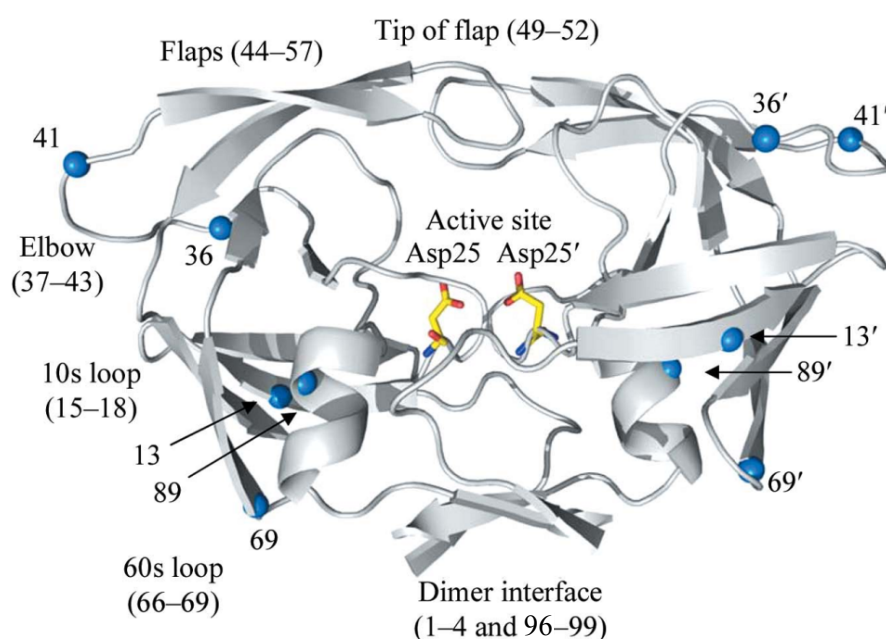


Figure 53 : Structure de la protéase homodimérique du VIH-1 [Robbins et al., 2010 : d'après DeLano, 2002].

La structure cristalline de la protéase du VIH-1 (Figure 56) [Wlodawer *et al.*, 1989] montre que la cavité du site actif est partiellement entourée par une paire de volets flexibles, comprenant les brins bêta-antiparallèles des résidus 45-55. Ces volets existent généralement dans les conformations les plus ouvertes en absence de substrat lié ou d'un inhibiteur. Les deux sous-unités de la protéase dimérique interagissent dans plusieurs régions : les extrémités des volets, les triplés du site actif, les ponts salins impliquant Asp₂₉, Arg₈₇ et Arg₈, et une contribution majeure du feuillet- β antiparallèle à quatre brins formé par les deux extrémités *N*- et *C*-terminales de chaque unité (résidus 1-4 et 96-99) [Weber, 1990, Pokorná *et al.*, 2009].

III. Modulateurs de la protéase du VIH-1

La protéase virale (PR) s'est révélée être une cible efficace pour le traitement du SIDA. Si la PR du VIH-1 est inhibée, les virions naissant ne peuvent arriver à maturation et la propagation du virus est donc arrêtée. L'introduction des inhibiteurs de la protéase du VIH-1 (IP) en 1995 et l'application de la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART : Highly active antiretroviral therapy), associant des IP avec d'autres antirétroviraux, notamment les inhibiteurs de la transcriptase inverse, ont considérablement amélioré l'espérance de vie des malades et entraîné une diminution considérable de la mortalité [Pokorná *et al.*, 2009].

La thérapie efficace actuelle utilise une sélection de dix inhibiteurs de la protéase en association avec d'autres médicaments antiviraux (Figure 54) : l'amprénavir (APV, Agénérase[®]), l'atazanavir (ATZ, Reyataz[®]), le darunavir (TMC114, Prezista[®]), le fosamprenavir (Lexiva[®]), l'indinavir (IDV, Crixivan[®]), le lopinavir (LPV, Kaletra[®]), le nelfinavir (NFV, Viracept[®]), le ritonavir (RTV, Norvir[®]), le saquinavir (SQV, Fortovase[®] / Invirase[®]) et le tipranavir (TPV, Aptivus[®]) [Arts et Hazuda, 2012].

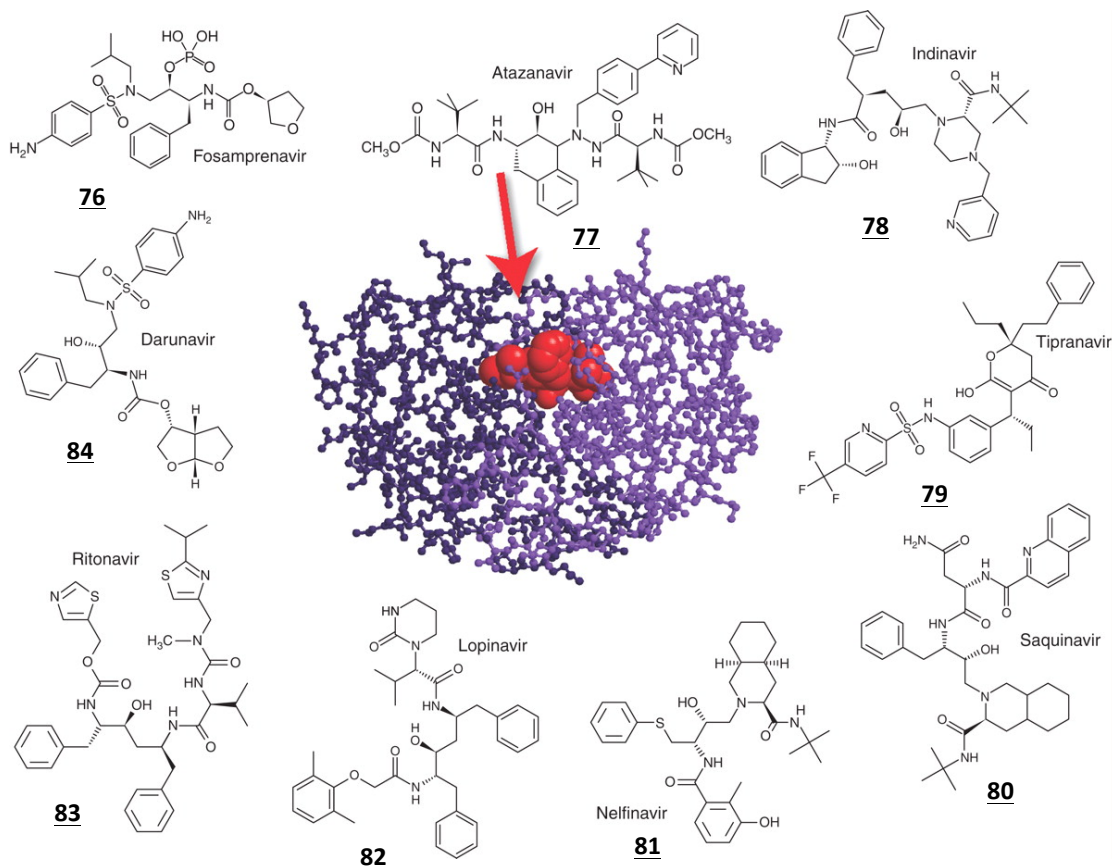


Figure 54 : Structure des inhibiteurs du site actif de la protéase [Arts et Hazuda, 2012].

Ces principes actifs agissent en se liant dans la cavité du site actif de la protéase du VIH-1 (Figure 55). Ils ont été conçus au cours des 15 dernières années en se basant sur les connaissances de la structure moléculaire de la protéase, la spécificité de son substrat et le mode de fixation des inhibiteurs. La plupart des inhibiteurs cliniques de la protéase du HIV-1 ont été alors développés rationnellement [Pokorná *et al.*, 2009].

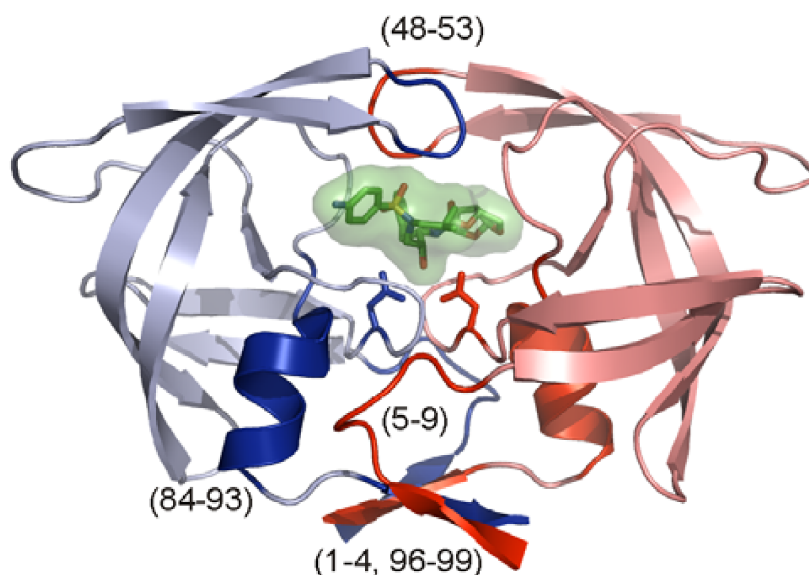


Figure 55 : La structure générale du dimère de la PR du VIH avec un inhibiteur lié au site actif. Les monomères sont de couleur **bleue** et **rouge**. Les régions impliquées dans la création d'une interface dimérique sont mises en valeur par des couleurs plus foncées et indiquées par des numéros de résidus.

Les premiers inhibiteurs antiviraux de la protéase, le saquinavir, l'indinavir et le ritonavir, ont été conçus pour cibler le type sauvage de protéase du VIH-1 en mimant la liaison du substrat. Les inhibiteurs se lient à la protéase à travers des interactions de type hydrogène similaires à celles des peptides et de grands groupes latéraux hydrophobes qui s'encastrent dans les sous-sites hydrophobes protéase pour augmenter l'affinité de liaison. Les molécules initiales engagent plusieurs groupes peptidiques. Par la suite, de nouveaux inhibiteurs ont été conçus en réduisant le caractère peptidique, et les conceptions les plus récentes d'inhibiteurs pour le tipranavir et le darunavir ont ciblé explicitement les enzymes mutantes résistants aux médicaments.

Récemment, des analyses des structures cristallines ont révélé que le darunavir se lie non seulement à la cavité du site actif, mais peut également occuper une surface de la poche formée par les volets (Figure 56) [Kovalevsky *et al.*, 2006]. Des expériences de la cinétique enzymatique ont confirmé en outre l'idée que le darunavir et l'aprenavir ont un second site de liaison en dehors du site actif [Kovalevsky *et al.*, 2008]. D'autres études suggèrent que le darunavir possède un double mécanisme d'inhibition, car il pourrait aussi être un inhibiteur potentiel de la dimérisation de PR [Koh *et al.*, 2007].

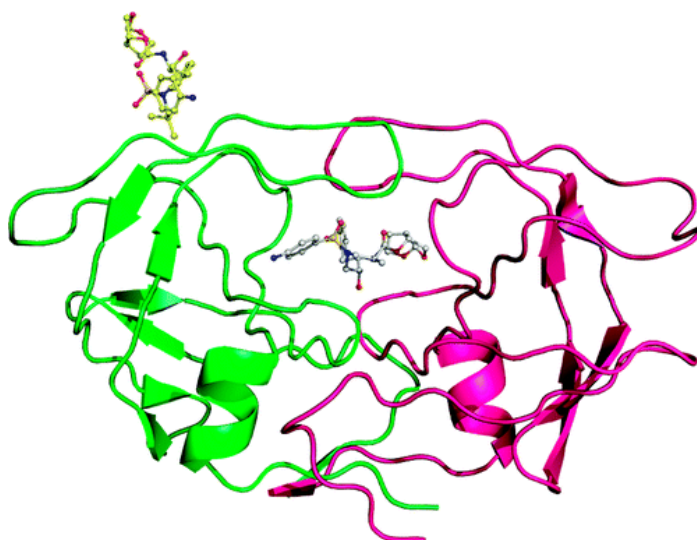


Figure 56 : Darunavir, un médicament antiviral puissant, a montré un inhabituel second site de liaison sur la surface de la protéase dimérique du VIH-1 [Kovalevsky *et al.*, 2008].

Près de 70% des 99 résidus de la protéase du VIH-1 sont connus pour muter, et beaucoup d'entre eux mutent avec une fréquence plus élevée chez les patients recevant un traitement antirétroviral. Ces sites de mutation sont à la fois à l'intérieur et à l'extérieur du site actif (Figure 57) et confèrent une résistance aux molécules ce qui signifie que l'enzyme continue son activité protéolytique permettant la maturation virale [Hoffman *et al.*, 2003 ; Johnston *et al.*, 2004 ; Rhee *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2003]. En comparant les structures cristallines des complexes avec le substrat à celles des structures cristallines des complexes avec les inhibiteurs, il a été constaté que les inhibiteurs s'éloignent de la poche du substrat à des endroits précis. Les sites dans lesquelles chaque inhibiteur s'écarte des substrats correspondent aux régions de mutations de la protéase du VIH-1 [King *et al.*, 2004 ; Prabu-Jeyabalan *et al.*, 2006].

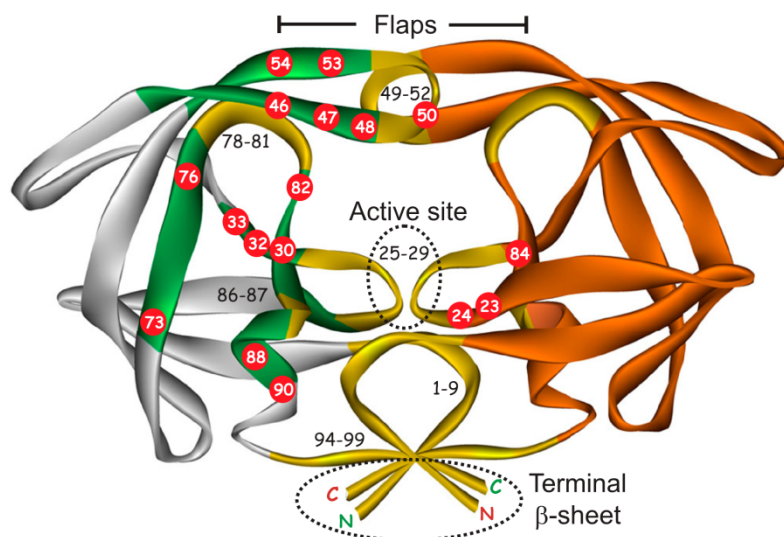


Figure 57 : Localisation des mutations de résistance aux médicaments
[Louis et al., 2011]

Par ailleurs, cinq régions non contiguës ont été déterminées dans lesquelles la PR n'a montré aucun changement d'acides aminés. Ces domaines comprennent les acides aminés 1-9 (séquence amino-terminale), 21-32 (séquence autour du site actif), 47-56 (en haut du volet), 78-88 et 94 à 99 (séquences de liaison du substrat et carboxy-terminale successivement) [Fontenot *et al.*, 1992 ; Pokorná *et al.*, 2009].

Les résidus 96-99 des extrémités carboxy-terminales de la protéase du VIH contribuent à 50% environ des interactions entre les sous-unités ioniques et des liaisons hydrogène et environ 45% de la surface impliquée dans la formation de dimère. Cette information peut être utile dans la conception des inhibiteurs de la formation de dimère, dont le blocage de la dimérisation des monomères de la protéase pourrait être un moyen efficace pour inactiver l'enzyme [Weber, 1990].

La structure cristalline de la protéase du VIH-1 montre que l'interface entre les sous-unités identiques formant la protéase dimérique active est composée de quatre brins bêta bien ordonnés des deux extrémités amino- et carboxy-terminales et les résidus 86 à 94 ont une conformation hélicoïdale. La disposition observée de l'interface du dimère suggère la possibilité de concevoir des inhibiteurs de la dimérisation [Wlodawer *et al.*, 1989].

Le feuillet β antiparallèle à quatre brins composé des deux extrémités *N*-terminales (résidus 1-4) s'imbriquant avec les deux extrémités *C*-terminales (résidus 96-99) contribue à 75% de l'énergie de stabilisation de l'enzyme (Figure 58) [Todd *et al.*, 1998]. Cette interface dimérique est conservée chez la plupart des protéases isolées de VIH-1 résistants aux médicaments et représente donc une cible intéressante pour le développement de composés empêchant la dimérisation.

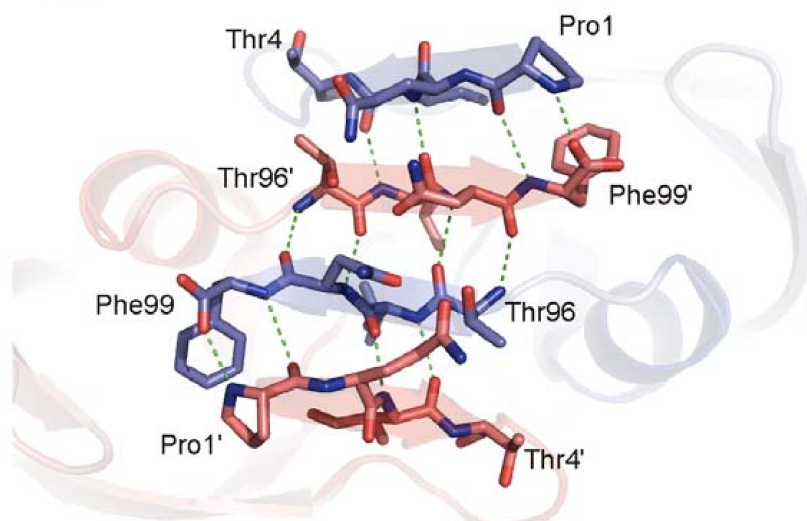


Figure 58 : Feuillet β antiparallèle à quatre brins formé par interaction entre les deux brins *N*- et *C*-terminaux « Les monomères sont de couleur *bleue* et *rouge*, respectivement. *Un réseau de liaisons hydrogène est représenté par des tirets verts* ».

Des études ont démontré que des fragments peptidiques reproduisant les séquences des interfaces natives *N*- et *C*-terminales joue le rôle d'inhibiteurs de la dimérisation de la PR du VIH-1, même à des concentrations micromolaires [Zhang *et al.*, 1991 ; Babé *et al.*, 1992 ; Schramm *et al.*, 1996]. De courtes séquences peptidiques issues de ces segments sont capables d'inhiber l'activité de la protéase [Schramm *et al.*, 1996]. Un térapeptide correspondant au segment *COOH*-terminale de protéase du VIH-1, est un excellent inhibiteur de l'enzyme. L'analyse cinétique a montré que l'inhibiteur se lie aux protomères inactifs et empêche leur association en dimère actif (inhibition de la dissociation) [Zhang *et al.*, 1991]. Les peptides mimant un brin β (résidus 95-99), ou deux brins- β (résidus 1-5 plus 95-99, ou 95-99 plus 95-99) se montraient inhibiteurs de la protéase du VIH-1 avec une IC_{50} dans le bas de gamme micromolaire [Babé *et al.*, 1992].

La connexion des chaînes peptidiques *N*- et *C*-terminales par un lien flexible [Zutshi *et al.*, 1997 ; Shultz et Chmielewski, 1999] ou un scaffold plus rigide « pinces moléculaires » [Bouras *et al.*, 1999 ; Bannwarth *et al.*, 2006] améliore le pouvoir inhibiteur (Figure 59). Une étude récente décrit de nouveaux peptides attachés à l'interface par leurs chaînes latérales, avec des puissances inhibitrices contre la PR du VIH-1 de type sauvage étant dans la gamme de nanomolaire faible [Bowman et Chmielewski, 2009].

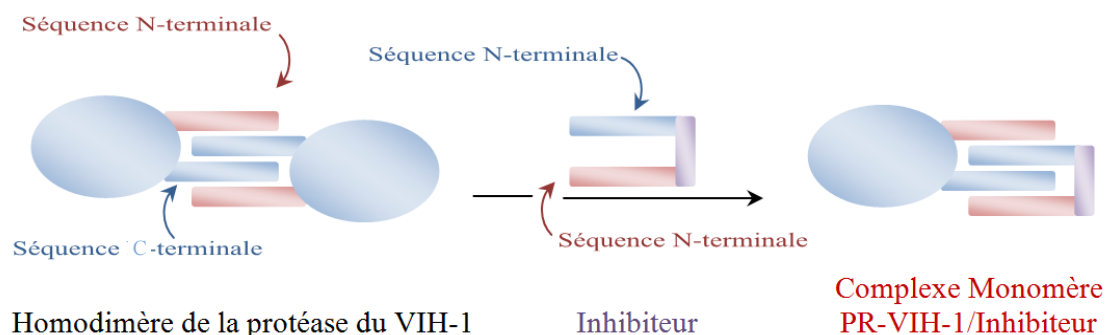


Figure 59 : Stratégie anti-dimère.

Enfin, il a été démontré que des pinces moléculaires basées sur deux brins peptidiques ou peptidomimétiques attachés à un noyau aromatique interfèrent avec une extrémité monomère dans un mode de feuillet β ce qui perturbe le processus de dimérisation de la protéase du VIH-1 et mène à une enzyme inactive (Figure 60) [Bouras *et al.*, 1999 ; Bannwarth *et al.*, 2006].

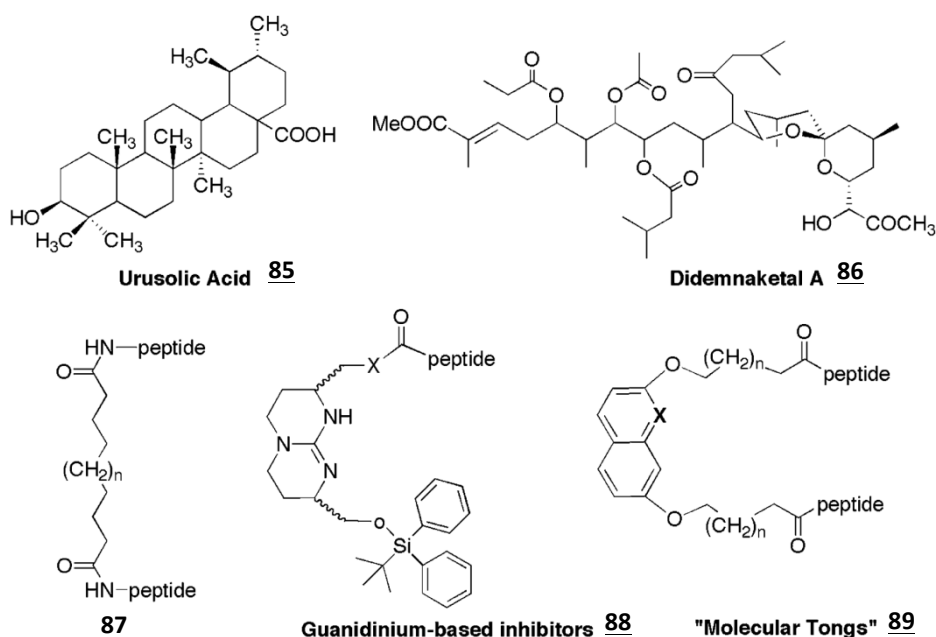


Figure 60 : Quelques molécules anti-dimères [Zutshi et Chmielewski, 2000].

IV. Travail du laboratoire

La protéase (PR) joue un rôle prépondérant dans la réplication du VIH-1 et constitue ainsi une cible majeure de la thérapie anti-SIDA. Cette enzyme est une protéine dimérique stabilisée par la formation d'un feuillet β antiparallèle à 4 brins entre les extrémités *N* et *C*-terminales de chaque monomère (Figure 61). Le dimère est en effet la seule forme enzymatique douée d'activité d'où la stratégie qui consiste à cibler l'interface des monomères présente des avantages. L'antidimère peut se complexer avec le monomère dès sa libération à partir de la polyprotéine, c'est-à-dire avant toute formation de protéase active ou libérer le monomère à partir du dimère (Figure 61). Contrairement au site actif, le feuillet β ciblé par ces molécules présente peu de mutations [Shafer *et al.*, 2000]. Les inhibiteurs de la dimérisation pourraient donc être une alternative thérapeutique pour lutter contre les virus résistants aux traitements existants.

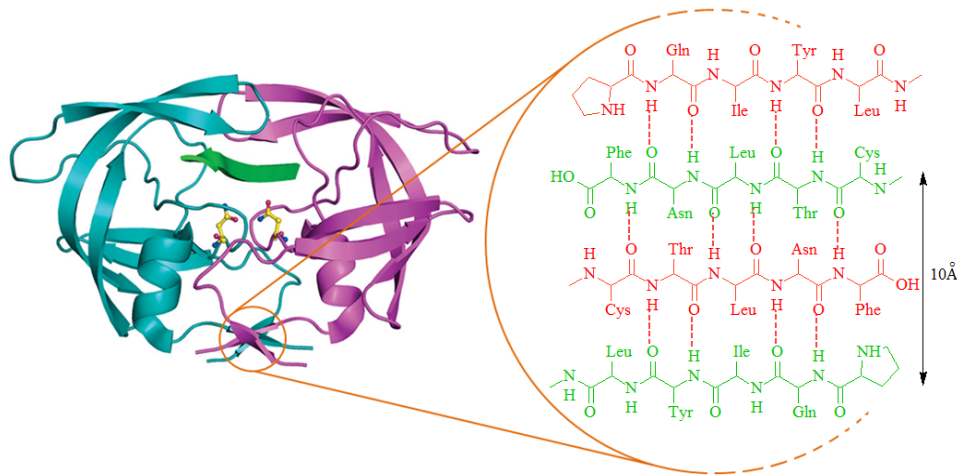


Figure 61 : Feuillet β à 4 brins stabilisant la structure dimérique de la PR du VIH-1.

La stratégie précédemment élaborée dans notre laboratoire pour empêcher la dimérisation de la PR, concerne la construction des premières pinces moléculaires susceptibles d'interférer avec le feuillet β à quatre brins. Ces pinces sont constituées d'un noyau central rigide, sur lequel sont fixés deux bras peptidiques *via* deux liens carboxypropyle. L'avantage de cette stratégie est que les deux brins peptidiques pourraient être convenablement orientés par l'espaceur permettant une formation d'un feuillet β antiparallèle avec les extrémités *N*- et *C*-terminales du monomère de la protéase du VIH-1, conduisant ainsi à une inhibition de la dimérisation et inactivation de ce fait de l'enzyme (Figure 62).

Il a été démontré, au laboratoire, par des études de modélisation moléculaire que les acides aminés des pinces moléculaires qui inhibent la PR du VIH-1 sont impliqués dans des interactions de liaison hydrogène avec les résidus des extrémités *N*- et *C*-terminales d'un monomère de l'enzyme. Ceci favorise la formation d'une structure en feuillet β et mime le feuillet β antiparallèle à quatre brins de la structure dimérique de la PR (Figure 62).

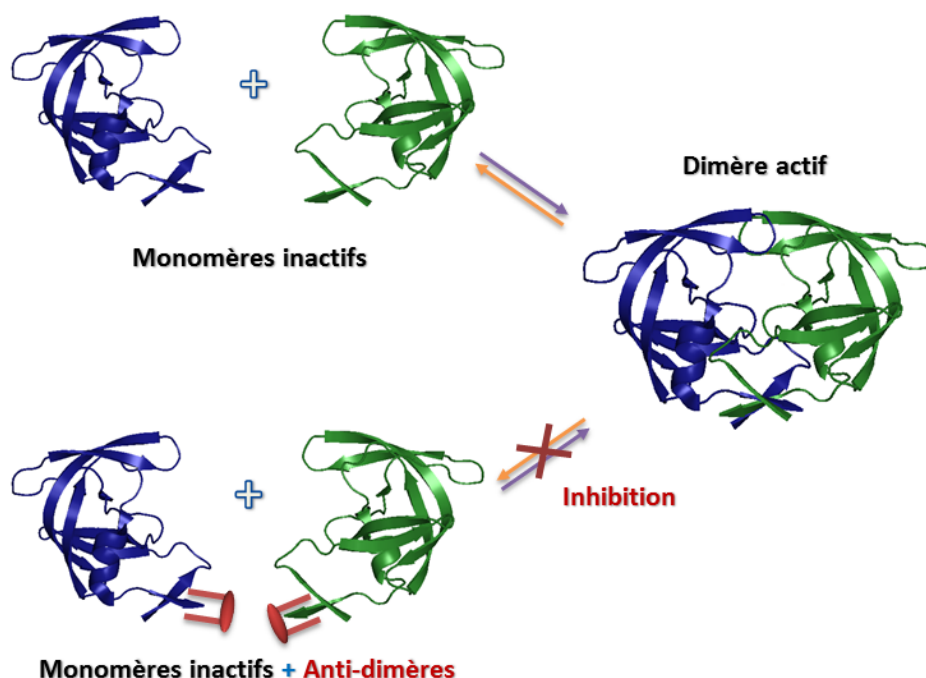


Figure 62 : Stratégie du laboratoire pour inhiber la dimérisation de la protéase du VIH-1.

Dans une première approche, le laboratoire a conservé les résidus TLNF et QITL formant les brins des deux monomères liés *via* un lien carboxypropyle à un scaffold central rigide à base de : résorcinol, 2,6-pyridinediol, 2,7-naphtalènediol ou 2,7-quinoléinediol (Figure 63). Les liens carboxypropyle ont conféré également une certaine flexibilité qui peut être nécessaire pendant le processus de complexation avec un monomère de la PR du VIH-1 [Bouras *et al.*, 1999].

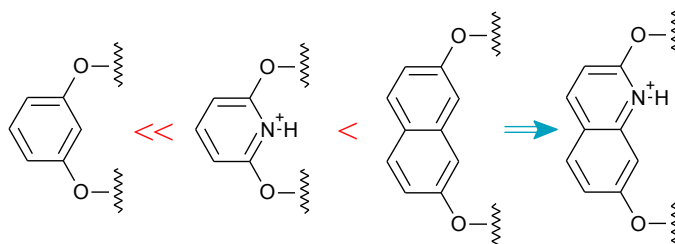


Figure 63 : Comparaison entre les différents scaffolds rigides.

Les premiers résultats obtenus ont montré que les pinces moléculaires à base d'une quinoléine ou de dérivés du naphthalène sont beaucoup plus actives que celles obtenues avec une pyridine et dérivés du résorcinol (Figure 63) [Merabet et al., 2004 ; Bouras et al., 1999].

Les modifications au niveau des bras peptidiques ont montré de même que les fragments tripeptidiques induisent une inhibition généralement meilleure par rapport aux fragments di- et tetra-peptidiques. La meilleure séquence tripeptidique trouvée est Val-Leu-Val-OMe, et le caractère hydrophobe des bras peptidiques apporte des caractéristiques favorables pour l'activité inhibitrice des pinces [Bannwarth *et al.*, 2006 ; Bouras *et al.*, 1999 ; Merabet et al., 2004].

Les acides aminés des deux bras peptidiques ont été choisis pour être capables de former un réseau de liaisons hydrogène avec les aminoacides des extrémités *N*- et *C*-terminales d'un monomère de la protéase pour favoriser la formation d'un feuillet- β antiparallèle à 4 brins en mimant l'interaction des deux monomères de la protéase (Figure 64).

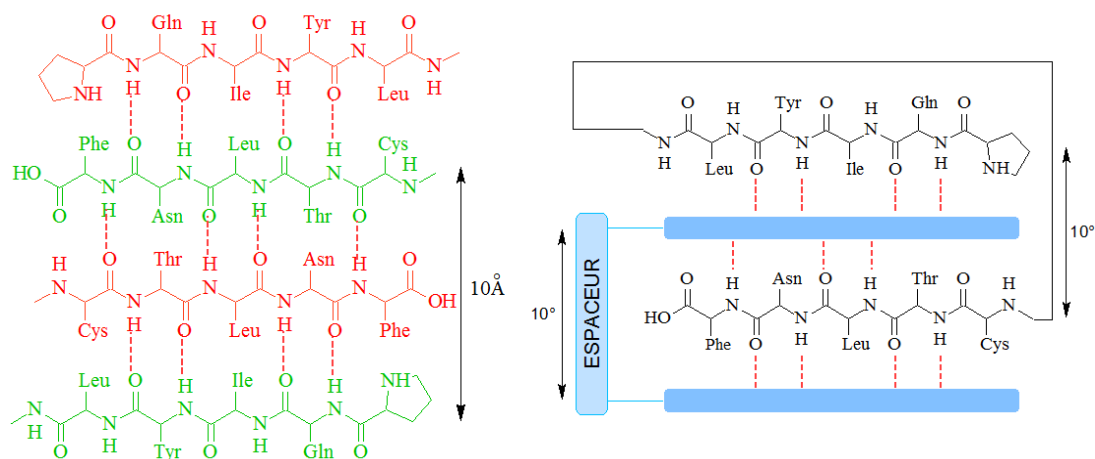


Figure 64 : Mode d'interaction des pinces moléculaires.

Pour améliorer la stabilité métabolique de ces molécules d'autres pinces moléculaires ont été développées en remplaçant un brin [Bannwarth *et al.*, 2006] puis deux brins peptidiques [Vidu *et al.*, 2010] par des brins peptidomimétiques tout en gardant le réseau de liaisons hydrogène (10 et 14). Ces molécules sont actives sur les protéases ANAM-11 et MDR-HM multmutées rencontrées en clinique et elles sont stables métaboliquement.

Une première molécule non peptidique inhibitrice de la dimérisation (Figure 65) a été récemment obtenue au laboratoire [Vidu *et al.*, 2010].

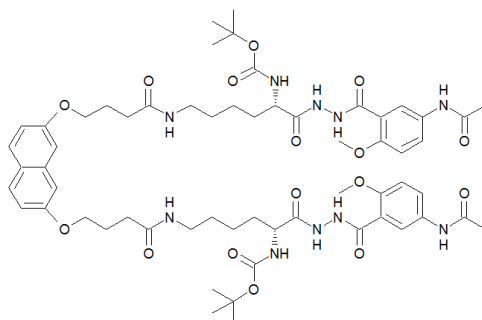


Figure 65 : Pince peptidomimétique 90.

L'inconvénient de ces pinces moléculaires peptidiques ou peptidomimétiques, est leur totale insolubilité dans l'eau. Nous nous sommes donc intéressés à obtenir des pinces moléculaires non peptidiques plus efficaces et plus solubles dans l'eau.

Dans cette deuxième partie de mes travaux de thèse, nous allons décrire la conception et la synthèse de nouvelles pinces moléculaires peptidomimétiques originales contenant un motif carbonylhydrazide (CONHNHCO) et leur capacité à inhiber la protéase du VIH-1 et les deux protéases ANAM-11 et MDR-HM multimutées (Figure 66).

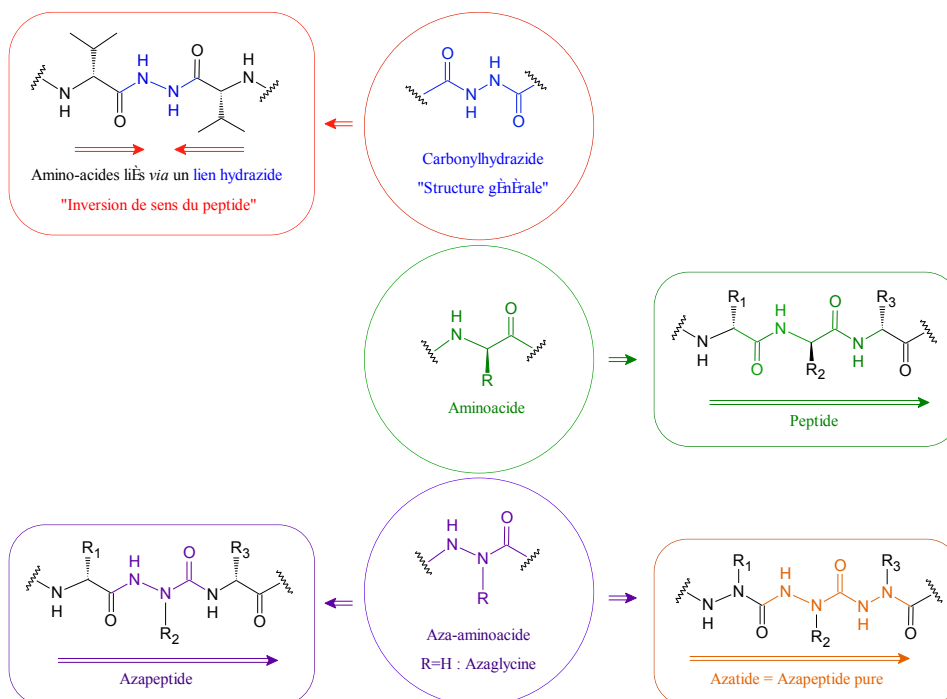


Figure 66 : Structure générale des motifs incorporés dans un ou deux bras peptidomimétiques des pinces moléculaires.

V. Objectifs

Les motifs carbonylhydrazide sont choisis en tant qu'éléments isostériques des résidus aminoacides pour introduire une résistance aux clivages protéolytiques. Selon le nombre de fragments introduits dans les pinces moléculaires nouvellement conçues, se trouve modulé l'équilibre hydrophilie/hydrophobie. Il est attendu que ces nouveaux bras à base de motifs carbonylhydrazide soient capables d'augmenter l'hydrophilie des pinces moléculaires, de diminuer le poids moléculaire et de stabiliser le feuillet- β formé entre nos molécules et l'homodimère de la protéase du VIH-1.

De nouveaux peptidomimétiques, conçus pour reproduire des brins- β [Dufau *et al.*, 2012], devraient être en mesure de former un feuillet β anti-parallèle avec l'extrémité C-terminale d'un monomère de la protéase du VIH-1 (Figure 67).

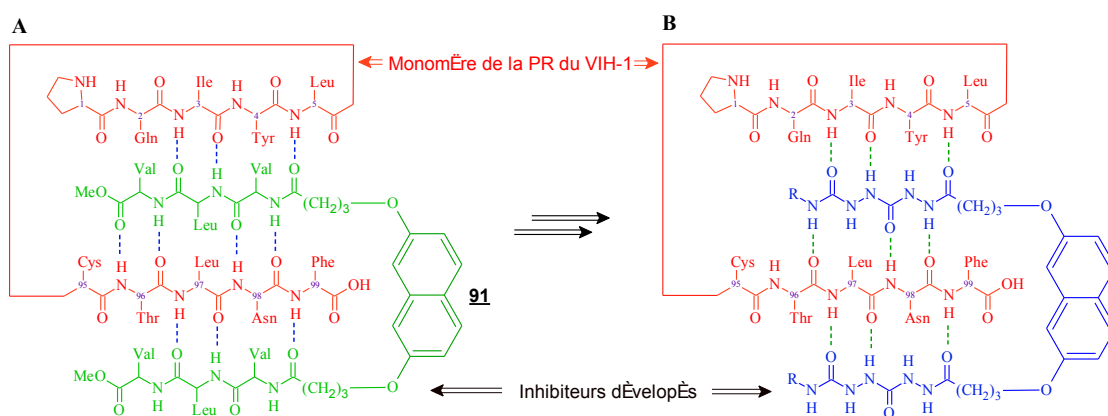


Figure 67: (A) Complexes possibles entre **monomère de la protéase du VIH-1** et **pince moléculaire peptidique**, (B) Complexes possibles entre **monomère de la protéase du VIH-1** et **pince moléculaire à base de motif carbonylhydrazide**.

Une nouvelle classe d'hydrazides très stables, fondée sur des hétérodimères de type ADDA-DAAD (A = accepteur de liaison hydrogène, D = donneur de liaisons hydrogène), a été utilisée avec succès dans l'auto-assemblage de systèmes de liaisons hydrogène supramoléculaires avec des structures bien établies [Zhao *et al.*, 2003 ; Hou *et al.*, 2004., Feng *et al.*, 2006] .

À notre connaissance, l'introduction de deux motifs carbonylhydrazides a été très rarement rapportée dans des molécules peptidomimétiques ou des inhibiteurs des interactions protéine-protéine.

Nos objectifs visent à concevoir, synthétiser et évaluer de nouvelles pinces moléculaires capables d'interagir avec les extrémités *N*- et *C*-terminales d'un monomère pour perturber la formation du dimère. Ces pinces sont constituées d'un noyau naphthalène sur lequel sont branchés en position 2 et 7, *via* un lien carboxypropyloxy, deux brins peptidomimétiques à base de motifs carbonylhydrazide. Le contrôle de la polarité de ces bras peptidomimétiques permet alors d'accroître l'hydrosolubilité des pinces. Des études de relations structures-activité sont réalisées.

La figure 68 regroupe l'ensemble des pinces moléculaires à base de motifs carbonylhydrazide développées au sein du laboratoire dans le but d'établir des relations structure-activité. Ces pinces moléculaires sont obtenues en réalisant plusieurs changements structuraux au niveau d'un ou des deux bras peptidiques.

Dans le cadre de cette étude de relations structure-activité j'ai participé à la conception et la synthèse des pinces moléculaires **100** et **101**, en réduisant le caractère peptidique, et pour lesquelles nous avons tenté d'accroître l'hydrosolubilité et d'augmenter la flexibilité de la partie *N*-terminale des bras peptidomimétiques. À cet effet dans le composé **100**, le motif carbonylhydrazide est introduit par l'intermédiaire d'une β -Alanine. Cette β -alanine est substituée par une lysine comme résidu plus flexible pour obtenir la pince **101**.

Les premières pinces **92** et **93** résultent de l'insertion d'un premier motif carbonylhydrazide en reliant deux résidus valine *via* un pont hydrazine ce qui inverse le sens du bras (Figure 68). Une autre série de pinces **94-101** est obtenue par introduction de deux motifs hydrazide en insérant deux azaglycines (azatide) dans les bras peptidomimétiques (Figure 68). Dans une première approche, les motifs azatides sont liés directement au scaffold central *via* un lien carboxypropyle **94-97**. Sur l'extrémité *C*-terminale on a introduit une valine amide dans les molécules **94** et **95** et une β -alanine dans la molécule **96**. Dans une seconde approche, le motif azatide est attaché au lien carboxypropyle *via* une valine **98**. Des unités peptidomimétiques plus courtes sont aussi préparées en remplaçant l'acide aminé terminal par un groupe méthylamine **97**.

La molécule **99** qui ne possède qu'un seul bras peptidomimétique (Figure 68) a été aussi évaluée en tant qu'inhibiteur de la dimérisation de la PR en vue de confirmer que seules les pinces à deux brins sont des inhibiteurs efficaces.

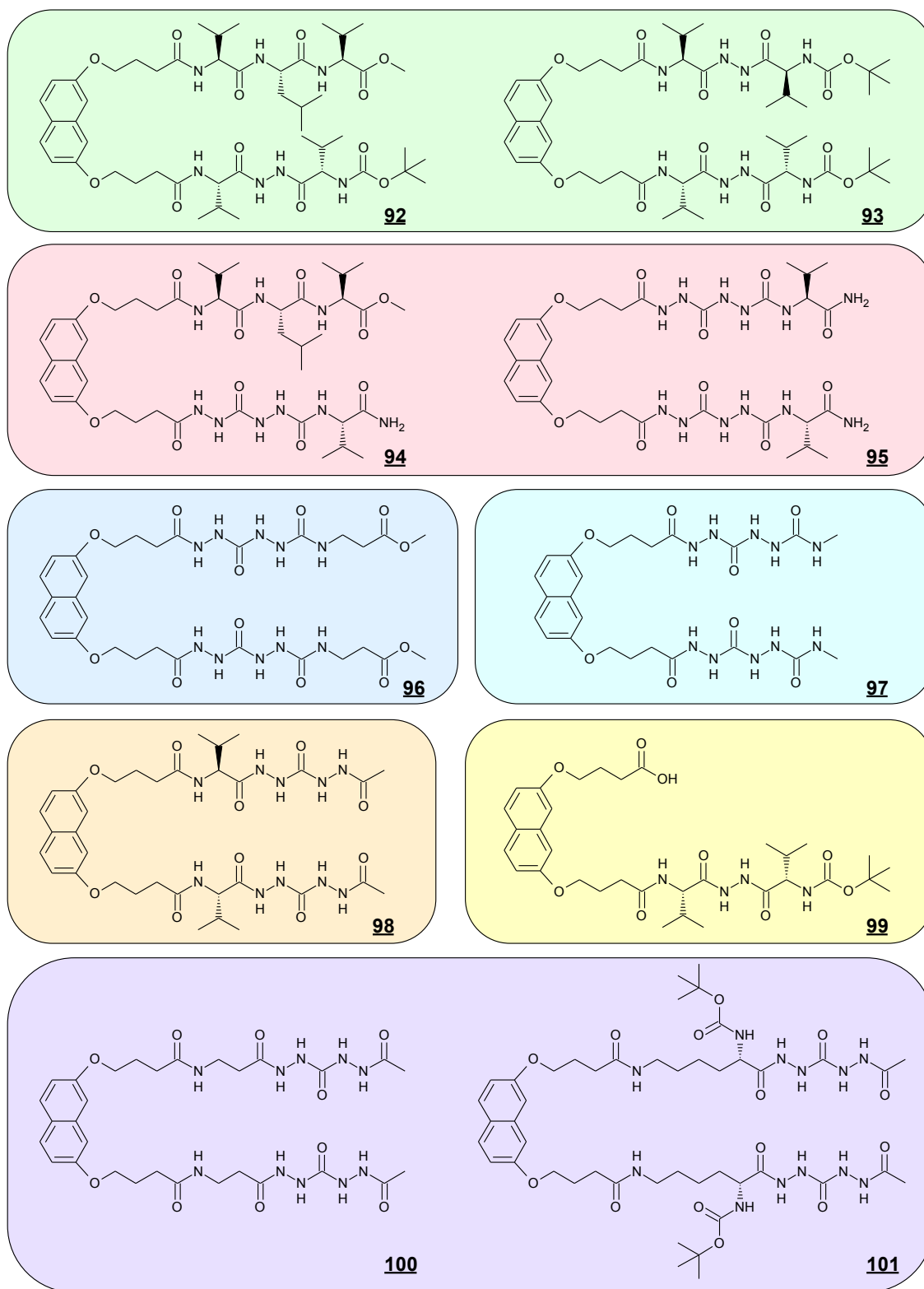


Figure 68 : Structure des pinces moléculaires à base de motifs carbonylhydrazide.

VI. Structure et intérêt des azapeptides

Dans les azapeptides un ou plusieurs atomes de carbone α sont remplacés par un atome d'azote. Par cette substitution $N-C_{\alpha}-CO \rightarrow N-N_{\alpha}-CO$ la liaison $C_{\alpha}-CO$, dont la rotation est libre, est remplacée par une liaison plus rigide $N_{\alpha}-CO$ car la délocalisation du doublet non liant de l'atome d'azote ralentit la rotation de la liaison. De plus, la répulsion électronique entre les doublets non liants des atomes d'azote adjacents restreint le mouvement autour des angles diédraux Ψ et Φ . La substitution d'un carbone α par un azote induit donc des changements significatifs dans la structure d'un peptide y compris la perte du centre asymétrique et génère deux éléments de structure : une hydrazine et une urée (Figure 69).

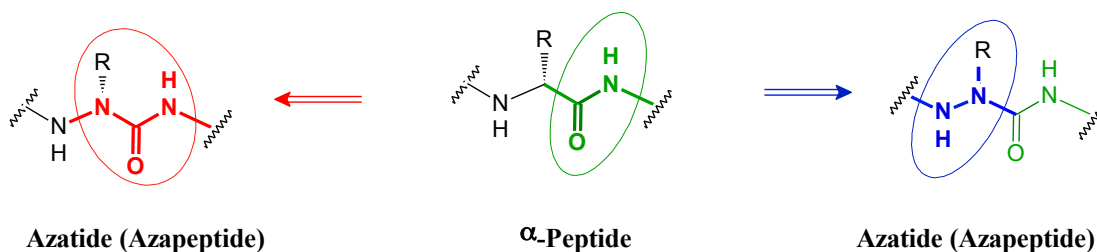


Figure 69 : Structure d'un azapeptide « L'introduction d'un atome d'azote génère deux éléments de structure : une partie hydrazine (en bleu) et un élément urée (en rouge) ».

Des études théoriques ont montré que l'énergie est minimale lorsque les doublets non-liants de l'azote sont perpendiculaires. On observe alors une structure plane de l'azote α . Par contre, si cet azote est substitué, la structure devient pyramidale. En revanche, la partie urée apporte une meilleure stabilité chimique que celle des liens amides. Les composés azapeptidiques semblent donc rassembler les conditions nécessaires à l'élaboration de pseudopeptides ou peptidomimétiques intéressants au niveau biologique.

D'une manière générale, la présence d'un aza-aminoacide au sein d'une séquence peptidique, est susceptible d'accroître localement la rigidité de la séquence et sa compacité. Les propriétés particulières de conformation contribuent à faire des aza-aminoacides un outil intéressant pour la conception de médicaments spécifiques mimant des structures secondaires des peptides et des protéines. En outre, puisque les azapeptides sont moins sensibles à la dégradation enzymatique par des protéases, ils peuvent éventuellement conduire à des molécules actives par voie orale avec une plus longue durée d'action.

VII. Synthèse

VII.1. Synthèse des bras à base de motifs carbonylhydrazide

La synthèse de ces nouvelles pinces moléculaires à motif carbonylhydrazide implique un motif azatide **104** commun. Ce dernier est obtenu en deux étapes avec un rendement moyen de 85% par réaction de carbazate de *tert*-butyle avec le chloroformate de phényle dans le dichlorométhane en présence de pyridine, pour obtenir le carbamate **103** qui est ensuite traité par de l'hydrazine (monohydrate) pour l'hydrazide **104** voulu avec un bon rendement.

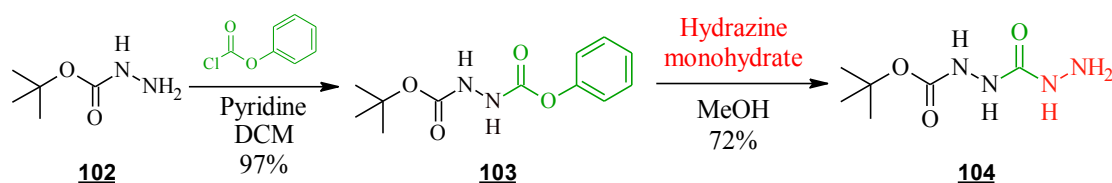


Schéma 5 : Synthèse de l'intermédiaire **104**.

L'acétylhydrazide **105** est obtenu avec un bon rendement (96 %) par acétylation du composé **104**. Le clivage acide du carbamate de *tert*-butyle donne intégralement la diaminourée **106**.

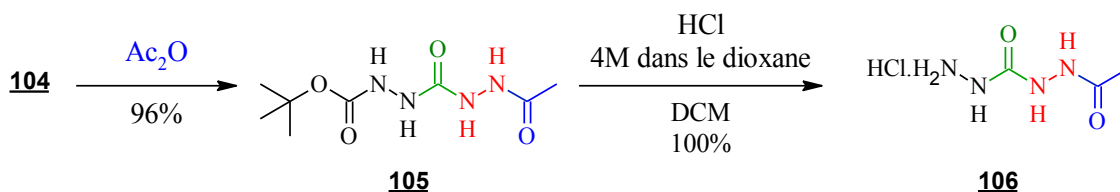


Schéma 6 : Synthèse de l'intermédiaire **106**.

Le couplage de l'intermédiaire **106** avec la *N*-Boc- β -Alanine-OH ou la *N* $_{\alpha}$ -Boc-*N* $_{\epsilon}$ -Z-Lys-OH, en utilisant les agents de couplage classiques, HBTU et HOBT en présence de la DIPEA dans le DMF donne respectivement les composés **109** et **110** avec des rendements très modestes (12% et 30% respectivement).

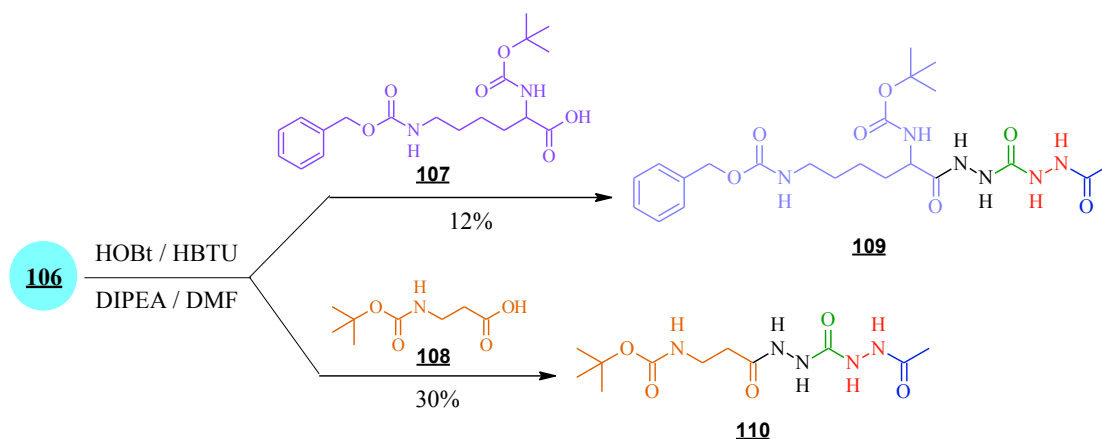


Schéma 7 : Synthèse des composés **109** et **110**.

Ces faibles rendements sont vraisemblablement dus au fait que les produits finaux **109** et **110** sont en partie hydrosolubles ce qui rend leur extraction difficile par les solvants organiques et conduit à une perte des molécules au cours des traitements aqueux.

La déprotection de l'amine de la chaîne latérale de la lysine du bras **109** par une hydrogénolyse de la fonction carbamate de benzyle conduit à l'amine **111**.

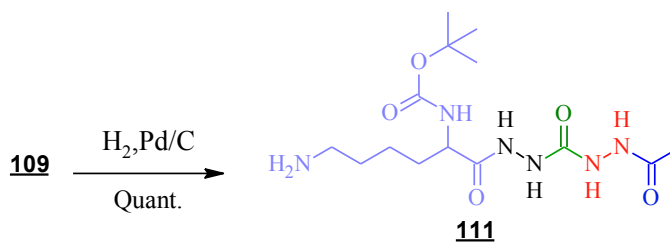


Schéma 8 : Synthèse du bras déprotégé **111**.

Le bras peptidomimétique « déprotégé » **112** est obtenu par hydrolyse acide du carbamate de *tert*-butyle *N*-protégé **110** en utilisant HCl 4M dans le dioxane.

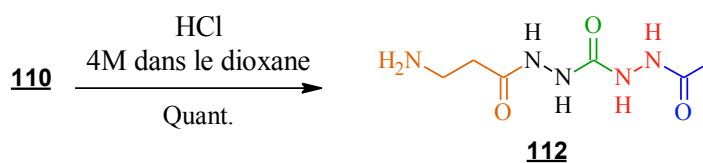


Schéma 9 : Synthèse du bras déprotégé **112**.

VII.2. Synthèse du scaffold central

Le scaffold naphthalénique **114**, avec ses deux espaceurs en position 2 et 7, est synthétisé par alkylation du 2,7-dihydroxynaphtalène commercial, par action de 4-bromobutyrate d'éthyle [Bouras *et al.*, 1999]. La saponification du diester **114** obtenu donne le diacide **115** avec un très bon rendement (97%).

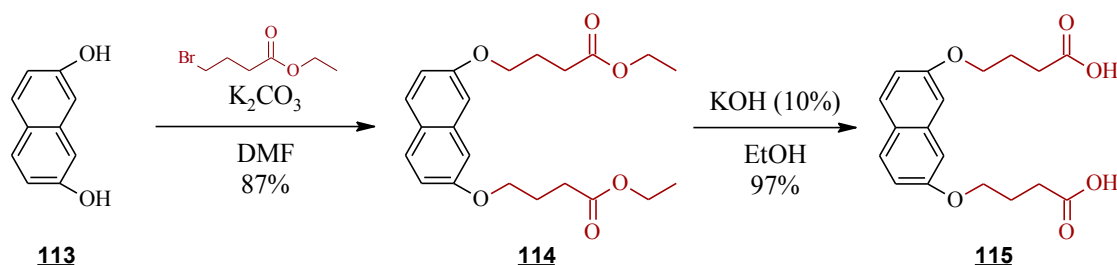


Schéma 10 : Synthèse du schaffold **115**.

VII.3. Synthèse de pinces moléculaires

Enfin, les deux pinces moléculaires symétriques **100** et **101** sont obtenues, avec des rendements satisfaisants (40% et 60% respectivement), par couplage peptidique des deux bras peptidomimétiques, **111** et **112** respectivement, avec le diacide **115** en utilisant l'HBTU et l'HOBt comme agents de couplage en présence de la DIPEA dans le DMF.

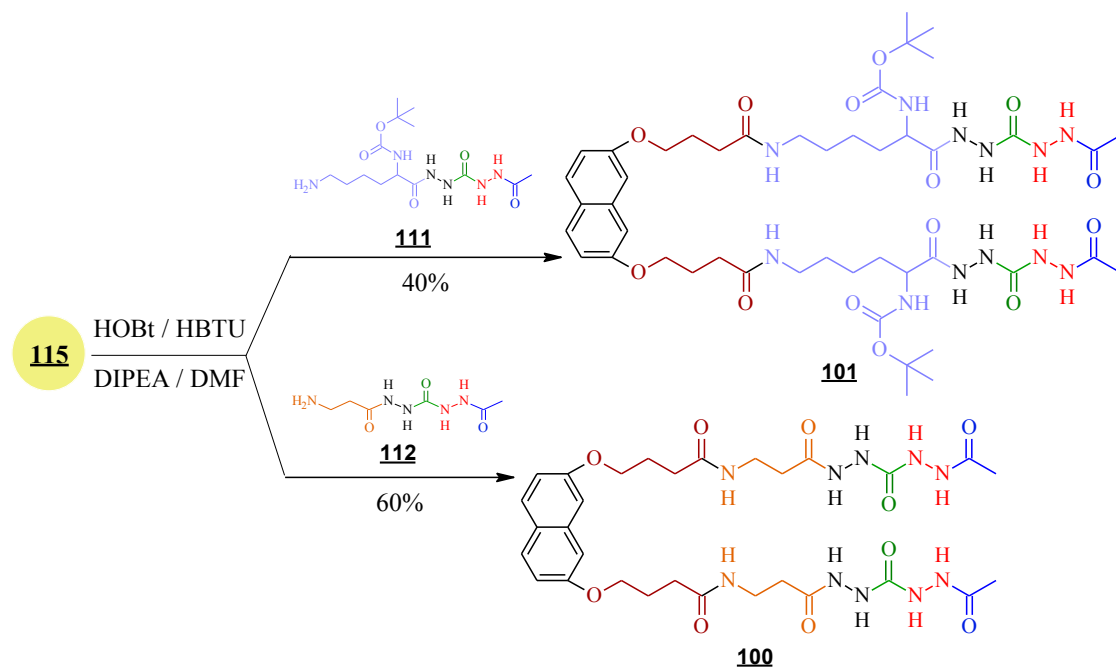


Schéma 11 : Synthèse des deux pinces peptidomimétiques **100** et **101**.

VIII. Résultats biologiques

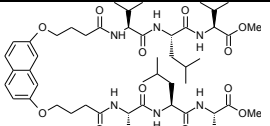
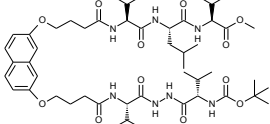
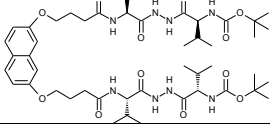
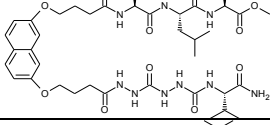
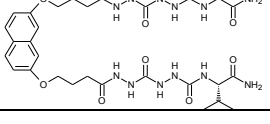
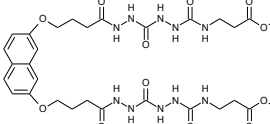
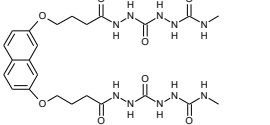
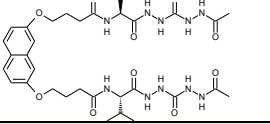
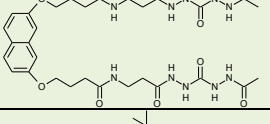
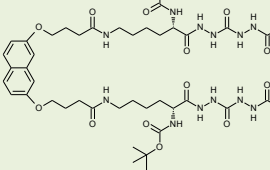
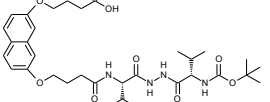
Les activités inhibitrices des pinces **92-101** sont testées par dosage fluorométrique vis-à-vis d'une lignée de PR recombinante de type sauvage à pH 4,7 et 30°C. Des analyses cinétiques de Zhang-Poorman sont aussi réalisées pour identifier leur mécanisme d'inhibition. L'ensemble des résultats obtenus avec les pinces moléculaires **100** et **101** (que j'ai synthétisées) et les pinces carbonylhydrazide **92-99**, (synthétisées au sein du laboratoire) sont résumés dans le tableau 4.

Les composés **92-95** se montrent des inhibiteurs efficaces vis-à-vis la protéase sauvage et aussi vis-à-vis des deux protéases multi-mutées, MDR-HM et l'ANAM-11. Les composés **97** et **98** montrent un faible effet inhibiteur (13% et 21% à 28µM, respectivement), tandis que les trois pinces moléculaires **96**, **100** et **101** ne présentent aucune activité inhibitrice à 28 µM.

Pour la pince moléculaire **93**, analogue de la pince totalement peptidique, il est observé que le remplacement du résidu isoleucine des deux bras peptidiques par un motif carbonylhydrazide améliore largement l'effet antidimère de ces pinces par un facteur 11 (K_{id} =50 nM pour **93** par rapport à 560 nM pour **91**). Par ailleurs, la puissance de l'activité inhibitrice est maintenue en remplaçant le résidu valine, lié au groupement carboxypropyle *via* un motif carbonylhydrazide (K_{id} =150 nM pour **94** et 90 nM pour **92**). D'une autre part, l'activité inhibitrice des pinces symétriques diminue par un facteur 14 en insérant deux motifs carbonylhydrazides liés directement au groupement carboxypropyle (K_{id} =700 nM pour **95** par rapport à 50 nM pour **93**). L'introduction d'un second motif carbonylhydrazide (azatide) en remplaçant le résidu valine terminal a presque supprimé l'activité inhibitrice des pinces moléculaires (inhibition de 21% à 28 µM pour **98** par rapport à 50 nM pour **93**).

Dans les travaux antérieurs, l'augmentation de la flexibilité au niveau des extrémités *N*-terminales une améliore l'activité inhibitrice [Vidu *et al.*, 2010]. Dans notre étude, au contraire, cette flexibilité est complètement délétère pour l'activité antidimère des pinces moléculaires **100** et **101** par rapport à la molécule **95** en introduisant une β -alanine ou une lysine (entre le scaffold et le motif carbonylhydrazide). Ceci signifie que la position la plus appropriée du motif azatide est d'être directement liée au scaffold par l'intermédiaire d'un lien carboxypropyle.

Tableau 4 : Activité inhibitrice des pinces moléculaires contre la protéase sauvage, MDR-HM et l'ANAM-11.

Composé	K_{id} (nM) PR	K_{id} (nM) MDR-HM	K_{id} (nM) ANAM-11
91 	560	nd	Nd
92 	90	160	100
93 	50	160	80
94 	150	270	170
95 	700	1600	800
Composé	% d'inhibition à 28 μ M		
96 	0		
97 	13		
98 	21		
100 	0		
101 	0		
99 	0		

Le composé **97** montre clairement que l'activité inhibitrice baisse également avec le raccourcissement des deux bras peptidomimétiques en supprimant la valinamide de l'extrémité C-terminale. De même, l'allongement de ces deux bras peptidomimétiques, dans le composé **96**, par une β -alanine sur le côté C-terminal baisse l'activité. Ces résultats peuvent être expliqués par la diminution du caractère hydrophobe des bras peptidomimétiques pour les pinces moléculaires **96** et **97** par rapport à la pince **95**, ce qui confirme les résultats antérieurs sur l'influence favorable de l'hydrophobie sur l'activité antidimérique de la PR du VIH-1 [Bouras *et al.*, 1999 ; Merabet *et al.*, 2004 ; Vidu *et al.*, 2010]. La molécule **99** (analogue des pinces **92** et **93**, mais ne portant qu'un bras peptidomimétique) n'est pas du tout inhibitrice de la dimérisation de la PR, ce qui confirme que les deux brins sont essentiels pour déstabiliser le dimère de la PR.

Enfin, la sélectivité des molécules **92-95** a été évaluée contre deux autres protéases aspartiques, la rénine monomère et la pepsine. Ni la rénine ni la pepsine n'a été inhibée par des concentrations de 10 μ M des composés **92-95** [Dufau *et al.*, 2012].

Selon les résultats obtenus (Tableau 4), les quatre nouvelles pinces moléculaires **92-95** se comportent comme des antidimères contre les deux protéases ANAM-11 et MDR-HM multimutées, qui sont des analogues des protéases trouvées dans les virus multirésistants [Dufau *et al.*, 2012].

La stabilité des pinces moléculaires symétriques **93** et **95** et asymétriques **92** et **94** a été déterminée dans un milieu de culture RPMI contenant 20% de sérum fœtal de veau. Les demi-vies des composés **92** et **94** étaient environ 24 h, ce qui est très similaire à la demi-vie de 28 h du peptide **91**. A l'inverse, les composés **93** et **95** ne sont pas significativement dégradés après une incubation de 48 h. Ces résultats suggèrent qu'elles sont plus résistantes à l'hydrolyse que les molécules peptidiques décrites précédemment [Dufau *et al.*, 2012].

Une étude de modélisation moléculaire a été réalisée au laboratoire pour corréler l'activité inhibitrice des pinces moléculaires **92-98**, **100** et **101** aux propriétés physicochimiques à savoir, clogP, surface hydrophobe et surface hydrophile. Les résultats obtenus (Tableau 5) montrent clairement une influence favorable de l'hydrophobie sur l'activité inhibitrice confirmant des observations antérieures.

VII.3. Modélisation moléculaire

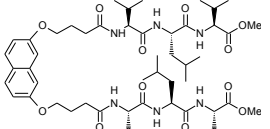
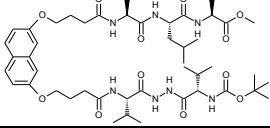
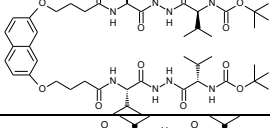
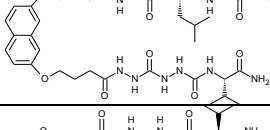
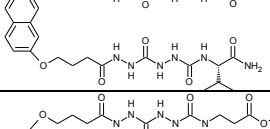
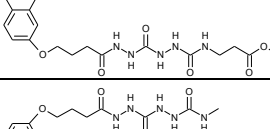
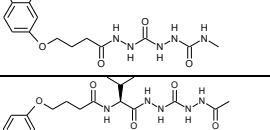
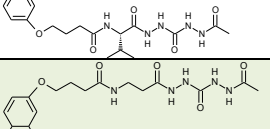
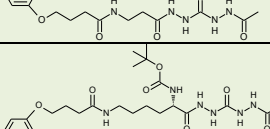
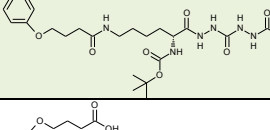
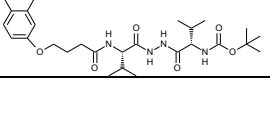
Les modèles moléculaires des pinces **92-98** et **100-101** sont obtenus en utilisant le logiciel CORINA 3.44 et la minimisation d'énergie est réalisée en utilisant la méthode de Powell implémentée dans le logiciel SYBYL 8.0. Les angles dièdres sont ensuite ajustés de telle sorte que chaque molécule est superposée sur la partie dorsale de la chaîne B (par la suite retirée) de la structure cristallographique de la protéase du HIV **7HVP** (code PDB). Les géométries des complexes résultants sont optimisées par minimisation d'énergie en utilisant le champ de force AMBER7 FF02 implémenté dans SYBYL pour détendre la structure et enlever des contraintes stériques. Les peptidomimétiques carbonylhydrazide conçus possèdent la conformation étendue compatible pour la formation d'un feuillet β (Figure 70).

Les minimisations sont réalisées par un pas de 1000 de plus grande pente suivie d'une minimisation du gradient conjugué jusqu'à ce que le gradient du potentiel RMS soit inférieur à $0,05 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-1}$. Une fonction diélectrique distance-dépendante ($\epsilon = 4r$) est utilisée. L'analyse des modèles complexes implique l'étude du réseau de liaison hydrogène et le nombre des interactions favorables.

VII.4. Estimation des surfaces accessibles et clogP

Une minimisation d'énergie, en utilisant le champ de force OPLS-2005 implémenté dans le logiciel Macromodel 9.9, est réalisée sur les coordonnées 3D des composés 1-10 et P1 libres générées par le logiciel CORNIA 3.44. Les zones de surfaces accessibles au solvant et clogP sont calculés pour ces modèles avec QikProp 3.4. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : propriétés physicochimiques (clogP, surface hydrophobe et surface hydrophile) des pinces moléculaires.

Composé	clogP	Surface hydrophobe (Å ²)	Surface hydrophile (Å ²)
91 	7.8	1467	232
92 	8.5	1443	281
93 	9.3	1391	326
94 	4.0	1079	398
95 	0.1	673	555
96 	3.2	797	570
97 	1.4	639	465
98 	3.4	911	468
100 	2.1	794	548
101 	5.6	1304	595
99 	6.4	924	270

La présence dans les bras peptidomimétiques des pinces moléculaires de fragments carbonylhydrazides (CONHNHCO) favorisant la création de liaisons hydrogène conduit à une augmentation notable de l'activité inhibitrice des composés 92 et 93 par rapport à 91, tandis que le cLogP a été légèrement amélioré.

L'activité inhibitrice et cLogP ont été améliorés tous les deux pour le composé 94, alors que pour le composé le plus soluble 95 (~ 0,3 mg/mL), l'activité inhibitrice n'a pas été diminuée. Ces données montrent que l'activité et la solubilité peuvent être augmentées en parallèle (Composé 94). Une diminution importante du cLogP et de la surface hydrophobe et l'augmentation de la surface hydrophile n'affecte pas l'efficacité inhibitrice (Composé 95).

Les complexes formés, par minimisation d'énergie, ont montré un réseau de liaisons hydrogène considérable entre les pinces moléculaires et les régions *N*- et *C*-terminales du monomère de la PR confirmant l'hypothèse de structuration en feuillet β entre ces extrémités (Figure 70). En particulier, les molécules 92-97 ont bien montré un réseau de liaisons hydrogène stable après minimisation d'énergie. Par ailleurs, aucun complexe stable n'a été observé avec les molécules 98, 100 et 101 après minimisation d'énergie. Les molécules 92-98, 101 et 101 ont montré que ces peptidomimétiques à base de motifs carbonylhydrazide adoptent une structure étendue et sont capable de mimer un brins- β .

Les résultats biologiques sont alors en accord avec l'étude de modélisation moléculaire qui montre que les pinces moléculaires 92-95 interagissent plus fortement avec le monomère que les molécules 98, 100 et 101. L'absence d'activité inhibitrice de 96 et 97 par rapport au composé 95 s'expliquerait par le manque d'acides aminés avec des chaînes latérales hydrophobes dans 96 et 97, sachant que les interactions hydrophobes sont bénéfiques pour la stabilisation des feuillets β .

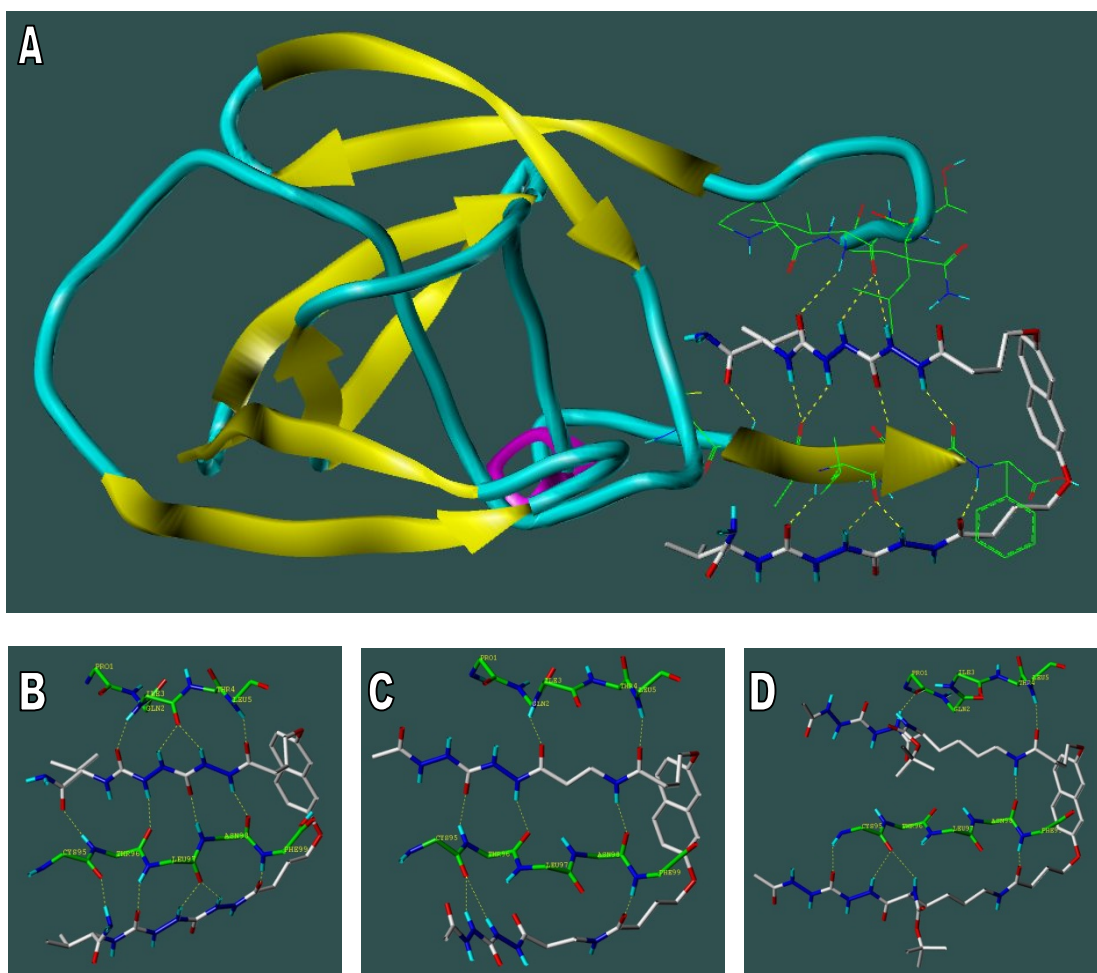


Figure 70 : Complexes possibles entre le monomère de la PR (l'extrémité *N*- et *C*-terminale d'un monomère-PR en vert) et pinces moléculaires peptidomimétiques 95 (A et B), 100 et 101 (C et D respectivement) (couleur en fonction du type d'atomes).

IX. Conclusion et Perspectives

Nous avons conçu et synthétisé une nouvelle série de pinces constituées d'un noyau central rigide « naphthalène » portant deux bras peptidomimétiques, à base de motifs carbonylhydrazides (CONHNHCO)_x et oligohydrazides (azatide), identiques ou différents par l'intermédiaire de liens carboxypropyloxy. La formation de liaisons hydrogène fait de ces peptidomimétiques de bons modulateurs des interactions protéine-protéine impliquant une structure en feuillet β. Leur scaffold central « naphthalène » confère aux pinces moléculaires une certaine rigidité et permet aux bras de la pince d'adopter une structure étendue essentielle pour mimer un brin β.

Comme preuve de concept, nous avons testé la capacité de ces molécules à perturber le feuillet β terminal de la PR du VIH-1 afin d'inhiber la dimerisation de la PR et donc son activité. La meilleure de nos pinces moléculaires non peptidiques inhibe la dimérisation de PR avec une constante d'inhibition K_{id} de 50 nM, ce qui est la meilleure inhibition de dimérisation de la PR du VIH-1 signalée à ce jour pour les pinces moléculaires.

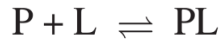
Même si les deux pinces moléculaires **100** et **101** que j'ai synthétisées n'ont présenté aucune activité inhibitrice de la protéase du VIH-1, cette étude nous a permis de réaliser une étude de relation structure-activité. D'après l'ensemble des résultats obtenus, il semblerait que la flexibilité est délétère pour l'activité inhibitrice. Les pinces peptidomimétiques à base de motifs azatide ont également augmenté solubilité dans l'eau. Cependant, les puissances inhibitrices varient considérablement selon les structures moléculaires, ce qui indique qu'il doit y avoir des équilibres appropriés entre la rigidité et flexibilité, et entre hydrophilie et hydrophobie des bras, dans le but d'obtenir des inhibiteurs puissants.

L'exemple de l'inhibiteur **95** montre qu'il n'y a pas de compromis entre la solubilité dans l'eau et l'efficacité inhibitrice. La capacité de ces molécules, résistantes à la protéolyse, à inhiber la PR multimutée ANAM-11 souligne leur capacité à surmonter avec succès la résistance à des inhibiteurs de protéases classiques rencontrées actuellement en clinique. Ces travaux ont donné lieu à une publication [*J Med Chem.*, **2012**, 55(15), 6762-6775].

Partie Expérimentale

I. Tests Biologiques

L'affinité d'une protéine pour un ligand est le degré d'attraction de la protéine pour le ligand. Si l'affinité est élevée, le ligand a plus de chance de se fixer sur la protéine. On peut utiliser la même notation que celle utilisée pour représenter les réactions chimiques :



P est la protéine, **L** le ligand, **PL** le complexe protéine-ligand. La double flèche indique que la liaison est réversible. Ces liaisons réversibles conduisent à un état d'équilibre quand la vitesse de formation de la liaison est égale à la vitesse de dissociation.

À l'équilibre, le rapport de la somme des concentrations du ligand et de la protéine à la concentration du complexe protéine-ligand est toujours le même, K_{eq} , appelé constante d'équilibre et s'applique à toutes les réactions chimiques réversibles :

$$K_{eq} = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

Dans le cas des liaisons protéine-ligand, l'équation donne une représentation quantitative de l'affinité de la protéine pour le ligand ; on appelle aussi la constante d'équilibre, **constante de dissociation, K_d** :

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

Équation qui peut aussi s'écrire :

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d}$$

Avec cette écriture, on voit bien que si K_d est grand, la valeur de $[PL]$ sera petite. Un K_d élevé traduit donc une faible affinité de la protéine pour le ligand. Si une protéine peut se lier à plusieurs ligands, la comparaison de leurs K_d respectifs permet de savoir quel est le ligand qui a la plus grande chance de se lier à la protéine. Les ligands qui sont en compétition pour un même site sont dits compétitifs. Cette compétition entre ligands est une caractéristique générale des protéines.

I.1. Matériel utilisé

PR : a été produite dans le laboratoire du Professeur Reboud (Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, FRE2852/CNRS-Université Paris 6). Elle est caractérisée par un poids moléculaire de 22 kDa et un coefficient d'extinction molaire de 12300 M^{-1} à 280 nm. Deux solutions (17 ou 34 μM) sont stockés à -80°C dans un tampon MES 50 mM, pH 6, EDTA 1 mM, DTT 1 M, NaCl 0,5 M, glycérol 5% (v/v).

Produits :

Le DMSO a été utilisé en tant que co-solvant pour aider la solubilisation de molécules dans des solutions aqueuses.

Le substrat fluorogène DABCYL- γ -Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS (Bachem) est utilisé pour mesurer l'activité de la PR. Pour cela, il est solubilisé dans du DMSO à une concentration de 3 mM et conservé à -20°C .

Les produits EDANS, 5-[(2-aminoéthyl) amino] naphthalène-1-sulfonique acide (Sigma) est utilisé en tant que standard de fluorescence.

Tampon : Le tampon utilisé est une solution d'acétate de sodium 100 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 4,7.

I.2. L'activité inhibitrice contre la PR multi-mutées

Afin d'établir si nos pinces moléculaires peptidomimétiques sont des candidats capables à surmonter les résistances rencontrées actuellement avec des inhibiteurs de la protéase classique, il est essentiel d'évaluer l'action de nos inhibiteurs de la dimérisation contre les PR mutantes résistantes aux médicaments.

Nos choix pour les mutants multirésistants étaient l'ANAM-11 [Muzammil *et al.*, 2003] et le MDR-HM [Ohtaka *et al.*, 2003]. La protéase multi-mutée ANAM-11 contient 11 mutations, dont 10 sont situées en dehors du site actif :

(L10I/M36I/S37D/M46I/R57K/L63P/A71V/G73S/L90M/I93L) et 1 dans le site actif (I84V). Cette protéase mutante (ANAM-11) réduit l'affinité de liaison de l'indinavir, nelfinavir, saquinavir et le ritonavir, par des facteurs de 2030, 2840, 4200 et 78000, respectivement.

Le mutant de MDR-HM contient six (L10I/M46I/I54V/V82A/I84V/L90M) mutations d'acides aminés situés à l'intérieur et en dehors du site actif de l'enzyme.

I.3. Méthodes cinétiques et biochimiques d'analyse

I.3.1. Propriétés de stabilité, de solubilité et spectrale de composés

Tout d'abord, la solubilité des pinces moléculaires dans le DMSO et le tampon a été systématiquement évaluée. La stabilité et la solubilité des inhibiteurs dans les tampons utilisés pour l'analyse cinétique ont été suivies sur une période de 1 h à 30 °C, en utilisant la spectrofluorométrie.

Des intervalles de 5 min ont été choisis entre deux spectres consécutifs. L'absence de changement ou de modification du spectre d'absorption (250-450 nm) montre une bonne solubilité et la stabilité dans des conditions de mesure.

I.3.2. Détermination de l'activité enzymatique

I.3.2.a. Dosage de l'activité fluorométrique

L'avantage du dosage de l'activité fluorométrique de la PR, dont le protocole a été décrit par Matayoshi et al, est d'utiliser de très petites quantités de PR et de faibles concentrations de substrat bien au-dessous de la constante de Michaelis K_m ($K_m=103$ mM). Ce dosage est basé sur le principe de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).

Le substrat fluorogène interne DABCYL- γ -Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS est constitué d'un groupe fluorescent ou d'un groupe donneur EDANS [acide 5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonique] lié par une courte chaîne peptidique à un groupe extincteur ou accepteur DABCYL [4-(4-diméthylaminophénylazo) benzoïque] (Figure 71).

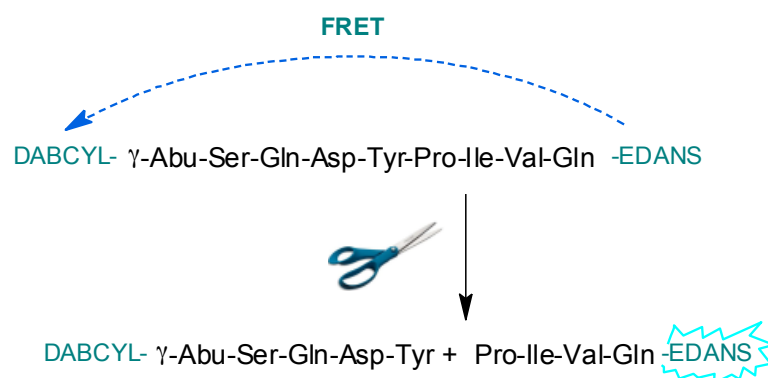


Figure 71 : Le principe de l'analyse fluorométrique de l'activité de la PR.

Le groupe EDANS absorbe la lumière à 340 nm et fluoresce à 490 nm, tandis que le groupe DABCYL, absorbe à 490 nm et il n'est pas fluorescent. La chaîne peptidique mime le site de clivage MA/CA (p17/p24) de la protéine gag-pol. Lorsque le substrat n'est pas hydrolysé, la fluorescence intrinsèque du groupe EDANS n'est pas significative en raison du transfert de son énergie d'émission par résonance pour le groupe DABCYL. Cependant, quand il y a une hydrolyse, la séparation de ces deux groupes (donneur et accepteur) de plus de 100 Å, provoquée par la rupture du site de clivage enzymatique de la PR (au niveau de la liaison Tyr-Pro) empêche le transfert d'énergie. La fluorescence émise par le fragment Pro-Ile-Val-Gln-EDANS à 490 nm est proportionnelle à la quantité de substrat hydrolysé. L'activité protéolytique peut être suivie par l'enregistrement de l'intensité de fluorescence en fonction du temps.

I.3.2.b. Activité protéolytique

La PR est d'abord diluée dans un tampon cinétique contenant 1 mg/ml de sérum albumine bovine pour stabiliser son activité enzymatique pendant toute une journée de l'expérience. Les conditions expérimentales pour l'action cinétique sont : le substrat unique ou, le substrat et l'inhibiteur, dissous avant dans du DMSO (concentration finale de 3% v / v) incubé pendant 5 min à 30 ° C.

La PR (7,5 nM) est ensuite ajoutée pour déclencher la réaction. La libération du produit d'hydrolyse du substrat (Pro-Ile-Val-Gln-EDANS) conduit à l'émergence de la fluorescence suivie pendant 3 min à 490 nm ($\lambda_{exc}=340$ nm).

Les vitesses initiales sont évaluées au cours des premiers instants de la réaction, lorsque l'intensité de fluorescence varie linéairement avec le temps. Il y a une ligne standard impliquant l'intensité de la concentration fluorescente ([EDANS] = 0-450 nM). Elle peut exprimer la vitesse d'hydrolyse en fonction du nombre de moles de substrat hydrolysé par unité de temps. Cela peut corriger les fluctuations dans l'intensité de fluorescence dues à la spectrofluoromètre. Les analyses de Zhang sont réalisées sur au moins six concentrations de la PR (3.5 nM-31,7 nM). L'inhibition de la PR est mesurée à des concentrations différentes en inhibiteur (0,56 μ M- 7 μ M).

I.3.3. Analyse cinétique de l'inhibition

a. Détermination des valeurs IC₅₀

La valeur IC₅₀ correspond, pour une concentration donnée de substrat, à la concentration de l'inhibiteur conduisant à une réduction de 50% de l'activité enzymatique.

Pour déterminer la valeur IC₅₀ d'un produit, quand l'effet inhibiteur varie de 10 à 80%, on calcule les pourcentages de l'inhibition de la PR (Equation 01) qui sont déterminées par rapport à l'activité enzymatique en absence de l'inhibiteur (contrôle). Ce calcul est effectué pour sept à douze concentrations du produit en question.

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (V_i(I)/V_i(0) = 100 \times [I]_0/(IC_{50}+[I]_0) \quad (01)$$

$V_i(I)$ = Taux d'inhibition en présence de l'inhibiteur,

$V_i(0)$ = Taux d'inhibition en absence de l'inhibiteur,

$[I]_0$ = Concentration initiale de l'inhibiteur.

Pour un inhibiteur compétitif, la valeur de la constante d'inhibition K_{ic} peut être estimée à partir de la valeur IC₅₀ en utilisant l'équation de Cheng & Prusoff (Equation 02) :

$$IC_{50} = K_{ic} (1 + [S]_0/K_m) \quad (02)$$

Où $[S]_0$ est la concentration initiale du substrat et de K_m , la constante de Michaelis.

b. Déterminer le mécanisme d'action et la cinétique de l'inhibition

Quand une molécule montre un puissant caractère inhibiteur, le mécanisme d'inhibition est obtenu par l'analyse cinétique. Pour cela, différentes techniques sont utilisées pour évaluer les constantes caractéristiques de l'inhibition. Tout d'abord, nous commençons par déterminer l'inhibition réversible et irréversible. Sachant que l'inhibition réversible est caractérisée par la formation de liens faibles entre l'enzyme et l'inhibiteur. L'activité de l'enzyme dans ce cas apparaisse après le retrait de l'inhibiteur. Cependant, il n'est pas possible de retrouver l'activité de l'enzyme après l'action d'un inhibiteur irréversible parce que l'inhibiteur est lié à l'enzyme par une liaison covalente. Deux méthodes sont utilisées pour déterminer les constantes cinétiques, la méthode de Dixon et la méthode de Zhang.

Dans le cas de la dimérisation, la méthode choisie est celle de Zhang. Les différents états d'équilibre atteints par monomère **M**, enzyme dimérique **D**, substrat **S**, et l'inhibiteur **I** sont représentés à la figure suivante :

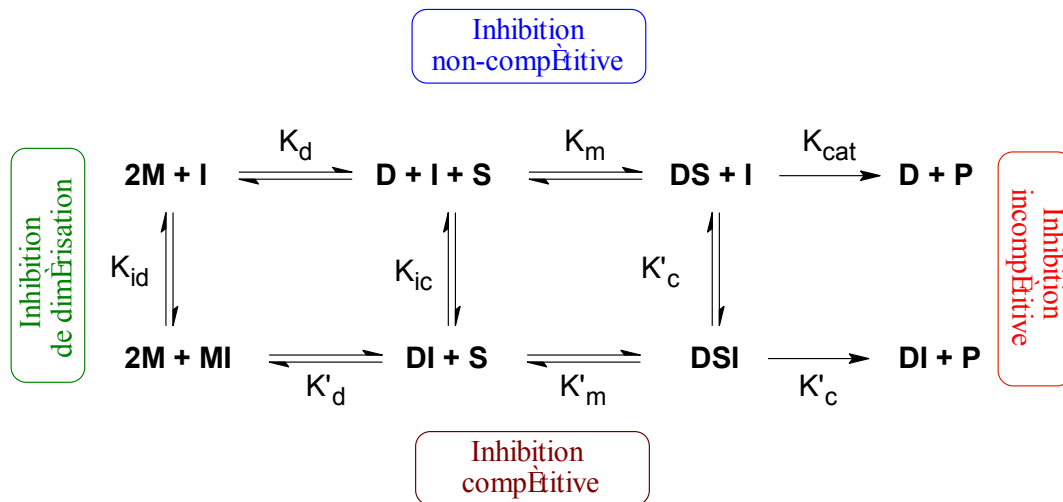


Figure 72 : Les différents états d'équilibre atteints par monomère **M**, enzyme dimérique **D**, substrat **S**, et l'inhibiteur **I**

b.1. L'inhibition compétitive

L'inhibiteur en compétition avec le substrat pour occuper du site catalytique et forme un complexe enzyme-inhibiteur. L'inhibition incompétitive : l'inhibiteur ne peut pas se lier à l'enzyme libre. Il a une affinité pour le complexe enzyme-substrat et forme un complexe ternaire inactif.

b.2. Inhibition non compétitive

L'inhibiteur se lie soit à l'enzyme libre ou au complexe enzyme-substrat.

b.3. L'inhibition de la dimérisation

Dans le cas où les molécules sont susceptibles d'interagir avec le feuillet-β antiparallèle de la PR, la méthode classique de Dixon n'est plus adéquate car il ne distingue pas un inhibiteur du site actif d'un inhibiteur de la dimérisation. Dans les deux cas, l'analyse cinétique en utilisant cette méthode ne peut conduire qu'à une inhibition compétitive. La seule méthode qui permet d'identifier un inhibiteur de la dimérisation et donne accès à la constante d'inhibition de la dimérisation (K_{id}) a été décrite par Zhang.

Compte tenu des différentes définitions des constantes d'équilibre (K_m , K_{ic} , K_{id} , etc), la vitesse de réaction enzymatique et les lois de conservation de formes d'enzyme, on peut exprimer la concentration totale de l'enzyme $[E]_0$, en fonction de la concentration du substrat $[S]$ et la concentration de l'inhibiteur $[I]$ (Équation3).

$$[E]_0 = \frac{v}{[S]} \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K'_c}\right)}{K_{cat} + K'_{cat} \frac{[I]}{K'_c}} + \sqrt{\frac{v}{[S]}} \frac{\sqrt{\frac{K_d K_m}{4} \left(1 + \frac{[I]}{K'_{id}}\right)}}{\sqrt{K_{cat} + \frac{K'_{cat} [I]}{K'_c}}} \quad (03)$$

Terme I

Terme II

Dans le premier terme sont impliqués les constantes des K_{ic} et des K'_c , correspondante pour l'inhibition compétitive et incompetitive tandis que le second terme de la constante de dissociation du dimère en monomères (K_d) et la constante inhibition de la dimérisation (K'_{id}).

La loi pour une inhibition de la dimérisation est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{[E]_0}{\sqrt{K_{exp}}} = \sqrt{K_{exp}} \frac{K_m}{K_{cat}} + \sqrt{\frac{K_d K_m}{4} \left(1 + \frac{[I]}{K_{id}}\right)} \quad (04)$$

La constante K_{exp} étant définit par : $K_{exp} = v / [S]$.

Diviser l'équation 4 par $4 (v_i)^{1/2}$ on obtient l'équation 5 pour le cas d'un inhibiteur compétitif, l'équation 6 dans le cas d'un inhibiteur de dimérisation et l'équation 7 pour un inhibiteur mixte.

$$\frac{[E]_0}{\sqrt{v_i}} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{id}}\right)}{K_{cat} [S]} \sqrt{v_i} + \sqrt{\frac{K_m K_d}{4 [S] K_{cat}}} \quad (05)$$

$$\frac{[E]_0}{\sqrt{v_i}} = \frac{K_m}{K_{cat} [S]} \sqrt{v_i} + \sqrt{\frac{K_m K_d}{4 [S] K_{cat}}} \left(1 + \frac{[I]_0}{K_{id}}\right) \quad (06)$$

$$\frac{[E]_0}{\sqrt{v_i}} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{K_{cat} [S]} \sqrt{v_i} + \sqrt{\frac{K_m K_d}{4 [S] K_{cat}}} \left(1 + \frac{[I]_0}{K_{id}}\right) \quad (07)$$

Les courbes respectives sont représentées dans la figure 73. Les lignes obtenues pour les différentes concentrations d'inhibiteurs convergent sur l'axe des y pour un inhibiteur compétitif, elles sont parallèles quand on a une inhibition de la dimérisation. Par ailleurs, pour un inhibiteur mixte elles ne sont pas parallèles et ne convergent pas sur l'axe des y.

Les valeurs des constantes K_{ic} et K_{id} sont calculées respectivement à partir des valeurs des ordonnées à l'origine par les équations suivantes :

$$K_{ic} = a_0 \times [I]/(a_i - a_0)$$

$$K_{id} = b_0 \times [I]/(a_i - a_0)$$

a_i et a_0 représentent les pentes des droites obtenues respectivement en présence et en absence d'inhibiteur,

b_i et b_0 représentent intercepter lignes obtenues respectivement en présence ou en absence de l'inhibiteur.

K_{ic} = Inhibition compétitive,

K_{id} = Inhibition constante de dimérisation.

En pratique, deux concentrations des inhibiteurs sont choisies et testées en présence de six à dix concentrations d'enzyme pour une concentration fixe du substrat.

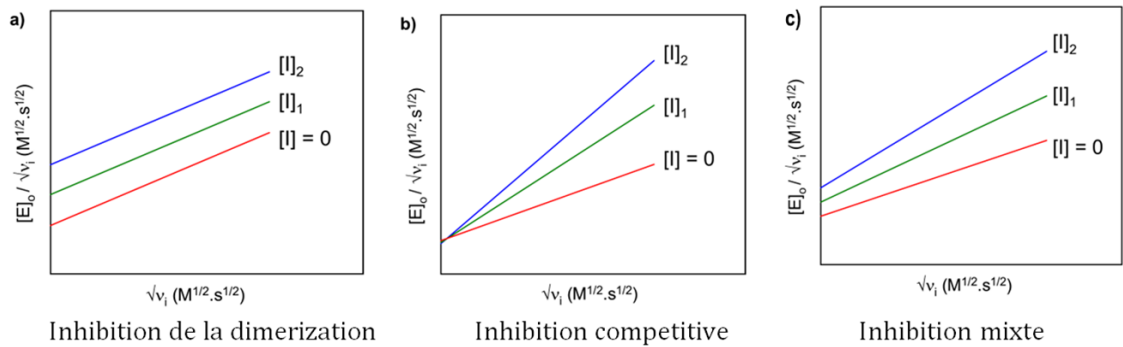
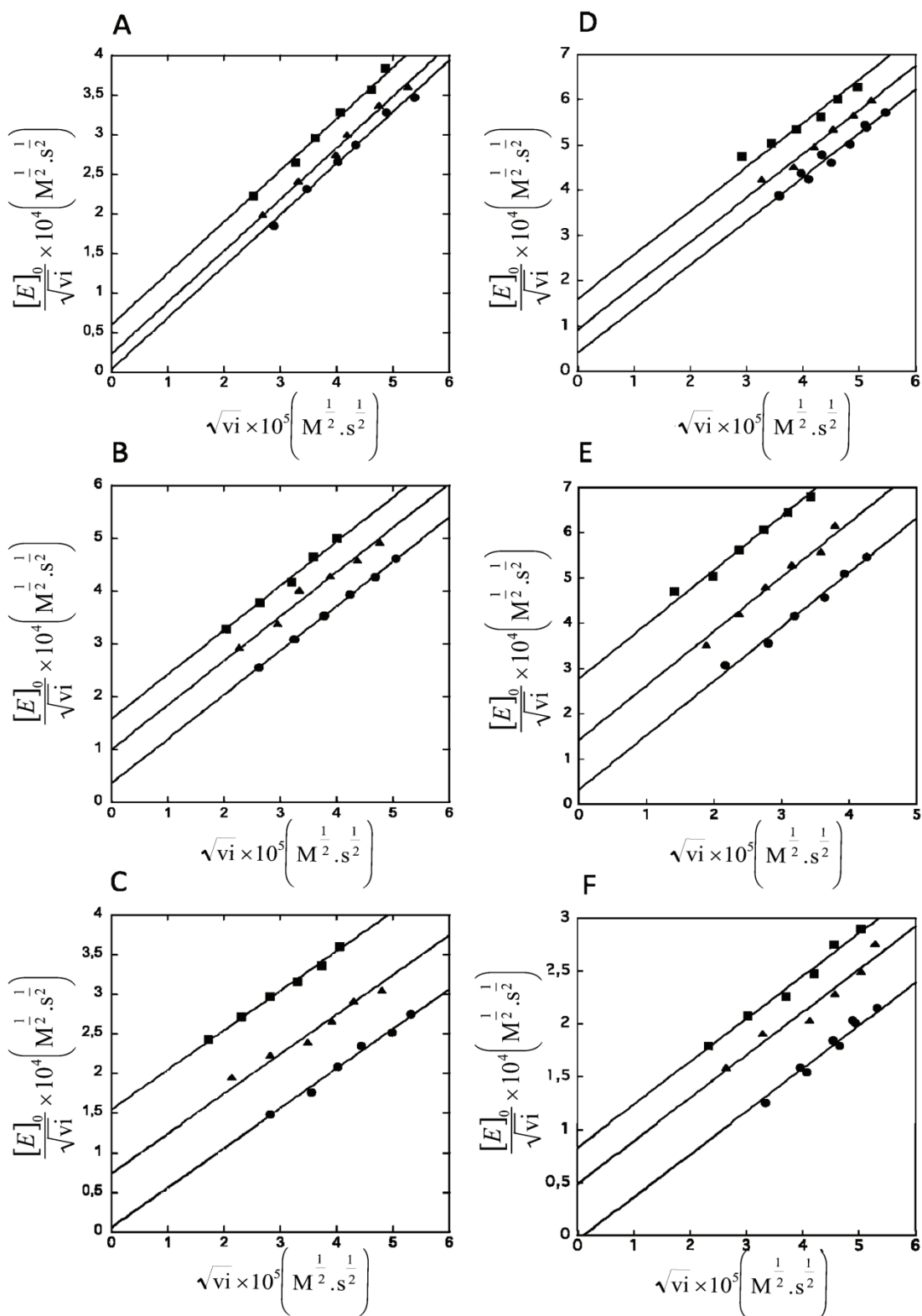


Figure 73 : Courbes de Zhang.



I.3.4. Liaison de la sonde fluorescente

L'ANS (1-anilino-8-naphtalène-sulfonate) se lie préférentiellement aux surfaces hydrophobes des protéines. Les spectres d'émission d'ANS ont été mesurés en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 370 nm et une longueur d'onde d'émission de 470 nm avec des bandes passantes de 10 et 5 nm, respectivement (Spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS 50B). La PR (350 nM) est dissoute dans le tampon de dosage (acétate de sodium 100 mM, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, pH 4,7) et incubée à 25 °C avec ou sans inhibiteur (5 μ M; acetylpepsatin, le saquinavir, les composés 1, 2, 3, 4, et P1). L'ANS (2 μ L, les concentrations finales : 10-60 μ M) a été ensuite ajouté. Dans tous les cas, la concentration finale de DMSO était de 0,2% (v/v).

Chaque mesure de la fluorescence a été faite cinq fois. La fluorescence intrinsèque de la PR, de l'acetylpepsatine, du saquinavir et des composés 1, 2, 3, 4, et P1 est négligeable dans les conditions expérimentales utilisées (Figure 75).

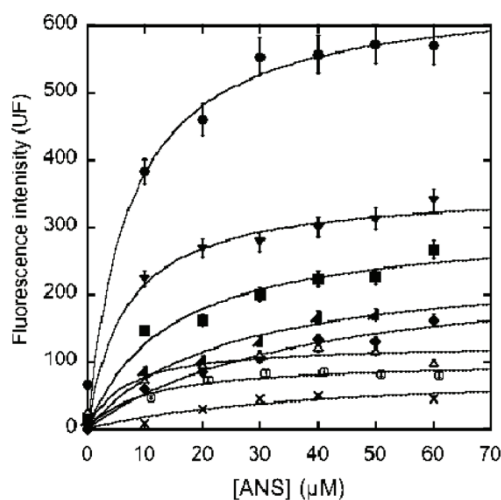


Figure 75: fluorescence d'émission ANS (470 nm) mesurée à pH 4.7 et 25 °C. La longueur d'onde d'excitation était de 370 nm. PR (275 nM) a été préincubée en absence d'inhibiteur (Δ) ou en présence de l'acetylpepsatin ($\times$), saquinavir ($\circ$), et composés 1 ($\blacksquare$), 2 ($\bullet$), 3 ($\blacktriangle$), 4 ($\blacklozenge$), et P1 ($\blacktriangledown$) avant l'addition de l'ANS. La concentration finale de DMSO était toujours de 0,2% (v/v). L'intensité de fluorescence a été corrigée pour la fluorescence des mêmes concentrations de l'ANS et un inhibiteur sans l'enzyme.

I.3.5. Évaluation de la stabilité métabolique

La stabilité des inhibiteurs dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institut Medium), milieu de culture contenant 20% de sérum fœtal de veau, est évaluée par l'étude de leur cinétique de décomposition à 37 ° C pendant 2 jours. Les incubations sont arrêtées par addition de l'éthanol. Le mélange a été versé à 4 ° C et centrifugé (10000 rpm pendant 10 min). Des aliquots du surnageant clair sont injectés sur une colonne HPLC (Waters E600). La demi-vie de décomposition a été obtenue par analyse linéaire de régression des moindres carrés de la courbe semi-logarithmique de la concentration d'inhibiteur en fonction de la durée d'incubation.

I.3.6. L'inhibition de la rénine et la pepsine

L'activité protéolytique de la rénine a été déterminée en utilisant la fluorimétrie d'un substrat fluorogène Arg-Glu (EDANS)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys-(DABCYL)-Arg. Les analyses ont été effectuées dans 50 mM Tris-HCl, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, et une concentration du substrat de 5 μ M (λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 500 nm).

L'activité protéolytique de la pepsine issue de la muqueuse gastrique de porc a été déterminée en utilisant la fluorimétrie d'un substrat fluorogène : Abz-Thr-Ile-Nle-(*p*-NO₂-Phe)-Gln-Arg-NH₂. Les analyses ont été effectuées dans 10 mM NaHCOO, pH 3,5, et une concentration de substrat de 20 μ M (λ_{ex} = 337 nm, λ_{em} = 410 nm)

II. Matériel et méthodes

Tous les **solvants** sont distillés : le *N,N*-diméthylformamide (DMF) sur CaSO_4 , le tétrahydrofurane (THF) sur sodium / benzophénone, l'acétonitrile sur CaCl_2 et sur de l'hydruure de calcium.

Les **chromatographies sur couche mince** (CCM) sont effectuées sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice (Merck 60 F₂₅₄). Les plaques visualisées par UV ($\lambda=254$ ou 365 nm) et révélées soit par une solution de vanilline, de ninhydrine ou d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol.

Les **chromatographies en phase liquide** sont effectuées sous pression avec de la silice « Geduran » de granulométrie 40-63 μm .

Les **points de fusion** sont mesurés sur un banc chauffant « Wagner & Munz » système Kofler.

Les **spectres infra-rouge** (IR) sont enregistrés sur un appareil Bruker Vector 22 à transformé de Fourier.

Les **analyses élémentaires** (C, H, N) sont réalisées sur un analyseur CHN Perkin-Elmer 2400.

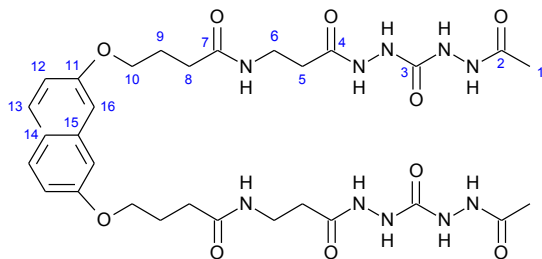
Les **spectres de résonance magnétique nucléaire** (RMN) sont effectuées sur un appareil Bruker AMX 200 (à 200 MHz pour ^1H et 188 MHz pour ^{19}F), Bruker Avance 300 (à 300 MHz pour ^1H et 75 MHz pour ^{13}C) ou un Bruker Avance 400 (à 400 MHz pour ^1H et 101 MHz pour ^{13}C). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm, et les abréviations suivantes sont utilisées pour la RMN ^1H : singulet (s), doublet (d), doublet doublet (dd), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m) et singulier large (bs). Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz.

Les **spectres de masse** sont obtenus en utilisant un appareil Esquire Bruker munie d'une source électrospray et avec pour analyseur une trappe à ion.

Certaines **hydrogénolyses** sont effectuées sur un appareil H-Cube®, HC-2.55 ThalesNano Nanotechnology Inc, en utilisant une cartouche 10% Pd/C.

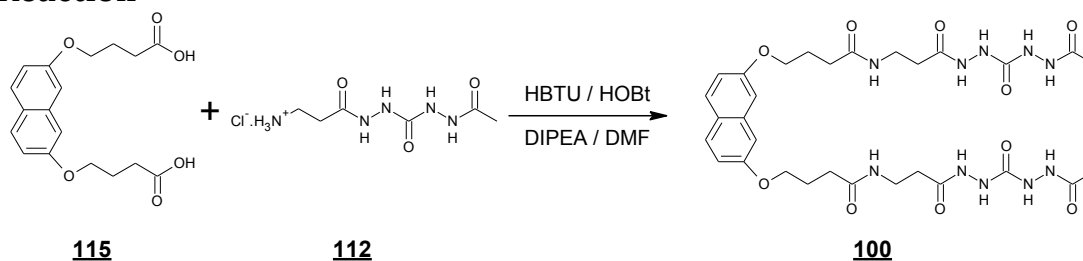
III. Description des composés

Molécule **100**



Formule brute :	: C ₃₀ H ₄₂ N ₁₀ O ₁₀
Masse molaire (g/mol)	: 702.72
Aspect	: Solide marron
R^{dt} (%)	: 40
T_F (°C)	: 225-227
μ-Analyse	: C ₃₀ H ₄₂ N ₁₀ O ₁₀ ·3H ₂ O
Théorique	: (47.61%) H(6.41%) N(18.51%)
Expérimentale	: (42.24%) H(6.64%) N(18.44%)
IR (cm⁻¹)	: 3215, 1642, 1542, 1212
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 9.53 (bs, 4H, NH), 8.24 (bs, 4H, NH), 7.90 (bs, 2H, NH), 7.70 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H), 7.18 (s, 2H), 6.96 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2 Hz, 2H), 4.05 (m, 4H, H ₁₀), 3.27 (m, 4H, H ₆), 2.27 (m, 8H, H ₈ and H ₅), 2.00 (m, 4H, H ₉), 1.80 (s, 6H, H ₁)
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 171.6 (C ₄), 170.2 (C ₇), 168.8 (C ₂), 157.5 (C ₃), 157.0, 135.8 (C ₁₄), 128.9 (C ₁₃), 123.7 (C ₁₅), 115.9 (C ₁₂), 106.1 (C ₁₆), 66.9 (C ₁₀), 35.1 (C ₆), 33.5 (C ₅), 31.7 (C ₈), 24.8 (C ₉), 20.6 (C ₁).
SM (ESI Positive/MeOH)	: 725 [M+Na] ⁺

Réaction

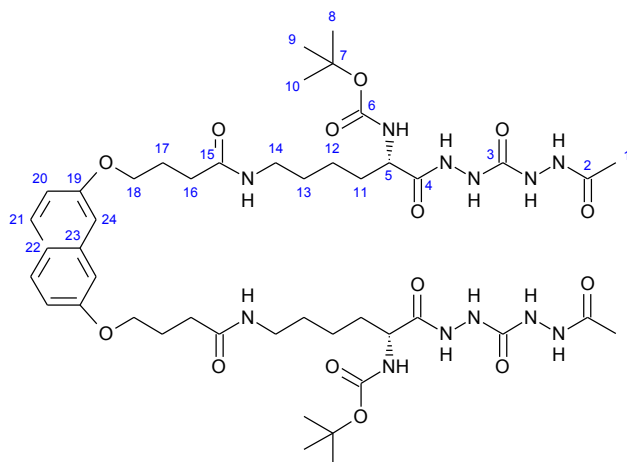


Mode opératoire

Le dérivé **112** (100 mg, 0.42 mmol, 2.2 eq) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute alors de la DIPEA (0.23 mL, 1.33 mmol, 7 eq) puis successivement, HOBt (56 mg, 0.42 mmol, 2.2 eq), HBTU (180 mg, 0.47 mmol, 2.5 eq) et **115** (63 mg, 0.19 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le résidu obtenu est dissous dans de l'AcOEt.

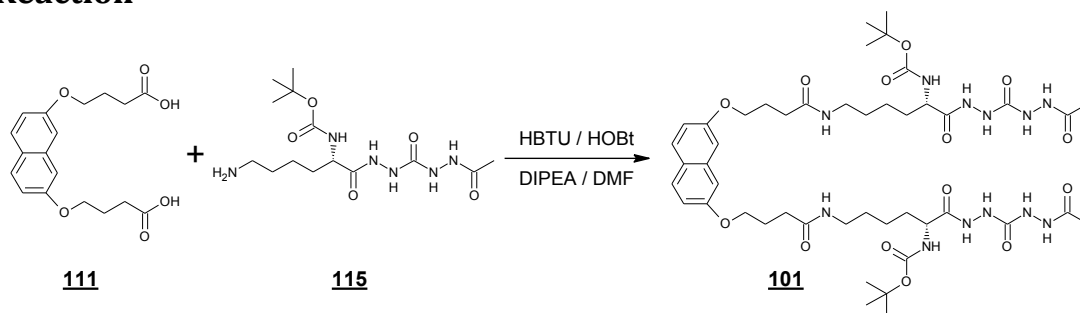
La phase organique est lavée avec de l'eau avec précipitation d'un solide qui est récupéré et lavé successivement avec : H₂O, K₂CO₃ (10%), AcOEt et DCM puis séché sous vide avec du P₂O₅ pour obtenir **100** (53 mg, 0.075 mmol, 39%) sous forme d'un solide marron.

Molécule **101**



Formule brute :	: C ₄₆ H ₇₂ N ₁₂ O ₁₄
Masse molaire (g/mol)	: 1017.14
Aspect	: Solide Jaune
R^{dt} (%)	: 60
T_F (°C)	: 157-159
μ-Analyse	: C ₄₆ H ₇₂ N ₁₂ O ₁₄ • 4H ₂ O
Théorique	: C(50.72%) H(7.42%) N(15.43%)
Expérimentale	: C(50.91%) H(6.86%) N(14.55%)
IR (cm⁻¹)	: 3277, 2967, 1629, 1514, 1160.
RMN ¹H (300MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 7.63 (d, J = 9Hz, 2H, H ₂₁), 7.12 (s, 2H, H ₂₀), 6.94 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 2H, H ₂₄), 4.10 (m, 4H, H ₁₈), 3.98 (t, J = 7.1Hz, 2H, H ₅), 3.19 (m, 4H, H ₁₄), 2.42 (t, J = 7.3Hz, 4H, H ₁₆), 2.13 (m, 4H, H ₁₇), 1.97 (s, 6H, H ₁), 1.75 (m, 2H, H ₁₁), 1.64 (m, 2H, H ₁₁), 1.51 (m, 4H, H ₁₃), 1.43 (s, 18H, H _{10/9/8}), 1.42 (m, 4H, H ₁₂).
RMN ¹³C (75MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 175.6, 175.0 (C ₁₅ and C ₄), 173.1 (C ₂), 159.9 (C ₁₉), 158.8, 158.1 (C ₆ and C ₃), 137.5 (C ₂₃), 130.0 (C ₂₁), 125.8 (C ₂₂), 117.2 (C ₂₀), 107.3 (C ₂₄), 80.9 (C ₇), 68.2 (C ₁₈), 54.9 (C ₅), 40.1 (C ₁₄), 33.7 (C ₁₆), 32.4 (C ₁₁), 30.0 (C ₇), 28.7 (C _{10/9/8}), 26.7 (C ₁₇), 24.0 (C ₁₂), 20.5 (C ₁).
SM (ESI Positive/MeOH)	: 1039.8 [M+Na] ⁺

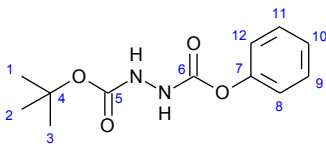
Réaction



Mode opératoire

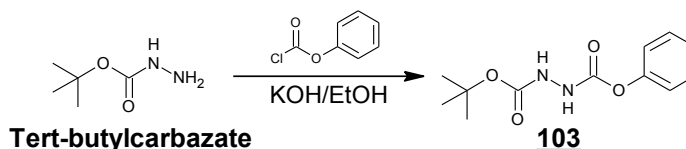
Le composé **111** (160 mg, 0.44 mmol, 2.2 eq) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute alors de la DIPEA (0.18 mL, 1.0 mmol, 5 eq) puis successivement, HOBt (60 mg, 0.44 mmol, 2.2 eq), HBTU (191 mg, 0.50 mmol, 2.5 eq) et **115** (67 mg, 0.2 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans de l'Et₂O jusqu'à l'obtention d'un solide qui après lavage successif avec différents solvants (AcOEt, DCM et Et₂O) puis séchage sous vide avec P₂O₅ permet d'obtenir le produit **101** (120 mg, 0.12 mmol, 60%)

Phenyl *N*-(*ter*-butoxycarbonylamino) carbamate **103**



Formule brute :	: C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄
Masse molaire (g/mol) :	: 252.27
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%) :	: 93
R_F	: 0.4 (cyclohexane /AcOEt : 70/30)
T_F(°C) :	: 132-134
IR (cm⁻¹) :	: 3223, 2969, 1758, 1723, 1692, 1519, 1213, 1177, 1025.
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 7.38-7.33 (t, <i>J</i> = 7.7, 2H, H ₉ and H ₁₁), 7.24-7.14 (m, 3H, H ₈ , H ₁₀ and H ₁₂), 7.00 (bs, 1H, NH), 6.50 (bs, 1H, NH), 1.49 (s, 9H, H _{1/2/3}).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 155.6 (C ₆), 155.3 (C ₅), 150.6 (C ₇), 129.4 (C ₉ and C ₁₁), 125.8 (C ₁₀), 121.4 (C ₈ and C ₁₂), 82.2 (C ₄), 28.2 (C _{1/2/3}).
SM (ESI Positive/MeOH)	: 275 [M+Na] ⁺

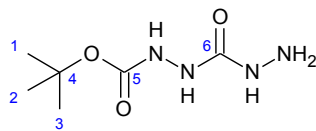
REACTION



Mode opératoire

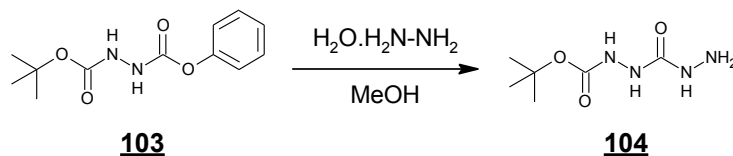
Le *tert*-butyl carbazate (2 g, 15.13 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors de la pyridine (2.71 mL, 33.29 mmol, 2.2 eq). Une solution de phényl Chloroformate (2.08 mL, 16.64 mmol, 1.1 eq) dans 10 mL de DCM est ensuite ajoutée goutte à goutte pendant 30 min à 0°C et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans l'AcOEt (400 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), de l'eau (100 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et à nouveau avec de l'eau (100 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (80/20) comme éluant pour donner **103** (3.53 g, 14 mmol, 93%) sous forme d'une poudre blanche.

***tert*-butyl N-(hydrazinecarbonylamino) carbamate 104**



Formule brute :	: C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₃
Masse molaire (g/mol)	: 190.20
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 72
R_F	: 0.3 (AcOEt/MeOH, 80:20)
T_F (°C)	: 134-136
IR (cm⁻¹)	: 3252, 2974, 1730, 1651, 1229, 1173.
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 8.41 (bs, 1H, NH), 7.80 (s, 1H, NH), 7.34 (s, 1H, NH), 4.04 (bs, 2H, NH ₂), 1.38 (s, 9H, H _{1/2/3}).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 159.9 (C ₅), 155.9 (C ₆), 78.7 (C ₄), 28.1 (C ₇).
SM (ESI Positive/MeOH)	: 213 [M+Na] ⁺

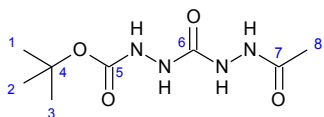
Réaction



Mode opératoire

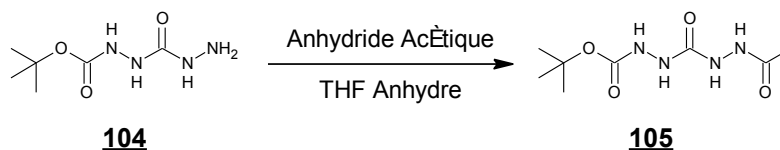
Le dérivé 103 (6.5 g, 25.77 mmol) est mis en solution dans 100 mL de MeOH. On ajoute alors de l'hydrazine monohydrate (8.14 mL, 167.5 mmol, 6.5 eq) et le mélange réactionnel est agité 1.5 h à reflux. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans l'AcOEt (400 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), de l'eau (100 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et à nouveau de l'eau (100 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther de pétrole. Le composé 104 (3.54 g, 18.6 mmol, 72%) est obtenu sous forme d'un précipité blanc après recristallisation dans un mélange AcOEt/Ether de pétrole.

***tert*-butyl N-(hydrazinecarbonylamino) carbamate 105**



Formule brute :	: C ₈ H ₁₆ N ₄ O ₄
Masse molaire (g/mol)	: 232.24
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 96
R_F	: 0.5 (AcOEt/MeOH, 80:20)
T_F (°C)	: 118-120
μ-Analyse	: C ₈ H ₁₆ N ₄ O ₄ • 0.15H ₂ O
Théorique	: C (40.44%) H (7.06%) N (23.59%)
Expérimentale	: C (40.54%) H (6.92%) N (23.23%)
IR (cm⁻¹)	: 3301, 1663, 1521, 1238, 1158.
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 9.46 (s, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, NH), 8.09 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, NH), 1.80 (s, 3H, H ₈), 1.39 (s, 9H, H _{1/2/3}).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	: 168.7 (C ₇), 157.7 (C ₅), 155.8 (C ₆), 78.8 (C ₄), 28.05 (C _{1/2/3}), 20.56 (C ₈).
SM (ESI Positive/MeOH)	: 255 [M+Na] ⁺

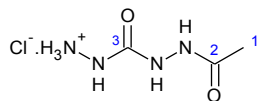
REACTION



Mode opératoire

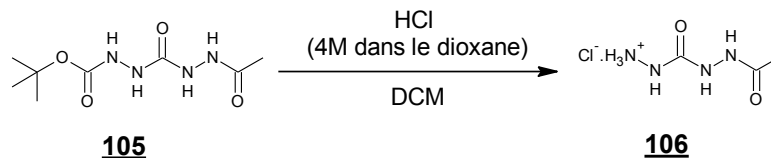
Le dérivé 104 (3 g, 15.7 mmol) est mis en solution dans 180 mL de THF anhydre. On ajoute alors de l'anhydride acétique (7.45 mL, 78.8 mmol, 5 eq) et le mélange réactionnel est agité 1.5 h à reflux. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans du DCM. Le précipité obtenu est lavé avec de l'éther de pétrole pour donner 105 (3.5 g, 15 mmol, 96%) sous forme d'un solide blanc.

Composé 106



Formule brute :	: C ₃ H ₉ ClN ₄ O ₂
Masse molaire (g/mol)	: 168.58
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: quantitatif
T_F (°C)	: 194-196
IR (cm⁻¹)	: 2980, 2691, 1739, 1567, 1535, 1480, 1259.
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 10.13 (br, 3H, NH ₃ ⁺), 9.73 (s, 1H, NH), 9.44 (br, 1H, NH), 8.80 (s, 1H, NH), 1.85 (s, 3H, H ₁).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 169.1 (C ₂), 157.3 (C ₃), 20.6 (C ₁).
SM (ESI Positive/MeOH)	: 133 [M+H] ⁺ / 155 [M+Na] ⁺

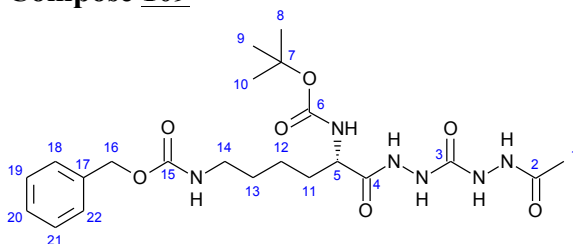
Réaction



Mode opératoire

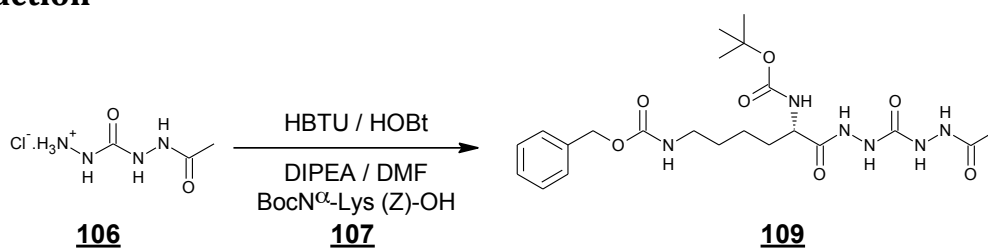
Le dérivé 105 (88 mg, 0.38 mmol) est mis en solution dans 4 mL d'HCl (4M dans le dioxane). Le mélange réactionnel est agité 2h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le chlorhydrate 106 est récupéré quantitativement sous forme d'un solide blanc.

Composé **109**



Formule brute	: C ₂₂ H ₃₄ N ₆ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 494.54
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 30
R_F	: 0.5 (AcOEt/MeOH, 80:20).
T_F (°C)	: 129-131
μ-Analyse	: C ₂₂ H ₃₄ N ₆ O ₇ ·1H ₂ O
Théorique	: C (51.55%) H (7.09%) N (16.40%)
Expérimentale	: C (51.21%) H (6.96%) N (16.64%)
IR (cm⁻¹)	: 3307, 1665, 1522, 1246, 1167
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 9.65 (br, 1H, NH), 9.49 (br, 1H, NH), 8.32 (br, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, NH), 7.37-7.32 (m, 5H, H _{22/18} , H _{21/19} and H ₂₀), 7.24 (t, J = 5.2 Hz, 1H, NH), 6.87 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.00 (s, 2H, H ₁₆), 3.92-3.85 (m, 1H, H ₅), 2.99-2.93 (m, 2H, H ₁₄), 1.80 (s, 3H, H ₁), 1.61-1.47 (m, 2H, H ₁₁), 1.40-1.24 (m, 13H, H _{10/9/8} , H ₁₃ and H ₁₂).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 175.3 (C ₄), 173.3 (C ₂), 160.0 (C ₃), 159.1, 158.3 (C ₁₅ and C ₆), 138.6 (C ₁₇), 129.6 (C _{21/19}), 129.1, 128.9 (C _{22/18} and C ₂₀), 81.0 (C ₇), 67.5 (C ₁₆), 55.1 (C ₅), 41.6 (C ₁₄), 32.6 (C ₁₁), 30.6 (C ₁₃), 28.9 (C _{10/9/8}), 24.0 (C ₁), 20.7 (C ₁₂).
SM (ESI Négative/MeOH)	: 493.3 [M-H] ⁻

Réaction

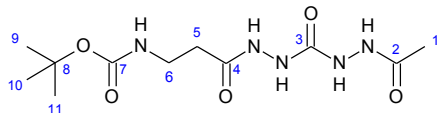


Mode opératoire

Le dérivé **106** (100 mg, 0.59 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute alors de la DIPEA (0.62 mL, 3.56 mmol, 6 eq) puis successivement, HOBt (88 mg, 0.65 mmol, 1.1 eq), HBTU (270 mg, 0.71 mmol, 1.2 eq) et *N*α-Boc-Z-Lys-OH **107** (248 mg, 0.65 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 24h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans du DCM (100 mL) et lavé avec de l'eau (100 mL).

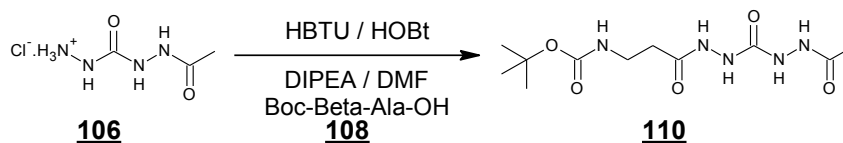
La phase organique est ensuite concentrée sous pression réduite pour obtenir une huile. **109** (88 mg, 0.18 mmol, 30%) est obtenu sous forme d'un solide blanc après purification par chromatographie sur une colonne de gel de silice en éluant avec un mélange AcOEt/MeOH (90:10).

Composé **110**



Formule brute :	: C ₁₁ H ₂₁ N ₅ O ₅
Masse molaire (g/mol)	: 303.31
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 12
R_F	: 0.66 (AcOEt/MeOH, 80:20).
T_F (°C)	: 145-147
IR (cm⁻¹)	: 3245, 1659, 1511, 1164
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 9.54 (s, 1H, NH), 9.49 (s, 1H, NH), 8.21 (br, 2H, NH), 6.77-6.74 (m, 1H, NH), 3.17-3.09 (m, 2H, H ₆), 2.28-2.22 (m, 2H, H ₅), 1.80 (s, 3H, H ₁), 1.37 (s, 9H, H _{11/10/9}).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 174.0 (C ₄), 173.2 (C ₂), 160.1 (C ₃), 158.3 (C ₇), 80.2 (C ₈), 37.6 (C ₆), 35.2 (C ₅), 28.7 (C _{11/10/9}), 20.6 (C ₁).
SM (ESI Négative/MeOH)	: 302 [M-H] ⁻

Réaction

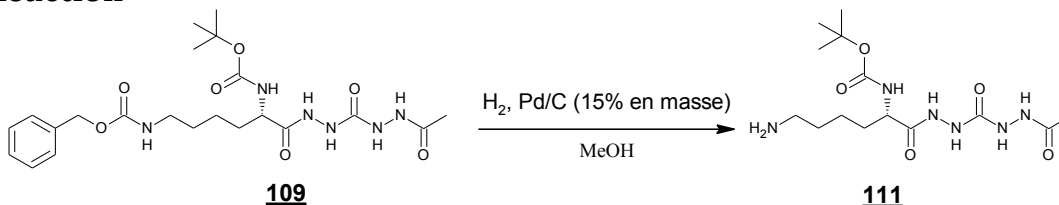


Mode opératoire

Le dérivé **106** (440 mg, 2.61 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute alors de la DIPEA (2.73 mL, 15.6 mmol, 6 eq) puis successivement, HOBt (350 mg, 2.59 mmol, 1.1 eq), HBTU (1.19 g, 3.14 mmol, 1.2 eq) et *N*-Boc-Beta-Ala-OH **108** (540 mg, 2.85 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 24 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans du DCM (200 mL) lavé avec de l'eau (100 mL). La phase organique est ensuite concentrée sous pression réduite pour obtenir une huile. **110** (95 mg, 0.3 mmol, 12%) est obtenu sous forme d'un solide marron après purification par chromatographie sur une colonne de gel de silice en éluant d'abord avec 100% de l'AcOEt puis avec AcOEt/MeOH (80:20).

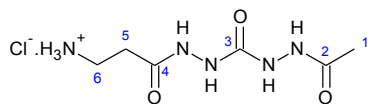
The chemical structure is 4-((4S,8S)-4-oxo-4,8-dihydro-2H-pyrido[4,3-b]pyrimidin-2-yl)-N,N-dimethylbenzamide. The atoms are numbered 1 through 14 as follows: 1 is the carbonyl carbon of the benzamide group; 2 is the nitrogen of the benzamide group; 3 is the carbonyl carbon of the pyrimidine ring; 4 is the nitrogen of the pyrimidine ring; 5 is the carbon of the pyrimidine ring; 6 is the carbonyl carbon of the pyrimidine ring; 7 is the nitrogen of the pyrimidine ring; 8 is the carbonyl carbon of the pyrimidine ring; 9 is the nitrogen of the pyrimidine ring; 10 is the carbonyl carbon of the pyrimidine ring; 11 is the carbon of the pyrimidine ring; 12 is the nitrogen of the pyrimidine ring; 13 is the carbonyl carbon of the pyrimidine ring; 14 is the nitrogen of the pyrimidine ring.

Réaction



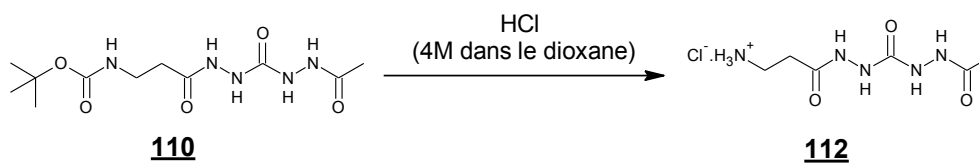
Le dérivé **109** (120 mg, 0.24 mmol) est mis en solution dans 15 mL de MeOH. On ajoute ensuite 18 mg de Pd/C (10% en masse). Le mélange est alors agité 2h sous atmosphère d'hydrogène. Après filtration du catalyseur sur celite et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement **111** sous forme d'un solide blanc.

Composé 112



Formule brute	: C ₆ H ₁₄ ClN ₅ O ₃
Masse molaire (g/mol)	: 239.66
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 3.26 (m, 2H, H ₆), 2.72 (m, J = 12.6, 6.4 Hz, 2H, H ₅), 2.03- 2.00 (m, 3H, H ₁).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	: 171.86 (C ₄), 171.01 (C ₂), 158.82 (C ₃), 35.31 (C ₆), 35.01(C ₅), 33.38, 19.22(C ₁)

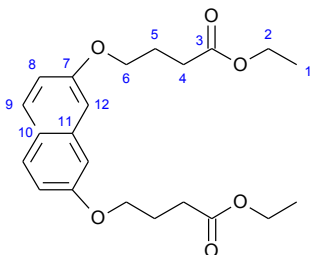
Réaction



Mode opératoire

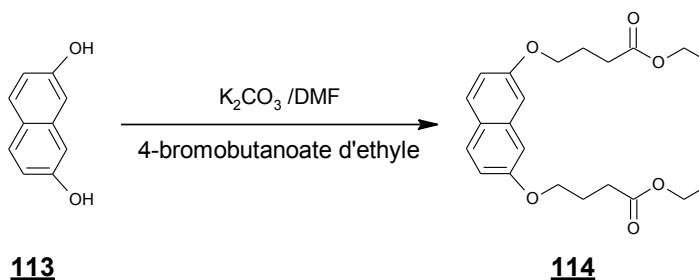
Le dérivé 110 (0.13 g, 0.43 mmol) est mis en solution dans 4 mL d'HCl (4M dans le dioxane). Le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le chlorhydrate 112 est récupéré quantitativement sous forme d'un solide blanc.

7-(4-ethoxy-4-oxobutoxy)-2-naphtyloxy) dibutanoate d'ethyle 114



Formule brute	: C ₂₂ H ₂₈ O ₆
Masse molaire (g/mol)	: 388.45
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 87
R_F	: 0.4 (Cyclohexane/EtOAc 70/30)
IR (cm⁻¹)	: 2965, 1729, 1627, 1177.
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.66 (d, <i>J</i> = 8.8, 2H, H ₉), 7.11-6.88 (m, 4H, H ₁₂ and H ₈), 4.32-3.98 (m, 8H, H ₆ and H ₂), 2.58 (t, <i>J</i> = 7.3, 4H, H ₄), 2.29-2.10 (m, 4H, H ₅), 1.25-1.30 (dt, <i>J</i> = 7.1, 6H, H ₁).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.6 (C ₃), 157.3 (C ₇), 135.8 (C ₁₁), 129.0 (C ₉), 124.3 (C ₁₀), 116.1 (C ₈), 106.0 (C ₁₂), 66.6 (C ₆), 60.4 (C ₂), 51.6 (C ₄), 30.8 (C ₅), 24.6 (C ₁).

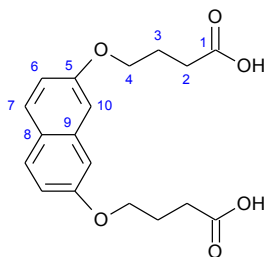
Réaction



Mode opératoire

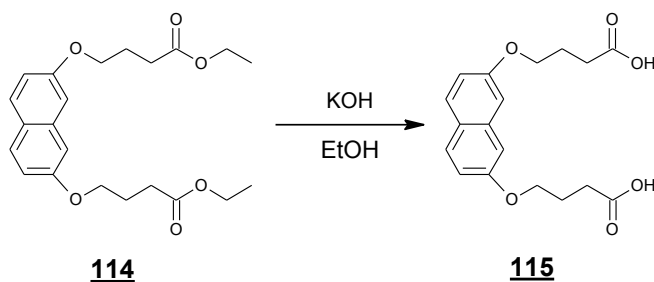
Le composé 2,7-dihydroxynaphtalène 113 (1.5 g, 9.37 mmol) et K₂CO₃ (3.24 g, 23.4 mmol, 2.5 eq) sont mis en solution dans 60 mL de DMF. On ajoute goutte à goutte une solution de 4-bromobutanoate d'éthyle (4.0 mL, 28.1 mmol, 3 eq) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans le DCM (100 mL) et lavée avec de l'eau (100 mL). Après séchage de la phase organique sur MgSO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour donner 114 (3.15 g, 8.1 mmol, 87%) sous forme d'une huile incolore.

7-(4-ethoxy-4-oxobutoxy)-2-naphtyloxy) dibutanoic acid 115



Formule brute :	: C ₁₈ H ₂₀ O ₆
Masse molaire (g/mol)	: 332.35
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 97
R_F	: 158-159°C
IR (cm⁻¹)	: 3209, 1712, 1629, 1209
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃)	: 7.75 (d, <i>J</i> = 7 Hz, 2H, H ₇), 7.25 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 2H, H ₁₀), 7 (dd, <i>J</i> = 7, 1.3 Hz 2H, H ₆), 4.1 (t, <i>J</i> = 7 Hz, 4H, H ₄), 2.5 (t, <i>J</i> = 7 Hz, 4H, H ₂), 2 (m, 4H, H ₃).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃)	: 174.1 (C ₁), 157.0 (C ₅), 136.0 (C ₉), 129.0 (C ₇), 123.8 (C ₈), 116.1 (C ₆), 106.2 (C ₁₀), 66.4 (C ₄), 30.2 (C ₂), 24.2 (C ₃).
δ (ppm)	

Réaction



Mode opératoire

Le dérivé 114 (2.76 g, 7.1 mmol) est mis en solution dans 50 mL d'éthanol. On ajoute alors une solution aqueuse de KOH 10% (50 mL) et le mélange réactionnel est agité 4 h à reflux. La réaction est arrêtée et reprise avec du DCM (100 ml). Après séparation, la phase aqueuse est acidifiée avec une solution aqueuse d'HCl (10%). Le précipité obtenu est récupéré par filtration et lavé plusieurs fois avec de l'eau pour obtenir 115 (2.29 g, 6.9 mmol, 97%) sous forme d'un solide blanc.

Références Bibliographiques

- Arts EJ, Hazuda DJ., HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, **2012**,2(4), a007161.
- Babé LM, Rosé J, Craik CS., Synthetic "interface" peptides alter dimeric assembly of the HIV 1 and 2 proteases. *Protein Sci.*, **1992**, 1(10), 1244-1253.
- Bannwarth L, Kessler A, Pèthe S, Collinet B, Merabet N, Boggetto N, Sicsic S, Reboud-Ravaux M, Onger S., Molecular tongs containing amino acid mimetic fragments: new inhibitors of wild-type and mutated HIV-1 protease dimerization. *J Med Chem.*, **2006** 49(15), 4657-4664.
- Bannwarth L, Rose T, Dufau L, Vanderesse R, Dumond J, Jamart-Grégoire B, Pannecouque C, De Clercq E, Reboud-Ravaux M., Dimer disruption and monomer sequestration by alkyl tripeptides are successful strategies for inhibiting wild-type and multidrug-resistant mutated HIV-1 proteases. *Biochemistry.*, **2009**, 48(2), 379-387.
- Bartonová V, Král V, Siegllová I, Brynda J, Fábry M, Horejsí M, Kozísek M, Sasková KG, Konvalinka J, Sedláček J, Rezacová P., Potent inhibition of drug-resistant HIV protease variants by monoclonal antibodies. *Antiviral Res.*, **2008**,78(3), 275-277.
- Bouras A, Boggetto N, Benatalah Z, de Rosny E, Sicsic S, Reboud-Ravaux M., Design, synthesis, and evaluation of conformationally constrained tongs, new inhibitors of HIV-1 protease dimerization. *J Med Chem.*, **1999**, 42(6), 957-962.
- Bowman MJ, Chmielewski J., Sidechain-linked inhibitors of HIV-1 protease dimerization. *Bioorg Med Chem.*, **2009**, 17(3), 967-976.
- Chakraborty R., HIV-1 infection in children : a clinical and immunologic overview. *Curr HIV Res.*, **2005**, 3(1), 31-41.
- Davis DA, Brown CA, Singer KE, Wang V, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield P, Maeda K, Harada S, Yoshimura K, Kosalaraksa P, Mitsuya H, Yarchoan R., Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res.*, **2006**, 72(2), 89-99.
- Davis DA, Tebbs IR, Daniels SI, Stahl SJ, Kaufman JD, Wingfield P, Bowman MJ, Chmielewski J, Yarchoan R., Analysis and characterization of dimerization inhibition of a multi-drug-resistant human immunodeficiency virus type 1

- protease using a novel size-exclusion chromatographic approach. *Biochem J.*, **2009**, 419(2), 497-506.
- DeLano WL, *The PyMOL Molecular Viewer*. **2002**, <http://www.pymol.org>.
 - Desrosiers RC, Letvin NL., Animal models for acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Infect Dis.*, **1987**, 9(3), 438-446.
 - Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M., Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2005**, 49(11), 4721-4732.
 - Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, Lin SW, Ying W, Smith SO, Sakmar TP, Moore JP., A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci.*, **2000**, 97(10), 5639-5644.
 - Dufau L, Marques Ressurreição AS, Fanelli R, Kihal N, Vidu A, Milcent T, Soulier JL, Rodrigo J, Desvergne A, Leblanc K, Bernadat G, Crousse B, Reboud-Ravaux M, Onger S., Carbonylhydrazide-based molecular tongs inhibit wild-type and mutated HIV-1 protease dimerization. *J Med Chem.*, **2012**, 55(15), 6762-6775.
 - Dumond J, Boggetto N, Schramm HJ, Schramm W, Takahashi M, Reboud-Ravaux M. Thyroxine-derivatives of lipopeptides : bifunctional dimerization inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease. *Biochem Pharmacol.*, **2003**, 65(7), 1097-1102.
 - Engelman A. and Cherepanov P., The structural biology of HIV-1 : mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbio.*, **2012**, 10, 279-290.
 - Espeseth AS, Felock P, Wolfe A, Witmer M, Grobler J, Anthony N, Egbertson M, Melamed JY, Young S, Hamill T, Cole JL, Hazuda DJ., HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2000**, 97(21), 1244-1249.
 - Fauci AS., HIV and AIDS : 20 years of science. *Nat Med.*, **2003**, 9, 839-843
 - Fauci AS., The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science.*, **1988**, 239(4840), 617-22.

- Fauci, AS, Desrosiers RC., Pathogenesis of HIV and SIV. **1997**, 587-636 in Coffin JM, Hugues SH, Varmus HE., *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (New York).
- Feng DJ, Wang P, Li XQ, Li ZT., Self-assembly of Hydrazide-based Heterodimers Driven by Hydrogen Bonding and Donor-Acceptor Interaction. *Chin J Chem.*, **2006**, 24(4), 1200-1208.
- Fontenot G, Johnston K, Cohen JC, Gallaher WR, Robinson J, Luftig RB, PCR amplification of HIV-1 proteinase sequences directly from lab isolates allows determination of five conserved domains. *Virology.*, **1992**, 190(1), 1-10.
- Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, Lehrman SN, Bolognesi DP, Broder S, Mitsuya H, et al., Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci.*, **1986**, 83 (21), 8333-8337.
- Hare S, Vos AM, Clayton RF, Thuring JW, Cummings MD, Cherepanov P., Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2010**, 107(46), 20057-20062.
- Hart GJ, Orr DC, Penn CR, Figueiredo HT, Gray NM, Boehme RE, Cameron JM., Effects of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC) 5'-triphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and mammalian DNA polymerases alpha, beta, and gamma. *Antimicrob Agents Chemother.*, **1992**, 36(8), 1688-1694.
- Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, Jolly SM, Wai JS, Zhuang L, Fisher TE, Embrey M, Guare JP Jr, Egbertson MS, Vacca JP, Huff JR, Felock PJ, Witmer MV, Stillmock KA, Danovich R, Grobler J, Miller MD, Espeseth AS, Jin L, Chen IW, Lin JH, Kassahun K, Ellis JD, Wong BK, Xu W, Pearson PG, Schleif WA, Cortese R, Emini E, Summa V, Holloway MK, Young SD., A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci.*, **2004**, 101(31), 11233-11238.
- Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, Schols D, Pollard RB, Brown S, Jackson JB, Coombs RW, Glesby MJ, Flexner CW, Bridger GJ, Badel K, MacFarland RT, Henson GW, Calandra G., Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **2004**, 37(2), 1253-1262.

- Hoffman NG, Schiffer CA, Swanstrom R., Covariation of amino acid positions in HIV-1 protease. *Virology*, **2003**, 314(2), 536-548.
- Hou JL, Shao XB, Chen GJ, Zhou YX, Jiang XK, Li ZT, Hydrogen Bonded Oligohydrazide Foldamers and Their Recognition for Saccharides. *J Am Chem Soc.*, **2004**, 126(39), 12386-12394.
- Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC., Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, **1998**, 282(5394), 1669-1675.
- Ingr M, Uhlíková T, Stříšovský K, Majerová E, Konvalinka J., Kinetics of the dimerization of retroviral proteases : The “fireman’s grip” and dimerization. *Protein Sci.*, **2003**, 12(10), 2173-2182.
- Johnston E, Winters MA, Rhee SY, Merigan TC, Schiffer CA, Shafer RW., Association of a novel human immunodeficiency virus type 1 protease substrate cleft mutation, L23I, with protease inhibitor therapy and in vitro drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**, 48(12), 4864-4868.
- King JR, Wynn H, Brundage R, Acosta EP., Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy. *Clin Pharmacokinet*, **2004**, 43(5), 291-310.
- Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldridge A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H., Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem.*, **2007**, 282(39), 28709-28720.
- Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RAF, Scolnick EM, Sigal IS., Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1988**, 85, 4686-4690.
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA., Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science.*, **1992**, 256(5065), 1783-1790.
- Kondru R, Zhang J, Ji C, Mirzadegan T, Rotstein D, Sankuratri S, Dioszegi M, Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol Pharmacol*. **2008**, 73(3), 789-800.
- Kovalevsky AY, Ghosh AK, Weber IT., Solution kinetics measurements suggest HIV-1 protease has two binding sites for darunavir and amprenavir. *J Med Chem.*, **2008**, 51(20), 6599-6603.

- Kovalevsky AY, Liu F, Leshchenko S, Ghosh AK, Louis JM, Harrison RW, Weber IT, Ultra-high resolution crystal structure of HIV-1 protease mutant reveals two binding sites for clinical inhibitor TMC114. *J Mol Biol.*, **2006**, 363(1), 161-173.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet R, Sodroski J, Hendrickson W., Structure of an HIV-1 gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, **1998**, 393(6686), 649-659.
- Lansdon EB, Brendza KM, Hung M, Wang R, Mukund S, Jin D, Birkus G, Kutty N, Liu X., Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase with etravirine (TMC125) and rilpivirine (TMC278): implications for drug design. *J Med Chem.*, **2010**, 53(10), 4295-4299.
- Lescar J, Brynda J, Rezacova P, Stouracova R, Riottot MM, Chitarra V, Fabry M, Horejsi M, Sedlacek J, Bentley GA., Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by a monoclonal antibody. *Protein Sci.* **1999**, 8(12), 2686-2696.
- Louis JM, Aniana A, Weber IT, Sayer JM., Inhibition of autoprocessing of natural variants and multidrug resistant mutant precursors of HIV-1 protease by clinical inhibitors. *PNAS.*, **2011**, 108(22), 9072-9077.
- McColl DJ, Chen X., Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase : bringing IN a new era of antiretroviral therapy. *Antiviral Res.*, **2010**, 85(1), 101-118.
- Merabet N, Dumond J, Collinet B, Van Baelinghem L, Boggetto N, Onger S, Ressad F, Reboud-Ravaux M, Sicsic S., New constrained "molecular tongs" designed to dissociate HIV-1 protease dimer. *J Med Chem.*, **2004**, 47(25), 6392-400.
- Miller V., International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, **2001**, 26 (1), S34-50.
- Mitsuya H, Broder S., Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci.*, **1986**, 83(6), 1911-1915.
- Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S., 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci.*, **1985**, 82(20), 7096-7100.

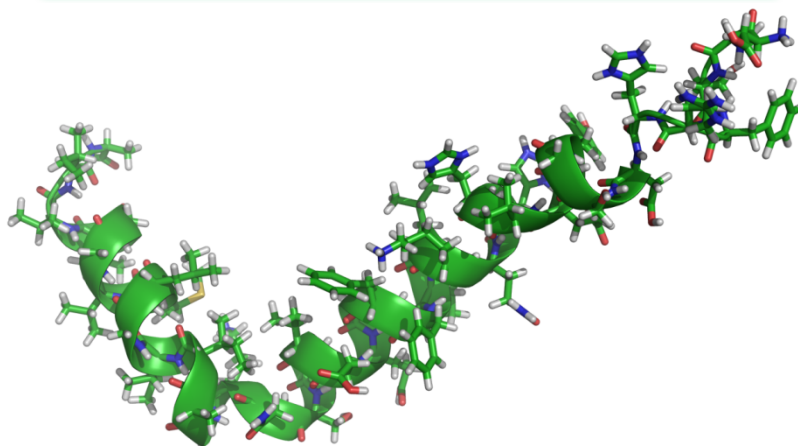
- Moir S, Chun TW, Fauci AS., Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annu Rev Pathol.*, **2011**, 6, 223-248.
- Muzammil S, Ross P, Freire E., A Major Role for a Set of Non-Active Site Mutations in the Development of HIV-1 Protease Drug Resistance. *Biochemistry.*, **2003**, 42(3), 631-638.
- Nzounza P, Chazal M, Guedj C, Schmitt A, Massé JM, Randriamampita C, Pique C, Ramirez BC., The Scaffolding Protein Dlg1 Is a Negative Regulator of Cell-Free Virus Infectivity but Not of Cell-to-Cell HIV-1 Transmission in T Cells. *PLoS One.*, **2012**, 7(1), 1-e30130 (1-14).
- Ohtaka H, Schön A, Freire E., Multidrug resistance to HIV-1 protease inhibition requires cooperative coupling between distal mutations. *Biochemistry.*, **2003**, 42 (46), 13659-13666.
- Ohtaka H, Schön A, Freire E., Multidrug Resistance to HIV-1 Protease Inhibition Requires Cooperative Coupling between Distal Mutations. *Biochemistry.* **2003**, 42(46), 13659-13666.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS, The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med.*, **1993**, 328(5), 327-335.
- Park J, Morrow CD., Mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 1 affect release and stability of virus particles. *Virology.*, **1993**, 194(2), 843-850.
- Pokorná J, Machala L, Řezáčová P, Konvalinka J., Current and Novel Inhibitors of HIV Protease. *Viruses.*, **2009**, 1, 1209-1239.
- Prabu-Jeyabalan M, King NM, Nalivaika EA, Heilek-Snyder G, Cammack N, Schiffer CA., Substrate envelope and drug resistance : crystal structure of RO1 in complex with wild-type human immunodeficiency virus type 1 protease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, 50(4), 1518-1512.
- Rhee SY, Fessel WJ, Zolopa AR, Hurley L, Liu T, Taylor J, Nguyen DP, Slome S, Klein D, Horberg M, Flamm J, Follansbee S, Schapiro JM, Shafer RW., HIV-1 Protease and reverse-transcriptase mutations : correlations with antiretroviral therapy in subtype B isolates and implications for drug-resistance surveillance. *J Infect Dis.*, **2005**, 192(3), 456-465.
- Robbins AH, Coman RM, Bracho-Sanchez E, Fernandez MA, Gilliland CT, Li M, Agbandje-McKenna M, Wlodawer A, Dunn BM, McKenna R., Structure of

- the unbound form of HIV-1 subtype A protease : comparison with unbound forms of proteases from other HIV subtypes. *Acta Cryst.*, **2010**, D66, 233-242.
- Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda S, Kodama E, Matsuoka M, Shinkai H., Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *J Med Chem.*, **2006**, 49(5), 1506-1508.
 - Schramm HJ, Boetzel J, Büttner J, Fritsche E, Göhring W, Jaeger E, König S, Thumfart O, Wenger T, Nagel NE, Schramm W., The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by 'interface peptides'. *Antiviral Res.*, **1996**, 30 (2-3), 155-170.
 - Schramm HJ, de Rosny E, Reboud-Ravaux M, Büttner J, Dick A, Schramm W., Lipopeptides as dimerization inhibitors of HIV-1 protease. *Biol Chem.*, **1999**, 380(5), 593-596.
 - Shafer RW, Jung DR, Betts BJ, Xi Y, Gonzales MJ., Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28(1), 346-348.
 - Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M., Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol.*, **2008**, 82(2), 764-774.
 - Shultz MD, Chmielewski J., Probing the role of interfacial residues in a dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Bioorg Med Chem Lett.*, **1999**, 9(16), 2431-2436.
 - Simon MA, Brodie SJ, Sasseville VG, Chalifoux LV, Desrosiers RC, Ringler DJ., Immunopathogenesis of SIVmac. *Virus Res.*, **1994**, 32(2), 227-251.
 - Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I., Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Curr HIV Res.*, **2004**, 2(4), 323-332.
 - Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science.*, **1995**, 267(5200), 988-993.
 - St Clair MH, Richards CA, Spector T, Weinhold KJ, Miller WH, Langlois AJ, Furman PA., 3'-Azido-3'-deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and

- substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother.*, **1987** 31(12), 1972-1977.
- Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, Pauwels R, Andries K, Janssen PA, Arnold E., Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol.*, **1994**, 243(3), 369-387.
 - Todd MJ, Semo N, Freire E, The structural stability of the HIV-1 protease. *J Mol Biol.*, **1998**, 283(2), 475-488.
 - Tsamis F, Gavrilov S, Kajumo F, Seibert C, Kuhmann S, Ketas T, Trkola A, Palani A, Clader JW, Tagat JR, McCombie S, Baroudy B, Moore JP, Sakmar TP, Dragic T., Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol.*, **2003**, 77(9), 5201-5208.
 - Vidu A, Dufau L, Bannwarth L, Soulier JL, Sicsic S, Piarulli U, Reboud-Ravaux M, Onger S., Toward the first nonpeptidic molecular tong inhibitor of wild-type and mutated HIV-1 protease dimerization. *Chem Med Chem.*, **2010**, 5(11), 1899-1906.
 - Weber IT., Comparison of the crystal structures and intersubunit interactions of human immunodeficiency and Rous sarcoma virus proteases. *J Biol Chem.*, **1990**, 265(18), 10492-10496.
 - Weber J., The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull.*, **2001**, 58(1), 61-72.
 - Wild C, Greenwell T, Matthews T., A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses.*, **1993**, 9(11), 1051-1053.
 - Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ., Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci.*, **1994**, 91(21), 9770-9774.
 - Wlodawer A, Miller M, Jaskólski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SB., Conserved folding in retroviral proteases : crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science.*, **1989**, 245(4918), 616-621.

- Wu TD, Schiffer CA, Gonzales MJ, Taylor J, Kantor R, Chou S, Israelski D, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW., Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments. *J Virol.*, **2003**, 77(8), 4836-4847.
- Zaitseva M, Peden K, Golding H., HIV coreceptors : role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta.*, **2003**, 1614(1), 51-61.
- Zhang ZY, Poorman RA, Maggiora LL, Heinrikson RL, Kezdy FJ., Dissociative inhibition of dimeric enzymes : Kinetic characterization of the inhibition of HIV-1 protease by its COOH-terminal tetrapeptide. *J Biol Chem.*, **1991**, 266(24), 15591-15594.
- Zhao X, Wang XZ., Jiang XL., Chen YQ, Li ZT, Chen GJ., Hydrazide-Based Quadruply Hydrogen-Bonded Heterodimers. Structure, Assembling Selectivity, and Supramolecular Substitution. *J Am Chem Soc.*, **2003**, 125(49), 15128-15139.
- Zutshi R, Chmielewski J., Targeting the dimerization interface for irreversible inhibition of HIV-1 protease. *Bioorg Med Chem Lett.*, **2000**, 10(17), 1901-1903.
- Zutshi R, Franciskovich J, Shultz M, Schweitzer B, Bishop P, Wilson M, Chmielewski J., Targeting the Dimerization Interface of HIV-1 Protease: Inhibition with Cross-Linked Interfacial Peptides. *J Am Chem Soc.*, **1997**, 119(21), 4841-4845.

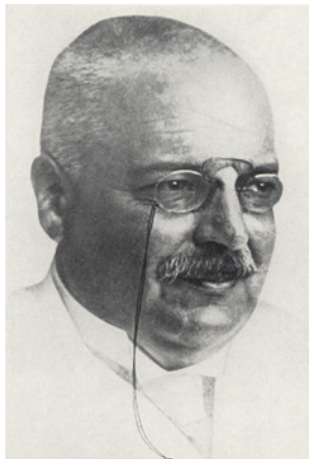
**INHIBITEURS DE
L'AGREGATION DU PEPTIDE
BETA-AMYLOÏDE**



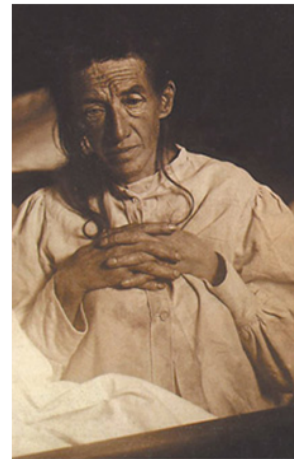
I. Introduction

En plus de leur rôle dans la structure des protéines, les feuillets β sont impliqués dans une pathologie neurodégénérative appelée maladie d'Alzheimer (MA). Cette démence sénile est caractérisée par un déclin progressif des capacités cognitives avec, comme conséquence, une perte synaptique et neuronale [Sarroukh *et al.*, 2011].

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois en 1906 par le neuropathologiste allemand Aloïs Alzheimer à propos d'une patiente (Auguste Deter) présentant un syndrome démentiel [Alzheimer, 1907 ; Stelzmann *et al.*, 1995 ; Tanzi et Bertram, 2005]. Cette pathologie est la forme neurologique la plus fréquente de démence qui augmente avec le vieillissement cellulaire, et dont la durée de survie moyenne après le premier diagnostic se situe entre 7 et 10 ans et dont aucun remède n'est encore connu [Alzheimer's Association *et al.*, 2011 ; Hebert *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2005 ; Takahashi *et al.*, 2008 ; Glabe, 2009].



Aloïs Alzheimer
(1864-1915)



Auguste Deter
(1850-1906)

Figure 76 : Aloïs Alzheimer et Auguste Deter.

Bien que la mortalité due aux grandes pathologies (maladies cardiovasculaires (-13%), cancer du sein (-3%), cancer de la prostate (-8%), accident vasculaire cérébral (-20%) et le VIH/SIDA (-29%)) aient diminué au cours de ces dernières années (2000-2008), les décès imputables à la MA ont augmenté de manière significative (+66%) pendant la même période (Figure 77) [Alzheimer's Association, 2012].

À l'heure actuelle, plus de 35 millions de personnes dans le monde sont touchées par la MA. Le nombre de patients atteints de cette maladie neurodégénérative augmentera considérablement dans un proche avenir, et il est estimé que plus de 80 millions de personnes seront atteintes d'ici l'an 2040 [Alzheimer's Association *et al.*, 2011; Ferri *et al.*, 2005].

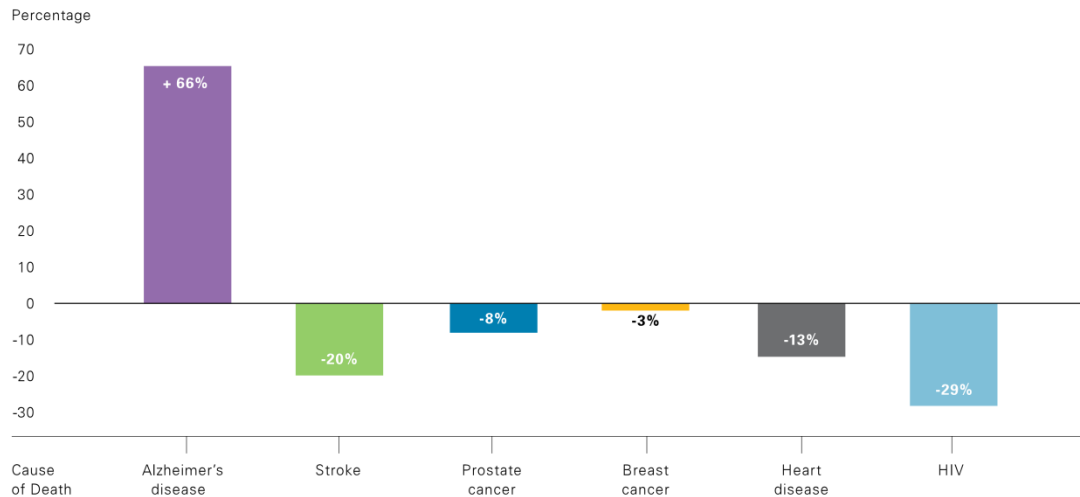


Figure 77 : Pourcentages de variation des causes de décès (tous âges) entre 2000 et 2008 [Alzheimer's Association, 2012].

La MA se caractérise par la présence, au niveau du système nerveux central, de plaques séniles extracellulaires formées principalement du peptide β amyloïde (Figure 78.A) [Haass *et al.*, 1992], ainsi que d'amas neurofibrillaires intracellulaires, constitués de paires de filaments appariés en hélice, causés par l'hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau (Figure 78.B) [Johnson et Hartigan, 1999 ; Gong et Iqbal, 2008], d'une atteinte du système cholinergique à l'origine de troubles cognitifs importants, d'une perte neuronale et synaptique spécifiques à certaines régions antérieures de l'encéphale et d'une baisse du débit sanguin cérébral et de l'activité métabolique cérébrale [Huang et Jiang, 2009 ; O'Brien et Wong, 2011 ; Zheng *et al.*, 2002 ; Murphy et LeVine, 2010 ; Iadecola, 2003].

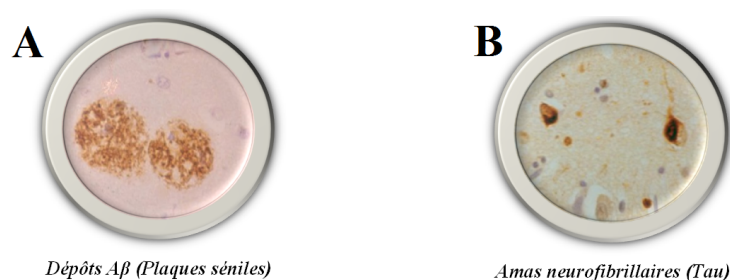


Figure 78 : Dépôt amyloïdes (A) et amas neurofibrillaires (B)

Au cours de l'évolution de la maladie d'Alzheimer, les plaques et les enchevêtrements (*parties bleutées* dans la figure 79) ont tendance à progresser à travers le cortex selon un schéma prévisible.

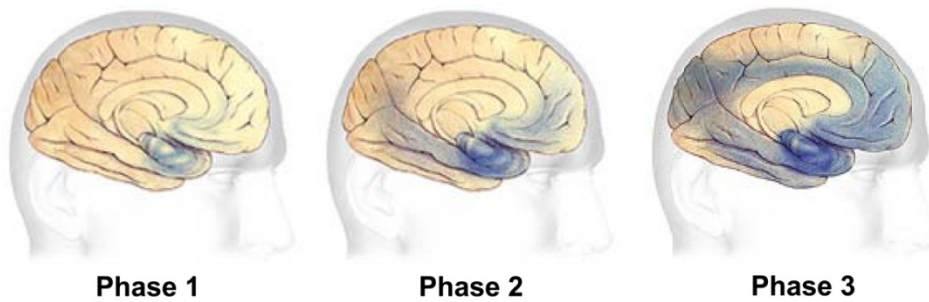


Figure 79 : Schéma représentant la progression de la maladie d'Alzheimer au cours du temps. *De gauche à droite, la phase infraclinique (1), la phase légère à modérée (2) puis la phase d'atteinte sévère (3)* [Alzheimer's Association (<http://www.alz.org>)].

La maladie d'Alzheimer comprend trois phases non précises au cours desquelles les symptômes s'entrecroisent :

le stade léger ou précoce (Phase 1 : préclinique) au cours duquel les changements peuvent commencer à se produire 20 ans avant le diagnostic, voire plus tôt. À ce stade, la maladie attaque uniquement les neurones cholinergiques du système limbique et particulièrement celle de l'hippocampe. Les troubles de la mémoire et l'altération des autres capacités intellectuelles sont discrets et peuvent passer inaperçus ;

le stade modéré (Phase 2 : prédémentielle) qui dure généralement de 2 à 10 ans. À ce stade, où la maladie évolue de façon significative, les régions du cerveau qui sont importantes pour la mémoire, la pensée et la planification développent un plus grand nombre de plaques et d'enchevêtrements qu'au stade précoce. Les désordres ont une répercussion nette dans la vie quotidienne et sociale. La perte d'autonomie s'accroît et la vie à domicile n'est plus possible qu'avec des aides. C'est souvent à ces stades que la maladie d'Alzheimer est diagnostiquée.

le stade sévère (Phase 3 : démentielle) qui peut durer de 1 à 5 ans. À ce stade, la majeure partie du cortex est sérieusement endommagée. Le cerveau rétrécit de façon spectaculaire à la suite de la mort généralisée des cellules et la récupération des informations est quasi nulle. Cette phase se caractérise par une perte d'autonomie massive et d'importants troubles du comportement. Les individus perdent leur capacité à communiquer, à reconnaître leurs proches et amis et à s'occuper d'eux-mêmes.

II. Cascade amyloïde

La MA se caractérise par la présence, au niveau du système nerveux central, de dépôts extracellulaires polymorphes sous forme de plaques séniles formées principalement d'un peptide de 4 kDa, le peptide β amyloïde ($A\beta$) [Glennner and Wong, 1984 ; Shoji *et al.*, 1992]. Ce peptide de 39 à 43 acides aminés provient de la transformation protéolytique de la protéine amyloïde précurseur de 695-770 résidus (APP) [Golde *et al.*, 1993 ; Kang *et al.*, 1987 ; Shoji *et al.*, 1992 ; Barrow *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 2009]. Le clivage de cette protéine transmembranaire par deux complexes enzymatiques spécifiques, β - et γ -sécrétases (Figure 80), libère une famille de peptides $A\beta$ qui s'agrègent ensuite sous forme de complexe de différentes tailles : à partir de petits oligomères solubles, de plus grandes protofibrilles et enfin des fibrilles causant des dépôts extraneuronaux dans le cerveau des personnes atteintes sont observées.

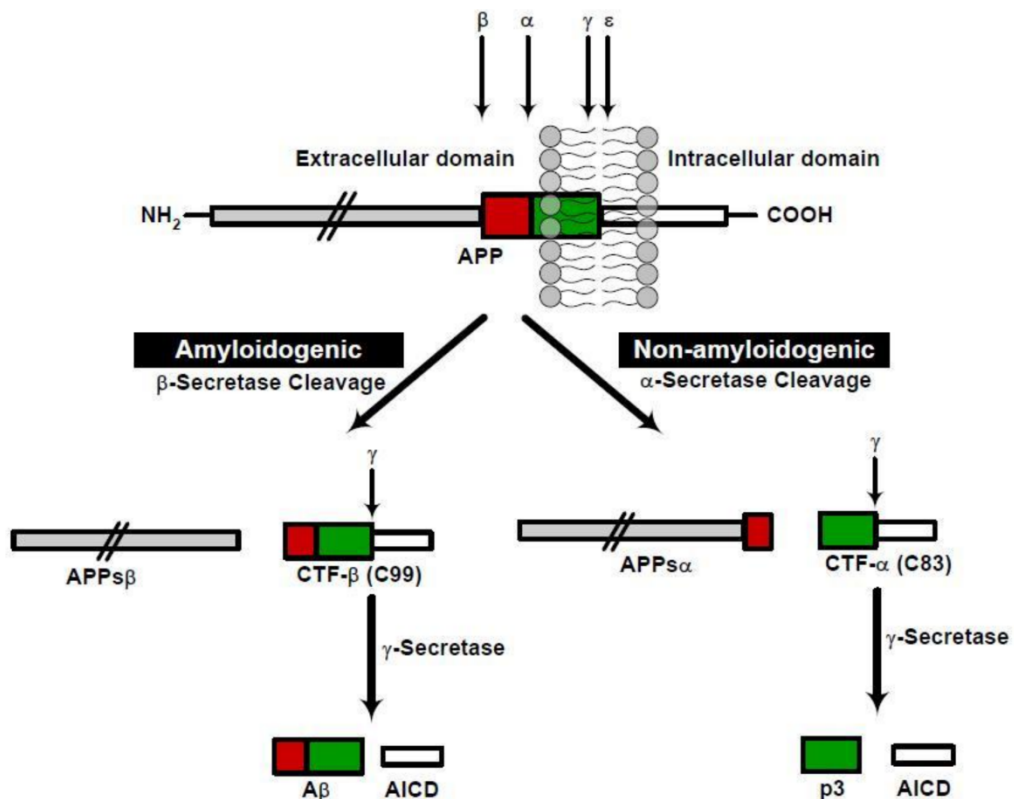


Figure 80 : Représentation schématique de la production de $A\beta$ par traitement protéolytique de l'APP [Kumar et Walter, 2011].

L'APP peut également être clivée dans une voie non-amyloïdogénique (Figure 80) qui implique le clivage initial par l' α -sécrétase dans le domaine $A\beta$ empêchant ainsi la génération suivante de peptides $A\beta$ [Sanders, 2009].

Les dépôts amyloïdes sont associés à la conversion de la forme non structurée du monomère β amyloïde soluble et non toxique en structures toxiques sous forme d'A β agrégés riches en feuillets β [Simmons *et al.*, 1994]. Les dépôts A β peuvent entraîner l'inflammation, l'excitotoxicité, le stress oxydatif et la neurotoxicité ce qui conduit à des lésions cellulaires (Figure 81).

Du fait de la rapidité du phénomène d'agrégation et de l'insolubilité des fibres, les mécanismes moléculaires ainsi que les facteurs déterminant la formation de structures riches en feuillets β ne sont pas clairement connus.

L'élucidation du processus de conduite d'agrégation, y compris les transitions structurales, pourrait être essentielle dans une recherche de thérapies capables d'inhiber l'agrégation ou la perturbation d'agrégats.

Des preuves indiscutables indiquent que ce sont les oligomères solubles à savoir, dimères [Shankar *et al.*, 2008 ; Jin *et al.*, 2011], trimères, tétramères, dodécamères (A β *56 : A β de 56 kDa) [Lesné *et al.*, 2006], mais aussi les ligands diffus des dérivés A β (ADDLs) [Klein, 2002], protofibrilles et également les oligomères annulaires [Kayed *et al.*, 2009], plutôt que des dépôts de peptides insolubles, qui exercent des effets cytotoxiques et jouent un rôle crucial dans l'apparition et la progression de la MA [Bartolini *et al.*, 2011].

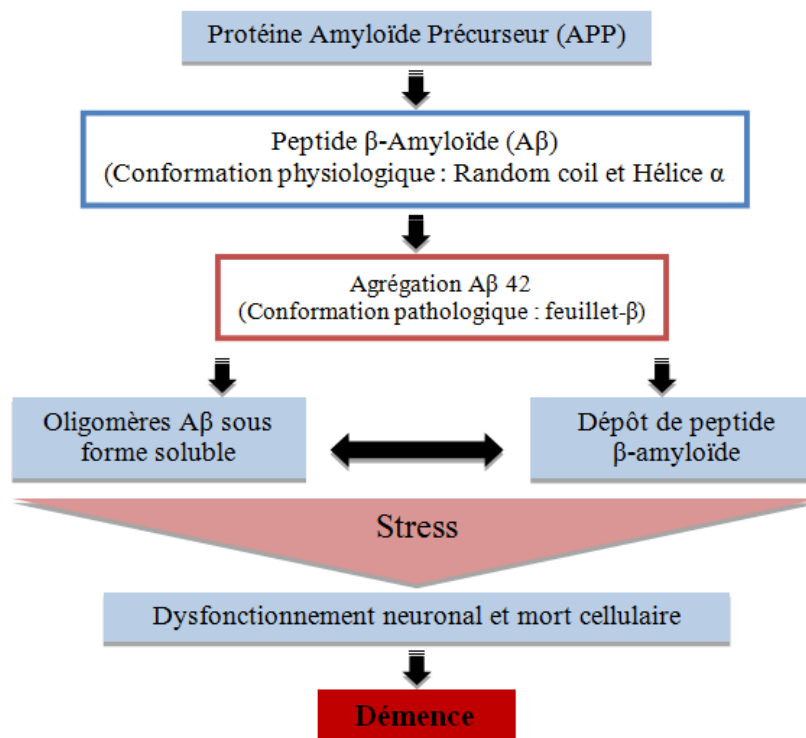


Figure 81 : Hypothèse de la cascade amyloïde [Adaptée d'après Karran *et al.*, 2011]

III. Structure et rôle physiopathologique du peptide β -amyloïde

Bien que le dépôt de $A\beta$ dans les cellules neuronales soit signalé comme un phénomène clinique précoce de la MA, le mécanisme moléculaire conduisant à la MA reste à élucider [Kayed *et al.*, 2003; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993 ; Haass *et al.*, 1992 ; Cras *et al.*, 1991 ; Blanquet *et al.*, 1987]. Dans une solution aqueuse, $A\beta$ s'agrège spontanément par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine (Figure 82) [Xu *et al.*, 2005 ; Sarroukh *et al.*, 2011].

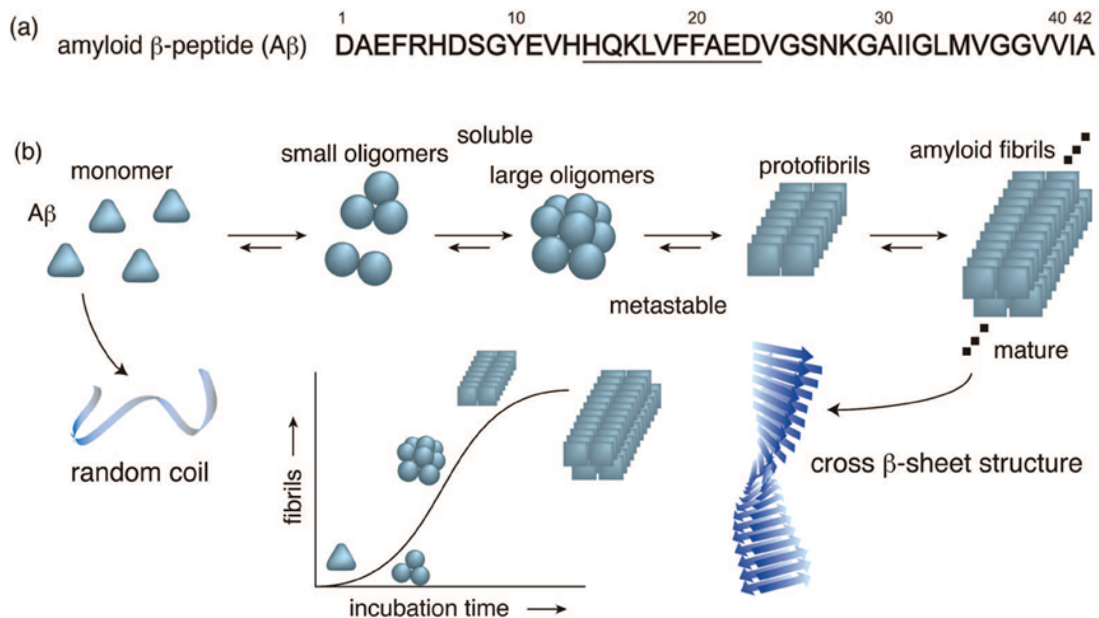


Figure 82 : (a) Séquence des aminoacides formant le peptide $A\beta_{1-42}$ (b) Représentation schématique de l'agrégation du monomère $A\beta$ de la structure aléatoire jusqu'aux fibrilles amyloïdes riches en feuillets β à travers plusieurs oligomères métastables [Takahashi et Mihara, 2008].

Même si le peptide $A\beta_{1-40}$ est produit majoritairement au cours de la transformation protéolytique de l'APP, le peptide $A\beta_{1-42}$ est le composant principal des plaques séniles [Iwatsubo *et al.*, 1994; Güntert *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009]. Dans leur état soluble natif, les peptides $A\beta_{1-42}$ adoptent à la fois une conformation hélicoïdale et aléatoire (Random Coil) (Figure 82) [Xu *et al.*, 2005]. Par ailleurs, des études de dichroïsme circulaire (DC) ont indiqué que les oligomères solubles et constitués de structures en feuillet bêta sont les plus toxiques [Simmons *et al.*, 1994 ; Bartolini *et al.*, 2007].

Il a été démontré que l'organisation de A β ₁₋₄₂ en structures aléatoires, hélice α et en feuillets plissés β , est fortement dépendante des conditions de la solution [Simmons *et al.*, 1994]. En solution aqueuse, la structure en feuillet plissé β est favorisée pour les peptides, tandis que dans une solution aqueuse contenant du trifluoroéthanol (TFE) ou de l'hexafluoroisopropanol (HFIP), la structure en hélice α est favorisée. La structure en hélice α se développe lorsque la température augmente et est favorisée à pH 1 à 4 et pH 7 à 10, par ailleurs, la conformation en feuillet plissé β est insensible à la température et est favorisée à pH 4 à 7 [Barrow *et al.*, 1992].

Le taux d'agrégation en structures oligomériques riches en feuillets β (hélice α $\rightarrow$ structure aléatoire $\rightarrow$ feuillet β) est également tributaire des conditions de solution tels que le pH et la concentration en peptide [Barrow *et al.*, 1992], où le maximum de feuillets β se forment à un pH de 5,4.

Des études menées sur le fragment peptidique hydrophobe A β ₂₉₋₄₂ ont montré qu'il adopte exclusivement une conformation intermoléculaire en feuillets β en solution aqueuse en dépit des changements de la température ou le pH [Barrow *et al.*, 1992]. Par conséquent, ce segment peut être la première région du peptide β qui s'agrège et peut diriger le repliement du peptide β entier pour produire la structure en feuillets plissés β trouvée dans les dépôts amyloïdes.

Les différences entre les conformations en solution de A β ₁₋₃₉ et A β ₁₋₄₂ suggèrent que les trois derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale sont essentiels à un dépôt d'amyloïde [Barrow *et al.*, 1992].

D'autre part les fibrilles amyloïdes A β adoptent des structures bien définies. Des études ont démontré que des séquences, comme les résidus 11-25 et 10-35, forment une structure en feuillet β antiparallèles bien ordonnée [Petkova *et al.*, 2004 ; Benzinger *et al.*, 2000].

III.1. Formation de fibrilles β -amyloïdes

Le mécanisme de formation des fibres amyloïdes commence par **une phase de latence ou de nucléation** suivie d'une **phase d'élongation ou d'allongement** de type exponentielle caractérisant la formation rapide des fibres (Figure 82).

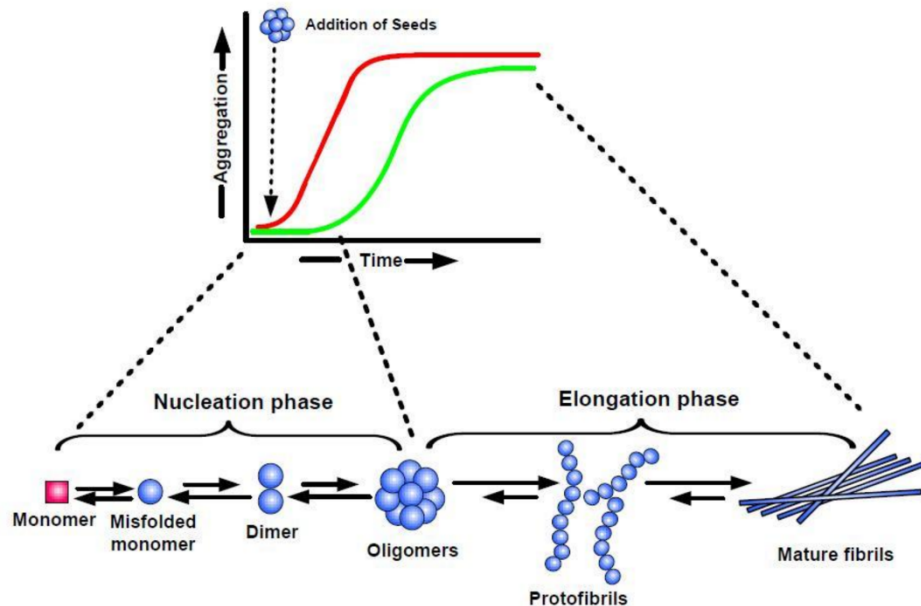


Figure 82 : Cinétique de formation de fibres amyloïdes« *Représentée par une courbe sigmoïde avec une phase de latence suivie par la phase de croissance rapide (courbe verte). Ainsi, la formation d'amyloïde peut être sensiblement accélérée par l'ajout de noyaux préformés. L'ajout de ces noyaux peut réduire le délai et induit la formation rapide des fibrilles (courbe rouge) ».*

La phase de latence est considérée comme le temps nécessaire à la constitution d'un noyau. Dans cette phase, les monomères subissent un changement conformationnel et s'associent pour former des noyaux oligomères. Une fois le noyau (nucléus) formé, l'élongation de la fibre s'opère rapidement par l'association de monomères ou d'oligomères à ce noyau et forme de plus grands polymères ou de fibrilles jusqu'à saturation (Figure 82). Le temps de latence est considérée comme très important, même si les fibres ne sont pas encore formées, à cause de la formation d'une variété d'espèces non fibrillaires, appelés protofibrilles, riches en feuillets β [Harper *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997 ; Walsh *et al.*, 1999].

Des études *in vitro* ont révélé que le monomère A β peut s'assembler en fibrilles amyloïdes avec une conversion facile dans des conditions physiologiques. Cette formation de fibres β amyloïdes est généralement considérée comme un processus de type nucléation dépendant [Pedersen *et al.*, 2004 ; Serio *et al.*, 2000], qui peut être accéléré de manière spectaculaire, *in vitro* et *in vivo*, par des noyaux fibrillaires (Figure 83) [Bieschke *et al.*, 2006 ; Kihara *et al.*, 2005]. Ce processus implique l'association et la dissociation des peptides β amyloïdes dans la formation de gros oligomères qui peuvent nucléer la formation de fibrilles.

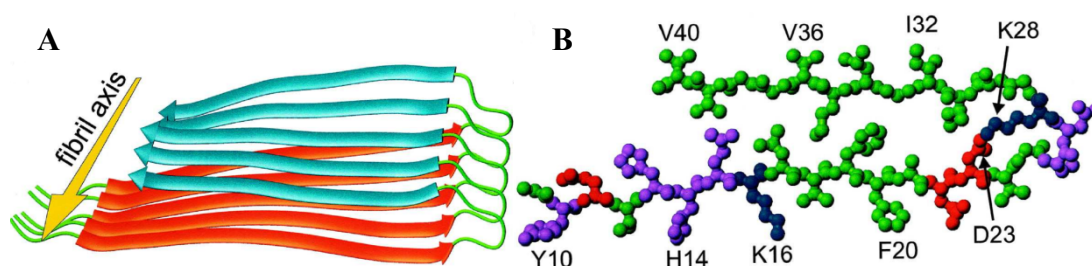


Figure 83 : Modèle structurale des feuillets β croisés parallèles formés par le peptide A β 40. (a) modèle ruban ; (b) modèle atomique (vert : hydrophobe ; magenta : polaire ; rouge : chargé négativement ; bleu : chargé positivement [Petkova *et al.*, 2002].

L'aspect typique des fibrilles β amyloïdes sous un microscope électronique est celui de longs filaments fins à 6-12 nm de diamètre [Shirahama et Cohen, 1967 ; Kirschner *et al.*, 1987 ; Serpell et Smith, 2000]. D'autres études par microscopie ont révélé que les fibres sont généralement constituées de 2 à 6 protofilaments (Figure 84) [Serpell *et al.*, 2000]. Enfin, ces protofilaments se torsadent pour former une fibre de 7 à 13 nm d'épaisseur (Figure 84) [Serpell *et al.*, 2000].

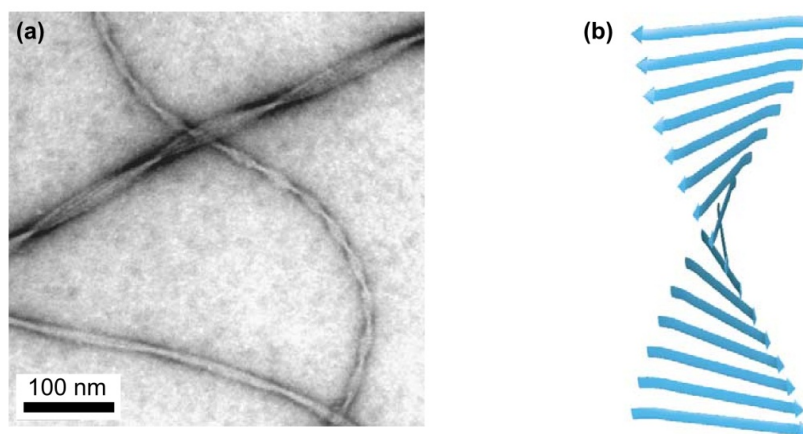


Figure 84 : (a) Image en MET de fibres du peptide β amyloïde, (b) Représentation de la structure en feuillet β twisté [Tycko, 2004].

Des études de diffraction des rayons X et de RMN ont révélé une structure très ordonnée des fibrilles amyloïdes, riche en feuillet β [Sunde *et al.*, 1997 ; Lührs *et al.*, 2005 ; Jaroniec *et al.*, 2004 ; Tycko, 2004]. La structure est composée d'un quaternaire unique, résultant d'un croisement intermoléculaire de feuillets β qui s'étend sur plus d'une molécule, ce qui rend la fibrille un «feuillet β de feuillets β » (Figure 85) [Lührs *et al.*, 2005].

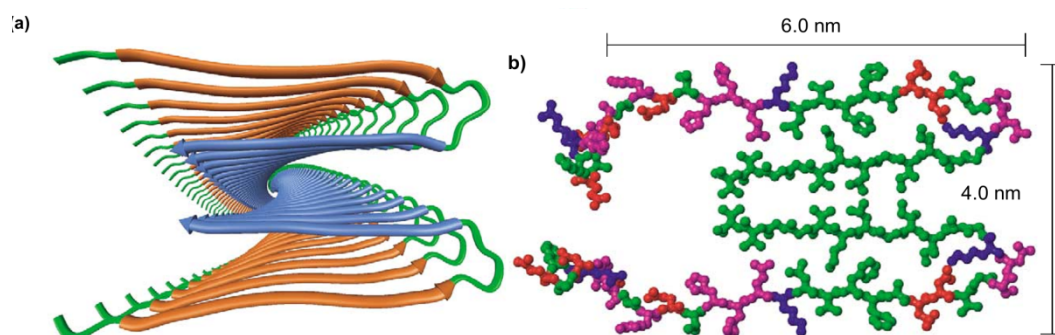


Figure 85 : Modèle atomique de la structure C2x (vert : hydrophobe ; magenta : polaire ; rouge : chargé négativement ; bleu : chargé positivement) [Tycko, 2004].

Les peptides amyloïdes repliés en feuillets β s'empilent les uns sur les autres par l'intermédiaire de liaisons hydrogène pour former les feuillets β croisés parallèles et colinéaires à l'axe de la fibre (Figure 83.A). L'édifice formé interagit sur lui-même, par la face hydrophobe, selon une symétrie C2x ou C2z, toutes deux probables, pour constituer le protofilament (Figure 86).

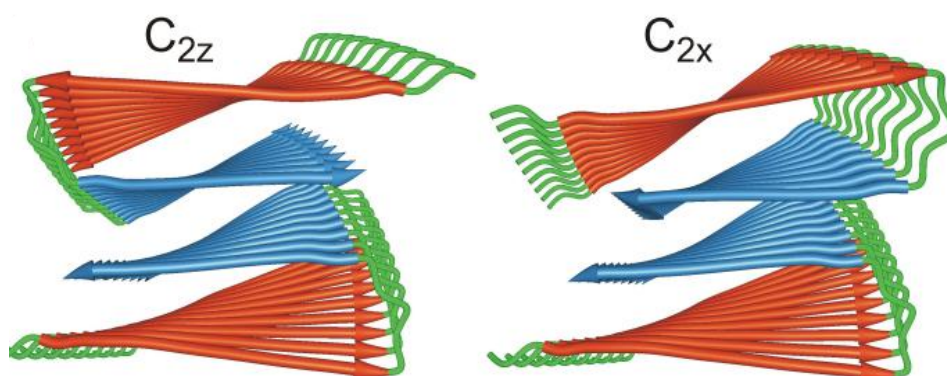


Figure 86 : Représentations des structures quaternaires des fibrilles β_{1-40} avec soit C2z ou symétries approximatives locales C2x. L'axe z est l'axe de la fibrille, à peu près perpendiculairement à la page. L'axe X est perpendiculaire à z et à peu près parallèlement aux brins β . Chaque molécule $A\beta_{1-40}$ contient deux brins β , de couleur rouge (brin β N-terminal) et bleu (brin β C-terminal), qui forment, feuillets β parallèles distincts. Différentes structures quaternaires se distinguent par différents type d'interactions entre les chaînes latérales "internes" (interfaces entre feuilles β un rouge et un bleu) et «externe» de l'interface (entre deux feuilles β bleus) [Petkova *et al.*, 2006].

Des études suggèrent que la conversion des oligomères aux fibrilles est le résultat d'une transition des feuillets β antiparallèles aux feuillets β parallèles. Ces changements structuraux sont décrits en termes de rupture/formation de liaisons hydrogène, réorientation de brins β et d'allongement des feuillets β [Sarroukh *et al.*, 2011].

Des études très récentes menées par Antzutkin *et al.* en utilisant la RMN du solide sont parvenus pour la première fois à analyser des liaisons hydrogène probables dans des petits oligomères formés par les peptides β amyloïdes Ac-A β_{16-22} -NH₂ et A β_{11-25} , qui sont les principaux fragments centraux du peptide A β (Figure 87). Antzutkin *et al.* ont réussi à mesurer la distance entre les deux isotopes ^{15}N et ^{17}O des groupes amines et carbonyles respectivement [Antzutkin *et al.*, 2012].

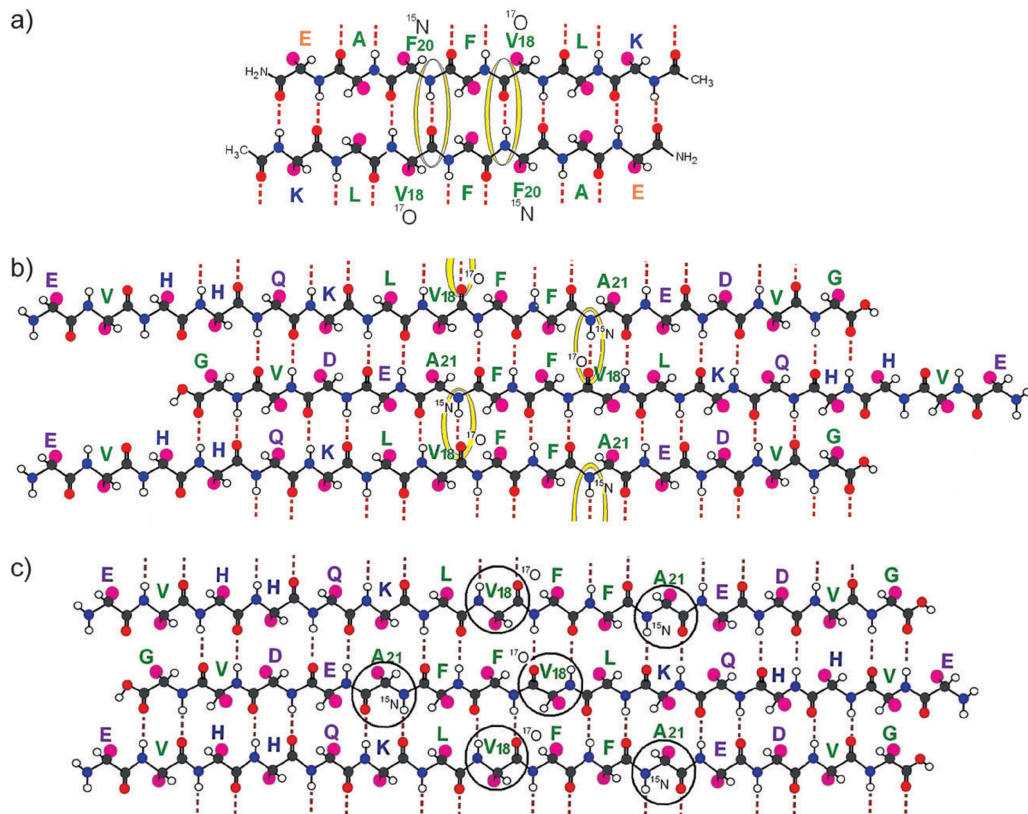


Figure 87 : Représentation schématique de la liaison hydrogène dans les modèles de fibrilles amyloïdes de Ac-A β_{16-22} -NH₂ (a) et A β_{11-25} incubées dans une solution aqueuse à un pH 2,4 pendant 80 jours (b) and et à pH 7.4 pendant 20 jours (c). Trois arrangements antiparallèles sont présentés, et les expériences ont été effectuées sur des échantillons avec un marquage du groupe carbonyle de la Val₁₈ par l'isotope ^{17}O et de la Phe₂₀ par l'isotope ^{15}N (Ac-A β_{16-22} -NH₂) (a) ou le groupe amide Ala₂₁ (A β_{11-25}) (b et c). Fragments marqués sélectivement par des isotopes impliqués dans les liaisons hydrogène ($\text{C}=\text{}^{17}\text{O} \cdots \text{H}-\text{}^{15}\text{N}$) sont entouré par des cercles jaunes et noirs [Antzutkin *et al.*, 2012].

Les fibres amyloïdes sont alors des structures quaternaires de protéine de type feuillet β et assemblées grâce à des liaisons hydrogène intermoléculaires [Barrow et Zagorski, 1991]. La formation de fibres amyloïdes peut être suivie par spectrophotométrie en présence de rouge Congo **116** (Figure 88), et par spectroscopie de fluorescence en présence de thioflavine T **117** (Figure 89) [Klunk W. E. et col, 1999 ; LeVine H., 1993].

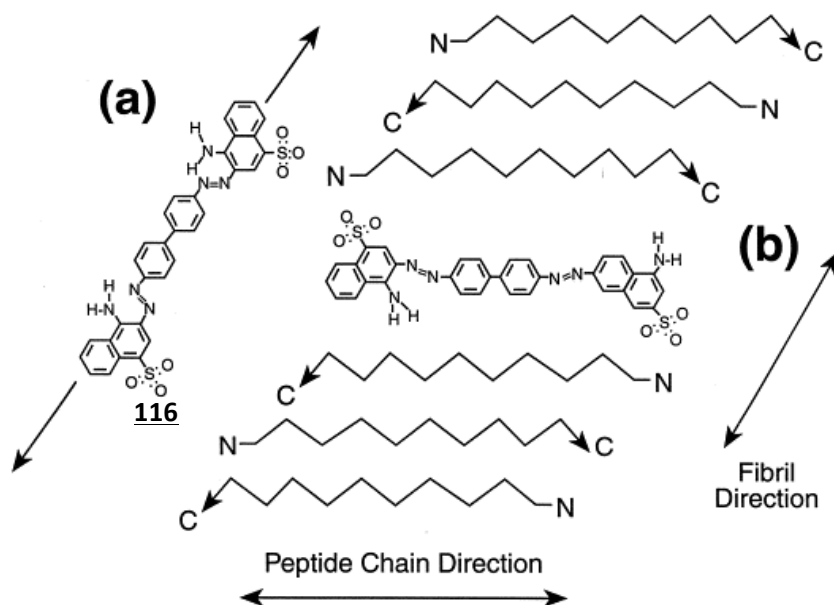


Figure 88 : Structure et modes d'interaction du Rouge de Congo [Carter et Chou, 1998].

La thioflavine T **117** devient fluorescente à 482 nm en présence de fibres amyloïdes. Pour confirmer les résultats obtenus en présence de thioflavine T et de rouge Congo, il est conseillé d'effectuer de l'imagerie (lumière polarisée, microscopie à force atomique, microscopie électronique) afin d'imager concrètement cette présence de fibres. Enfin, les techniques de dichroïsme circulaire et de spectroscopie infrarouge permettent de caractériser la structure secondaire des protéines assemblées. L'ensemble de ces observations permet de conclure sur la présence de fibres amyloïdes.

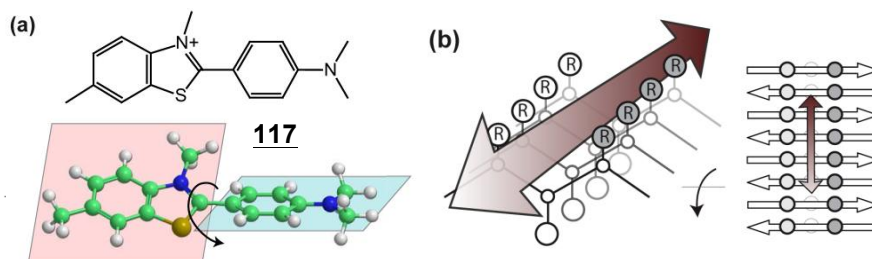


Figure 89 : Structure et modes d'interaction de la Thioflavine T avec des fibres amyloïdes [Biancalana et Koide, 2010].

Des études récentes suggèrent que les oligomères β amyloïdes sont éventuellement à l'origine de la neurotoxicité par perméabilisation de la membrane [Demuro *et al.*, 2005 ; Kourie *et al.*, 2002 ; Kayed *et al.*, 2004 ; Fagan *et al.*, 2006 ; Lashuel et Lansbury, 2006 ; Lin *et al.*, 2001 ; Simakova et Arispe 2006]. Par conséquent, une nouvelle hypothèse a été développée, dans laquelle les oligomères β amyloïdes induisent une neurotoxicité en formant des pores/canaux dans les membranes cellulaires (Figure 90) [Sarroukh *et al.*, 2009]. Ces pores permettent un afflux rapide et incontrôlé des ions, en particulier des ions calcium dans les cellules neuronales, ce qui peut conduire directement à la mort cellulaire, ou déclencher la voie de signalisation de l'apoptose [Dong *et al.*, 2006].

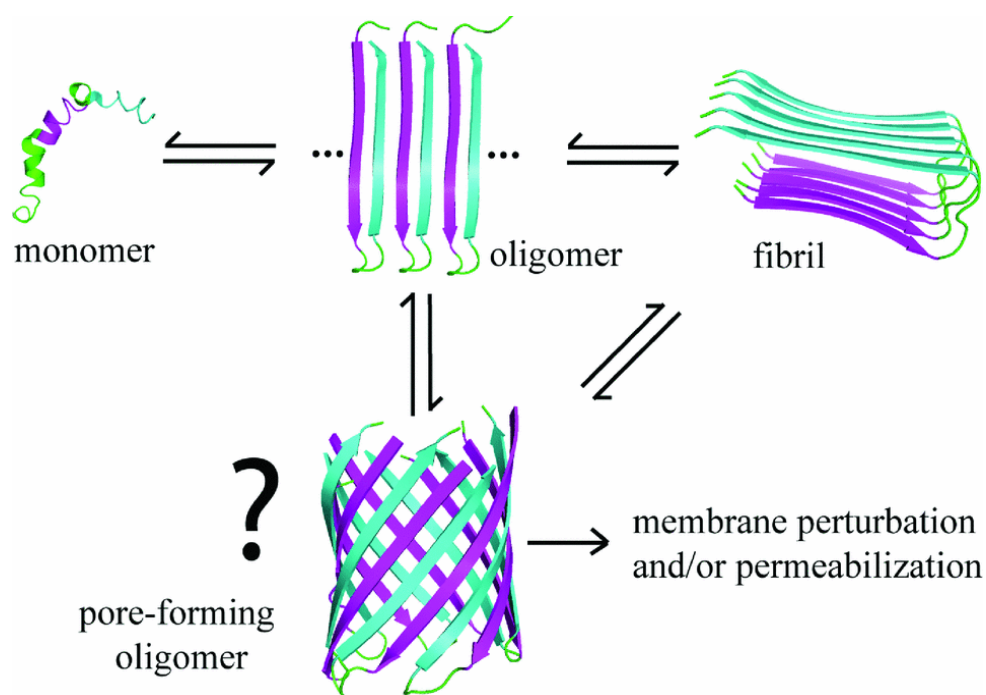


Figure 90 : Représentation schématique d'un pore formé à partir des oligomères A β [Sarroukh *et al.*, 2009].

L'ion calcium est le messenger intracellulaire le plus important du cerveau. Il joue un rôle primordial dans les processus d'apprentissage et de la mémoire. Il est également impliqué dans la survie et la mort neuronale. La perte de la régulation de l'homéostasie du calcium est un aspect commun à plusieurs maladies neurodégénératives. Dans la maladie d'Alzheimer, des concentrations élevées du calcium cytosolique stimule l'agrégation de A β et l'amyloïdogenèse [Isaacs *et al.*, 2006 ; Pierrot *et al.*, 2004 ; Bachurin, 2003].

Des mutations au niveau des présénilines sont susceptibles de perturber l'homéostasie du calcium dans le réticulum endoplasmique [Leissring et al., 2000 ; Nelson et al., 2007]. Cependant, le principal effet de ces mutations est d'augmenter les niveaux de A β ₁₋₄₂, qui à son tour augmente les réserves de calcium dans le réticulum endoplasmique et sa libération dans le cytoplasme [LaFerla, 2002]. Le taux élevé du calcium intracellulaire cause l'activation des caspases et d'autres facteurs d'induction d'apoptose, conduisant à la perte des neurones (Figure 91) [Lipton, 2006; Suh et Checler, 2002]. L'excès de Ca²⁺ génère alors un stress oxydant *via* la surconcentration de calcium dans les mitochondries et l'activation de l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) qui conduit à la production du radical NO[•] et à la formation du radical dioxyde d'azote et de radical superoxyde [Querfurth et LaFerla, 2010].

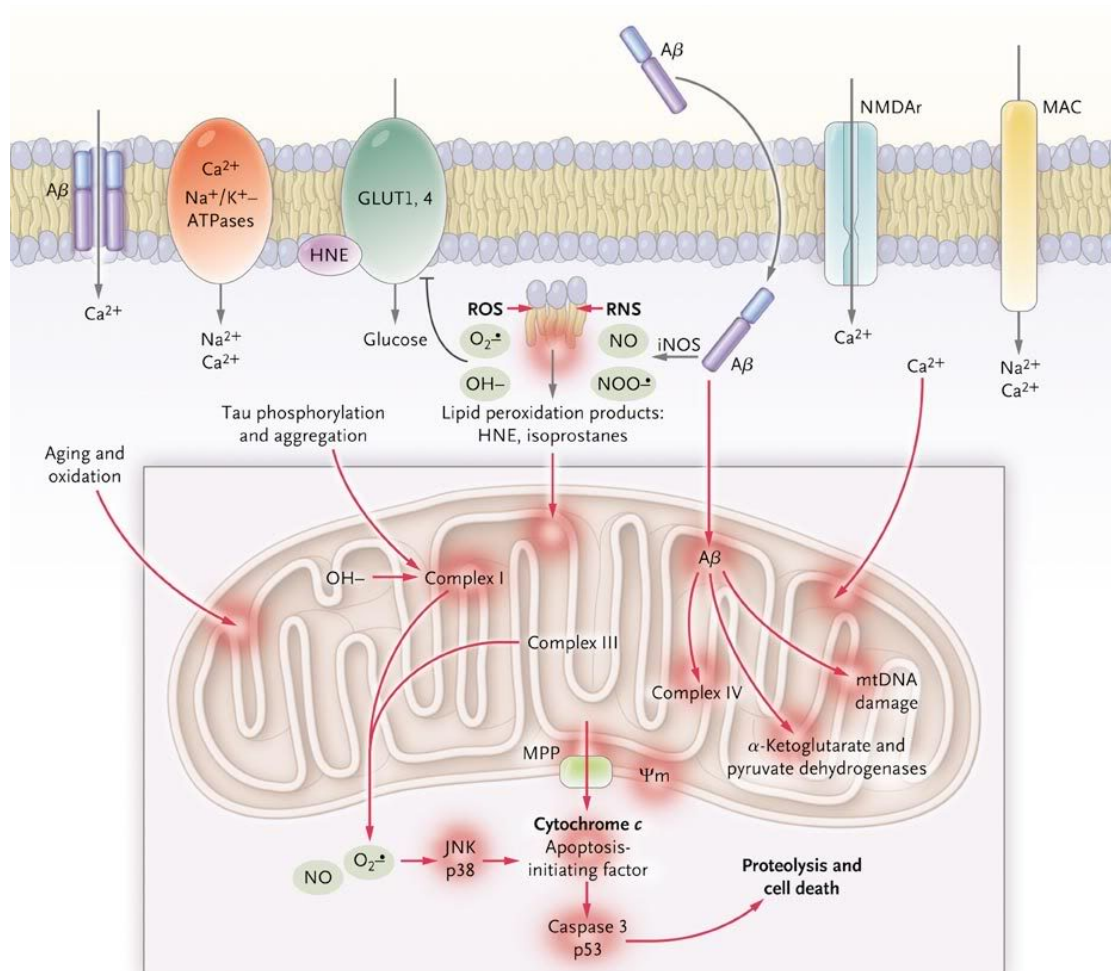


Figure 91 : Stress oxydatif et altération mitochondriale [Querfurth et LaFerla, 2010].

The diagram illustrates the role of microglia and astrocytes in Alzheimer's disease pathology. It shows a neuron, a microglia cell, and an astrocyte. Microglia are shown phagocytosing Aβ plaques and releasing inflammatory cytokines. Astrocytes are shown degrading Aβ and releasing apolipoprotein J and MMP. The neuron is shown with APP, Aβ, and LRP-1, leading to neurotoxicity and cell death. A legend identifies degradation pathways: IDE, Plasmin, MMP, and Nep.

~ 175 ~

III.2. Rôle physiologique du peptide β -amyloïde

$A\beta$ est produit au cours du métabolisme cellulaire normal [Haass *et al.*, 1992/1993 ; Shoji *et al.*, 1992] et sécrété dans le milieu extracellulaire du cerveau humain et également trouvé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ainsi que des cellules non neuronales [Araki *et al.*, 1994]. Cependant cette production «normale » ne dépasse pas des concentrations de l'ordre du nanomolaire. A ces concentrations, le peptide $A\beta_{1-40}$ possède des propriétés neurotrophiques quand il est appliqué sur des cultures de cellules hippocampiques de rat. Mais, dès qu'une concentration de 40 nM est atteinte, le peptide devient toxique [Yankner *et al.*, 1990]. Des études ont montré que le peptide $A\beta_{1-40}$ conserve son activité protectrice jusqu'à des concentrations de 20 μ M tant qu'il reste à l'état de monomère [Zou *et al.*, 2003].

La présence d' $A\beta$ dans le LCR des individus non déments pourrait indiquer un rôle physiologique de ce peptide $A\beta$ dans le système nerveux central. Les fonctions physiologiques suggérées d' $A\beta$ comprennent la modulation des canaux ioniques, l'activation des kinases, la régulation du transport du cholestérol, la protection contre les dommages oxydatifs induites par les métaux, l'apprentissage, mémorisation et la régulation de la transcription des gènes associés à la MA.

Il a été montré que le peptide $A\beta_{1-40}$ inhibe l'oxydation des lipoprotéines dans le liquide céphalorachidien et le plasma [Kontush, 2001]. Ces données semblent confirmées par Zou et collaborateurs qui ont montré un effet antioxydant de l' $A\beta_{1-40}$ [Zou *et al.*, 2002].

Des études, *in vitro*, ont démontré un autre aspect protecteur du peptide $A\beta_{1-40}$ qui serait lié à sa capacité à inhiber la formation de fibrilles d' $A\beta_{1-42}$ [Hasegawa *et al.*, 1999]. Une autre étude a montré que le peptide $A\beta_{1-40}$ interagit directement avec $A\beta_{1-42}$ et bloque son changement conformationnel en feuillets β , une étape essentielle dans la formation de fibrilles.

L'effet protecteur d'A β ₁₋₄₀ sur la toxicité induite par A β ₁₋₄₂ a été confirmé sur des cellules en culture [Zou *et al.*, 2003]. Très récemment, Jan et collaborateurs ont montré que le ratio 40/42 conditionne directement les capacités anti-agrégantes de l'A β ₁₋₄₀ [Jan *et al.*, 2008]. De plus, ils montrent que l'A β ₁₋₄₀ limite non seulement l'agrégation de l'A β ₁₋₄₂ monomérique, mais bloque également la maturation de protofibrilles d'A β ₁₋₄₂ en fibres matures.

Enfin, des études récentes ont indiqué que dans des conditions normales la présence d'A β est importante pour l'apprentissage et la mémoire, et que les peptides A β ₁₋₄₂ sont aussi diffusés dans des quantités plus faibles dans les cerveaux normaux au cours de l'activité synaptique. A β ₁₋₄₂ facilite l'induction et le maintien de la potentialisation à long terme dans des coupes hippocampiques [Morley *et al.*, 2010].

Des études ont démontré que les faibles concentrations de A β ₁₋₄₂ jouent un rôle modulateur positif sur la neurotransmission et la mémoire, tandis que des concentrations élevées exercent un effet néfaste aboutissant à la démence (Figure 93) [Puzzo *et al.*, 2008]. Ces études ont démontré que les faibles concentrations picomolaires d'une préparation contenant à la fois des monomères et oligomères A β ₁₋₄₂ cause une augmentation marquée de la potentialisation à long terme de l'hippocampe, alors que de fortes concentrations nanomolaires conduisent à la réduction bien établie des niveaux de potentialisation.

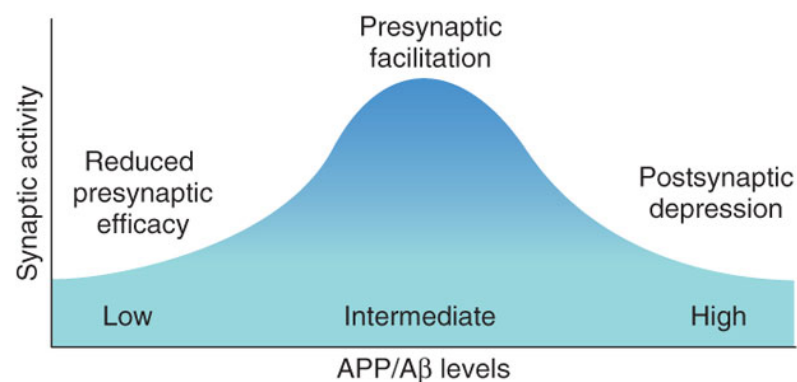


Figure 93 : Régulation présynaptique et postsynaptique de la transmission synaptique par A β [Palop et Mucke, 2010]. *la relation hypothétique entre le niveau d'A β et l'activité synaptique. Les niveaux intermédiaires d'A β améliorent l'activité synaptique et présynaptique, alors que des niveaux anormalement élevés ou faibles d'A β nuisent à l'activité synaptique en induisant la dépression post-synaptique ou la réduction de l'efficacité présynaptique, respectivement.*

IV. Traitements anti-Alzheimer

Si la cause exacte de la MA est encore inconnue, il est suspecté que des facteurs environnementaux et génétiques y contribuent. Actuellement, il n'existe aucun traitement étiologique de la maladie, ni même de traitement permettant d'arrêter son évolution ; quelques médicaments sont susceptibles de la retarder. Ces médicaments permettent d'atténuer les pertes de mémoires, les problèmes de langage et de raisonnement, ou semblent ralentir au moins en apparence la progression de la maladie [Ferrari *et al.*, 2001].

IV.1. Stratégies utilisées en clinique

Dans le but de combattre les effets de la dégénérescence progressive des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et le néocortex et d'atténuer de ce fait les troubles cognitifs ainsi que ceux de la mémoire, des inhibiteurs d'acétylcholinestérase, tel que le donépézil **119**, la rivastigmine **120**, la galantamine **118** et la tacrine **121** ont été mis sur le marché dans l'indication du traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer légère à modérément sévère (Figure 94). Ceci permet d'augmenter la transmission cholinergique en inhibant l'enzyme de dégradation dans l'espace synaptique, l'acétylcholinestérase. En raison d'un risque d'hépatotoxicité la tacrine, le premier traitement commercialisé en 1993 [Tumiatti *et al.*, 2010], n'est plus prescrite.

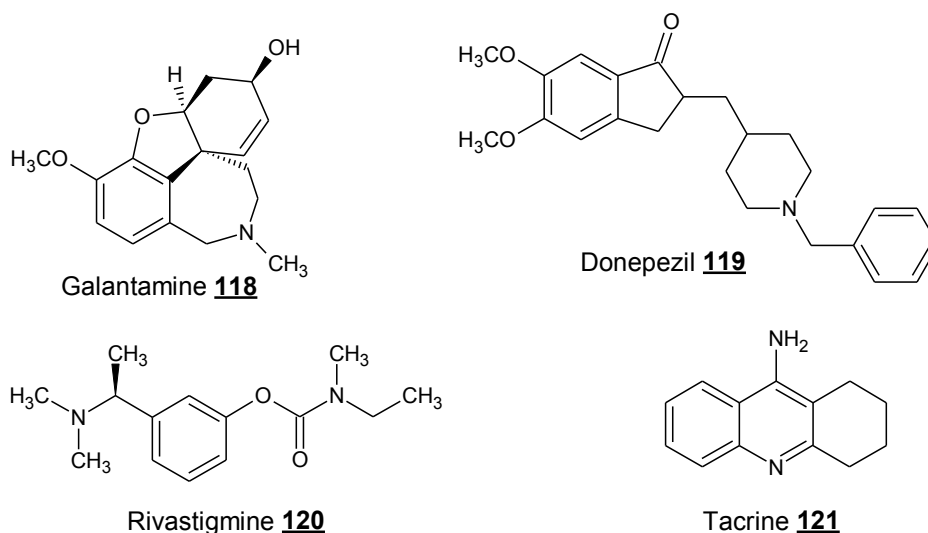


Figure 94 : Quelques inhibiteurs d'acétylcholinestérase.

Les récepteurs glutaminergiques NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) quant à eux jouent un rôle important dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Par ailleurs, une activité excessive de ces récepteurs entraîne une destruction des cellules nerveuses. La mémantine (Figure 95) est un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA qui freine l'excitation glutaminergique et induit un effet neuroprotecteur [Gong et Iqbal, 2008].

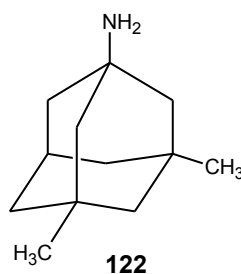


Figure 95 : La mémantine « bloqueur des récepteurs glutaminergiques NMDA ».

La mémantine est le premier médicament non cholinergique mis sur le marché. Les études ont confirmé l'activité sur les fonctions cognitives et le déclin fonctionnel aux stades sévères de la maladie et, plus récemment, aux stades modérés [Winblad *et al.*, 2007].

Une étude en double aveugle a ainsi montré un bénéfice lors d'une bithérapie en associant de la mémantine au donépézil [Tariot *et al.*, 2004]. Par ailleurs, une étude plus récente a montré que l'association de ces deux molécules n'a pas d'avantages significatifs, sur les fonctions cognitives et le déclin fonctionnel aux stades sévères et aux stades modérés de la maladie, par rapport à l'efficacité de l'une des deux seule [Howard *et al.*, 2012].

IV.2. Traitements étiologiques en cours d'étude

Les traitements symptomatiques présentés précédemment n'interviennent pas directement dans la cascade amyloïde. Des deux cibles possibles, la plaque amyloïde extracellulaire et la dégénérescence neurofibrillaire intraneuronale, le choix s'est prioritairement porté sur la première. Afin d'interférer avec cette voie, une seconde stratégie thérapeutique consiste à développer des médicaments capables d'influencer la production, l'agrégation, le dépôt et/ou la clairance de la protéine amyloïde β .

Plusieurs approches basées sur l'hypothèse amyloïde sont en développement. Une première approche réside dans la stimulation de la voie non amyloïde, qui vise à augmenter l'activité normale de l' α -sécrétase afin d'éviter la production du peptide A β . Un activateur de la protéine kinase C (PKC), testé dans le cancer augmenterait significativement l'activité de l' α -sécrétase et réduirait la concentration de l'A β_{42} dans le cerveau de souris transgéniques Alzheimer. La bryostatine 1 (Figure 96) ayant fait l'objet de nombreuses études cliniques pour le traitement du cancer, elle pourrait être facilement testée comme agent thérapeutique potentiel chez des patients Alzheimer [Etcheberrigaray *et al.*, 2004].

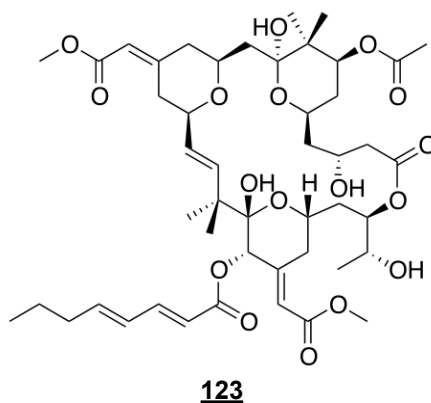


Figure 96 : Bryostatine 1.

Ainsi, l'approche la plus directe dans la thérapie anti-A β est la réduction de la production de A β , ce qui a conduit naturellement à mettre l'accent sur les inhibiteurs des β - et γ -sécrétases [Vassar *et al.*, 1999 ; Vassar et Citron, 2000 ; Gao et Pimplikar, 2001 ; Kitazume *et al.*, 2001 ; Luo *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2003].

Bien que l'utilisation de petites molécules pour moduler la γ -sécrétase bénéficie d'une attention croissante en tant qu'approche thérapeutique prometteuse [Tomita, 2008], et en dépit des efforts considérables dans ce domaine, peu des nouveaux composés chimiques fondés sur cette stratégie ont atteint les essais cliniques. La γ -sécrétase ayant de nombreux substrats physiologiquement essentiels, les effets indésirables sont alors inévitables. Un des substrats est la protéine de signalisation de Notch, qui joue un rôle d'intermédiaire, essentiel, dans la différenciation et la prolifération de nombreux types cellulaires.

Les conséquences de l'inhibition de la γ -sécrétase comprennent notamment des troubles de la différenciation des lymphocytes et une altération de la structure des

cellules du mucus intestinal [Van *et al.*, 2005 ; Tarassishin *et al.*, 2004 ; Leissring *et al.*, 2002].

L'administration orale d'un inhibiteur non peptidique sélectif de la β -sécrétase (BACE-1) diminue le clivage β de l'APP et entraîne une réduction significative de l'A β_{40} et l'A β_{42} dans le cerveau de souris transgéniques APP.

L'inhibition de la β -sécrétase n'est pas porteuse du même risque de toxicité que celui de l'inhibition γ -sécrétase. Cependant, la conception des inhibiteurs de la β -sécrétase est difficile. La protéine β -sécrétase contient une grande poche catalytique, par conséquent les inhibiteurs de la β -sécrétase développés à ce jour, sont trop volumineux pour pénétrer la barrière hémato-encéphalique [Citron, 2004 ; Opar, 2008 ; Citron, 2010].

Le développement d'inhibiteurs des sécrétases A β est basé sur l'hypothèse que les dépôts A β dans le cerveau sont dus à la surproduction ou la mauvaise clairance d'A β . Cependant, il est probable que ceci est seulement vrai pour les cas de MA familiale causée par une mutation génétique. Les cas de MA non génétiques, qui représentent la majorité des patients, ne portent de mutations et ne doivent pas nécessairement avoir une surproduction de la protéine amyloïde précurseur (APP) [Nishitomi *et al.*, 2006]. Plus important encore, une meilleure compréhension de A β a révélé que les isoformes de A β serviraient également comme régulateurs endogènes positifs de libération probable d'A β au niveau des synapses hippocampiques, d'où certaines études suggèrent que les monomères A β sont bénéfiques pour les neurones [Giuffrida *et al.*, 2009 ; Abramov *et al.*, 2009].

Un long peptide A β (par exemple A β_{1-42}) forme des fibrilles amyloïdes insolubles plus rapidement que A β_{1-40} . Ainsi, les mutants de l'APP₇₁₇ peuvent causer la maladie d'Alzheimer, car elles sécrètent des quantités accrues de A β étendu, ce qui favorise un dépôt amyloïde [Suzuki *et al.*, 1994].

Les mutations causant la MA sont trouvées au niveau des gènes codant pour l'APP et les sécrétases [Goate *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1994]. Des mutations dans les gènes codant pour des présénilines (PS1 et PS2) qui participent dans le complexe catalytique de la γ -sécrétase sont fonctionnellement associées à une augmentation de la production de $A\beta_{1-42}$ [Suzuki *et al.*, 1994]. En revanche, les maladies sporadiques souffriraient surtout d'une réduction de la clairance de la protéine sous l'influence de facteurs de risque génétiques tels que l'allèle 4 de l'apolipoprotéine E (APOE 4) et de facteurs d'environnement.

Une troisième approche vise à détruire les plaques amyloïdes par l'immunothérapie. Cette approche a été développée après l'observation que des anticorps dirigés contre le peptide $A\beta_{1-42}$ inhibent non seulement son agrégation *in vitro* mais peuvent aussi solubiliser les dépôts amyloïdes. Un vaccin (AN1792 $A\beta$) composé d'agrégats de peptides $A\beta_{1-42}$ a été ainsi étudié par des essais cliniques. Cependant, ces essais ont dû être arrêtés en phase II à cause du développement de cas de méningoencéphalites [Lemere et Masliah, 2010]. De nouveaux vaccins composés de fragments *N*-terminaux de peptides $A\beta$ ont ensuite été conçus et sont actuellement en étude clinique.

Enfin, une quatrième approche consiste à l'élaboration de molécules qui interfèrent avec le processus de formation de fibres amyloïdes. La conception et la synthèse d'inhibiteurs de l'agrégation du peptide $A\beta$ sont au cœur de mon sujet de thèse et seront développées ici en détail.

IV.3. Inhibiteurs d'agrégation du peptide β -amyloïde

La toxicité du peptide β amyloïde ($A\beta$), est censée jouer un rôle crucial dans le développement de la MA [Hardy et Selkoe, 2002]. Ainsi, les stratégies anti-amyloïdes ont été l'objet principal de développement de médicaments pour lutter contre la MA ces 10 dernières années. L'une des stratégies thérapeutiques suggérée pour le traitement de la MA est l'inhibition de la cascade amyloïde, dont de nombreux inhibiteurs d'agrégation du peptide β amyloïde ont été identifiés. Il s'agit notamment de petites molécules organiques, des peptides, des peptidomimétiques et des protéines (Figure 97).

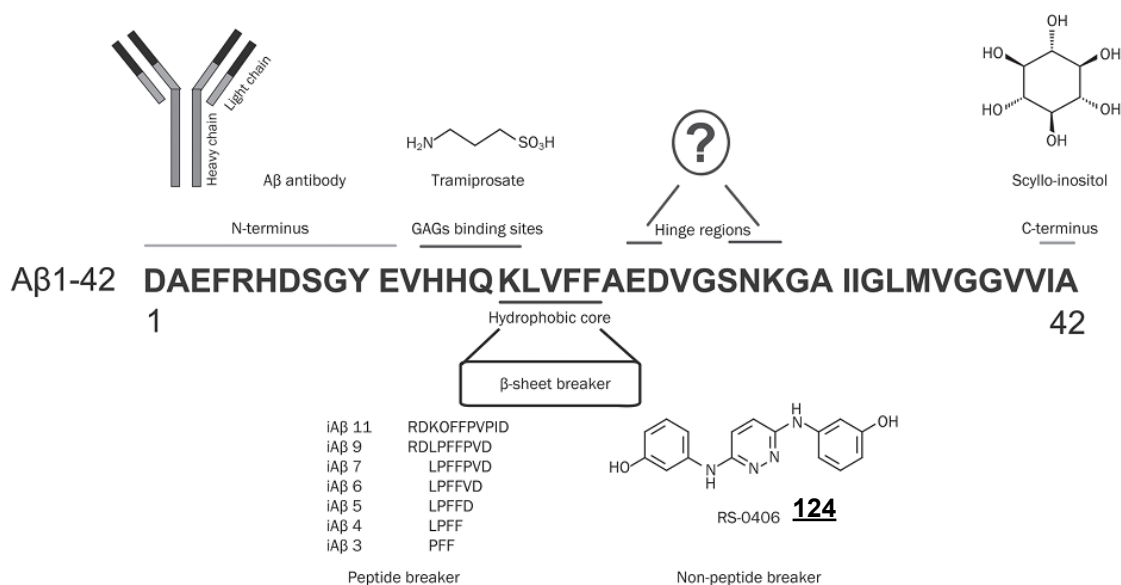


Figure 97 : Les régions cibles dans Aβ [Nie *et al.*, 2011].

À l'heure actuelle, l'agrégation du peptide Aβ en oligomère prefibrillaire toxique, est considérée comme l'événement pathogène clé dans l'apparition de la MA [Resende *et al.*, 2008 ; Walsh et Selkoe, 2004]. Conformément à ce point de vue, les oligomères Aβ peuvent : (1) induire directement un dysfonctionnement synaptique et la mort neuronale qui sont les deux responsables de l'initiation et la progression de la MA [Reddy et Beal, 2008 ; Hu *et al.*, 2008 ; Rowan *et al.*, 2007] ; et (2) des événements déclencheurs tels que les dommages oxydatifs et l'inflammation, qui contribuent à la progression de la maladie [Salminen *et al.*, 2009 ; Ruan *et al.*, 2009 ; Ali-Khan *et al.*, 1988].

Des efforts considérables ont été déployés ces dernières années sur le développement de petites molécules qui sont capables d'inhiber l'agrégation de Aβ. Cependant, à ce jour, aucun des composés n'a abouti à une utilisation clinique. Ceci est en particulier du au fait que l'inhibition de l'agrégation de Aβ nécessite le blocage des interactions protéine-protéine entre les monomères Aβ qui sont des cibles particulièrement difficiles [Whitty et Kumaravel, 2006].

Pour relever ces défis, les chercheurs ont imaginé une stratégie de cheval de Troie dans laquelle des petites molécules bifonctionnelles bénéficiant d'un accès au compartiment biologique pertinent, se lie étroitement à un chaperon, et fournit ainsi le volume stérique nécessaire pour perturber des interactions protéine-protéine [Gestwicki *et al.*, 2004].

Une deuxième approche consiste à cibler directement les chaperons importants, tels que les métaux, dans le cerveau. Un nombre croissant de preuves suggère que la présence d'un excès de zinc, de fer, de cuivre et/ou d'aluminium dans les plaques séniles exacerbe les dommages oxydatifs induite par A β et agit comme un catalyseur pour l'agrégation d'A β dans la MA [Dong *et al.*, 2007]. Ainsi, les thérapies de chélation visant à perturber les interactions aberrantes entre A β et les métaux ont attiré une attention considérable ; un exemple est PBT2, qui est actuellement en phase IIa des essais cliniques [Adlard *et al.*, 2008]. Malheureusement, à ce jour, aucun des composés nouveaux qui emploient cette stratégie n'ont abouti à une utilisation clinique.

La découverte que la formation de fibrilles A β est contrôlée par certains acides aminés spécifiques « hot spot » dans le peptide A β lui-même a donné une nouvelle vue de l'idée que les petites molécules pourraient perturber son agrégation. Des études ont démontré que les diverses régions du peptide A β contribuent différemment à son agrégation et ont identifié des interactions importantes entre des régions peptidiques spécifiques qui contrôlent ce processus [Maji *et al.*, 2009]. Par exemple, les extrémités *N*- et *C*-terminales [Gardberg *et al.*, 2007 ; McLaurin *et al.*, 2002 ; Fradinger *et al.*, 2008 ; McLaurin *et al.*, 2006], les cœurs hydrophobes [Wasmer *et al.*, 2008 ; Permanne *et al.*, 2002], régions de coudes ou boucles [Maji *et al.*, 2009 ; Hoyer *et al.*, 2008 ; Fawzi *et al.*, 2008] de A β sont tous cruciaux pour la capacité du peptide à s'agréger et ainsi promouvoir la neurotoxicité.

L'importance de la région His₁₃-Lys₁₆ (HHQK) dans l'oligomérisation, la propagation fibrillaire et la neurotoxicité est bien connue [Bartolini *et al.*, 2007 ; Williamson *et al.*, 2006 ; Watson *et al.*, 1997]. Cette région à quatre résidus est également une composante essentielle du site de liaison à l'héparine pour les glycosaminoglycanes (GAG), qui aident le motif HHQK à effectuer un changement dans la structure secondaire de A β soluble, non ordonnée en forme d'une hélice α à une conformation stable riche en feuillets β . Ces structures riches en feuillets β ont une affinité, à leur tour, pour l'association avec d'autres monomères pour former des oligomères, protofibrilles et des fibrilles qui s'agrègent sous forme de plaques [Bartolini *et al.*, 2007]. La structure en épingle à cheveux β sert au repliement des monomères A β , ce qui est l'étape limitante dans la formation des fibrilles [Hoyer *et al.*, 2008 ; Fawzi *et al.*, 2008 ; Melquiond *et al.*, 2008].

La formation des régions de coude réunit deux segments hydrophobes dans l'espace et produit la structure en brin β . Dans cette région, la Lys₂₈ forme un pont salin avec Asp₂₃/Glu₂₂ (Figure 98), ce qui stabilise en outre la structure [Melquiond *et al.*, 2008 ; Buchete et Hummer, 2007 ; Sciarretta *et al.*, 2005].

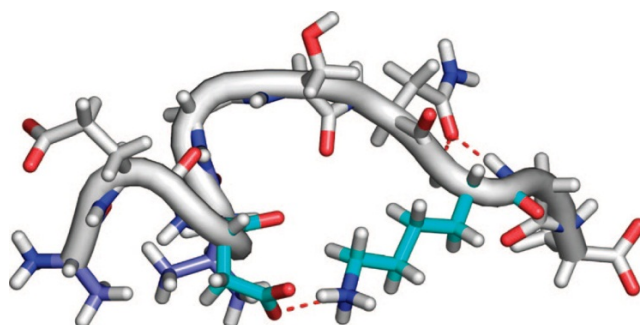


Figure 98 : La conformation représentatif de la structure en coude avec le pont salin pertinent pour les protofibrilles (représenté par la ligne pointillée rouge entre les acides aminés Asp23 et Lys28) [Fawzi *et al.*, 2008].

Les interactions électrostatiques et hydrophobes jouent un rôle crucial dans l'assemblage des peptides β amyloïdes [Buchete et Hummer, 2007]. Les segments hydrophobes sont le noyau principal des agrégats A β , et les interactions hydrophobes sont une force motrice importante dans la formation des agrégats A β [Lu *et al.*, 2007 ; Chimon *et al.*, 2007]. Sur la base de ces cœurs hydrophobes, un casseur de feuillet β a été étudié en tant que premier inhibiteur potentiel d'agregation de A β [Soto *et al.*, 1998].

En ciblant ces régions de liaison, une petite molécule sera plus susceptible de bloquer directement l'agregation de A β . En fait, la plupart des inhibiteurs qui sont entrés dans des essais cliniques ciblent ces sous-régions spécifiques dans la séquence A β (Figure 97). Tramiprosate (3-aminopropanesulfonique), un mime de GAGs, cible la région HHQK à l'extrémité *N*-terminale.

Bien que la simplicité structurale du tramiprosate le rend très spécifique à A β , il a finalement échoué dans les derniers stades d'une Phase III des essais cliniques [Rauk, 2008]. Malgré cet échec, les données obtenues ont fourni la preuve que les inhibiteurs ciblant des régions spécifiques de A β représentent une approche viable pour le traitement de la MA [Blazer et Neubig, 2009].

Le scyllo-inositol est l'un des agents ciblant l'extrémité C-terminale qui s'est montré prometteur dans les essais en cours de phase clinique. Ce dernier interfère avec des assemblages fibrillaires de A β en se liant à A β ₄₁₋₄₂ [McLaurin *et al.*, 2006]. La région hydrophobe centrale, KLVFF, est encore une autre cible prometteuse pour les inhibiteurs de la fibrillation A β , qui comprennent **RS-0406124** (Figure 97) [Nakagami *et al.*, 2002].

Un grand nombre de composés organiques ont été démontré pour inhiber ou ralentir, *in vitro*, l'agrégation des peptides A β sous forme de fibres. Il s'agit notamment de la nicotine, β -cyclodextrine, l'hémine et analogues de porphyrines, anthracycline 4'-iodo-4'-deoxy doxorubicine, hexadécyl-*N*-methyl-piperidinium de bromure (HMP), la rifampicine, (-)-5,8-dihydroxy-3*R*-méthyl-2*R*-(dipropylamino)-1,2,3,4-tétrahydro-dronaphtalène et de la mélatonine (Figure 99).

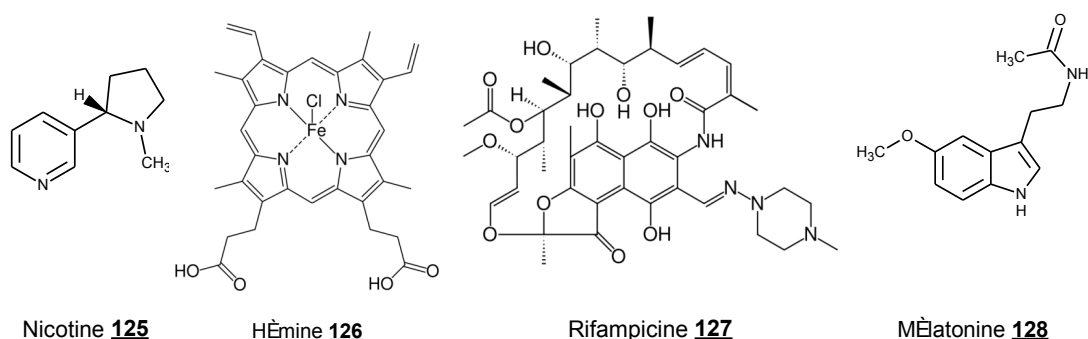


Figure 99 : Quelques inhibiteurs de l'agrégation de A β

Comme la stratégie d'inhibition de l'agrégation de A β a gagné de plus en plus de place, un plus grand nombre d'inhibiteurs a été développé et les relations structure-activité des inhibiteurs puissants ont été systématiquement explorées [Reinke et Gestwicki, 2007].

Ces études ont révélé que les inhibiteurs typiques de l'agrégation de A β tels que le rouge Congo (RC), chrysamine G (CG) et la curcumine partagent un scaffold similaire. Ces molécules contiennent deux groupes aromatiques ou des groupes inositol (avec un groupe convenablement substitué) séparés par un squelette de longueur appropriée [Reinke et Gestwicki, 2007].

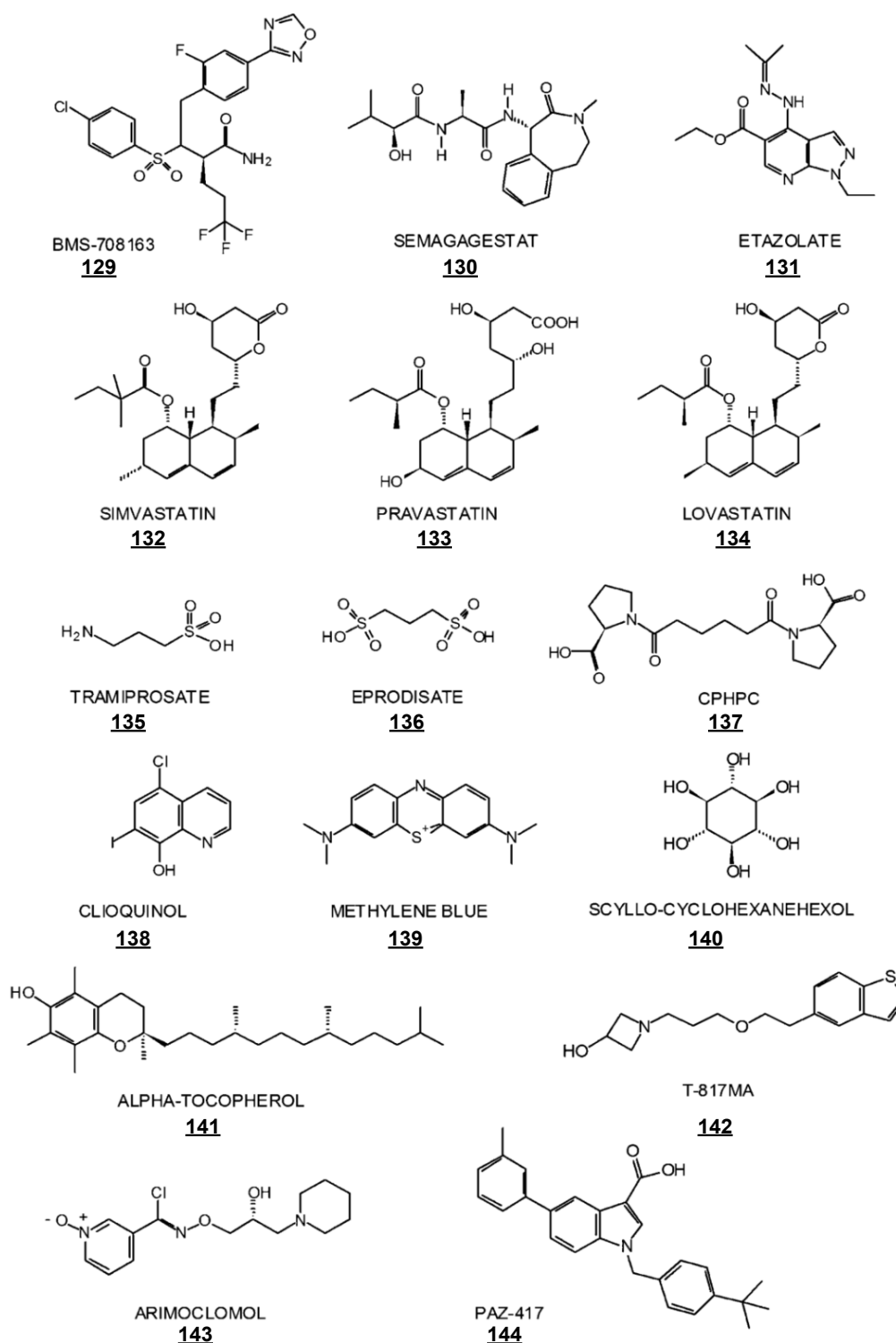


Figure 100 : Quelques inhibiteurs en stades cliniques.

D'après les travaux de Tjernberg *et al.*, les résidus 16 à 20 (**KLVFF**) sont nécessaires à l'interaction entre les peptides A β [Tjernberg *et al.*, 1996/1997]. Cette partie centrale du peptide A β est alors désignée comme élément crucial pour la formation de fibres.

Des études par modélisation moléculaire montrent que l'interaction entre les résidus de cette zone, dite de nucléation, et la région homologue ($A\beta_{17-21}$ et/ou $A\beta_{18-22}$) se fait via la formation d'un feuillet β -antiparallèle. Cependant, ce pentapeptide seul ne permet pas la formation de fibres. Par la suite, la même équipe a montré que le peptide $A\beta_{14-23}$ est le plus petit fragment nécessaire à la formation des fibres. De même, les interactions électrostatiques, hydrophobes et π -stacking sont désignées comme essentielles à la formation des fibres puisque des tétrapeptides tels que **KFFE** et **KVVE** forment des fibres.

Tjernberg et Soto, ont préparé certains composés capables de perturber la formation d'un feuillet β (casseurs de feuillet β) et d'empêcher de ce fait l'agrégation du peptide β amyloïde. Ces composés sont considérés comme des agents thérapeutiques potentiels de la maladie d'Alzheimer. Les deux peptides de Tjernberg (**KLVFF**) [Tjernberg *et al.*, 1996] et de Soto (**LPFFD**) [Soto *et al.*, 1996/1998] contiennent deux phénylalanines et des acides aminés chargés (lysine et acide aspartique) qui pourraient être essentiels respectivement dans les interactions π -stacking et la formation des ponts salins entre les inhibiteurs et le peptide cible (Figure 101).

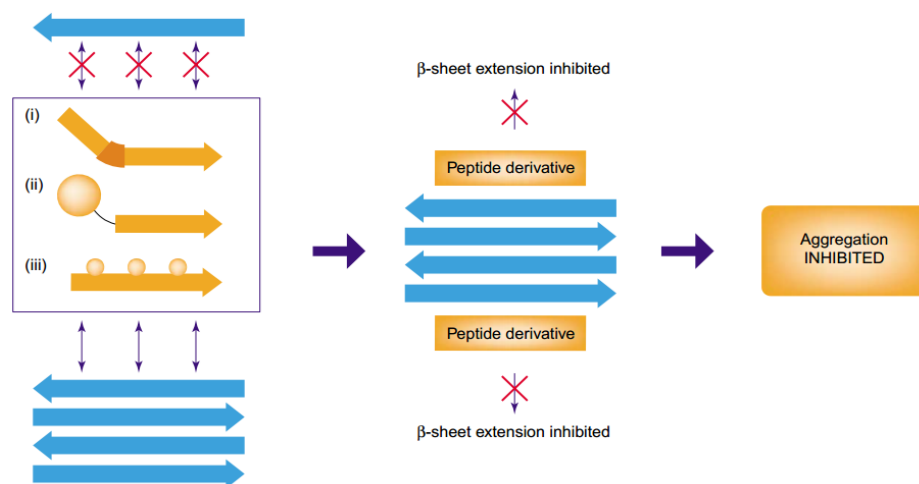


Figure 101 : Stratégies développées pour inhiber l'agrégation du peptide $A\beta$.

(i) Proline introduit un casseur de feuillet β . (ii) groupe Terminal de blocage (cholyte, poly (Lys), etc.), (iii) les amides *N*-méthylés pour bloquer un brin β .

Une variante de ce domaine central incorporant des aminoacides en tant que casseurs de feuillets- β , tel que la proline, les acides α -aminés *N*-méthylés ou les aminoacides D, se sont révélées être des molécules précieuses pour inhiber l'agrégation du peptide $A\beta$ en déstabilisant la conformation pathologique [Stains *et al.*, 2007].

V. Travail antérieur du laboratoire

Plusieurs stratégies ont été proposées pour inhiber l'agrégation des monomères solubles d'A β , soit en stabilisant les conformations natives ou en empêchant les interactions intermoléculaires des brins β par des casseurs de feuillets β . Il a été démontré que la cinétique d'agrégation peut être modulée par de petites molécules mimant une séquence hydrophobe **KL**VFF dans la région centrale de A β (résidus 16-20) qui semble importante pour la stabilisation des interactions intra- et intermoléculaires impliquées dans le processus d'oligomérisation et la formation des fibrilles amyloïdes.

Il a été déjà développé au laboratoire une classe de petites molécules glycopeptidiques, où un dérivé osidique a été incorporé dans une séquence pentapeptidique, comme inhibiteur puissant de l'agrégation de A β [Dorgeret *et al.*, 2011]. Ces composés comportent deux unités dipeptidiques hydrophobes Ala-Val et Val-Leu qui ont été choisies pour interagir avec la région hydrophobe d'A β . Les deux séquences dipeptidiques sont attachées à un espaceur central, D-glucopyranosyl, *via* des liens aminoalkyle et carboxyéthyle en positions 1 et 6 respectivement (Figure 102). Les deux liens carboxy- et amino-alkyle dans ces peptidomimétiques ont été choisis pour conférer une certaine flexibilité qui pourrait être nécessaire pour l'interaction des séquences dipeptidiques avec le feuillet β de la cible.

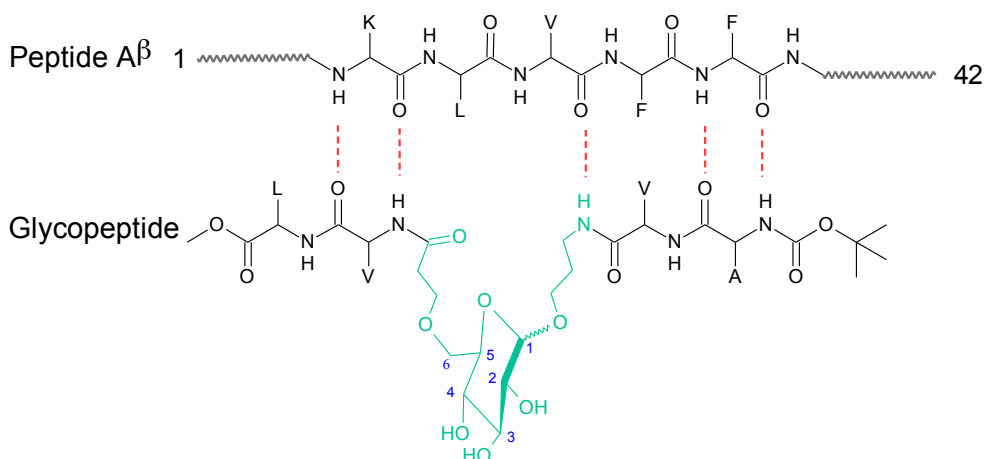
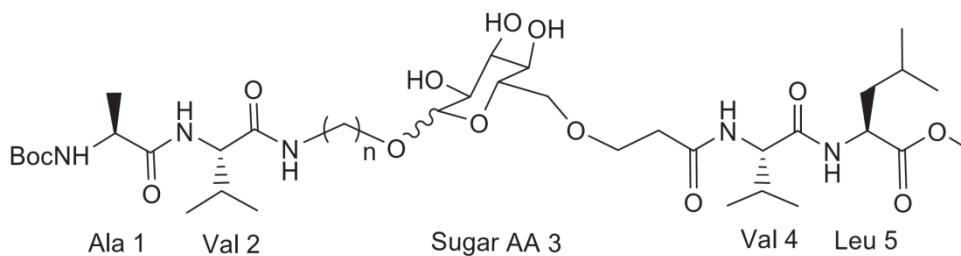


Figure 102 : Structure des glycopeptides et hypothèse de mode d'interaction avec A β [Dorgeret *et al.*, 2011].

Quatre molécules peptidomimétiques (Figure 103) qui diffèrent par la longueur de l'espaceur en position 1 ($n = 2, 3$) et la configuration du carbone anomérique (α ou β) ont été préparées. Il a été montré de même que ces molécules sont capables de diminuer le taux de formation des fibrilles A β par fluorescence à la Thioflavine-T et la microscopie électronique à transmission.



145

Figure 103 : Structure générale des peptidomimétiques contenant un dérivé aminoacide D-glucopyranosyl [Dorgeret *et al.*, 2011].

Des études par RMN 2D (NOESY), du peptidomimétique **145** (1 mM) en présence du peptide A β_{1-40} (0,25 mM), ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Professeur Olivier LEQUIN (UMR7203, UPMC). La détection des corrélations NOE négatives a indiqué clairement que le glycopeptide **145** est capable d'interagir avec les espèces A β_{1-40} [Dorgeret *et al.*, 2011]. Ceci a été confirmé par des expériences RMN-STD [Meyer et Peters, 2003] où des signaux STD ont été observés pour les résonances méthyliques des résidus Ala, Leu et Val du peptidomimétique **145**, ce qui a prouvé que ces glycopeptides interagissent avec les espèces A β_{1-40} grâce à ses acides aminés hydrophobes [Dorgeret *et al.*, 2011]. Il a été observé de même que les signaux STD sont dépendant du temps. Ce qui peut être expliqué par la lente conversion du monomère A β_{1-40} en espèces agrégées et confirme que le peptidomimétique **145** interagit préférentiellement avec les espèces A β oligomériques [Dorgeret *et al.*, 2011]. Enfin, l'hypothèse émise est que le sucre central perturbe le réseau de liaisons hydrogène par son caractère hydrophile et par sa structure qui ne respecte pas le réseau de liaisons hydrogène.

Il a été montré, au laboratoire, par des tests de fluorescence par la Thioflavine T que ces molécules peptidomimétiques retardent considérablement la cinétique de formation des fibres amyloïdes, même à un faible ratio de 0,1:1 (Inhibiteur : peptide A β). D'une autre part, la microscopie électronique a révélé que ces peptidomimétiques réduisent efficacement la quantité de fibres amyloïdes. Cet effet d'inhibition a été jugé spécifique de la séquence puisque ces molécules ne modifient pas la cinétique d'agrégation d'un autre peptide amyloïde, IAPP impliquée dans le diabète sucré de type 2.

Dans cette dernière partie de mes travaux de thèse, nous allons décrire la conception et la synthèse de nouveaux pseudopeptides originaux incorporant un motif aminoacide trifluorométhylalcool (Figure 104). Nous allons de même les tester sur le peptide β amyloïde (A β_{1-42}) afin de déterminer leur capacité à inhiber et/ou à accélérer son agrégation.

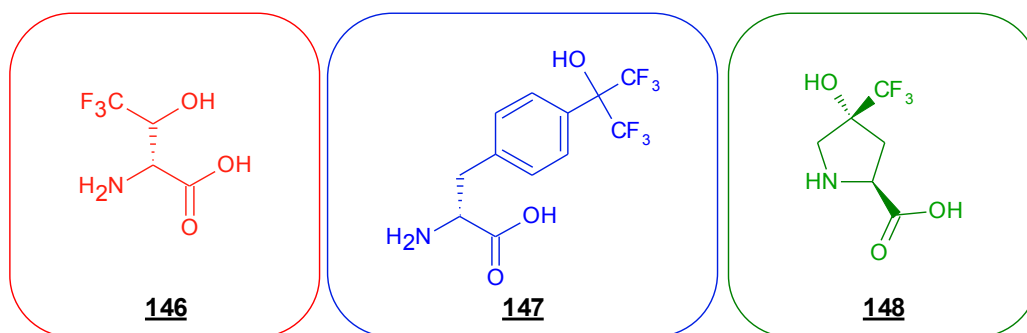


Figure 104 : Structure des aminoacides tri et hexafluorométhylalcool

VI. Objectifs

Le groupe trifluorométhylé est souvent utilisé en chimie médicinale afin d'améliorer la stabilité métabolique et/ou l'activité biologique. Il est hydrophobe, riche en électrons, encombrant, et peut remplacer des groupements fonctionnels tels qu'un groupe méthyle, isopropyle ou phényle. Par conséquent, l'incorporation d'un groupe trifluorométhylé dans une séquence peptidique ou peptidomimétique peut modifier considérablement ses propriétés structurales et donc sa capacité à interagir avec les cibles biologiques.

En se basant sur les résultats encourageants, obtenus auparavant au laboratoire, avec les dérivés glycopeptidiques et dans le but d'améliorer le profil pharmacologique et l'activité de ces molécules nous avons décidé de concevoir et de synthétiser d'autres peptidomimétiques mimant la zone de nucléation, **KLIVFF**, du peptide β -amyloïde (Figure 105). Ces nouvelles molécules sont conçues par insertion dans la partie centrale de la séquence hydrophobe de dérivés pseudo-aminoacides trifluorométhylalcools. L'unité centrale est conçue pour interagir d'un côté avec le peptide $A\beta$ grâce à son caractère aminoacide et pour perturber localement le réseau de liaisons de l'autre côté grâce à sa chaîne latérale trifluorométhylalcool très polaire et très acide.

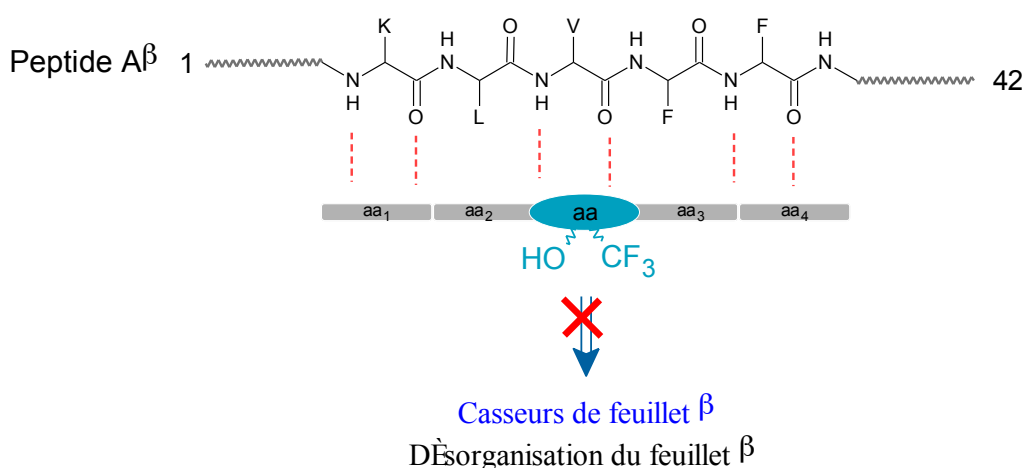


Figure 105 : Nouvelle stratégie pour développer des casseurs de feuillet β .

Notre but consiste donc à inhiber l'agrégation d'Aβ pour limiter la présence de petits oligomères neurotoxiques. Cette stratégie repose d'une part sur les travaux des équipes de Tjernberg [Tjernberg *et al.*, 1996/1997] et de Soto [Soto *et al.*, 1996/1998] qui ont développé des inhibiteurs potentiels de l'agrégation du peptide β amyloïde (Figure 106). Ces derniers sont des pentapeptides utilisés en tant que casseurs de feuillet β.

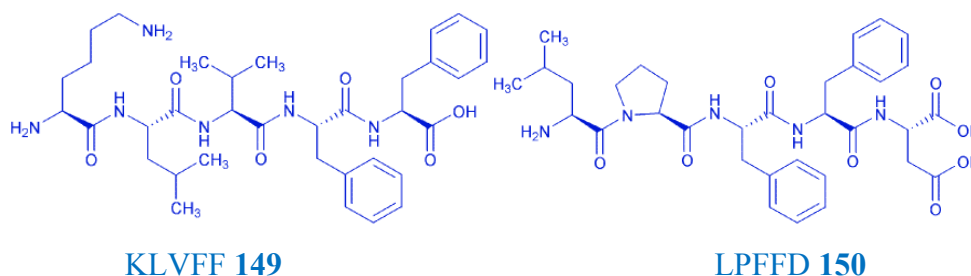


Figure 106 : Structure des pentapeptides de Tjernberg 149 et Soto 150.

D'autre part cette stratégie repose sur les travaux de Török et ses collaborateurs qui ont développé un ensemble de petites molécules organofluorées, contenant un motif CF₃-C-X (X=OH ou NH₂) [Török *et al.*, 2006]. Ces molécules organofluorées ont montré une inhibition significative contre la formation soit des fibres ou des oligomères [Török *et al.*, 2006/2011/2012 ; Sood *et al.*, 2009]. Par la suite, la même équipe a montré que l'acidité des inhibiteurs est un facteur crucial dans le mode d'action de ces composés ; plus le groupement OH est acide et plus l'activité est plus puissante [Török *et al.*, 2006/2012]. L'ordre du degré croissant de l'acidité en parallèle avec l'activité inhibitrice des différents motifs utilisés, par Török *et al.*, est illustré dans la figure suivante :

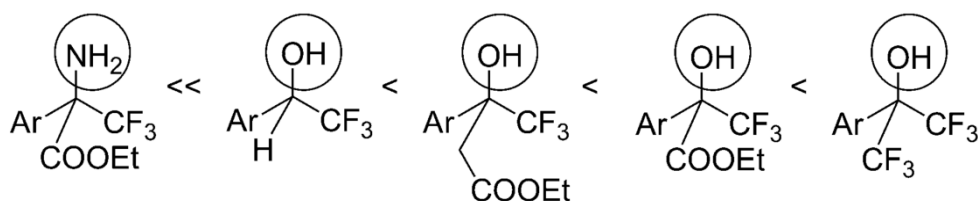


Figure 107 : L'ordre du degré croissant d'acidité en parallèle avec l'activité inhibitrice des inhibiteurs utilisés par Török *et al.* (2012).

Le rôle des groupes aromatiques semble également important. Tous les inhibiteurs efficaces possèdent un noyau hétérocyclique dont les composés à base d'indole étaient trouvés plus actifs suivis par les composés à base de pyrrole (Figure 108) [Török *et al.*, 2012]. En soulignant que la capacité à participer aux interactions π - π est également un aspect dominant de ces composés [Török *et al.*, 2012].

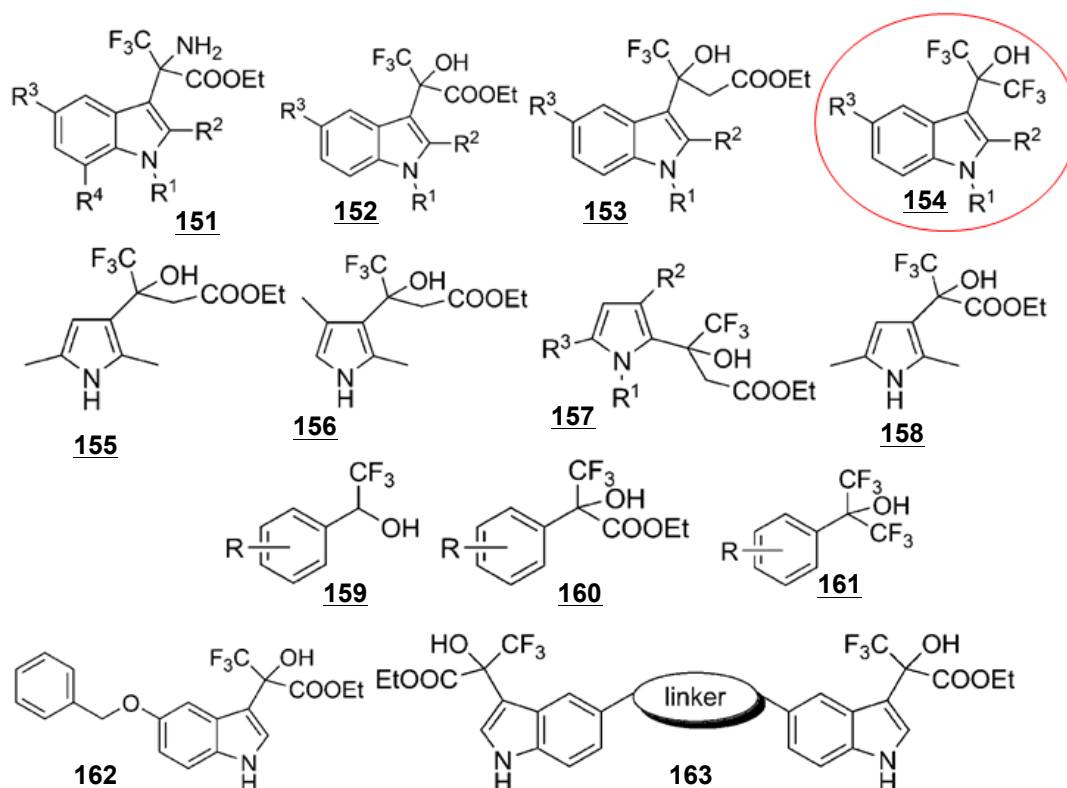


Figure 108 : Quelques petites molécules organofluorées développées par Török *et al.*

Il a été de même observé que l'interaction du peptide A β avec ces petites molécules chirales n'est pas stéréospécifique [Sood *et al.*, 2009]. Ceci semble contradictoire avec des résultats antérieurs où la chiralité d'un résidu aminoacide est considérée d'une importance clé pour les inhibiteurs peptidiques, [Sciaretta *et al.*, 2006 ; Chalifour *et al.*, 2003].

À notre connaissance, le motif trifluorométhylalcool n'a jamais été introduit dans une séquence peptidique potentiellement inhibitrice de l'agrégation de A β ou d'une autre protéine amyloïde.

Nos objectifs sont de concevoir, synthétiser et évaluer de nouvelles molécules pseudo-pentapeptidiques capables d'interagir avec une séquence, dite de nucléation, du peptide β -amyloïde sous sa forme monomérique pour perturber son auto-assemblage en forme dimérique ou oligomérique et d'empêcher de même sa déposition sous forme de plaques séniles.

Ces molécules originales sont constituées d'un aminoacide trifluorométhylalcool central sur lequel sont branché directement, via un lien peptidique, deux bras dipeptidiques Val-Leu et Val-Ala. Il a été déjà démontré au laboratoire que ces deux bras dipeptidiques interagissent avec le peptide A β [Dorgeret *et al.*, 2012]. On remplace alors le sucre central par un aminoacide trifluorométhylhydroxylé capable de perturber le réseau de liaisons hydrogène par son double caractère très polaire et très acide et déstabiliser localement la formation d'un feuillet β (Figure 109).

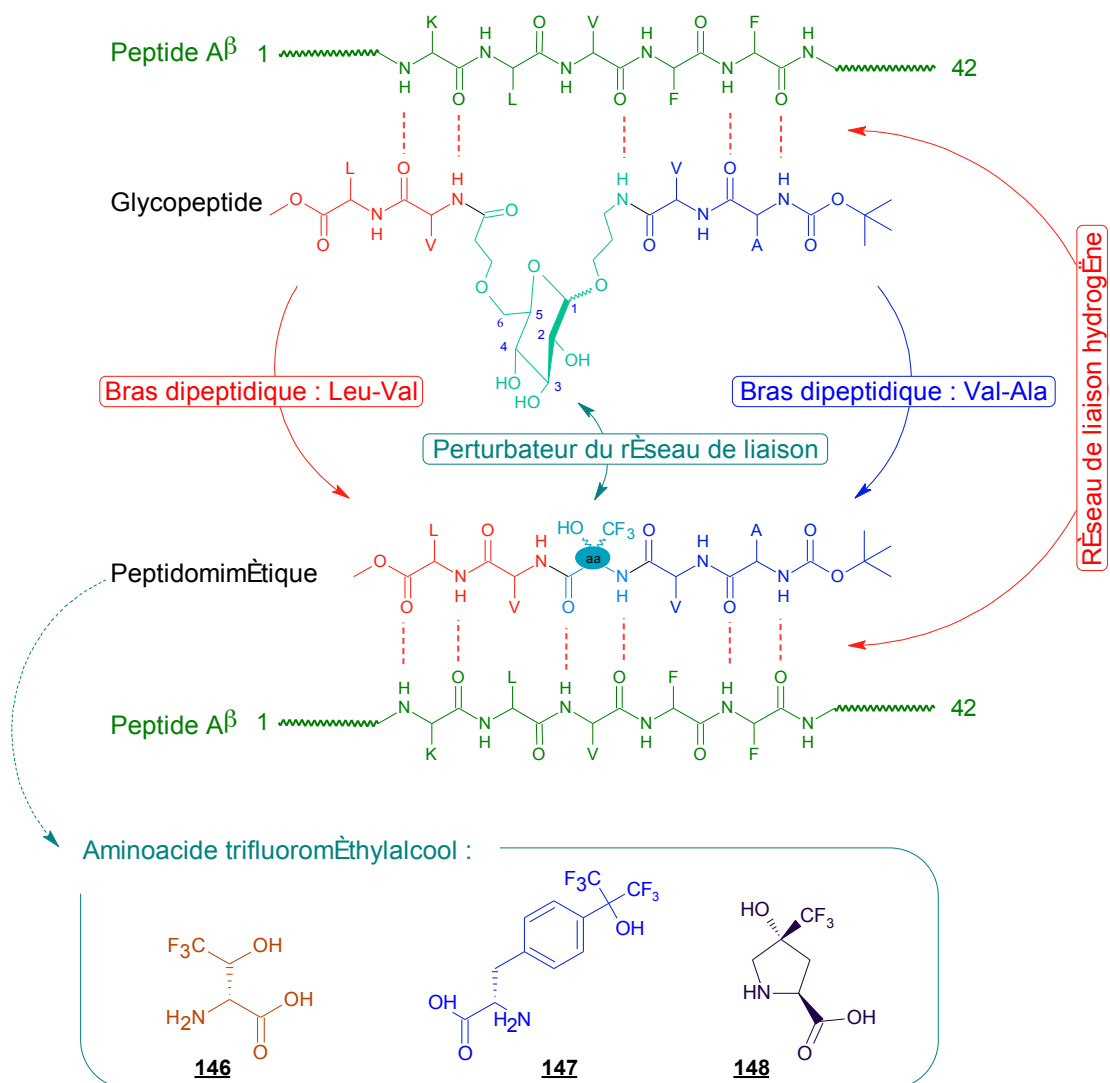


Figure 109 : Stratégie de conception.

En raison des propriétés particulières de l'atome de fluor, l'introduction d'un groupement trifluorométhyle sur une chaîne peptidique peut influencer non seulement la lipophilie, la stabilité métabolique et son interaction avec les cibles biologiques mais aussi sa conformation. D'où l'intérêt de préparer ces peptidomimétiques trifluorométhylés et leurs dérivés non fluorés pour réaliser une étude comparative et déterminer l'effet de ces groupements fluorés sur l'activité et la conformation de ces nouvelles molécules.

La figure 110 regroupe l'ensemble des pentapeptides et pseudopentapeptides développés au cours de mon stage au sein du laboratoire BioCIS / Faculté de Pharmacie à l'université Paris Sud-11.

Dans le but de réaliser une étude de relations structure-activité pour déterminer l'influence de l'ajout d'un groupement alcool-trifluorométhylé sur les paramètres structuraux, physico-chimiques et l'activité biologique des pentapeptides nous avons synthétisé et testé, en tant qu'inhibiteur de l'agrégation du peptide β amyloïde, d'autres dérivés en remplaçant l'acide aminé trifluorométhylalcool central par l'acide aminé naturel et/ou l'hydroxy-acide aminé correspondants. Ainsi, le pseudopentapeptide **164** a été obtenu en remplaçant le sucre central du glycopeptide par une sérine trifluorométhylée. Ce pentapeptide a été ensuite comparé à son dérivé naturel **165** obtenu par remplacement du pseudo-acide aminé central par une sérine.

La synthèse de composés contenant une proline **169**, hydroxy-proline **167** et **168** ou une hydroxy-proline trifluorométhylée **166** a été aussi réalisée pour déterminer l'influence d'une contrainte stérique au cœur du pentapeptide sur l'activité biologique de ces dérivés.

Dans une autre approche, j'ai synthétisé le pseudopentapeptide **170** en introduisant au centre du pentapeptide une phénylalanine hexafluorométhylalcool dans le but d'étudier l'influence d'un acide aminé aromatique, semblable à celui de Török et al., sur l'activité biologique de ces dérivés. Ce pseudopentapeptide est comparé à son dérivé naturel en remplaçant le pseudoacide aminé central par une tyrosine pour obtenir le pentapeptide **171**.

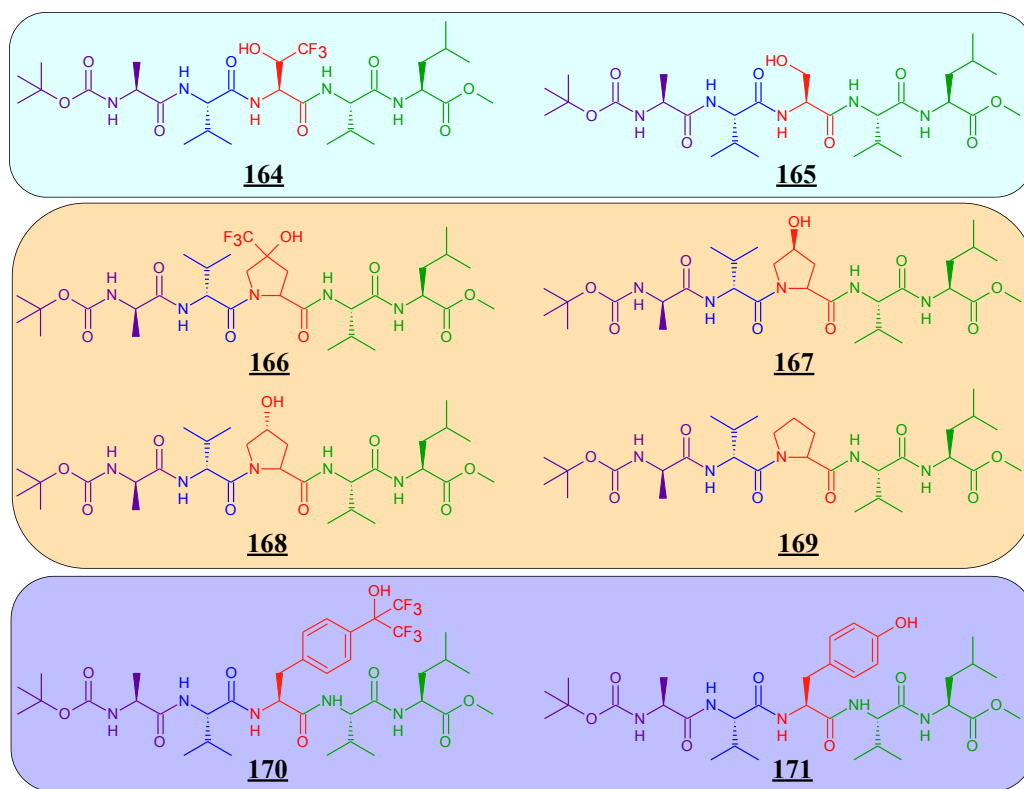


Figure 110 : Pentapeptides et pseudopentapeptides préparés.

La figure 111 regroupe les intermédiaires benzylés des pentapeptides ou peptidomimétiques précédents. Ces composés sont aussi testés en tant qu'inhibiteurs de l'agrégation d'A β pour étudier l'influence d'un noyau aromatique sur l'activité. Dans des travaux précédents il a été montré que la présence de groupement benzyles sur les différents hydroxyles du noyau central des glycopeptides leur confèrent un effet accélérateur de l'agrégation de A β alors que leurs analogues déprotégés sont ralentisseurs de l'agrégation de A β .

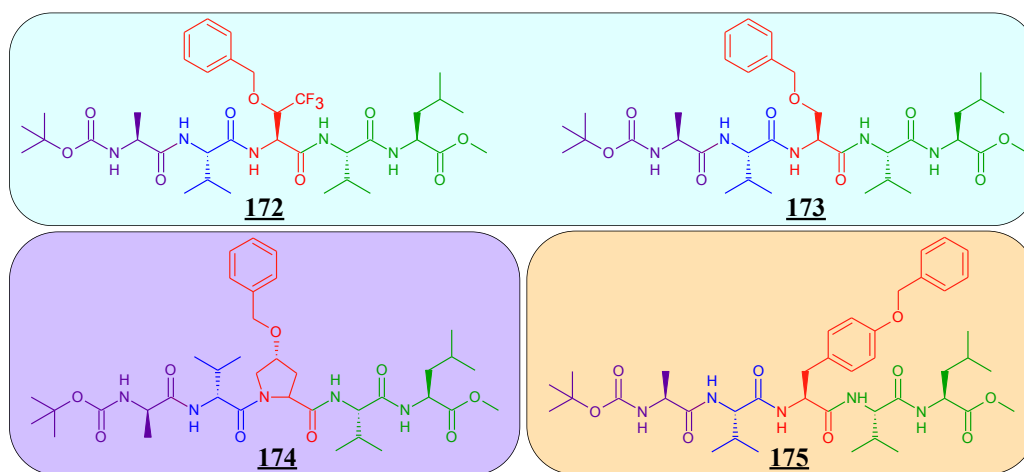


Figure 111 : Dérivés benzylés des pentapeptides ou peptidomimétiques

VII. Intérêt du fluor

L'introduction d'atomes de fluor dans des molécules à visée thérapeutique est devenue un outil fondamental dans la conception et le développement de nouveaux médicaments et constitue un enjeu majeur pour les entreprises pharmaceutiques. Il est maintenant **présent dans 20 à 30% des médicaments sur le marché**. Les modifications induites par l'introduction d'atomes de fluor dans une molécule organique jouent un **rôle important sur son comportement dans un environnement biologique** ; amélioration de la stabilité métabolique ; modifications des propriétés physicochimiques, telles que l'acidité et la basicité des fonctions voisines qui ont un effet très fort sur les propriétés pharmacocinétiques ; Impact direct et indirect dans des interactions entre le fluor et les protéines [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008 ; Kirk, 2006 ; Hagmann, 2008 ; Ojima, 2009 ; O'Hagan, 2010].

La plupart des effets induits par la présence d'atomes de fluor dans une molécule résultent de sa structure et de ses propriétés atomiques fondamentales. Cet atome possède des propriétés très spécifiques comme l'indiquent les valeurs extrêmes des paramètres atomiques présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Paramètres atomiques de l'atome de fluor

Atome	Potentiel d'ionisation (kcal/mol)	Affinité électrique (kcal/mol)	Polarisabilité atomique ($\text{\AA}^3$)	Rayon de Van der Waals ($\text{\AA}$)	Electronégativité de Pauling X_p
H	313.6	17.7	0.667	1.20	2.20
F	401.8	79.5	0.557	1.47	3.98
Cl	299.0	83.3	2.18	1.75	3.16
Br	272.4	72.6	3.05	1.85	2.96
I	241.2	70.6	4.7	1.98	2.66
C	240.5	29.0	1.76	1.70	2.55
N	335.1	-6.2	1.10	1.55	3.04
O	314.0	33.8	0.82	1.52	3.44

Malgré sa ressemblance en terme de taille avec l'hydrogène, le fluor varie sensiblement de l'hydrogène par rapport à son électronégativité, hydrophobie, la capacité comme accepteur de liaisons hydrogène (lorsqu'il est lié au carbone), et la résistance au métabolisme.

Les effets résultants de l'ajout d'un atome de fluor ou d'un groupe fluoré dans une molécule sont nombreux. Nous pouvons citer des effets sur :

VII.1. Métabolisme et stabilité métabolique

Une molécule biologiquement active circule dans l'organisme et est peu à peu dégradée de façon à être éliminée. L'introduction de fluor dans une molécule peut être utilisée pour modifier les voies et les vitesses de métabolisme dans le but d'allonger la demi-vie plasmatique ou d'éviter la formation de métabolites toxiques [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

Un second objectif particulièrement important en chimie médicinale est de ralentir ou de limiter le métabolisme oxydatif conduisant à la formation d'espèces réactives (époxydes, quinone-imines, etc.) souvent source de toxicité. L'introduction du fluor dans une molécule à visée thérapeutique est le plus souvent utilisée pour bloquer des sites d'oxydation de noyaux aromatiques (Figure 112).

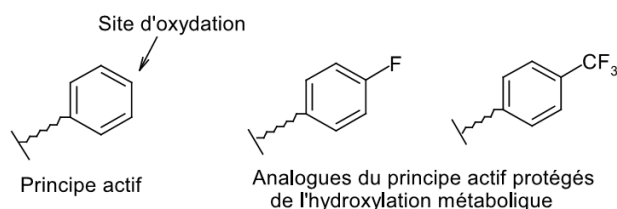


Figure 112 : Oxydation biologique d'un noyau aromatique.

La présence d'atomes de fluor protège non seulement une molécule du métabolisme oxydatif, mais peut également la protéger de la protéolyse, en défavorisant la formation d'espèces cationiques intermédiaires de cette protéolyse. Ceci est particulièrement important pour les principes actifs sensibles au milieu acide, difficilement administrable par voie orale du fait du pH stomacal très acide [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

VII.2. Acidité, basicité et liaison hydrogène

Les groupements fluoroalkylés étant des groupes très électroattracteurs, l'acidité des atomes d'hydrogène voisins est largement augmentée. L'acidité des acides carboxyliques, des alcools et des imides est fortement augmentée par la présence de substituants fluorés. La fluoration diminue également fortement la basicité des amines [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

L'atome de fluor n'est pas apte à donner de liaison hydrogène. D'autre part, en dépit de sa forte électronégativité et de ses paires libres d'électrons, il est un faible accepteur de liaison hydrogène du fait de la faible polarisation de ses électrons σ et π .

Si l'atome de fluor lui-même est peu impliqué dans des liaisons hydrogènes, son effet inductif joue un rôle très important sur l'aptitude des fonctions voisines à donner ou à recevoir des liaisons hydrogène [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008]. La présence d'atomes de fluor accroît l'aptitude d'une fonction voisine à donner une liaison hydrogène (α H₂) (acidité), et diminue son aptitude à accepter une liaison hydrogène (β H₂) (basicité). Ainsi les alcools fluorés sont des donneurs de liaison hydrogène très puissants. Le caractère électroattracteur de l'atome de fluor, et surtout des groupes fluoroalkyles modifient profondément le pKa des fonctions voisines, et donc leurs aptitudes à donner ou à recevoir des liaisons hydrogènes. Le caractère acide des alcools fluorés, et donc l'excellent caractère donneur de liaisons hydrogène explique leur influence sur les propriétés pharmacologiques des molécules contenant ce motif [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

VII.3. Hydrophobie et lipophilie

La notion de lipophilie est extrêmement importante dans la conception de futurs médicaments ; en effet, elle contrôle de nombreux paramètres comme l'absorption, le passage des barrières biologiques et donc le transport dans les organes et les cellules, et enfin l'interaction avec la macromolécule cible [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

Pour qu'une molécule soit bien absorbée par l'organisme, il faut qu'elle soit soluble dans le sang (qu'elle soit donc hydrophile). Mais pour franchir les barrières cellulaires (des couches lipidiques hydrophobes), il faut que la molécule soit également lipophile. Il faut donc trouver le juste compromis entre ces deux propriétés antagonistes. C'est là que le fluor peut intervenir. Il est particulièrement important de noter que dans le cas des composés fluorés il n'y a pas de corrélation entre la lipophilie et l'hydrophobie puisque les molécules fluorées sont à la fois lipophobes et hydrophobes [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

La présence d'atomes de fluor dans une molécule aliphatique décroît la lipophilie mais augmente l'hydrophobie, au point que les molécules hautement fluorées ne sont solubles ni dans les solvants organiques, ni dans l'eau, le milieu fluoré formant une troisième phase [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

VII.4. Effets stériques

Le rayon de Van der Waals de l'atome de fluor est compris entre celui de l'hydrogène et celui de l'oxygène. En dépit de ce rayon de Van der Waals, nettement plus grand que celui de l'hydrogène, de nombreuses données expérimentales montrent que la substitution d'un hydrogène par un atome de fluor, ne provoque que de faibles perturbations stériques. L'encombrement stérique lié à la présence d'atomes de fluor peut déstabiliser l'édifice supramoléculaire formé par la macromolécule et l'analogue fluoré du substrat ou même empêcher sa formation [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008].

VII.5. Effets du fluor sur les propriétés biologiques

L'introduction d'atomes de fluor modifie les propriétés physiques et chimiques d'une molécule, ce qui a des répercussions profondes sur son activité biologique. Les processus d'absorption, de distribution, de reconnaissance et d'interaction avec la cible biologique, le métabolisme et l'élimination de cette molécule seront donc affectés. La présence d'atomes de fluor peut influencer sur chacune de ces étapes : l'absorption, le transport et le métabolisme [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008]. La seconde étape est l'interaction avec la cible, la présence d'atomes de fluor peut grandement influencer sur la reconnaissance moléculaire et l'affinité. Les groupes fluorés sont des groupes isostères ou isopolaires de diverses fonctionnalités, ils peuvent les mimer dans les processus d'interaction avec les macromolécules biologiques [Bégué et Bonnet-Delpon, 2008 ; Hagmann, 2008 ; Ojima, 2009 ; O'Hagan, 2010].

VIII. Synthèse

La stratégie de synthèse consiste à obtenir les pentapeptides voulus par synthèse peptidique, en faisant réagir les aminoacides correspondants *N*-protégés par un groupement Boc sur le pseudoaminoacide central. Ce dernier est soit un produit commercial ou résulte d'une synthèse asymétrique d'un aminoacide trifluorométhylé (Schéma 12).

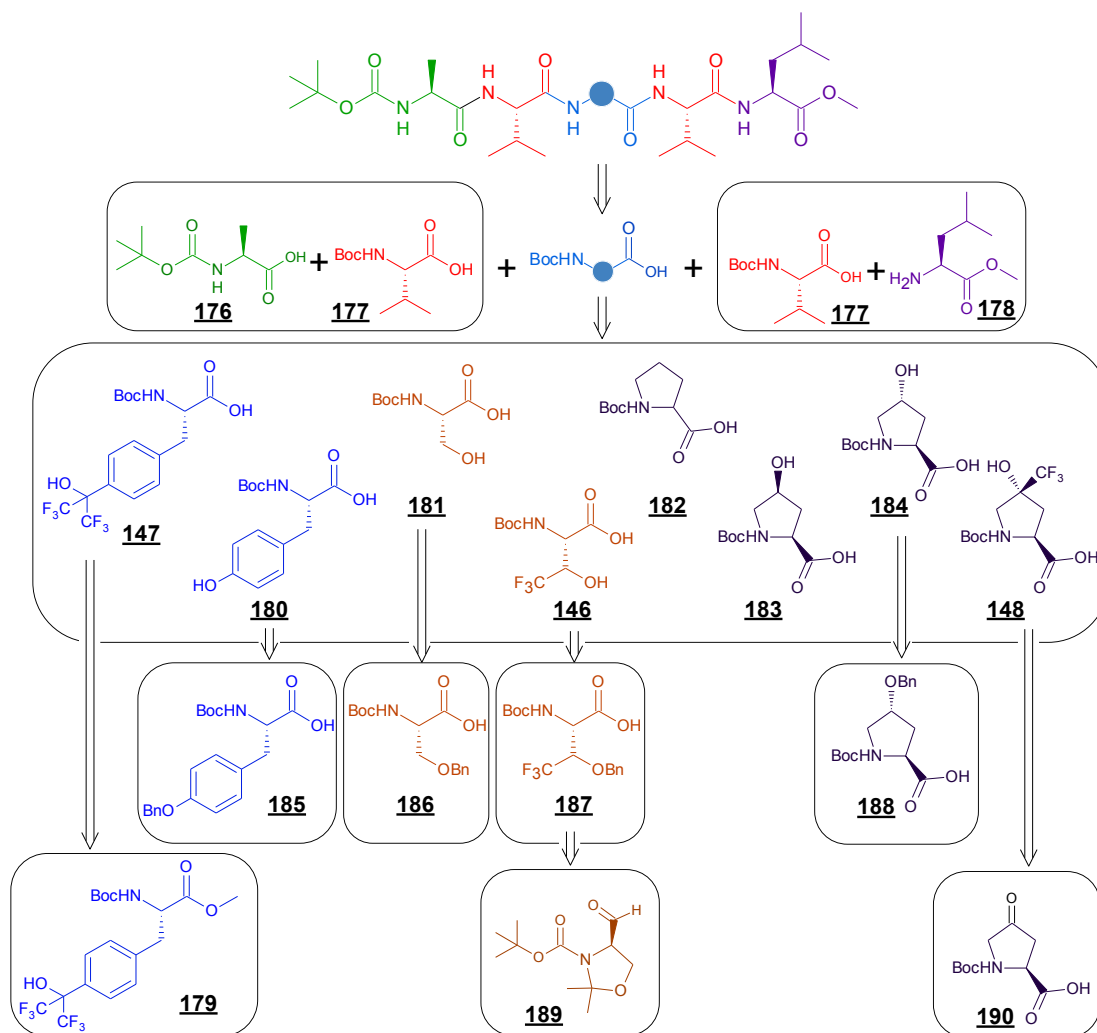


Schéma 12 : Stratégie de synthèse des peptidomimétiques.

La tyrosine *O*-benzylée **185**, la sérine *O*-benzylée **186** et l'hydroxyproline benzylée **188** sont les trois aminoacides commerciaux utilisés pour la synthèse des trois pentapeptides finaux **171**, **165** et **168** respectivement. L'ester méthyle commercial **179** est aussi utilisé pour préparer le peptidomimétique final **170** (Schéma 12).

Les deux pseudo-aminoacides trifluorométhylés **146** et **148** sont obtenus par des synthèses asymétriques en introduisant un groupement CF_3 sur deux réactifs commerciaux ; l'aldéhyde de Garner **189** [Zeng *et al.*, 2010] et la 4-oxoproline **190** respectivement. L'aminoacide commercial **183** est aussi utilisé pour préparer le peptidomimétique final **167**.

La réaction de trifluorométhylation nucléophile est la méthode la plus utilisée pour introduire un groupement CF_3 . Le trifluorométhyl(triméthyl)silane est actuellement le réactif le plus utilisé [Prakash et Yudin, 1997 ; Shreeve et Singh, 2000 ; Prakash et Mandal, 2001 ; Bastos, 2008], et ses applications s'étendent à une large gamme d'électrophiles.

Découvert par Ruppert en 1984 [Ruppert *et al.*, 1984 ; Beckers *et al.*, 1986], l'utilisation de ce réactif pour des trifluorométhylations nucléophiles a été développée par Prakash quelques années plus tard [Prakash *et al.*, 1989].

Les aldéhydes et les cétones constituent les substrats les plus utilisés pour cette réaction, du fait de leur électrophilie, et des applications importantes des trifluorométhylcarbinols [Mizuta *et al.*, 2007].

La réaction de trifluorométhylation nucléophile à partir du réactif de Ruppert-Prakash, sur un dérivé carbonylé, consiste en une addition nucléophile du CF_3TMS selon un processus en chaîne (Schéma 13) [Prakash *et al.*, 1989].

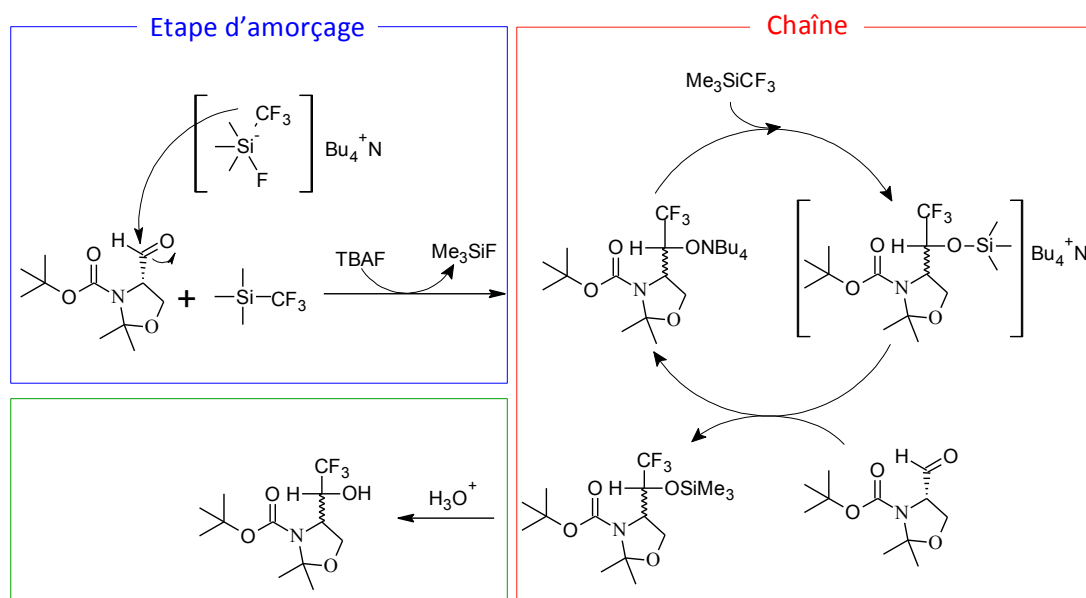


Schéma 13 : Mécanisme de la réaction de trifluorométhylation nucléophile d'un carbonyle (aldéhyde de Garner) en utilisant le réactif de Ruppert.

L'étape d'amorçage s'effectue *via* l'attaque silicophile de l'amorceur sur le CF₃TMS pour former une espèce à silicium hypervalent, qui, mise en présence du substrat carbonyle, transfère un anion CF₃⁻ et conduit à un intermédiaire réactionnel oxyanionique. C'est cet intermédiaire qui réalise le transfert de chaîne par activation d'une nouvelle molécule de CF₃TMS pour former un autre intermédiaire à silicium pentavalent, qui mis en présence du substrat carbonyle, conduit à l'éther silylé trifluorométhylé, tout en régénérant l'intermédiaire porteur de chaîne oxyanionique.

Du fait de la force de la liaison Si-F, ce sont les amorceurs fluorés, comme le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) et le fluorure de césium qui ont été les premiers et les plus employés [Prakash et Yudin, 1997 ; Shreeve et Singh, 2000 ; Prakash et Mandal, 2001 ; Bastos, 2008].

Pour les amorceurs fluorés, l'utilisation de solvants comme le THF ou le DME peut être préférée à celle de solvants polaires comme le DMF ou l'acétonitrile, susceptibles de réagir avec le CF₃TMS en présence d'ions fluorure [Adams *et al.*, 1998 ; Panne *et al.*, 2001].

VIII.1. Synthèse de pseudo-aminoacide trifluorométhylé

L'introduction de molécules fluorées dans une structure peptidique constitue un puissant outil peptidomimétique. En raison des effets uniques dus à l'incorporation d'atomes de fluor dans les molécules, les acides aminés fluorés sont des molécules cibles très intéressantes pour la conception de composés biologiquement actifs, et plusieurs méthodes ont été signalées dans la littérature pour leur synthèse stéréosélective. Ces molécules peuvent fortement influencer la lipophilie, la stabilité hydrolytique et les conformations d'un peptide, ainsi que son interaction avec les cibles biologiques (enzymes, récepteur, etc.).

VIII.2. Synthèse de la sérine trifluorométhylée

En vue d'obtenir la trifluorométhyl-sérine *O*-protégée nous avons procédé au même schéma de synthèse que celui développé par Zeng et al. (Schéma 14) [Zeng *et al.*, 2010]. Dans cette voie de synthèse, l'alcool **192** a été obtenu, sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères avec un ratio de 9:1 environ, par une réaction de trifluorométhylation nucléophile à partir du réactif de Ruppert sur l'aldéhyde-(*S*) de Garner **191**, en présence d'une quantité catalytique de TBAF. Le stéréoisomère majoritaire **193** voulu a été ensuite obtenu par une réaction de benzylation de l'alcool tertiaire **192** et d'une chromatographie sur colonne. Enfin, l'acide **195** a été obtenu par hydrolyse de l'alcool **194** suivie d'une oxydation de Jones.

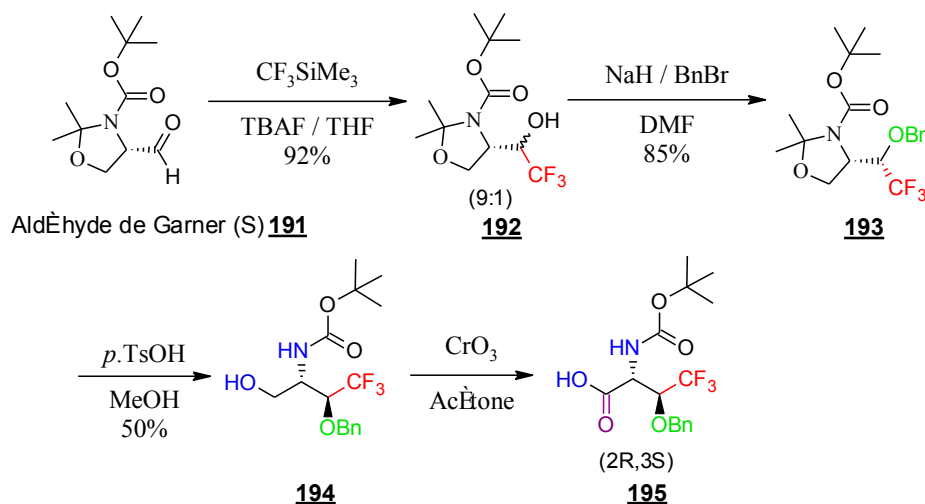


Schéma 14 : Synthèse de la sérine trifluorométhylée 2*R*,3*S*.

Zeng *et al.* ont obtenu en cinq étapes de synthèse le diastéréoisomère (2*R*,3*S*) à partir de l'aldéhyde-(*S*) de Garner. Ils ont attribué la stéréochimie de l'isomère majoritaire **193** en se basant sur la formation préférentielle du produit d'addition *anti* comme diastéréoisomère seul à partir d'une réaction d'addition de l'anion trichlorométhyle sur un aldéhyde très semblable à l'aldéhyde de Garner [Beaulieu, 1991 ; Zeng *et al.*, 2010]. De même, une comparaison de spectre RMN ^1H de l'acide aminé dérivé du produit débenzylé (l'acide aminé libre) aux données du même diastéréoisomère comme rapporté dans la littérature. En particulier, le déplacement chimique de l'hydrogène β (CHCF_3) de l'isomère *anti* obtenu par Zeng *et al.* vers 4.24 ($\text{DMSO-}d_6$) correspond étroitement à la valeur 4,20 ($\text{DMSO-}d_6$) décrite dans la littérature, alors que le déplacement chimique de H_β (CHCF_3) de l'isomère *syn* a été signalé vers 4,70 ($\text{DMSO-}d_6$) [Scolastico *et al.*, 1985].

En se basant sur ces résultats nous avons procédé à cette voie de synthèse pour préparer à partir de l'aldéhyde (*R*) la trifluorométhyl-sérine *O*-protégée avec une diastéréoisomérisation (*2S,3R*). Zeng et al. ont déjà indiqué que la synthèse de ce diastéréoisomère est possible à partir de l'aldéhyde (*R*) de Garner mais, à notre connaissance, ils ne l'ont jamais préparé [Zeng *et al.*, 2010].

Dans cette voie de synthèse, l'intermédiaire clé **196** a été obtenu, sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères *via* une réaction de trifluorométhylation nucléophile à partir du réactif de Ruppert sur l'aldéhyde **189** de Garner-*(R)* dans le THF et en présence d'une quantité catalytique de TBAF. Une benzylation de l'alcool tertiaire **196** est ensuite réalisée pour obtenir l'intermédiaire voulu sous forme de deux diastéréoisomères **197a** et **197b**. Cependant, ces deux diastéréoisomères sont séparés facilement à cette étape par chromatographie sur colonne.

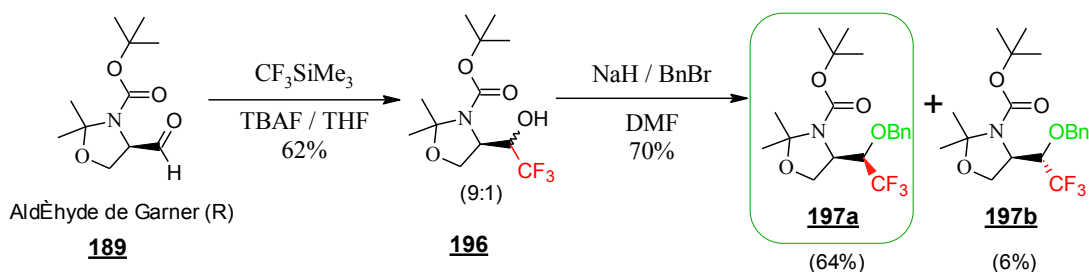


Schéma 15 : Synthèse de l'intermédiaire **192**.

Seul le diastéréoisomère majoritaire **197a** est utilisé dans les étapes suivantes. Une hydrolyse de ce dernier suivie d'une oxydation de Jones de l'alcool **198** formé nous a permis de récupérer l'acide **187** voulu avec un rendement moyen de 87%.

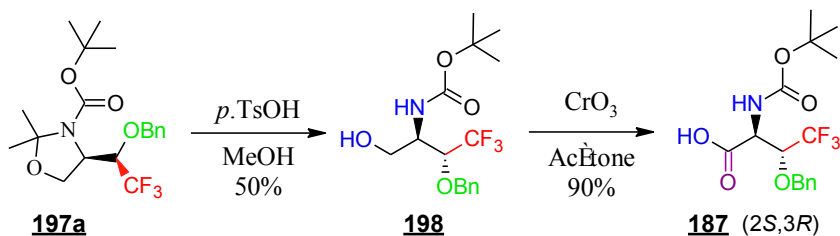


Schéma 16 : Synthèse de la sérine trifluorométhylée *2S, 3R*.

Le pouvoir rotatoire d'une solution du produit **187** (*2S,3R*), dissous dans du MeOH à une concentration de 0.79 g/L, a été de même mesurée à 25°C environ. La valeur obtenue est égale à -13 opposée à la valeur (+13) décrite par Zeng *et al.* pour le diastéréoisomère (*2R,3S*).

VIII.3. Synthèse de l'hydroxyproline trifluorométhylée

Parmi les nombreux dérivés proline rapportés dans la littérature, les prolines fluorées ont reçu une attention croissante. Ceci est dû notamment aux propriétés physiques et biologiques induites par l'introduction de groupes fluorés dans les peptides et peptidomimétiques.

Récemment, Qiu et Qing ont décrit une approche efficace pour la synthèse de *N*-Boc-4-hydroxy-4-trifluorométhyl-L-proline **202** *via* un intermédiaire pyrrolidinone **201** préparé à partir de l'hydroxyproline **199** en trois étapes (Schéma 16) [Qiu et Qing, 2002]. La réaction de la *N*-Boc-4-oxo-L-proline avec CF₃-TMS, en présence d'une quantité catalytique de TBAF, a donné le produit d'addition **202** avec un groupement CF₃ *trans* par rapport au groupe ester [Qing et Peng, 1998].

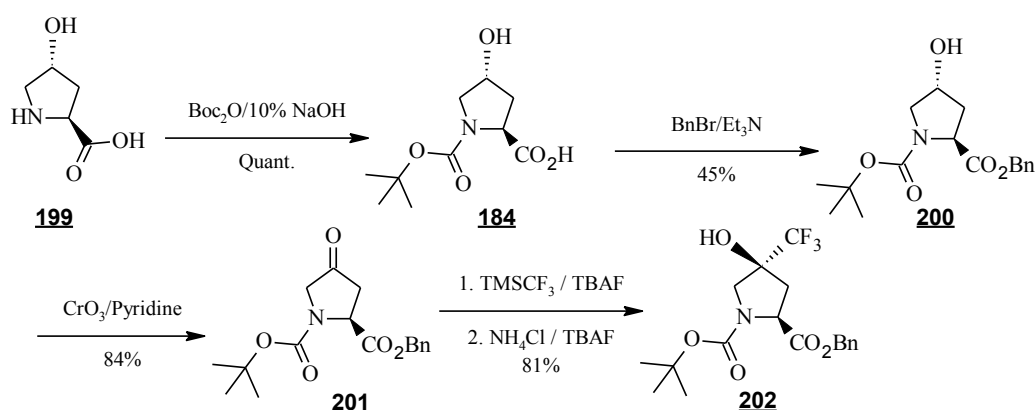


Schéma 16 : Synthèse de **202** à partir de **184**.

En suivant cette voie de synthèse nous avons synthétisé la *N*-Boc-4-hydroxy-4-trifluorométhyl-L-proline **148** à partir de l'intermédiaire **203** préparé à partir de l'oxoproline **190** en deux étapes (Schéma 17). Le traitement de la cétone **190** commercial avec le réactif de Ruppert (TMS-CF₃) en présence d'une quantité catalytique de TBAF donne l'alcool tertiaire **203** avec un rendement de 79%, supérieur à celui obtenu par Goodman and Del Valle (56%) en utilisant l'ester méthylique [Goodman and Del Valle, 1998]. L'hydrolyse alcaline de l'intermédiaire **206** génère l'acide **148** avec un bon rendement.

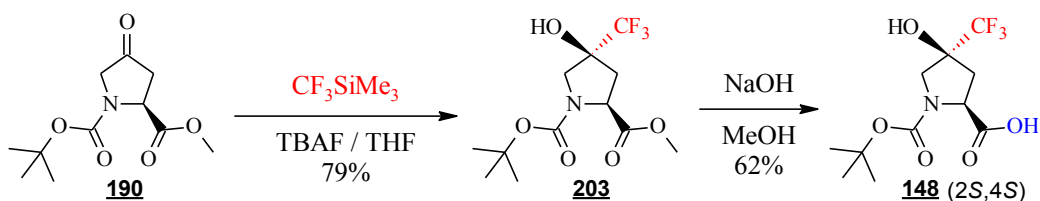


Schéma 17 : Synthèse de la *N*-Boc-4-hydroxy-4-trifluorométhyl-L-proline.

VIII.4. Synthèse des différents pentapeptides

Le premier dipeptide déprotégé commun **205** est obtenu en deux étapes, avec un bon rendement (83%), par couplage peptidique de deux aminoacides Boc-Val-OH **177** et Leu-OMe **179** en utilisant de l'isobutyle chloroformate (IBCF) en présence de la *N*-méthylmorpholine (NMM) dans le dichlorométhane (DCM), suivie d'un clivage acide de la fonction *tert*-butyle carbamate en utilisant du TFA.

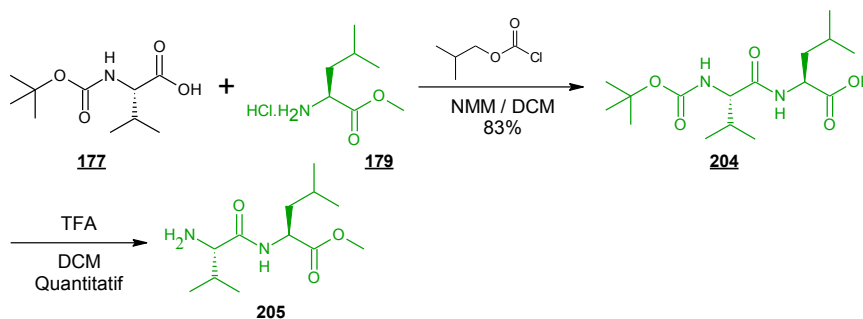


Schéma 18 : Synthèse de l'intermédiaire **205**

Le couplage de l'intermédiaire commun **205** avec les aminoacides ou pseudoaminoacides centraux (**146-148**, **180-184**), en utilisant les agents de couplage traditionnels, HBTU et HOBt en présence de la DIPEA dans le DMF donne respectivement les composés **206-213** avec des rendements satisfaisants (36%-88%).

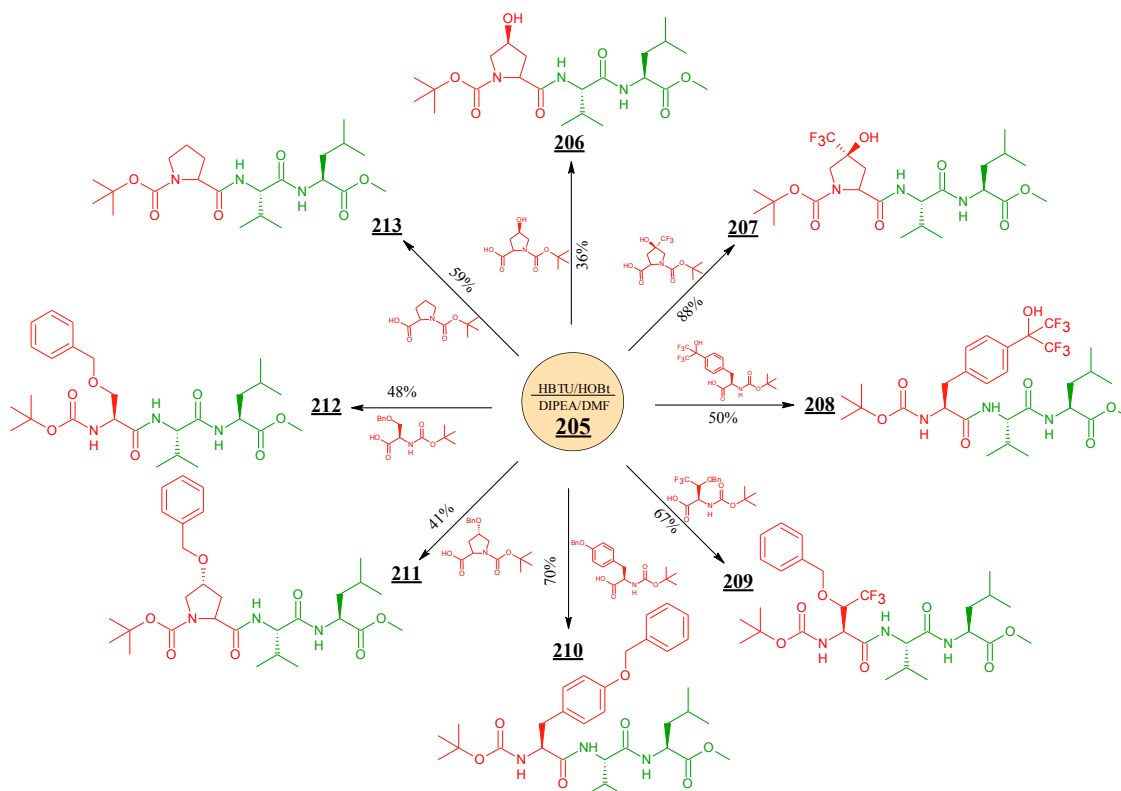


Schéma 19 : Synthèse des pseudotripeptides **206-213**.

Les tetrapeptides *N*-protégés (**214-221**) sont obtenus, avec de bons rendements (47-87%) par une hydrolyse acide des composés *N*-protégés (**206-213**), suivie d'un simple couplage peptidique de ces tripeptides déprotégés avec la *N*-Boc-Valine-OH en utilisant l'HBTU et l'HOBt comme agents de couplage en présence de la DIPEA dans le DMF.

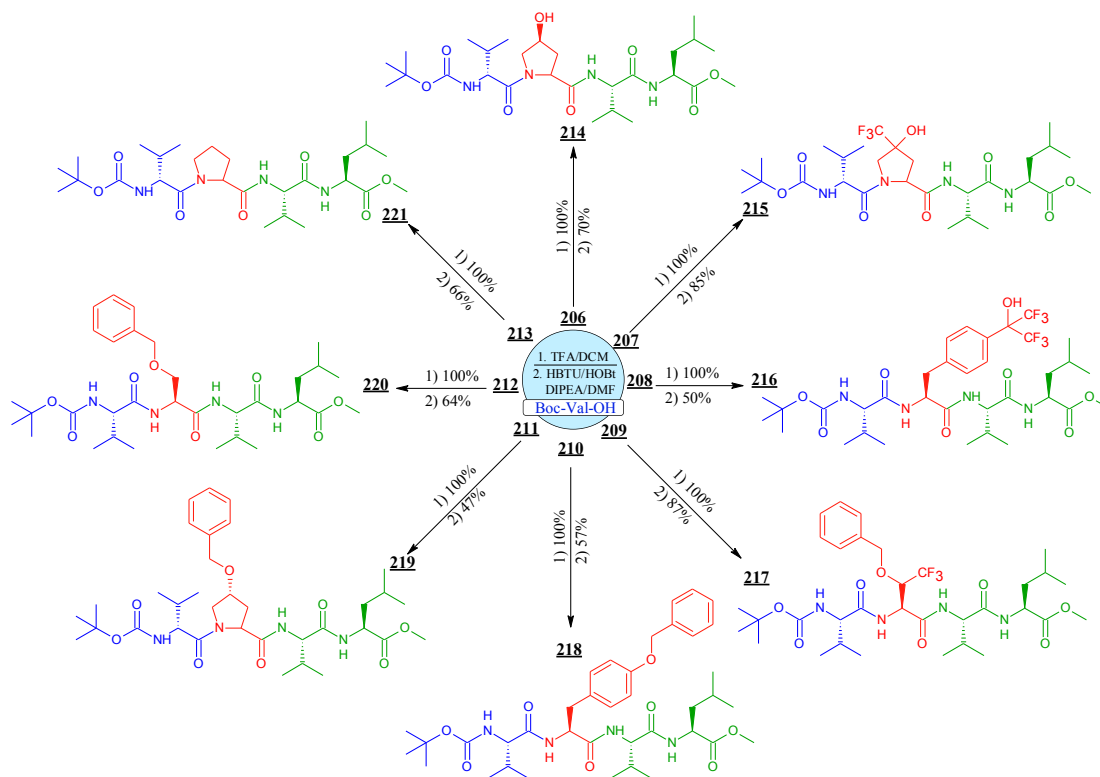


Schéma 20 : Synthèse des intermédiaires **214-221.**

Enfin, les différents pentapeptides (**166**, **167**, **169**, **170** et **172-175**) sont obtenus, avec de bons rendements (47%-83%), par une réaction de déprotection de la fonction amine protégée par un Boc (**214-221**), en utilisant du TFA dans le dichlorométhane, suivie d'un couplage peptidique de ces tetrapeptides déprotégés avec une *N*-Boc-Alanine-OH avec un groupement *tert*-butylcarbamate en utilisant l'HBTU et l'HOBt comme agents de couplage en présence de la DIPEA dans le DMF.

IX. Résultats biologiques :

Nous avons dans premier temps évalué l'activité des nouveaux composés **164-175** sur l'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$. La fluorescence à la Thioflavine T (ThT) est la méthode standard pour suivre la cinétique d'agrégation du peptide amyloïde sous forme de fibres. L'intensité de fluorescence ThT finale dépend essentiellement de la quantité d'espèces fibrillaires formées et la constante de liaison à la ThT. Le peptide $A\beta_{42}$ placé dans les puits d'une microplaque à la concentration de 10 μM . Les différents composés **164-175**, solubilisés dans du DMSO, sont introduits dans les puits à différentes concentrations. La ThT est introduite dans le milieu à la concentration de 11.1 μM et l'agrégation est initiée par l'ajout de 50 mM de phosphate de sodium et de 100 mM de NaCl, pH 7,4. L'augmentation du signal de fluorescence de la ThT est lue à 485 nm après excitation à 440 nm. Pour chaque série d'expériences des puits témoins sont réalisés dans lesquels le peptide $A\beta_{1-42}$ est étudié dans les mêmes conditions, en absence d'inhibiteur potentiel. Les résultats de l'inhibition de la formation de fibre du peptide $A\beta_{1-42}$ par les différents composés **164-175** sont présentés dans les figures 114-120. Nous avons incubé à 30 °C le peptide $A\beta_{42}$ avec 100 et 200 μM des composés **164-175** en trois essais sur une durée d'environ 72 heures.

Comme décrit précédemment, la formation de fibres à partir du peptide $A\beta_{1-42}$, à une concentration de 10 μM , sans inhibiteur suit une courbe sigmoïdale typique d'agrégation avec une phase de latence d'environ 7 à 9 heures, suivie par une phase de croissance rapide sur une durée de 4 à 7 heures et enfin un plateau correspondant à un maximum de fluorescence(Figure 113, **courbe rouge**).

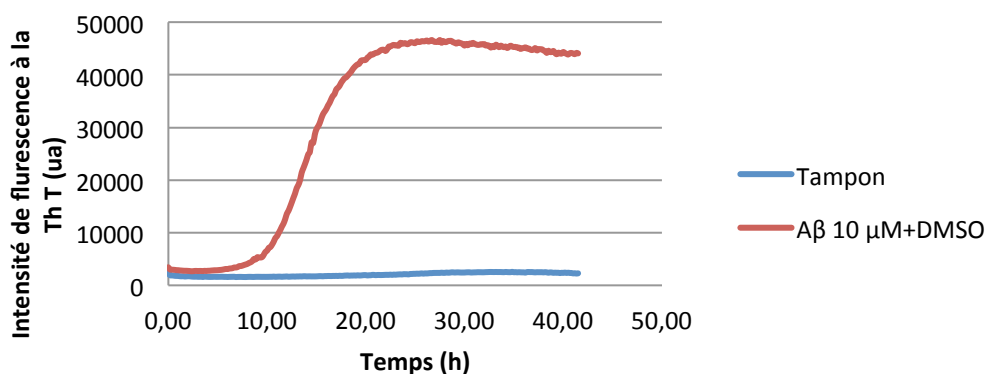


Figure 113 : Cinétique d'agrégation de $A\beta_{1-42}$.

IX.1. Dérivés de la sérine

Lorsque le peptide $A\beta_{1-42}$ est incubé avec 100 et 200 μM (ratio **165** : peptide, 10:1 et 20:1) de composé **165** (Sérine OH) une inhibition complète du signal est observée (Figure 114, courbe rose et orange respectivement).

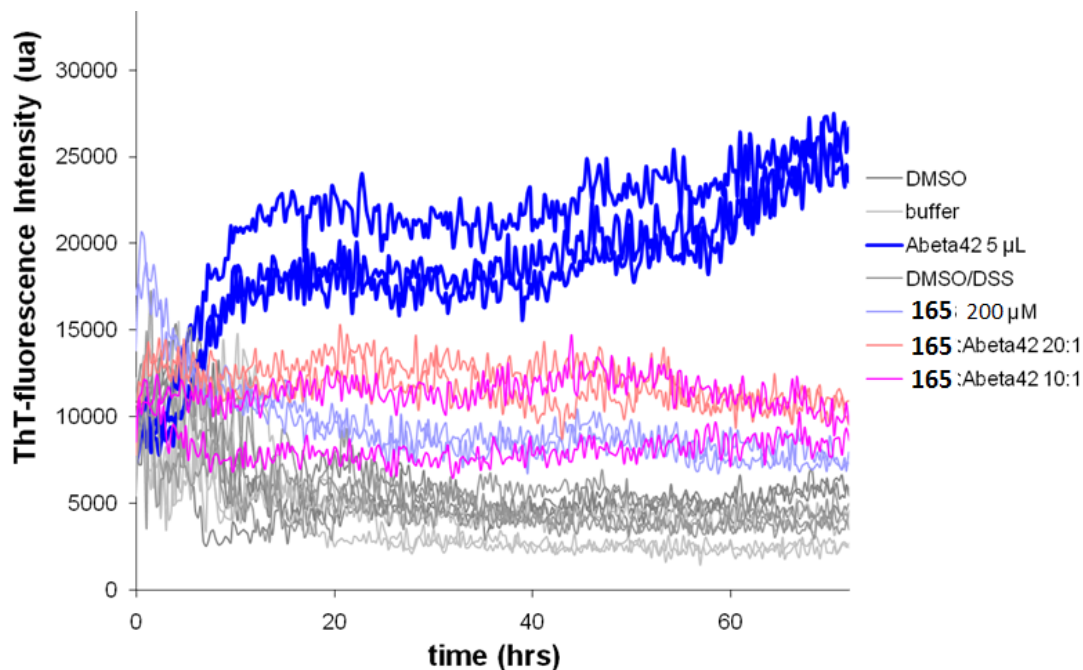


Figure 114 : Cinétique d'agrégation de $A\beta_{1-42}$ en présence de **165** (ratio 20:1 et 10:1).

De même au ratio 1:1 (10 micomolaire de **165**), l'agrégation de $A\beta_{1-42}$ est totalement inhibée (Figure 115, courbe rose). On constate alors que le composé **165** altère la cinétique d'agrégation et empêche de ce fait la formation de fibrilles.

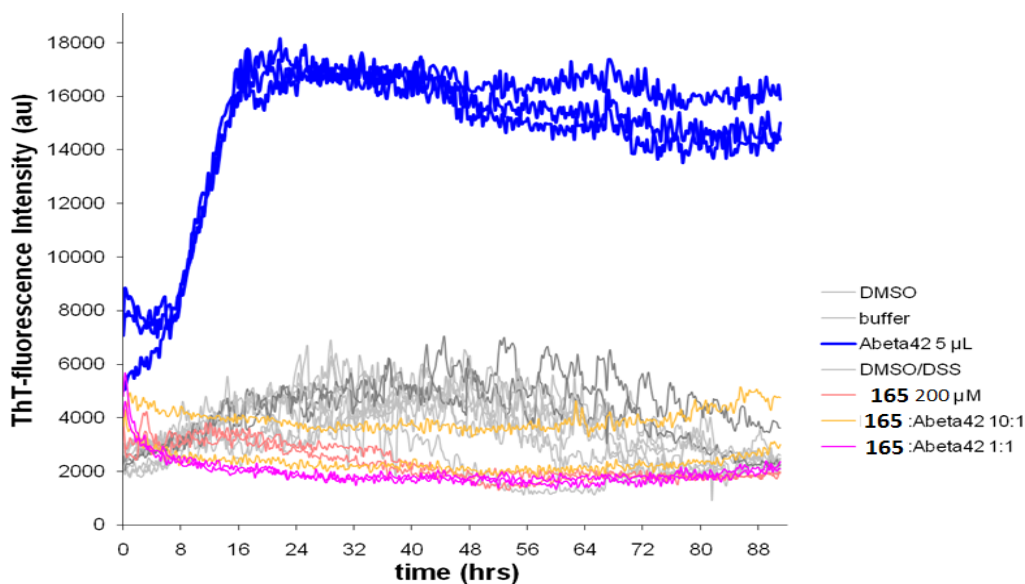


Figure 115 : Cinétique d'agrégation de $A\beta_{1-42}$ en présence de **165** (ratio 1:1).

En revanche, le composé benzylé **173** (Serine OBn) à 10 et 100 micromolaire, n'a aucun effet sur l'agrégation de A β ₁₋₄₂ (Voir figure 118)

Dans les mêmes conditions décrites précédemment, le composé **164** (Sérine CF₃) induit un signal de fluorescence maximal seul, indiquant que ce composé a la capacité de s'agréger seul et de fixer la thioflavine T. Le composé 164 n'a pas été évalué sur l'agrégation de A β .

Lorsque le peptide A β ₁₋₄₂ est incubé avec 1 et 10 μ M de composé **172** (Sérine OBn/CF₃) une très légère accélération de la cinétique d'agrégation est observée (Figure 116). Alors qu'elle devient significative pour 100 μ M. L'intensité du signal de fluorescence est très intense (saturée) dans les puits contenant le peptidomimétique **172** seul à une concentration de 100 μ M (Figure 116). Ces résultats suggèrent, que ce composé tend à s'agréger tout seul à forte concentration et qu'il accélère, à cette concentration, l'agrégation en réduisant le temps de latence.

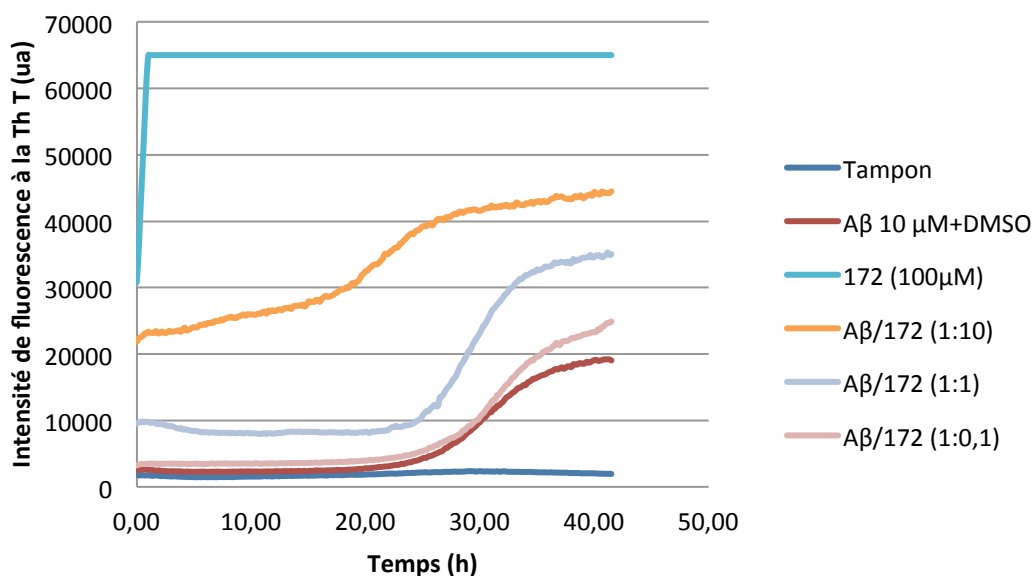


Figure 116 : Cinétique d'agrégation de A β ₁₋₄₂ en présence de **172**.

De façon surprenante, les résultats de l'agrégation de A β ₁₋₄₂ présence de **172** tendent à montrer que A β ₁₋₄₂ « désagrège » **172** et qu'il y a donc bien interaction entre **172** et A β ₁₋₄₂.

Toutes les expériences d'agrégation suivantes ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment.

IX.2. Dérivés de la proline

Pour les composés **174** (Proline OBn), **166** (Proline OH/CF₃) et **167** (Proline OH) on constate que quelque soit la concentration, de 1 à 100 µM, il n'y a pas d'inhibition de l'agrégation (Figure 117). Nous n'observons pas de retard d'agrégation (pas d'effet sur le temps de latence), ni de diminution de la valeur de fluorescence au niveau du plateau.

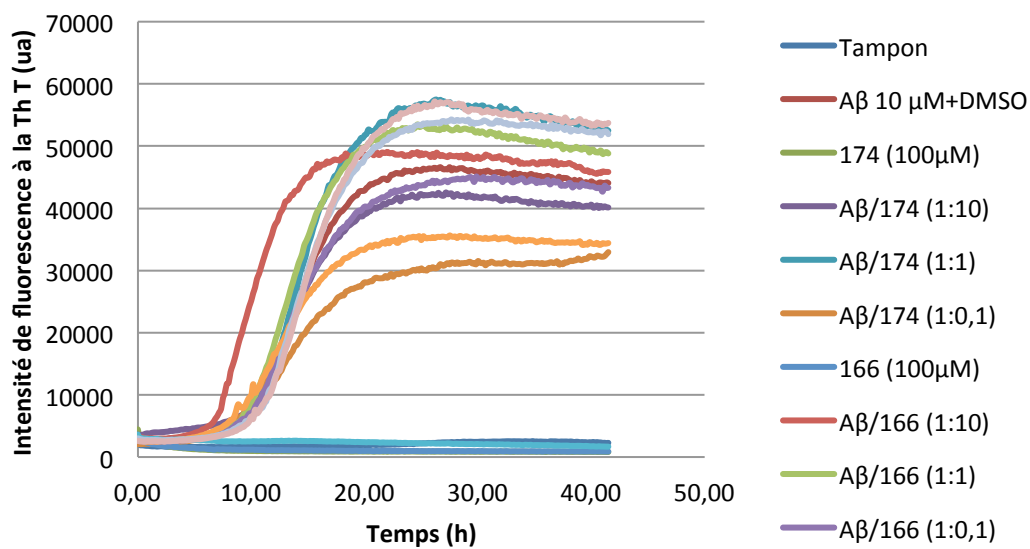


Figure 117 : Cinétique d'agrégation de Aβ₁₋₄₂ en présence de **166**, **167** et **174**.

De même, il n'y a pas d'inhibition de l'agrégation en présence des composés **169** (Proline) quelque soit la concentration utilisée, de 1 à 100 µM (Figure 118).

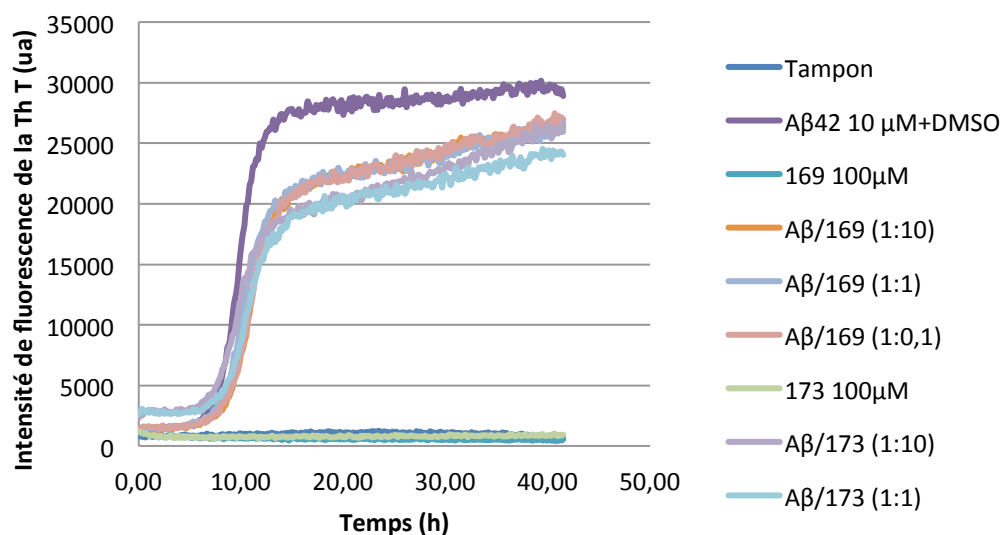


Figure 118 : Cinétique d'agrégation de Aβ₁₋₄₂ en présence de **169** et **173**.

IX.3. Dérivés de la tyrosine

Pour le composé **171** (Tyrosine) on constate qu'il n'y a pas d'inhibition de l'agrégation aux concentrations 1 et 10 μM , (Figure 119). Par ailleurs, une accélération significative de l'agrégation est observée avec une concentration de 100 μM . Cette accélération du signal de fluorescence est aussi observée de même pour une incubation du pentapeptide **171** seul à une concentration de 100 μM . On constate, que ce composé tend à s'agréger tout seul à forte concentration. On ne peut pas conclure sur l'interaction de **171** avec $\text{A}\beta_{1-42}$. Il semble que la fluorescence observée résulte de l'addition de la fluorescence de la Thioflavine T complexée à $\text{A}\beta_{1-42}$ et de la Thioflavine T complexée à **171**.

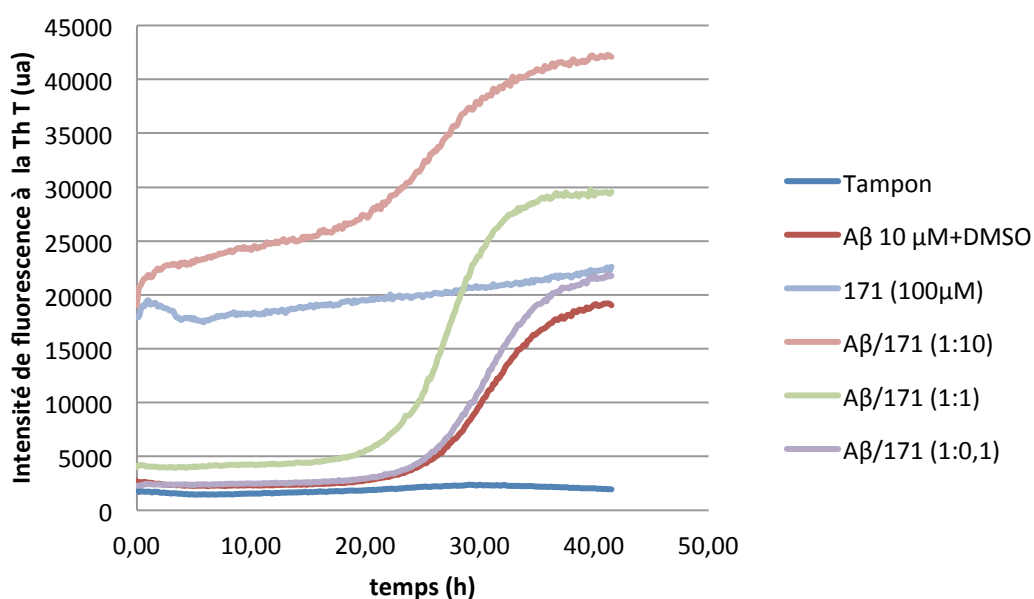


Figure 119 : Cinétique d'agrégation de $\text{A}\beta_{1-42}$ en présence de **171**.

Le composé **175** (Tyrosine benzylée) ne présente aucune inhibition du signal de fluorescence aux concentrations 1 et 10 μM , (Figure 120). Par ailleurs, une légère accélération du signal est observée avec une concentration de 100 μM . On constate, que ce composé accélère, à forte concentration, l'agrégation et tend à réduire le temps de latence. En revanche, **175** ne semble pas s'agréger seul. Il y aurait donc interaction de **175** avec $\text{A}\beta_{1-42}$ qui accélérerait le processus d'agrégation.

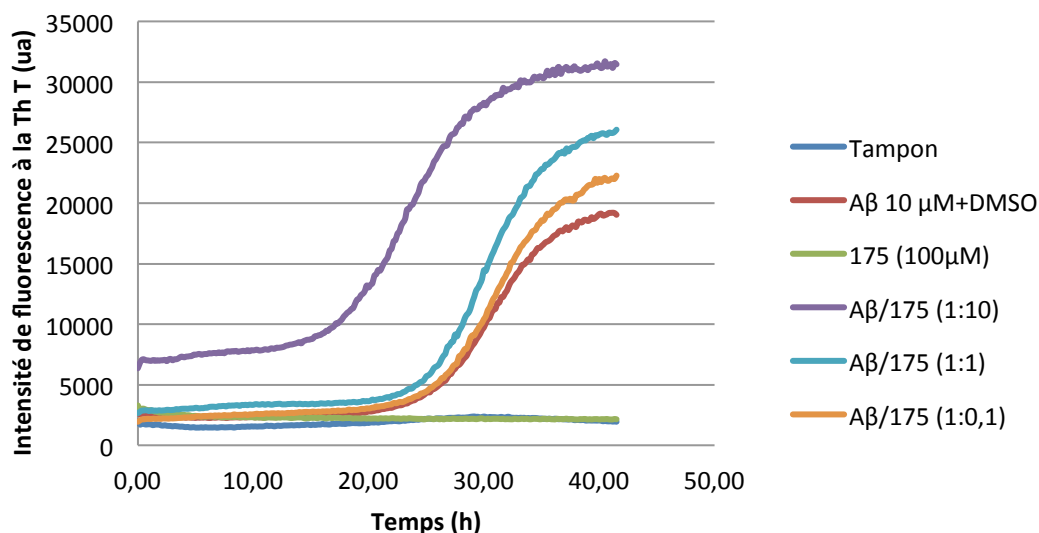


Figure 120 : Cinétique d'agrégation de $A\beta_{1-42}$ en présence de 175.

Enfin, lorsque $A\beta_{1-42}$ est incubé avec 100 et 200 μM de composé 170 (Tyrosine HFIP) une suppression du temps de latence est observée sans augmentation de la fluorescence au niveau du plateau (Figure 121, courbe rose et orange respectivement). À ces concentration 170 accélère l'agrégation mais a peu tendance à s'agréger seul. 170 interagit donc avec $A\beta_{1-42}$ pour accélérer l'agrégation.

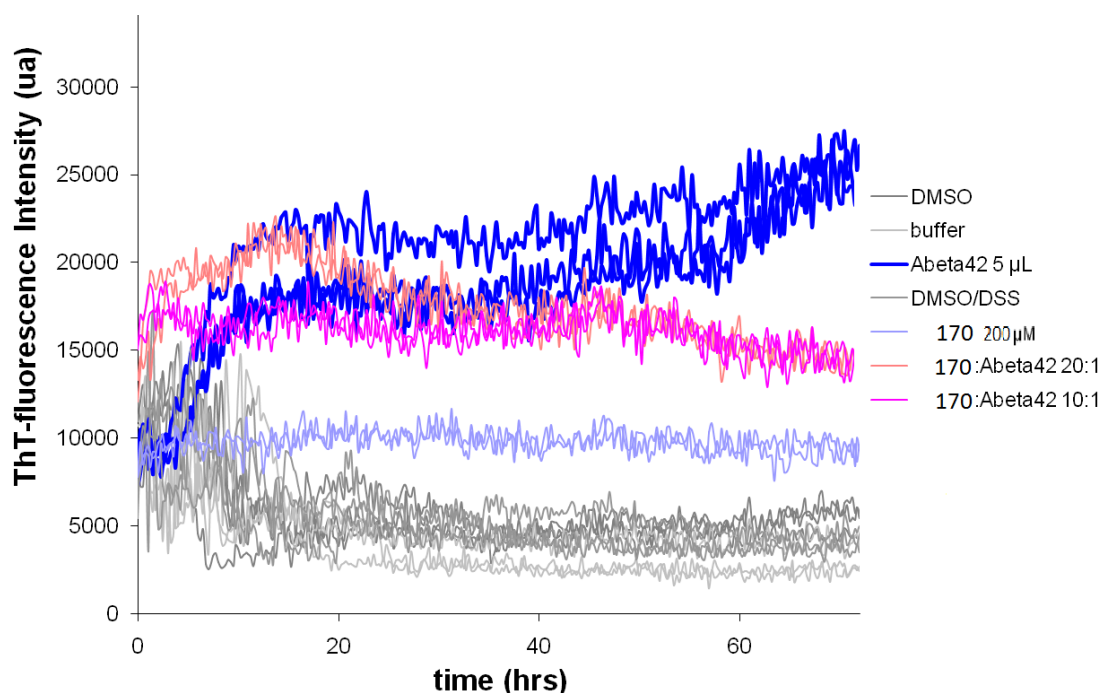


Figure 121 : Cinétique d'agrégation de $A\beta_{1-42}$ en présence de 170.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que le composé **165** est un inhibiteur puissant de la formation de fibres et que son activité résulte de sa structure peptidique qui est de nature très différente de celle de Soto (LPFFD). La différence majeure est la position de l'acide aminé polaire « sérine » au milieu de la séquence pentapeptidique alors que les analogues de Soto *et al.* présentent un groupement polaire (Ac. Aspartique) à l'extrémité.

La molécule **165** présente, en plus de l'activité inhibitrice de la nucléation, une activité sur l'élongation des fibres. L'inhibition de l'élongation implique une interaction avec le monomère ou avec le peptide structuré en feuillets β croisés. En effet, il a été montré que les molécules qui augmentent le temps de latence sont impliquées dans une interaction avec le peptide A β qui stabilise une conformation non amyloïdogénique [Bartolini *et al.*, 2007]. L'interaction de ce pentapeptide avec les formes monomériques de A β va être étudiée prochainement par des analyses de SPR (BIAcore).

De façon remarquable, l'analogue benzylé **173** du composé **165** est totalement inactif et n'a aucun effet sur l'agrégation de A β_{1-42} (ni le temps de latence ni le plateau de fluorescence) ce qui signifie que la présence d'un groupement hydroxyle au centre de la séquence pentapeptidique est favorable pour une activité inhibitrice de l'agrégation du peptide β amyloïde. L'importance de ce groupement polaire pourra être confirmée par des études similaires sur un analogue résultant d'une substitution de la sérine centrale par une valine.

En revanche, l'analogue trifluorométhylé **164** montre un effet totalement différent. Son effet sur l'agrégation de A β_{1-42} n'a pas pu être élucidé à ce jour car il s'agrège seul et donne un signal de fluorescence maximal en présence de Thioflavine T. Cette structuration particulière de ce peptidomimétique est due apparemment à la présence d'un groupement trifluorométhyle ce qui confirme l'influence de l'ajout du fluor sur la structure d'une chaîne peptidique et de ce fait sur son activité biologique. La conformation de ces peptidomimétiques va être prochainement étudiée par RMN et la morphologie des fibrilles formées par ce peptidomimétique vont être étudiées par des analyses de dichroïsme circulaire et IR.

Le peptidomimétique **172**, précurseur benzylé de **164**, présente une forte capacité à s'auto-agréger et accélérer l'agrégation du peptide A β ₄₂, ce qui réduit fortement le temps de latence et augmente rapidement le plateau d'équilibre jusqu'à saturation. Mise à part la présence d'un groupement CF₃ qui a apparemment un effet structurant, l'introduction d'un benzyle semble accentuer l'auto-assemblage de ces molécules via des interactions hydrophobes.

En revanche, les composés contenant une proline **169**, une hydroxy-proline **167** et une hydroxy-proline trifluorométhylée **166** au cœur du pentapeptide, ainsi que leurs dérivés benzylés **172** et **174** n'ont présenté aucun effet sur la formation des fibres. Ceci peut être s'expliquer par une structuration en forme de coude, favorisée par la présence d'une proline au centre de la séquence peptidique, ce qui est apparemment délétère pour l'activité inhibitrice de l'agrégation de ces molécules. Soto avait introduit une proline dans son pentapeptide **LPFFD**, en position 2 et cette proline semblait être bénéfique et constitue un élément casseur de feuillet β . Dans notre cas, la présence de cette proline confère une certaine rigidité au pentapeptide ce qui empêcherait l'interaction des deux bras dipeptidiques branchés sur la proline avec le peptide β amyloïde. À cet effet, l'augmentation de la flexibilité de ces molécules en introduisant les espaceurs entre la proline centrale et les bras dipeptidiques semblerait favorable pour l'interaction de ces derniers avec A β .

Enfin, le composé **171** a montré un auto-assemblage à 100 μ M avec une réduction du temps de latence. Des études de microscopie électronique sont envisagées pour vérifier qu'il ne s'agit pas d'une addition d'effets **170** quant à lui présente un auto-assemblage plus fort que celui observé avec **175** ce qui est probablement dû à la présence de deux groupements CF₃ sur le noyau aromatique. En revanche, le dérivé benzylé **175** n'a pas présenté d'effet remarquable sur l'agrégation ce qui est peut-être dû à une gêne stérique.

X. Conclusion et Perspectives :

Nous avons conçu des pentapeptides avec un pseudoaminoacide central alcool-fluoré en tant que casseurs de feuillet β en formant d'un côté un feuillet β antiparallèle et/ou parallèle avec le peptide β amyloïde par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes, et en perturbant de l'autre côté le réseau de liaison afin d'empêcher un autre peptide d'interagir et de ce fait inhiber l'agrégation du peptide amyloïde.

Plusieurs composés ont été obtenus par synthèse en phase liquide et purifiés par chromatographie sur gel de silice. De même, des tests de fluorescence à la thioflavine T ont été réalisés pour évaluer l'activité de nos pentapeptides en tant qu'inhibiteurs de l'agrégation du peptide β amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

Les résultats obtenus à ce stade sont très prometteurs. On a réussi à développer d'une part un pentapeptide capable d'inhiber totalement l'agrégation de $A\beta_{1-42}$, et d'autre part des pentapeptides capables d'accélérer son agrégation et donc peut être de diminuer la présence de petits oligomères neurotoxiques.

Nous avons aussi démontré l'influence du F sur la structuration d'un pentapeptide ; des études préliminaires par RMN (menées par O. Lequin, UPMC, UMR7203) semblent démontrer que ce pentapeptide (sérine CF_3) adopte une structure étendue en brin β .

D'autres études par RMN et DC sont en cours. De plus, pour vérifier si l'effet inhibiteur observé sur $A\beta_{1-42}$ est spécifique, des tests sur un autre peptide amyloïde, IAPP (Islet Amyloid Polypeptide), impliqué dans le diabète sucré de type II sont envisagées.

Enfin, pour tous les pentapeptides, ayant un effet sur l'agrégation de $A\beta_{1-42}$, accélérateur ou inhibiteur de l'agrégation, d'autres études seront menées dans le laboratoire (EC, ME, SPR, etc)

Partie Expérimentale

I. Méthode d'évaluation de l'activité anti-agrégante des pentapeptides

La spectroscopie de fluorescence par la Thioflavine-T est la méthode d'analyse choisie pour étudier l'effet de nos pentapeptides sur la cinétique d'agrégation du peptide amyloïde β .

I.1. Mode opératoire du suivi de la cinétique d'agrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ par fluorescence à la Thioflavine T

Les expériences ont été réalisées en ajoutant le peptide à une solution tampon contenant la ThT dont la concentration a été choisie afin que tous les sites potentiels de liaison ThT-fibrilles soient occupés (ratio $A\beta$:ThT, 1:4). Pour chaque échantillon, l'intensité de fluorescence de la ThT a été enregistrée pendant 42 ou 70 heures en utilisant une paire de filtres dont les longueur d'onde d'excitation et d'émission ont été respectivement fixées à 440 et 485 nm.

I.2. Matériel utilisé

- Solution de Thioflavine-T (ThT) 1 mM dans l'eau : ThT solution.
- Solution de Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7,4 : tampon.
- Tampon (19,2 ml) + solution ThT (0,8 ml) = Tampon + solution ThT.
- Peptide $A\beta_{1-42}$ (10 μ M).
- Les ratios des inhibiteurs : peptide $A\beta_{1-42}$ = 20 :1, 10:1, 1:1, 0,1:1.

I.3. Dispositif

- Lecteur de plaque FLUOstar Optima, BmgLabtech.
- Microplaque Costar 3792 Noir, 96 puits, volume de 200 μ l.

I.4. Conditions d'utilisation

- Fluorescence : excitation 440 nm, émission 485 nm.

I.5. Paramètres de l'analyse

- 250 cycles, le temps : 600 secondes pour les expériences durant 42 heures.
- Les mesures ont été réalisées en triplicate.

I.6. Protocole de traitement du peptide

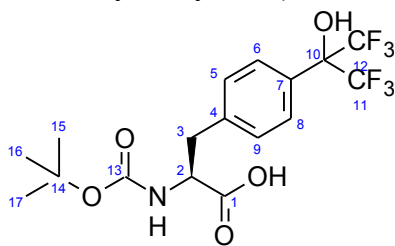
1% de NH_4OH dans H_2O 1 mM (solution mère) et ensuite dilué à 0,2 mM dans le tampon (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM) juste avant l'utilisation, puis mesure.

Note

Les travaux sur l'étude de la cinétique de formation des fibres du peptide amyloïde $\text{A}\beta_{1-42}$ ont été réalisées dans le laboratoire de Biomolécules, UMR 7203 CNRS-UPMC-ENS, UPMC Univ Paris 06, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05 par les Dr. Julia KAFFY (UMR 8076, UPSUD) et Dr. Lucie KHEMTEMOURIAN (UMR 7203, UPMC).

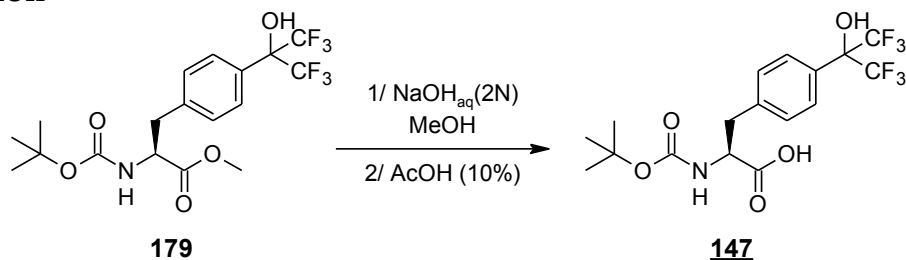
II. Description des composés

Boc-7-hydroxy-7-di(trifluoromethyl)-L-Phenylalanine **147**



Formule brute	: C ₁₇ H ₁₉ F ₆ NO ₅
Masse molaire (g/mol)	: 431.33
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 92
IR (cm ⁻¹)	: 3672, 3606, 3506, 3314, 1664, 1526
RMN ¹H (300 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 7.58 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, H _{8/6}), 7.32 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H, H _{9/5}), 6.00 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.42-4.20 (m, 1H, H ₂), 3.15 (dd, <i>J</i> = 13.9, 4.7 Hz, 1H, H ₃), 2.92 (dd, <i>J</i> = 13.8, 9.3 Hz, 1H, H ₃), 1.17 (bs, 9H, H _{17/16/15}).
RMN ¹³C (75 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 173.49 (C ₁), 156.27 (C ₁₃), 140.96 (C ₄), 130.40 (C _{9/5}), 129.84 (C ₇), 127.62 (C _{8/6}), 126.01 (C ₁₀), 122.18 (C ₁₂ and C ₁₁), 79.32 (C ₁₄), 37.82 (C ₃), 28.46 (C _{17/16/15}).
RMN 19F (188MHz, Acetone- <i>d</i> ₆)	: 73.71

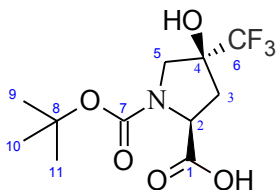
Réaction



Mode opératoire

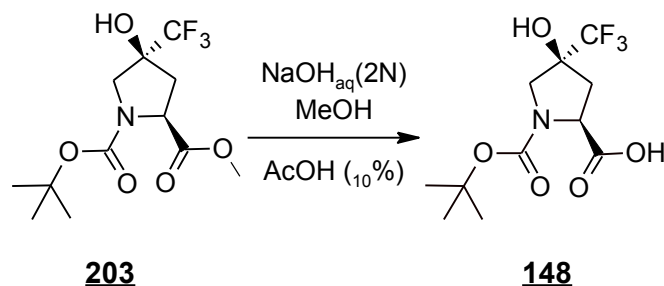
Le composé commercial **Boc-Phe(HFIP)-OMe **179**** (0.4 g, 0.96 mmol) est mis en solution dans 10 mL de MeOH. On ajoute ensuite une solution aqueuse de NaOH (2N, 5 mL) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le mélange réactionnel est acidifié avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (20 mL). Après reprise avec du DCM (30 mL) la phase organique, séparée, est alors lavée avec une solution saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant l'acide **147** (0.38 g, 0.88 mmol, 92%) est récupéré sous forme d'un solide blanc.

Boc-(2*S*,4*S*)-4-hydroxy-4-trifluoromethyl-L-Proline **148**



Formule brute	: C ₁₁ H ₁₆ F ₃ NO ₅
Masse molaire (g/mol)	: 299.24
Aspect	: Solide jaune
R^{dt} (%)	: 62
T_F (°C)	: 195-197
IR (cm ⁻¹)	: 3560, 3476, 3303, 2970, 1732, 1645, 1531
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 4.29 (t, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H, H ₂), 3.60-3.44 (m, 2H, H ₅), 2.07 (dd, <i>J</i> = 13.2, 6.4 Hz, 1H, H ₃), 1.38 (2s, 9H, H _{11/10/9}).
RMN ¹⁹F (188MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: -78.07 (d, <i>J</i> = 12.1 Hz).

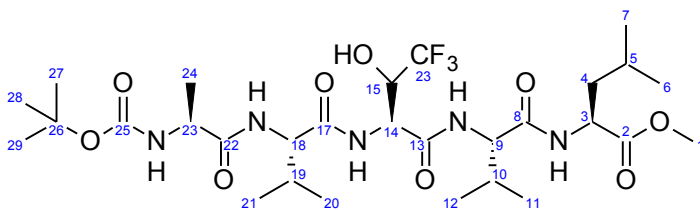
Réaction



Mode opératoire

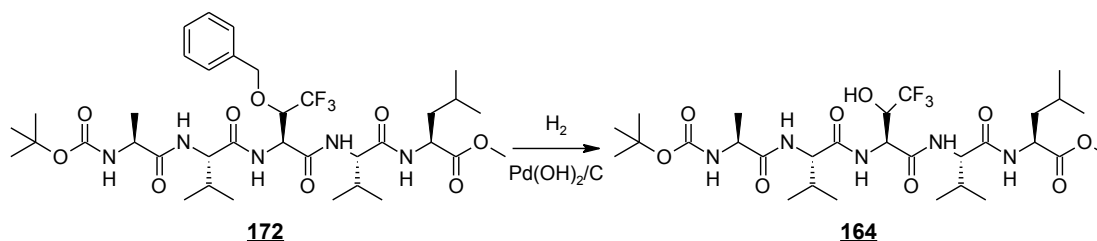
Le dérivé **203** (1.02 g, 3.26 mmol) est mis en solution dans 10 mL de MeOH. On ajoute ensuite une solution aqueuse de NaOH (2N, 5 mL) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le mélange réactionnel est acidifié avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL). Après reprise avec de l'AcOEt (60 mL) la phase organique, séparée, est alors lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant le produit **148** (0.60 g, 2.01 mmol, 62%) est récupéré sous forme d'un solide blanc.

Boc-Ala-Val-Ser(CF₃)-Val-Leu-OMe **164**



Formule brute :	: C ₂₉ H ₅₀ F ₃ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 669.73
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 60
RMN ¹H (400MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 8.20 (m, 2H, NH), 8.01 (bs, 1H, NH), 7.78 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H, NH), 7.29 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz, 1H, NH), 4.48-3.9 (m, 1H, H ₁₄), 4.35-4.20 (m, 3H, H ₁₅ , H ₉ and H ₃), 4.12 (m, 1H, H ₂₃), 3.71 (s, 3H, H ₁), 2.16-2.05 (m, 2H, H ₁₉ and H ₁₀), 1.77-1.57 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.44 (s, 9H, H _{29/28/27}), 1.32-1.28 (m, 3H, H ₂₄), 1.01-0.85 (m, 18H, H _{21/20} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 175.7 (C ₂₂), 174.4 (C ₈), 173.3 (C ₂), 173 (C ₁₇), 170.5 (C ₁₃), 164.9 (C ₂₅), 80.7 (C ₂₆), 70.6 (C ₁₅), 68.4, 59.7 (C ₉), 59.6 (C ₁₈), 53.8 (C ₁₄), 52.6 (C ₁), 52.3 (C ₃), 51.7 (C ₂₃), 41.3 (C ₄), 32.4 (C ₁₉), 31.8 (C ₁₀), 28.7 (C _{29/28/27}), 25.8 (C ₅), 23.2, 21.8 (C ₇ and C ₆), 19.7, 19.6, 18.2, 18 (C _{21/20} , C _{12/11} and C ₂₄)

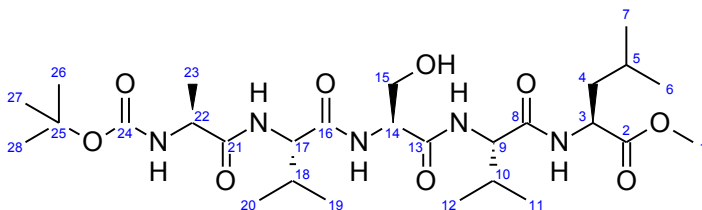
Réaction



Mode opératoire

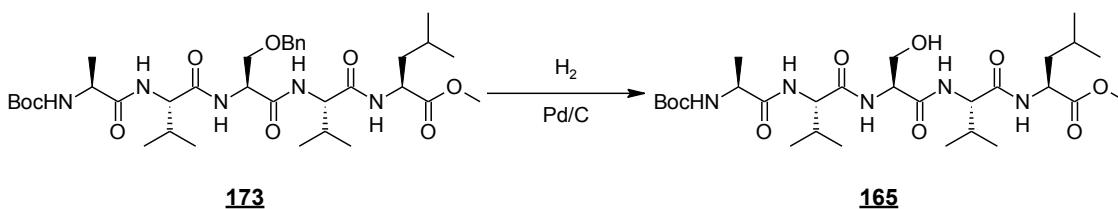
Le dérivé **172** (0.06 g, 0.079 mmol) est mis en solution dans un mélange MeOH/DMF (2/0.2, v/v, mL). On ajoute ensuite 40 mg de Pd(OH)₂/C (20% en masse). Le mélange est agité une nuit sous atmosphère d'hydrogène. Après filtration du catalyseur sur celite et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient **164** (0.03 g, 0.045 mmol, 60%) sous forme d'un solide blanc.

BocHN.Ala-Val-Ser-Val-Leu.OMe 165



Formule brute :	: C ₂₈ H ₅₁ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 601.73
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 94
T_F (°C)	: 226-228
IR (cm⁻¹)	: 3649, 3587, 3281, 3227, 2964, 1634, 1539
RMN ¹H (300MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 4.59-4.37 (m, 2H, H ₁₄ and H ₃), 4.28-4.23 (m, 2H, H ₂₁ and H ₉), 4.18-4.04 (m, 1H, H ₂₂), 3.85-3.71 (m, 2H, H ₁₅), 3.69 (s, 1H, H ₁), 2.16-2.11 (m, 2H, H ₁₈ and H ₁₀), 1.79-1.53 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.44 (s, 9H, H _{28/27/26}), 1.32 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, H ₂₃), 1.04-0.81 (m, 18H, H _{7/6} , H _{12/11} and H _{27/26}).
RMN ¹³C (75MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 176.05 (C ₂₄), 174.35 (C ₂), 173.60 (C ₈), 173.47 (C ₁₆), 172.32 (C ₁₃), (C ₂₄), 63.05 (C ₁₅), 60.00 (C ₁₇), 59.90 (C ₉), 56.54 (C ₁₄), 52.57 (C ₁), 52.18 (C ₃), 51.74 (C ₂₂), 41.28 (C ₄), 32.15 (C ₁₈), 31.85 (C ₁₀), 28.73 (C _{28/27/26}), 25.85 (C ₅), 23.30, 21.83, 21.77 (C ₇ and C ₆), 19.76, 19.64, 18.61, 18.45 (C _{20/19} and C _{12/11}), 17.97 (C ₂₃).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 624 [M+Na] ⁺

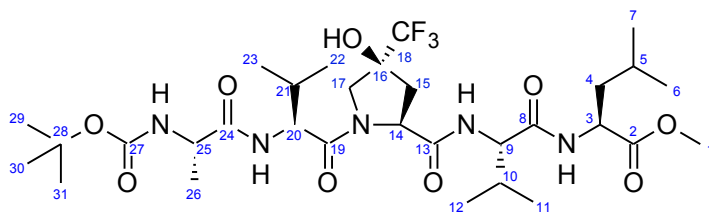
Réaction



Mode opératoire

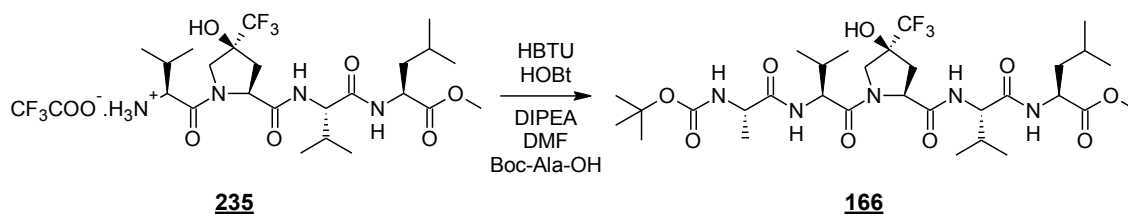
L'hydrogénolyse est réalisée avec un système H-Cube® sur une cartouche 10% Pd/C CatCart à 20°C. la pression d'hydrogène est fixée à 20 bar. Le dérivé 173 (0.05 g, 0.08 mmol) est mis en solution dans un mélange de MeOH/DMF (2/0.2, v/v, mL) et passé sur la cartouche avec un débit de 1 mL/min. après trois passages, le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner 165 (0.04 g, 0.07 mmol, 92%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-Ala-Val-Pro(OH/CF₃)-Val-Leu-OMe 166



Formule brute :	: C ₃₁ H ₅₂ F ₃ N ₅ O ₉
Masse molaire(g/mol)	: 695.77
Aspect	: Solide jaune
R^{dt} (%)	: 48
R_F	: 0.50 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F(°C)	: 158-160
μ-Analyse	: C ₃₁ H ₅₂ F ₃ N ₅ O ₉ • 1.5 H ₂ O
Théorique	: C(51.51%) H(7.69%) N(9.69%)
Expérimentale	: C(51.86%) H(7.86%) N(9.37%)
IR (cm⁻¹)	: 3650, 3603, 3450, 3300, 2968, 1631, 1539
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 8.09 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H, NH), 7.52 (m, 1H, NH), 6.33 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.22 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H, NH), 4.95 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H, H ₁₄), 4.70-4.61 (m, 1H, H ₃), 4.49 (m, 1H, H ₂₀), 4.43 (m, 1H, H ₂₅), 4.27 (m, 1H, H ₉), 4.17 (m, 1H, H ₁₇), 3.92 (d, <i>J</i> = 10.6 Hz, 1H, H ₁₇), 3.76 (s, 3H, H ₁), 2.50 (dd, <i>J</i> = 14.0, 9.5 Hz, 1H, H ₁₅), 2.29-2.18 (d, 14.0 Hz, 1H, H ₁₅), 2.16-1.99 (m, 2H, H ₂₁ and H ₁₀), 1.74-1.54 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.47 (s, 9H, H _{31/30/29}), 1.35-1.22 (m, 3H, H ₂₆), 1.03-0.85 (m, 18H, H _{23/22} , H _{12/11} and H _{7/6})
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.11 (C ₂), 172.86 (C ₂₄), 172.55 (C ₁₃), 172.22 (C ₁₉), 170.19 (C ₈), 155.47 (C ₂₇), 125.68 (C ₁₈), 80.19 (C ₂₈), 79.80 (C ₁₆), 59.57 (C ₉), 59.32 (C ₁₄), 56.48 (C ₁₇), 55.65 (C ₂₀), 52.37 (C ₁), 50.87 (C ₃), 49.52 (C ₂₅), 41.35 (C ₄), 34.92 (C ₁₅), 31.53 (C ₂₁), 30.94 (C ₁₀), 28.35 (C _{31/30/29}), 24.88 (C ₅), 22.68, 21.90 (C ₇ and C ₆), 19.16, 19.01 (C ₂₃ and C ₁₂), 18.90 (C ₂₆), 18.21, 18.04 (C ₂₂ and C ₁₁).
SM (ESI Positif/MeOD)	: 718 [M+Na] ⁺
SM (ESI négative/MeOD)	: 694 [M-H] ⁻
RMN 19F (188MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: -78.35

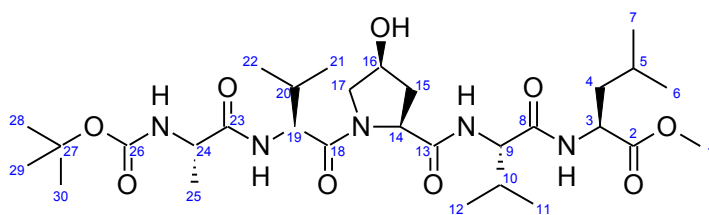
Réaction



Mode opératoire

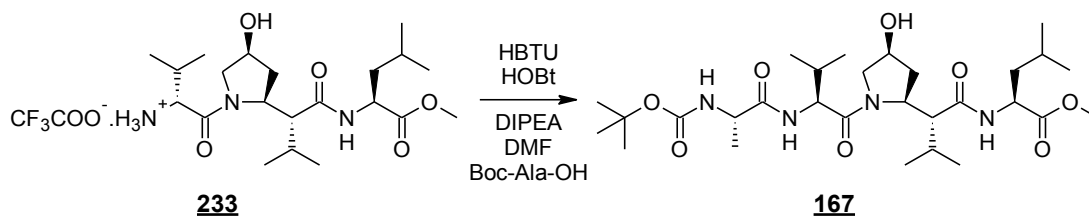
Le dérivé **235** (0.72 g, 1.13 mmol) est mis en solution dans 15 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (1.18 mL, 6.76 mmol) puis successivement, HOBt (0.17 g, 1.24 mmol), HBTU (0.51 g, 1.35 mmol) et **Boc-Ala-OH 176** (0.23 g, 1.24 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (60 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (90 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (30 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (30 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange DCM/MeOH (90/10) comme éluant. Une deuxième purification est réalisée en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour donner **166** (0.38 g, 0.55 mmol, 48%) sous forme d'un solide jaune.

Boc-Ala-Val-*cis*-Pro(OH)-Val-Leu-OMe 167



Formule brute	: C ₃₀ H ₅₃ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 627.77
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 70
R_F	: 0.55 (AcOEt/MeOH : 90/10)
T_F(°C)	: 137-139
μ-Analyse	: C ₃₀ H ₅₃ N ₅ O ₉ • 0.85 H ₂ O
Théorique	: C(56.03%) H(8.59%) N(10.89%)
Expérimentale	: C(56.35%) H(8.99%) N(10.79%)
IR (cm⁻¹)	: 3649, 3569, 3472, 3278, 2956, 1630, 1536
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.99 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.58 (m, 1H, NH), 6.32 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.74 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, OH), 5.20 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, NH), 4.81 (dd, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, H ₁₄), 4.65 (td, <i>J</i> = 8.4, 5.1 Hz, 1H, H ₃), 4.56 (m, 1H, H ₁₉), 4.51-4.40 (m, 2H, H ₂₄ and H ₁₆), 4.27 (dd, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, H ₉), 4.00 (dd, <i>J</i> = 10.8, 3.9 Hz, 1H, H ₁₇), 3.86 (dd, <i>J</i> = 11.1 Hz, 1H, H ₁₇), 3.76 (s, 3H, H ₁), 2.25 (m, 1H, H ₁₅), 2.14 (m, 2H, H ₁₅ and H ₁₀), 2.09-1.98 (m, 1H, H ₂₀), 1.76-1.54 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.46 (s, 9H, H _{30/29/28}), 1.29 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 3H, H ₂₅), 1.06-0.86 (m, 18H, H _{22/21} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.34, 173.10, 172.83, 171.98, 170.42 (C ₂₃ , C ₁₈ , C ₁₃ , C ₈ and C ₂), 155.38 (C ₂₆), 80.05 (C ₂₇), 71.15 (C ₁₆), 59.58 (C ₁₄), 59.37 (C ₉), 58.02 (C ₁₇), 55.67 (C ₁₉), 52.31 (C ₁), 50.84 (C ₃), 49.69 (C ₂₄), 41.34 (C ₄), 36.30 (C ₁₅), 31.61 (C ₂₀), 30.85 (C ₁₀), 28.36 (C _{30/29/28}), 24.88 (C ₅), 22.73, 21.96 (C ₇ and C ₆), 19.23, 19.04, 18.17, 18.09 (C _{22/21} , C ₂₅ and C _{12/11}).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 650.6 [M+Na] ⁺
SM (ESI négative/MeOH)	: 626 [M-H] ⁻

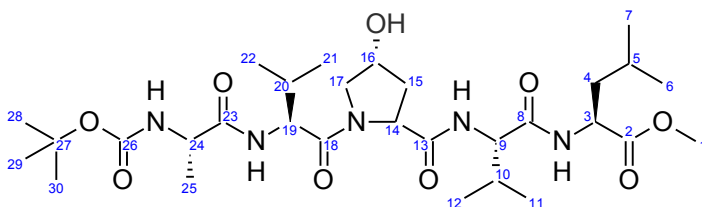
Réaction Mode opératoire



Mode opératoire

Le dérivé **233** (0.13 g, 0.23 mmol) est mis en solution dans 15 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.24 mL, 1.37 mmol) puis successivement, HOBt (0.03 g, 0.25 mmol), HBTU (0.1 g, 0.27 mmol) et **Boc-Ala-OH 176** (0.05 g, 0.25 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (40 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (20 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (20 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (20 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange de Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour fournir un solide qui après recristallisation dans un mélange DCM/MeOH donne **167** (0.10 g, 0.16 mmol, 70%) sous forme de cristaux blanc.

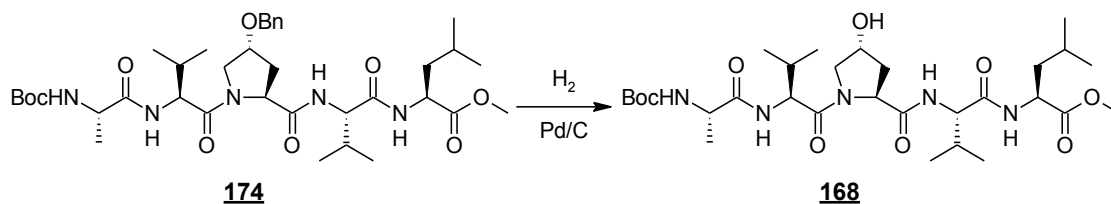
Boc-Ala-Val-Pro(OH)-Val-Leu-OMe **168**



Formule brute	: C ₃₀ H ₅₃ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 627.77
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 69
IR (cm⁻¹)	: 3463, 3405, 3283, 2953, 1653, 1625, 1541
RMN ¹H (300MHz, Acetone-d ₆) δ (ppm)	: 8.10-8.01 (m, 1H, NH), 7.58 (m, 2H, NH), 6.21 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H, NH), 4.76 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 1H, H ₁₄), 4.64-4.38 (m, 5H, H ₂₄ , H ₁₉ , H ₁₆ , H ₉ and H ₃), 3.86-3.73 (m, 2H, H ₁₇), 3.69 (s, 3H, H ₁), 2.16-2.06 (m, 4H, H ₂₀ , H ₁₅ and H ₁₀), 1.69 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.43 (s, 9H, H _{30/29/28}), 1.29 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 3H, H ₂₅), 1.00-0.88 (m, 18H, H _{22/21} , H _{11/12} and H _{6/7}).
RMN ¹³C (75MHz, Acetone-d ₆) δ (ppm)	: 172.76 (C ₂), 172.64 (C ₂₃), 171.45 (C ₁₃), 171.29 (C ₈), 170.88 (C ₁₈), 155.30 (C ₂₆), 78.52 (C ₂₇), 69.72 (C ₁₆), 58.86 (C ₁₄), 57.96 (C ₉), 55.72 (C ₁₇), 55.64 (C ₁₉), 51.32 (C ₁), 50.62 (C ₃), 49.93 (C ₂₄), 40.44 (C ₄), 37.46 (C ₁₅), 31.17 (C ₂₀ and C ₁₀), 27.74 (C _{30/29/28}), 24.52 (C ₅), 22.31, 21.05 (C ₇ and C ₆), 18.88 (C ₂₅), 18.05, 17.65, 17.41 (C _{29/12} and C _{28/11}).

SM (ESI Positif/MeOH) : 651 [M+Na]⁺
629 [M+H]⁺

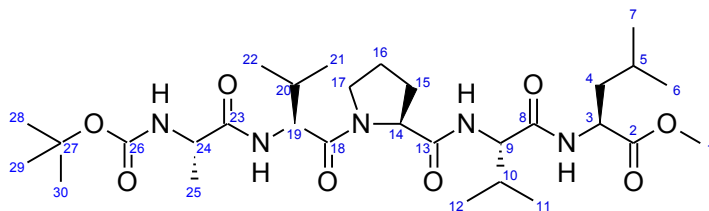
Réaction



Mode opératoire

L'hydrogénolyse est réalisée avec un système H-Cube® sur une cartouche 10% Pd/C CatCart à 35°C. La pression d'hydrogène est fixée à 20 bars. Le dérivé **174** (0.05 g, 0.08 mmol) est mis en solution dans 2 mL de MeOH et passé sur la cartouche avec un débit de 1 mL/min. Après trois passages, le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner **168** (0.03 g, 0.05 mmol, 69%) sous forme d'un solide blanc.

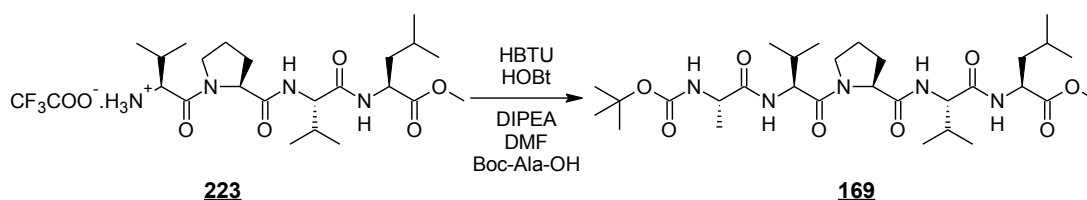
Boc-Ala-Val-Pro-Val-Leu-OMe **169**



Formule brute :	: C ₃₀ H ₅₃ N ₅ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 611.77
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 47
R_F	: 0.65 (AcOEt/MeOH, 90:10)
T_F (°C)	: 121-123
μ-Analyse	: C ₃₀ H ₅₃ N ₅ O ₈ • 0.5 H ₂ O
Théorique	: C(58.04%) H(8.79%) N(11.28%)
Expérimentale	: C(57.72%) H(8.80%) N(11.03%)
IR (cm⁻¹)	: 3449, 3308, 2957, 1625, 1528, 1366
RMN ¹H	: 7.20-7.20 (m, 2H, NH), 6.35 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, NH),
(300MHz, CDCl ₃)	5.09 (m, 1H, NH), 4.68-4.52 (m, 3H, H ₁₉ , H ₁₄ and H ₃),
δ (ppm)	4.33 (m, 1H, H ₂₄), 4.25-4.15 (m, 1H, H ₉), 3.82 (m, 1H, H ₁₇), 3.71 (s, 3H, H ₁), 3.66 (m, 1H, H ₁₇), 2.13-1.92 (m, 6H, H ₂₀ , H ₁₆ , H ₁₅ and H ₁₀), 1.67-1.57 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.43 (s, 9H, H _{25/26/27}), 1.26 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H, H ₂₅), 0.92-0.97 (m, 18H, H _{22/21} , H _{12/11} and H _{7/6}).

RMN ^{13}C : 173.14 (C_2), 172.53 (C_{23}), 171.55 (C_{18}), 171.39 (C_{13}),
 (75MHz, CDCl_3) 170.76 (C_8), 155.34 (C_{26}), 80.04 (C_{27}), 59.96 (C_{14}),
 δ (ppm) 58.81 (C_9), 55.45 (C_{19}), 52.25 (C_1), 50.64 (C_3), 49.82
 (C_{24}), 47.84 (C_{17}), 41.40 (C_4), 31.51 (C_{20}), 30.37 (C_{10}),
 28.31 ($\text{C}_{28/29/30}$), 28.23 (C_{15}), 25.07 (C_{16}), 24.78 (C_5),
 22.75, 21.87, 19.42, 19.26 ($\text{C}_{22/21}$ and $\text{C}_{12/11}$), 18.71
 (C_{25}), 18.05, 17.67 ($\text{C}_{7/6}$).
SM (ESI Positif/MeOH) : 634 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
SM (ESI négative/MeOH) : 610 $[\text{M}-\text{H}]^-$

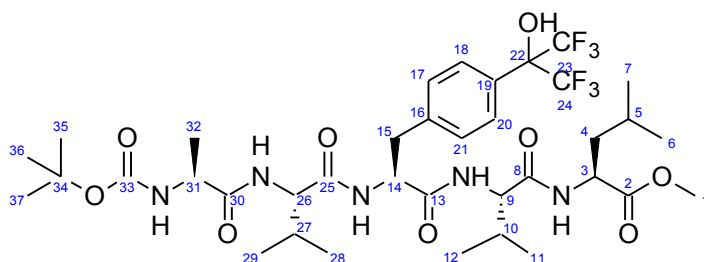
Réaction



Mode opératoire

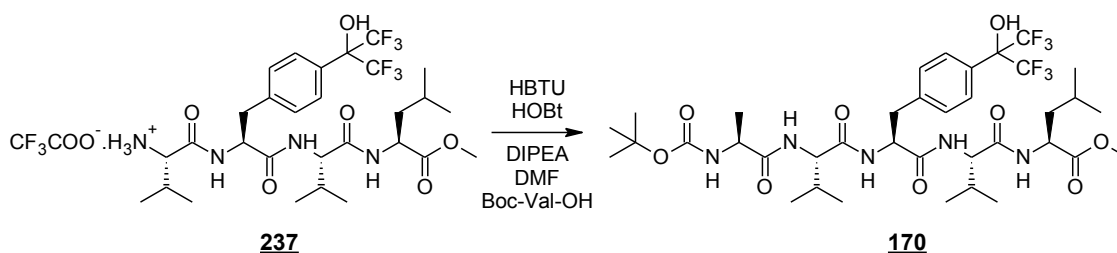
Le sel **223** (0.23 g, 0.41 mmol) est mis en solution dans 6 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.44 mL, 2.49 mmol) puis successivement, HOBt (0.06 g, 0.46 mmol), HBTU (0.21 g, 0.50 mmol) et **Boc-Ala-OH 176** (0.09 g, 0.46 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (30 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (30 mL), une solution aqueuse de K_2CO_3 10% (30 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant successivement l' Et_2O (100%) puis un mélange $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (90/10) comme éluant pour donner **169** (0.12 g, 0.20 mmol, 47%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-Ala-Val-Phe(HFIP)-Val-Leu-OMe 170



Formule brute	: C ₃₇ H ₅₅ F ₆ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 827.85
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 74
R_F	: 0.31 (Cyclohexane/AcOEt : 30/70)
T_F (°C)	: 220-222 (pâte vers 191)
μ-Analyse	: C ₃₇ H ₅₅ F ₆ N ₅ O ₉ • 4H ₂ O
Théorique	: C(49.38%) H(7.07%) N(7.78%)
Expérimentale	: C(49.86%) H(6.80%) N(7.00%)
IR (cm ⁻¹)	: 3669, 3552, 3489, 3287, 2957, 1637, 1551
RMN ¹H (300 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 7.93 (bs, 1H, NH), 7.78 (bs, 1H, NH), 7.65 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 3H, NH and H _{20/18}), 7.56 (bs, 1H, NH), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, H _{21/17}), 5.00 (bs, 1H, NH), 4.57 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, 1H, H ₁₄), 4.43 (m, 2H, H ₂₆ and H ₉), 4.30 (m, 1H, H ₃₁), 3.69 (bs, 3H, H ₁), 3.24 (m, 1H, H ₁₅), 3.09-2.97 (m, 1H, H ₁₅), 2.89-2.15 (m, 2H, H ₂₇ and H ₁₀), 1.83-1.59 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.41 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 9H, H _{37/36/35}), 1.31 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H, H ₃₂), 1.03-0.75 (m, 18H, H _{29/28} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 52.3 (C ₁), 173.6 (C ₂), 51.5 (C ₃), 41.2 (C ₄), 25.7 (C ₅), 172, 172.3 (C ₈), 59.2, 59.6 (C ₉), 31.8 (C ₁₀), 172, 172.3 (C ₁₃), 38.5 (C ₁₅), 140.8 (C ₁₆), 130.3 (C _{17/21}), 127.6 (C _{18/20}), 129.7 (C ₁₉), 172, 172.3 (C ₂₅), 59.2, 59.6 (C ₂₆), 32.2 (C ₂₇), 174.2 (C ₃₀), 50.9 (C ₃₁), 19 (C ₃₂), 156.6 (C ₃₃), 79.7 (C ₃₄), 28.7 (C _{37/36/35})
SM (ESI positif/MeOH)	: 850.6 [M+Na] ⁺

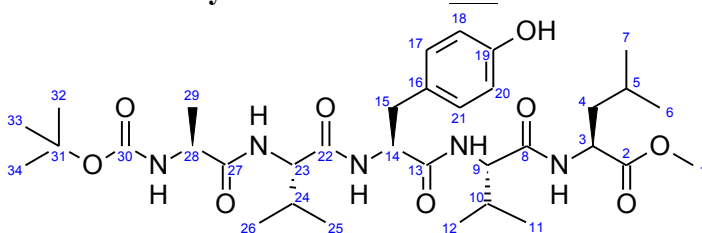
Réaction



Mode opératoire

Le sel **237** (0.15 g, 0.19 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (0.2 mL, 1.17 mmol) puis successivement, HOBt (0.03 g, 0.21 mmol), HBTU (0.09 g, 0.23 mmol) et **Boc-Ala-OH 176** (0.04 g, 0.21 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL) pour fournir un précipité blanc qui après plusieurs lavages successifs à l'eau donne **170** (0.10 g, 0.12 mmol, 74%) sous forme d'un solide blanc.

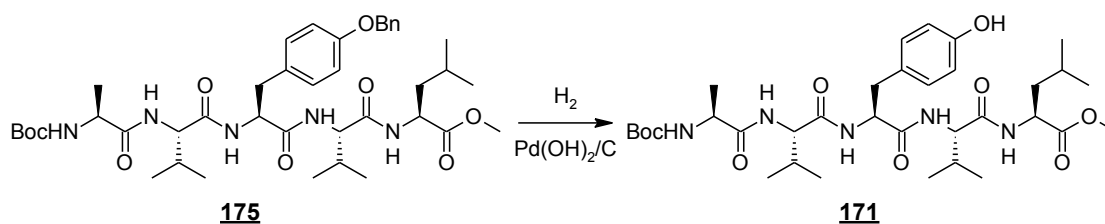
Boc-Ala-Val-Tyr-Val-Leu-OMe **171**



Formule brute	: C ₃₄ H ₅₅ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 677.83
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 99
R_F	: 0.85 (AcOEt/MeOH : 90/10)
T_F (°C)	: 249-251
μ-Analyse	: C ₃₄ H ₅₅ N ₅ O ₉ • 1 H ₂ O
Théorique	: C(58.68%) H(8.27%) N(10.07%)
Expérimentale	: C(58.76%) H(8.20%) N(10.06%)
IR (cm⁻¹)	: 3650, 3482, 3334, 3305, 2949, 1637, 1513
RMN ¹H (400MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 9.12 (s, 1H, OH), 8.25 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, NH), 8.02-7.93 (m, 1H, NH), 7.80 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, NH), 7.50 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, NH), 6.99-6.97 (m, 3H, NH and H _{21/17}), 6.59 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, H _{20/18}), 4.51 (td, <i>J</i> = 8.5, 4.9 Hz, 1H, H ₁₄), 4.27 (m, 1H, H ₃), 4.22-4.11 (m, 2H, H ₂₃ and H ₉), 4.04-3.89 (m, 1H, H ₂₈), 3.60 (s, 3H, H ₁), 2.86 (m, 1H, H ₁₅), 2.66 (m, 1H, H ₁₅), 2.00-1.84 (m, 2H, H _{24/10}), 1.67-1.42 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.35 (s, 9H, H _{34/33/32}), 1.10 (d, <i>J</i> = 16.1, 7.0 Hz, 3H, H ₂₉), 0.94-0.71 (m, 18H, H _{26/25} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 172.70 (C ₂), 172.35 (C ₂₇), 170.86 (C ₈), 170.79 (C ₁₃), 170.55 (C ₂₂), 155.73 (C ₁₉), 155.07 (C ₃₀), 129.91 (C _{21/17}), 127.58 (C ₁₆), 114.78 (C _{20/18}), 78.07 (C ₃₁), 57.23 (C ₉), 57.07 (C ₂₃), 53.86 (C ₁₄), 51.70 (C ₁), 50.16 (C ₃), 49.65 (C ₂₈), 39.60 (C ₄), 36.55 (C ₁₅), 30.97, 30.83 (C ₂₄ and C ₁₀), 28.16 (C _{34/33/32}), 24.19 (C ₅), 22.73, 21.20 (C ₇ and C ₆), 19.14, 18.94, 18.05, 17.66 (C ₂₆ , C ₂₅ , C ₁₂ and C ₁₁), 17.76 (C ₂₉).

SM (ESI Positif/MeOH) : 700.6 [M+Na]⁺

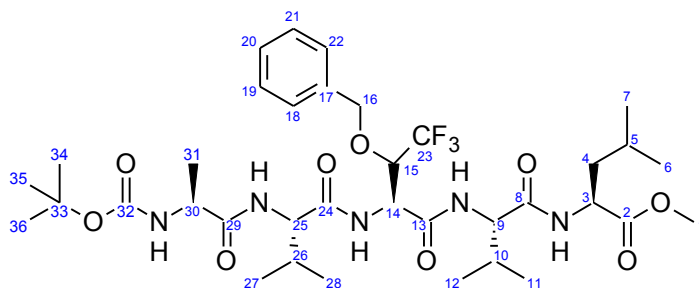
Réaction



Mode opératoire

Le dérivé **175** (0.23 g, 0.3 mmol) est mis en solution dans un mélange MeOH/DMF (40/1, v/v, mL). On ajoute ensuite 50 mg de Pd(OH)₂/C (20% en masse). Le mélange est agité une nuit sous atmosphère d'hydrogène. Après filtration du catalyseur sur celite et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient **171** (0.20 g, 0.30 mmol, 99%) sous forme d'un solide blanc.

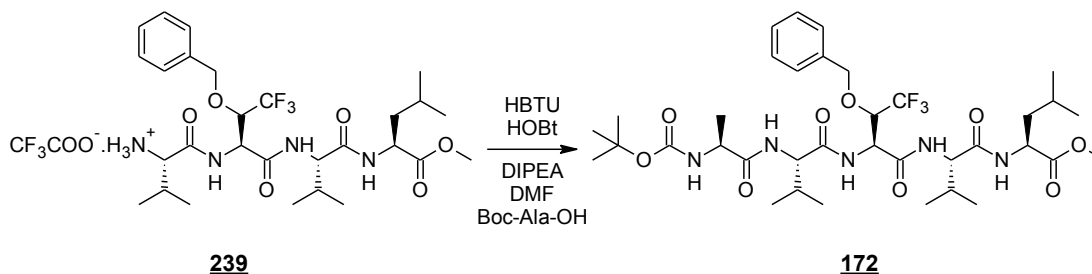
Boc-Ala-Val-Ser(OBzl/CF₃)-Val-Leu.OMe **172**



Formule brute	: C ₃₆ H ₅₆ F ₃ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 759.85
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 83
R_F	: 0.65 (Cyclohexane, 100%)
T_F (°C)	: > 260
μ-Analyse	: C ₃₆ H ₅₆ F ₃ N ₅ O ₉ • 2 C ₃ H ₆ O (Acétone)
Théorique	: C(57.59%) H(7.84%) N(8.00%)
Expérimentale	: C(57.12%) H(7.43%) N(7.65%)
IR (cm ⁻¹)	: 3573, 3273, 2959, 2900, 1720, 1636, 1549, 1453

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm)	: 8.43-8.25 (m, 3H, NH), 7.53 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH), 7.32-7.24 (m, 5H, $\text{H}_{22/21/20/19/18}$), 7.05 (bs, 1H, NH), 4.98 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_{14}), 4.65-4.56 (m, 2H, H_{16}), 4.25 (m, 3H, H_{15} , H_9 and H_3), 4.05-3.90 (m, 1H, H_{25}), 3.58 (s, 3H, H_1), 1.97 (m, 2H, H_{26} and H_{10}), 1.64-1.42 (m, 3H, H_5 and H_4), 1.37 (s, 9H, $\text{H}_{36/35/34}$), 1.14 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H_{31}), 0.80 (m, 18H, $\text{H}_{28/27}$, $\text{H}_{12/11}$ and $\text{H}_{7/6}$).
RMN ^{13}C (101MHz, DMSO- d_6) δ (ppm)	: 172.64 (C_2), 172.40 (C_{29}), 170.62 (C_8), 170.14 (C_{24}), 167.60 (C_{13}), 136.76 (C_{17}), 128.05, 127.78, 127.56 ($\text{C}_{22/18}$, $\text{C}_{21/19}$ and C_{20}), 124.80 (C_{23}), 78.08 (C_{33}), 74.64 (C_{16}), 57.69 (C_{25}), 56.91 (C_9), 51.67 (C_1), 51.20 (C_{14}), 50.29 (C_3), 49.76 (C_{30}), 39.5 (C_4), 31.07 (C_{10}), 30.84 (C_{26}), 28.10 ($\text{C}_{36/35/34}$), 24.10 (C_5), 22.60, 21.19 ($\text{C}_{7/6}$), 18.93, 18.85, 18.06, 17.62 ($\text{C}_{28/27}$, $\text{C}_{12/11}$ and C_{31}).
RMN ^{19}F (188 MHz/ CDCl_3) δ (ppm)	: -70.57(d, $J = 6.7$ Hz).
SM (ESI negative/MeOH)	: 758[M-H] $^-$

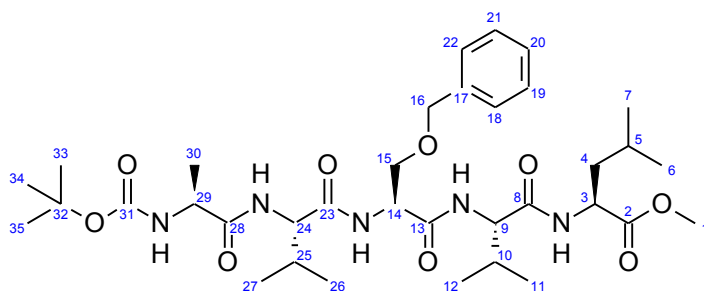
Réaction



Mode opératoire

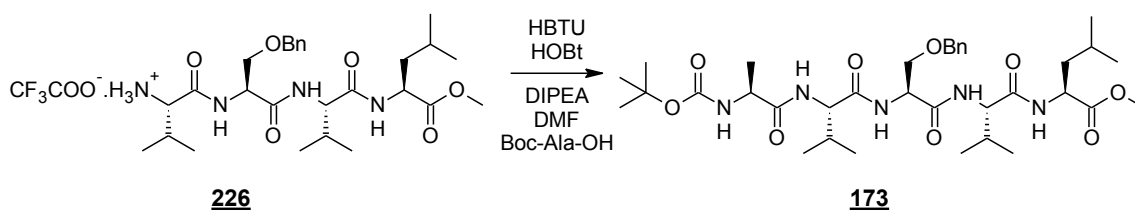
Le sel **239** (0.1 g, 0.14 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (0.15 mL, 0.85 mmol) puis successivement, HOBt (0.02 g, 0.16 mmol), HBTU (0.07 g, 0.17 mmol) et **Boc-Ala-OH 176** (0.03 g, 0.16 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL) pour fournir un précipité blanc qui après lavage successif avec de l'Ether, DCM, Acétone, AcOEt et MeOH donne **172** (0.09 g, 0.12 mmol, 83%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-Ala-Val-Ser(Bzl)-Val-Leu-OMe 173



Formule brute :	: C ₃₅ H ₅₇ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 691.85
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 63
R_F	: 0.3 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 237-239
μ-Analyse	: C ₃₅ H ₅₇ N ₅ O ₉ • 0.5 H ₂ O
Théorique	: C(59.98%) H(8.36%) N(9.99%)
Expérimentale	: C(60.02%) H(8.18%) N(9.61%)
IR (cm⁻¹)	: 3479, 3447, 3264, 2970, 1715, 1632
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 8.75 (m, 1H, NH), 8.43 (m, 1H, NH), 8.03 (m, 2H, NH), 7.17 (m, 5H, H _{22/18} , H _{21/19} and H ₂₀), 6.15 (m, 1H, NH), 5.34 (m, 1H, H ₂₉), 4.98 (m, 1H, H ₁₄), 4.77-4.54 (m, 3H, H ₂₄ , H ₉ and H ₃), 4.40-4.19 (m, 2H, H ₁₆), 3.69 (s, 3H, H ₁), 3.46 (m, 2H, H ₁₅), 2.06 (m, 1H, H ₁₀), 1.93 (m, 1H, H ₂₅), 1.70-1.47 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.42 (s, 9H, H _{35/34/33}), 1.29 (d, <i>J</i> = 12.8, 5.9 Hz, 3H, H ₃₀), 1.02-0.68 (m, 18H, H _{7/6} , H _{12/11} and H _{27/26}).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.24 (C ₂), 173.07 (C ₂₈), 171.45, 171.31, 170.14 (C ₂₃ , C ₁₃ and C ₈), 155.62 (C ₃₁), 138.01 (C ₁₇), 128.19, 127.21, 127.18 (C _{22/18} , C _{21/19} and C ₂₀), 79.11 (C ₃₂), 72.66 (C ₁₆), 70.31 (C ₁₅), 58.60 (C ₉), 58.1 (C ₂₄), 52.14 (C ₁₄), 51.94 (C ₁), 50.67 (C ₂₉), 40.53 (C ₄), 32.51 (C ₂₅), 31.48 (C ₁₀), 28.39 (C _{35/34/33}), 24.87 (C ₅), 22.52, 21.96 (C ₇ and C ₆), 18.83 (C ₃₀), 18.30, 19 (C _{27/26} and C _{12/11}).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 692 [M+H] ⁺

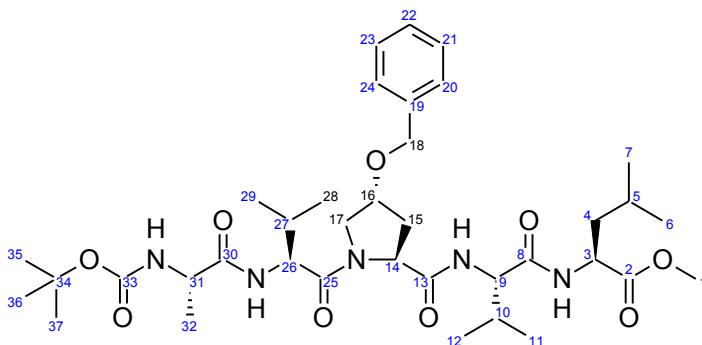
Réaction



Mode opératoire

Le dérivé **226** (0.19 g, 0.30 mmol) est mis en solution dans 8 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.31 mL, 1.80 mmol) puis successivement, HOBt (0.04 g, 0.33 mmol), HBTU (0.14 g, 0.36 mmol) et **Boc-Ala-OH 176** (0.06 g, 0.33 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans de l'AcOEt (60 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant, pour donner **173** (0.13 g, 0.19 mmol, 63%) sous forme d'un solide blanc.

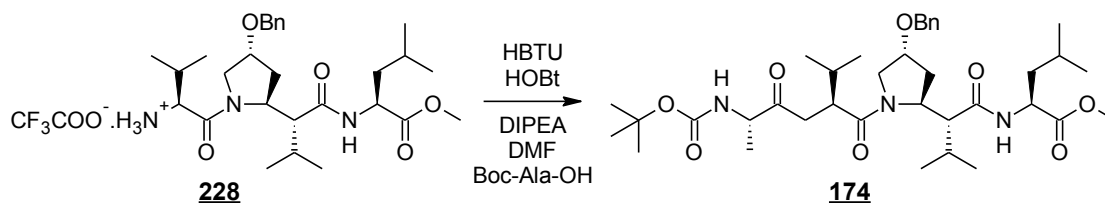
Boc-Ala-Val-Pro(OBzl)-Val-Leu-OMe **174**



Formule brute :	: C ₃₇ H ₅₉ N ₅ O ₉
Masse molaire (g/mol)	: 717.89
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 54
R_F	: 0.5 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 137-139 (Pate vers 125°C)
μ-Analyse	: C ₃₇ H ₅₉ N ₅ O ₉ • 0.15 H ₂ O
Théorique	: C(61.67%) H(8.31%) N(9.72%)
Expérimentale	: C(61.71%) H(8.42%) N(9.50%)
IR (cm⁻¹)	: 3409, 3297, 2952, 1653, 1626, 1528

RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ (ppm)	: 7.52 (m, 2H, 2NH), 7.41-7.26 (m, 5H, $\text{H}_{24/20}$ $\text{H}_{23/21}$ and H_{22}), 6.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 5.21 (m, 1H, NH), 4.76 (m, 1H, H_{14}), 4.61 (m, 2H, H_{26} and H_3), 4.57-4.48 (m, 2H, H_{18}), 4.44 (m, 1H, H_{31}), 4.35 (m, 1H, H_{16}), 4.26 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_9), 4.16 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H_{17}), 3.81-3.72 (m, 4H, H_{17} and H_1), 2.31 (m, 2H, H_{15}), 2.24-2.12 (m, 1H, H_{27}), 2.10-1.99 (m, 1H, H_{10}), 1.70-1.56 (m, 3H, H_4 and H_5), 1.47 (s, 9H, $\text{H}_{37/36/35}$), 1.19 (d, $J = 5.1$ Hz, 3H, H_{32}), 1.05-0.84 (m, 18H, $\text{H}_{6/7}$, $\text{H}_{11/12}$ and $\text{H}_{29/28}$).
RMN ^{13}C (101MHz/ CDCl_3) δ (ppm)	: 173.19 (C_2), 172.50 (C_{25}), 171.60 (C_{30}), 171.53 (C_{13}), 170.79 (C_8), 155.3 (C_{33}), 137.68 (C_{19}), 128.41 ($\text{C}_{23/21}$), 127.78, 127.73 ($\text{C}_{24/20}$ and C_{22}), 80.0 (C_{34}), 76.95 (C_{16}), 70.99 (C_{18}), 58.93 (C_{14} and C_9), 55.76 (C_{26}), 52.66 (C_{17}), 52.26 (C_1), 50.67 (C_3), 49.6 (C_{31}), 41.51 (C_4), 34.79 (C_{15}), 31.66 (C_{27}), 30.28 (C_{10}), 28.38 ($\text{C}_{37/36/35}$), 24.84 (C_5), 22.77, 21.98 (C_7 and C_6), 19.34, 19.21 (C_{29} and C_{12}), 19.14 (C_{32}), 18.13, 18.00 (C_{28} and C_{11}).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 718 $[\text{M}+\text{H}]^+$

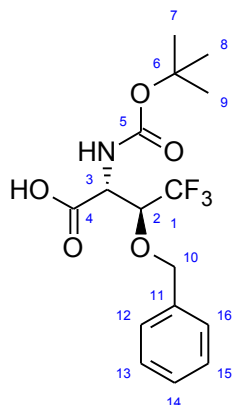
Réaction Mode opératoire



Mode opératoire

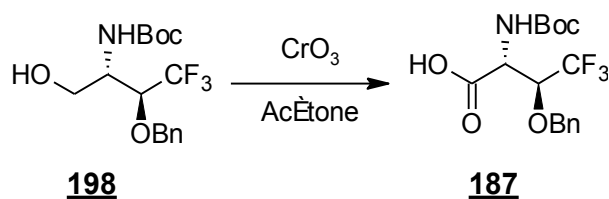
Le dérivé **228** (0.17 g, 0.26 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.27 mL, 1.54 mmol) puis successivement, HOBt (0.04 g, 0.28 mmol), HBTU (0.12 g, 0.31 mmol) et **Boc-Ala-OH 176** (0.05 g, 0.28 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (40 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (20 mL), une solution aqueuse de K_2CO_3 10% (20 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (40 mL). Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant successivement un mélange DCM/AcOEt (90/10) puis (70/30) comme éluant pour donner **174** (0.10 g, 0.14 mmol, 54%) sous forme d'un solide blanc.

Acide-(2*S*,3*R*)-3-(benzyloxy)-2-(terbutoxycarbonylamino)-4,4,4-trifluoro-butanoïque 187



Formule brute	: C ₁₆ H ₂₀ F ₃ NO ₅
Masse molaire (g/mol)	: 363.33
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 90
R_F	: 0.70 (AcOEt/MeOH, 98:2)
[α]_D²⁰	: +13 [C = 0.75, MeOH]
T_F (°C)	: 158-160
IR (cm ⁻¹)	: 3531, 3377, 2982, 2189, 1732, 1608, 1480
RMN ¹H (400 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 7.43-7.25 (m, 5H, H _{16/15/14/13/12}), 5.50 (s, 1H, OH), 4.81(m, 1H, H ₁₀), 4.72 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H, H ₁₀), 4.57 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H, H ₃), 4.37 (dd, <i>J</i> = 12.9, 6.5 Hz, 1H, H ₂), 1.45 (s, 9H, H _{9/8/7}).
RMN ¹³C (75 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 175.30 (C ₄), 157.50 (C ₅), 137.11 (C ₁₁), 127.88, 127.80, 127.55 (C _{16/12} , C _{15/13} and C ₁₄), 126.65 (C ₁), 79.30 (C ₆), 76.98 (C ₂), 73.74 (C ₁₀), 54.25 (C ₃), 27.28 (C _{9/8/7}).
RMN ¹⁹F (188 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: -72.08 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz).
SM (ESI négatif/MeOH)	: 362 [M-H] ⁻

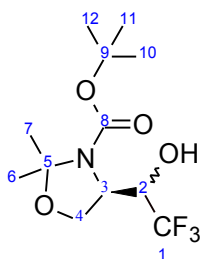
Réaction



Mode opératoire

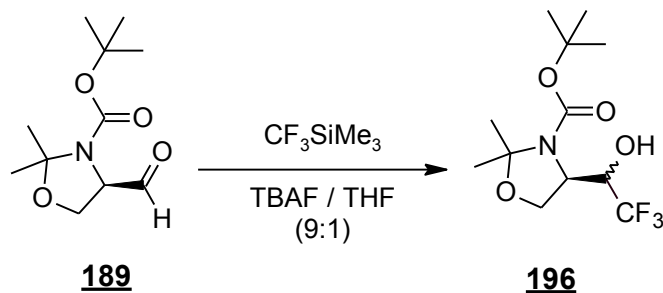
Le dérivé **198** (0.29 g, 0.83 mmol) est mis en solution dans 10 mL d'acétone à 0°C. Le réactif de Jones (1.20 mL) est ensuite ajouté et le mélange réactionnel est agité 3 h à 0°C. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'isopropanol (5 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors successivement lavée avec de l'eau (10 mL) puis une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu **187** (0.27 g, 0.74 mmol, 90%) est récupéré sous forme d'un solide blanc.

(*R*)-*tert*-butyl-2,2-diméthyl-4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyéthyl)oxazolidine-3-carboxylate **196**



Formule brute :	: C ₁₂ H ₂₀ F ₃ NO ₄
Masse molaire (g/mol)	: 299.29
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 62
R_F	: 0.75 (AcOEt/MeOH : 90/10)
RMN	: L'existence de plusieurs rotamères rend difficile l'interprétation du spectre [Zeng <i>et al.</i> , 2010].
SM (ESI négatif/MeOH)	: 298 [M-H] ⁻

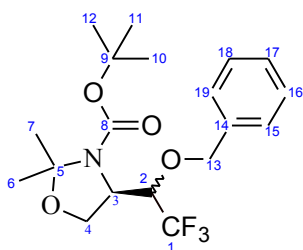
Réaction



Mode opératoire

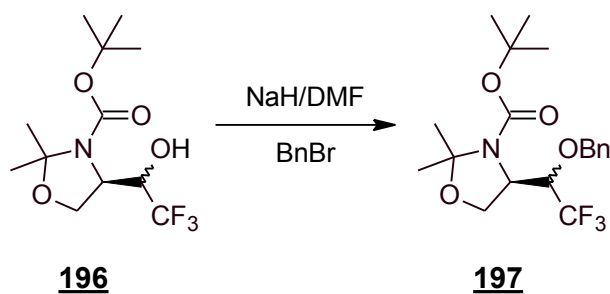
L'aldéhyde (**R**) de Garner **189** (1 g, 4.36 mmol) est mis en solution dans 5 mL de THF à 0°C. On ajoute ensuite une solution de TMS.CF₃ (2.58 mL : 2M dans le THF, 17.45 mmol). Le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis une solution de TBAF (0.1 mL : 1.1 M dans le THF, 0.35 mmol) est additionnée. Après 60 h d'agitation, une solution de TBAF (8.80 mL : 1.1 M dans le THF, 30.53 mmol) est à nouveau ajoutée et le mélange est ensuite maintenu encore pendant 6 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (100 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (300 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (50 mL), de l'eau distillée (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (92/8, 80/20, puis 70/30) comme éluant pour donner **196** (0.81 g, 2.71 mmol, 62%) sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomère avec un ratio 9:1.

(*R*)-tert-butyl-4-((*R*)-1-(benzyloxy)-2,2,2-trifluoroethyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate **197a**



Formule brute	: C ₁₉ H ₂₆ F ₃ NO ₄
Masse molaire (g/mol)	: 389.41
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 70
R_F	: 0.75 (Cyclohexane/AcOEt : 60/40) Dia1 0.65 (Cyclohexane/AcOEt : 60/40) Dia2
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.41-7.31 (m, 5H, H _{19/15} , H _{18/16} , H ₁₇), 4.94-4.60 (m, 2H, H ₁₃), 4.20 (m, 3H, H ₄ and H ₃), 4.02 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, H ₂), 1.61-1.46 (m, 15H, H _{12/11/10} , H ₇ and H ₆).
RMN ¹⁹F (188MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: -72.20 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz), -72.42 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz). 2 Rotamères : 58/42 (%)

Réaction



Mode opératoire

Le dérivé **196** (0.80 g, 2.67 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. Une suspension de NaH (0.21 g : 60% dans l'huile minérale, 8.02 mmol) est ajoutée et une solution de BnBr (0.63 mL, 5.35 mmol) est, ensuite, additionnée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (20 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (30 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu sous forme d'une huile est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (95/2) comme éluant pour fournir séparément les deux diasérioisomères **197a** (0.67 g, 1.72 mmol, 64%) et **197b** (0.06 g, 0.15 mmol, 6%) sous forme de solides blancs.

Remarques :

1. Seul le diastéréoisomère **197a** a été utilisé pour les étapes suivantes de la synthèse.
2. La présence des rotamères a été confirmée par RMN du fluor (Figure 122). Ces rotamères disparaissent en chauffant (Figure 122 ; C,D et E) ou en changeant de solvant (Figure 122 ; A et B).

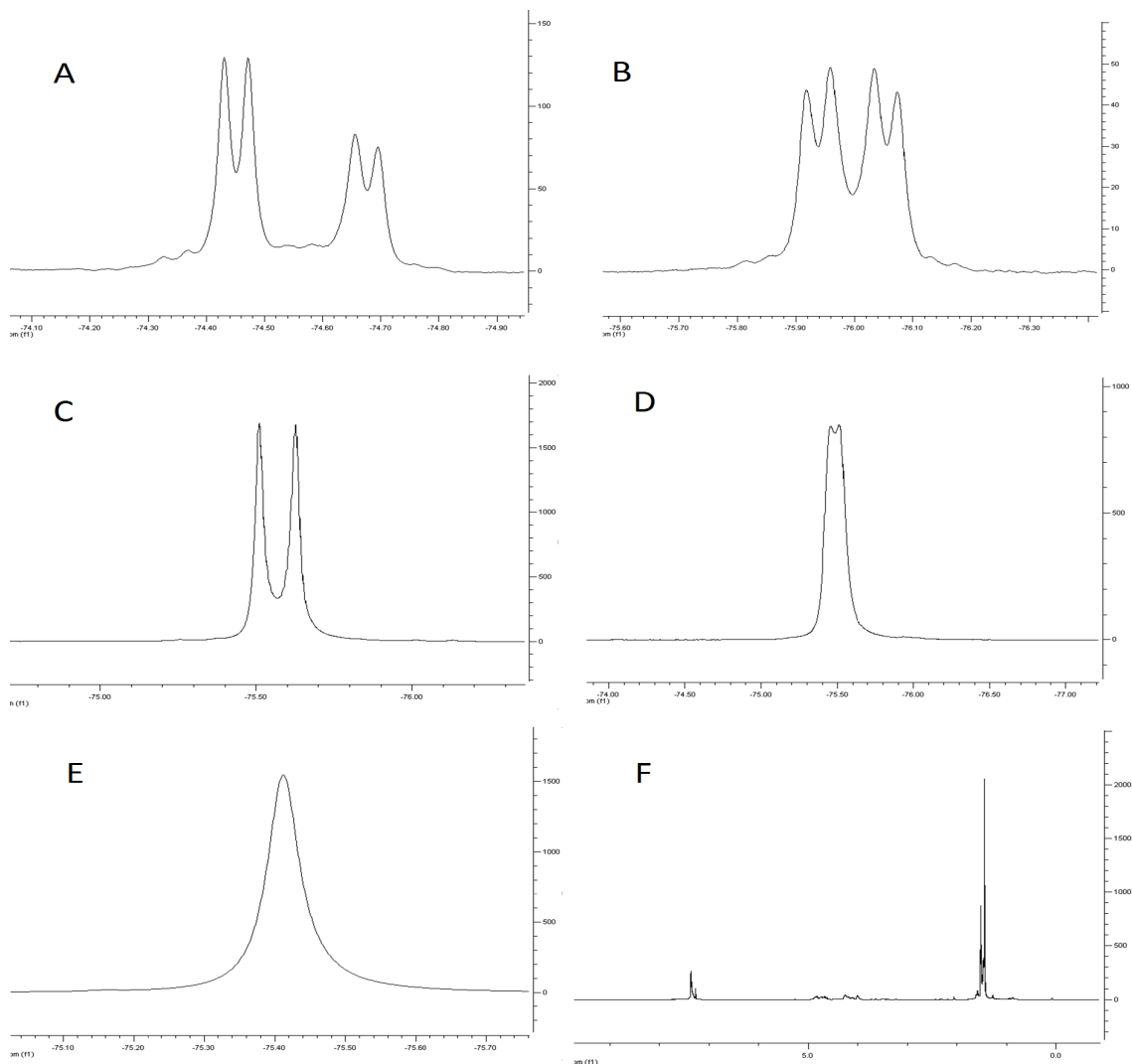
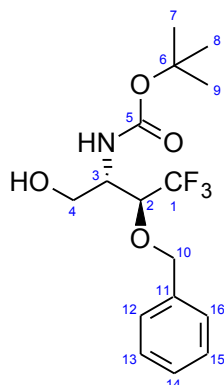


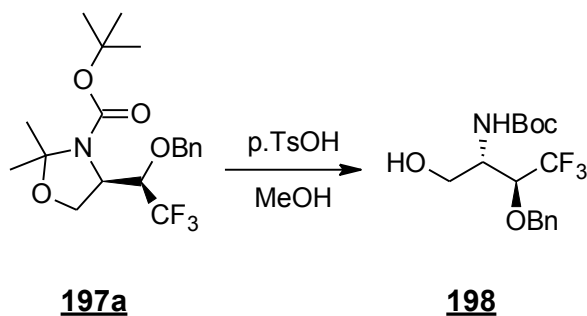
Figure 122 : Spectres RMN du ^{19}F Couplé H « **A** : dans CDCl_3 , **B** : dans MeOD », Spectres RMN du ^{19}F découplé H dans le MeOD « **C** : à 300K, **D** : à 313K, et **E** à 323K », et Spectre RMN du ^1H (**F**) .

(*R*)-tert-butyl-(2*R*,3*R*)-3-(benzyloxy)-4,4,4-trifluoro-1-hydroxybutan-2-ylcarbamate 198



Formule brute :	: C ₁₆ H ₂₂ F ₃ NO ₄
Masse molaire (g/mol)	: 349.34
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 50
R_F	: 0.80 (AcOEt/MeOH : 98/2)
RMN ¹H (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.45-7.32 (m, 5H, H _{16/12} , H _{15/13} , H ₁₄), 5.20 (s, 1H, OH), 4.91 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz, 1H, H ₁₀), 4.62 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz, 1H, H ₁₀), 4.18 (m, 1H, H ₃), 4.05 (dd, <i>J</i> = 11.9, 3.0 Hz, 1H, H ₄), 3.87 (dd, <i>J</i> = 11.9, 3.0 Hz, 1H, H ₄), 3.74-3.64 (m, 1H, H ₂), 1.44 (s, 9H, H _{9/8/7}).
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 157.50 (C ₅), 137.11 (C ₁₁), 128.76, 128.65, 128.42 (C _{16/12} , C _{15/13} and C ₁₄), 126.65 (C ₁), 78.09 (C ₆), 77.72, 75.71 (C ₂), 65.83 (C ₁₀), 61.77 (C ₄), 50.49 (C ₃), 28.25 (C _{9/8/7}), 15.25.
RMN 19F (188 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: -71.16 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz)..

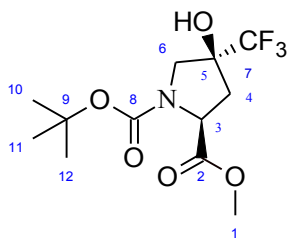
Réaction



Mode opératoire

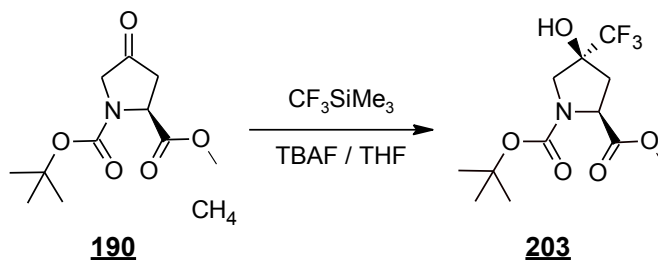
Le dérivé **197a** (0.68 g, 1.75 mmol) est mis en solution dans 50 mL de MeOH. On ajoute ensuite le *p*.TsOH (0.043 g, mmol) et le mélange réactionnel est agité 5 jours à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le résidu obtenu est dissous dans de l'AcOEt (30 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution saturée de K₂CO₃ (30 mL), de l'eau (30 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (85/15) comme éluant, pour donner **198** (0.31 g, 0.89 mmol, 50%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-(2*S*,4*S*)-4-hydroxy-4-trifluoromethyl-L-Proline-methylester **203**



Formule brute	: C ₁₂ H ₁₈ F ₃ NO ₅
Masse molaire (g/mol)	: 313.27
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 79
R_F	: 0.45 (AcOEt/MeOH, 90:10)
RMN 1H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 4.62-4.43 (m, 1H, H ₃), 3.87- 3.61 (m, 5H, H ₆ and H ₁), 2.57 (dd, <i>J</i> = 13.4, 9.8 Hz, 1H, H ₄), 2.23 (dd, <i>J</i> = 13.7, 9.3 Hz, 1H, H ₄), 1.46 (2s, 9H, H _{12/11/10}).
RMN ¹⁹F (188MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: -78.36 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz)

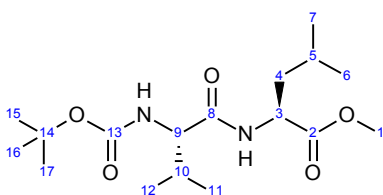
Réaction



Mode opératoire

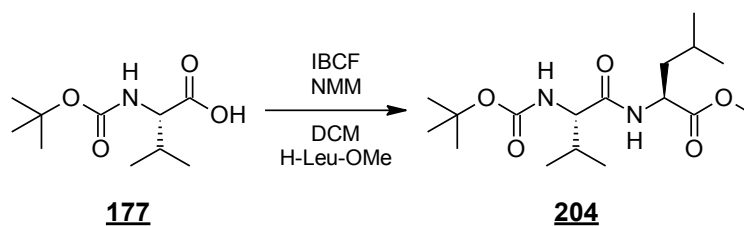
Le composé **Boc-Oxo-Pro.OMe 190** commercial (1 g, 4.11 mmol) est mis en solution dans 20 mL de THF à 0°C. On ajoute ensuite une solution de TMS.CF₃ (2.43 mL : 2M dans le THF, 16.44 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. À ce moment une solution de TBAF (0.095 mL : 1.1 M dans le THF, 0.33 mmol) est alors additionnée et le mélange réactionnel est agité 2 jours et ½ à température ambiante. Une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (10 mL) est ajoutée et après agitation 15 min on ajoute à nouveau une solution de TBAF (8.3 mL : 1.1 M dans le THF, 28.78 mmol). Après agitation 3 h à température ambiante, la réaction est arrêtée en ajoutant 100 mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis reprise avec de l'AcOEt (300 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (50 mL), de l'eau distillée (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (80/20) comme éluant pour obtenir **203** (1.02 g, 3.26 mmol, 79%) sous forme d'une huile.

Boc-Val-Leu.OMe 204



Formule brute	: C ₁₇ H ₃₂ N ₂ O ₅
Masse molaire (g/mol)	: 344.45
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 83
R_F	: 0.35 (Cyclohexane/AcOEt, 70:30)
T_F (°C)	: 142-144
IR (cm ⁻¹)	: 3335, 3263, 2960, 2052, 1757, 1686, 1650
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 6.25 (m, 1H, NH), 5.05 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH), 4.62 (m, 1H, H ₃), 3.88 (m, 1H, H ₉), 3.70 (s, 3H, H ₁), 2.11 (m, 1H, H ₁₀), 1.66 (m, 3H, H ₄ and H ₅), 1.43 (s, 9H, H _{15/16/17}), 1.02-0.85 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).

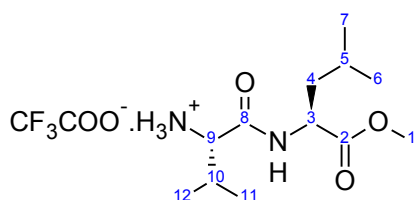
Réaction



Mode opératoire

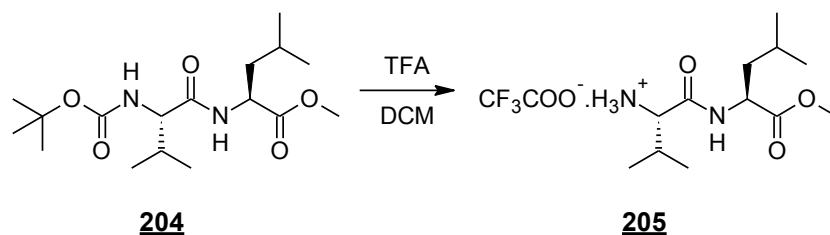
Le composé **Boc-Val-OH 177** (4 g, 18.41 mmol) est mis en solution dans 20 mL de DCM à -10°C. On ajoute alors une solution de NMM (2.43 mL, 22.09 mmol). Après 30 min de l'IBCF (2.63 mL, 20.25 mmol) est additionné goutte à goutte et le mélange réactionnel est agité 45 min à -10°C. On ajoute alors **H-Leu-OMe 178** (3.66 g, 20.25 mmol). Après agitation 4 h à température ambiante et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans l'AcOEt (40 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (20 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (20 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour donner **204** (5.24 g, 15.21 mmol, 83%) sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻H₃N⁺-Val-Leu-OMe 205



Formule brute	: C ₁₄ H ₂₅ F ₃ N ₂ O ₅
Masse molaire (g/mol)	: 358.35
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 8.75 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, NH), 8.15 (bs, 3H, NH ₃ ⁺), 4.33 (m, 1H, H ₃), 3.63 (s, 3H, H ₁), 3.62 (s, 1H, H ₉), 2.11 (m, 1H, H ₁₀), 1.73-1.54 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.00-0.82 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).

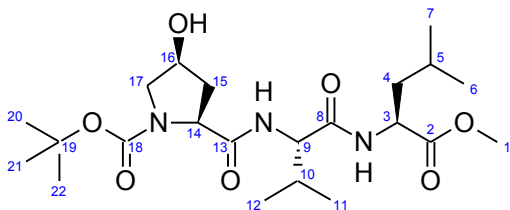
Réaction



Mode opératoire

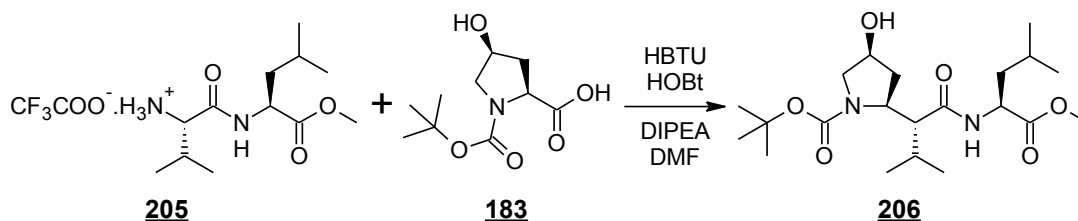
Le dérivé **204** (0.3 g, 0.87 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (3.24 mL, 52.25 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **205** sous forme d'un solide blanc.

Boc-*cis*-Pro(OH)-Val-Leu-OMe **206**



Formule brute	: C ₂₂ H ₃₉ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 457.56
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 36
R_F	: 0.60 (AcOEt/MeOH, 98:2)
T_F (°C)	: 65-67
IR (cm⁻¹)	: 3634, 3589, 3303, 2956, 1744, 1645, 1536
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.48 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH), 6.39 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.64 (m, 1H, H ₃), 4.49 (m, 1H, H ₁₄), 4.42 (m, 1H, H ₁₆), 4.30-4.23 (m, 1H, H ₉), 3.76 (s, 3H, H ₁), 3.54-3.48 (m, 2H, H ₁₇), 2.42-2.16 (m, 3H, H ₁₅ and H ₁₀), 1.66-1.57 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.48 (s, 9H, H _{22/21/20}), 1.10-0.86 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.40 (C ₁₃), 173.10 (C ₂), 170.49 (C ₈), 155.59 (C ₁₈), 80.77 (C ₁₉), 70.78 (C ₁₆), 59.67 (C ₁₄), 59.23 (C ₉), 56.96 (C ₁₇), 52.31 (C ₁), 50.77 (C ₃), 41.42 (C ₄), 35.86 (C ₁₅), 30.71 (C ₁₀), 28.36 (C _{22/21/20}), 24.84 (C ₅), 22.77, 21.90 (C ₇ and C ₆), 19.15, 17.52 (C ₁₂ and C ₁₁).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 480 [M+Na] ⁺
SM (ESI négative/MeOH)	: 456 [M-H] ⁻

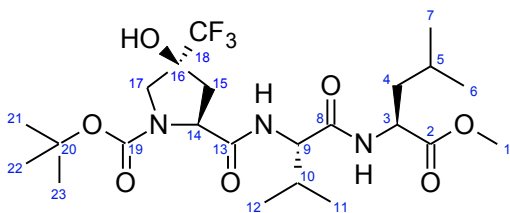
Réaction



Mode opératoire

Le dérivé **205** (0.5 g, 1.40 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (1.46 mL, 8.37 mmol) puis successivement, HOBt (0.21 g, 1.53 mmol), HBTU (0.63 g, 1.67 mmol) et le produit commercial **Boc-cis-Pro(OH)-OH 183** (0.35 g, 1.53 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (120 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (60 mL). Après séchage de la phase organique avec Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange DCM/AcOEt (70/30) comme éluant pour fournir **206** (0.23 g, 0.5 mmol, 36%) sous forme d'un solide blanc.

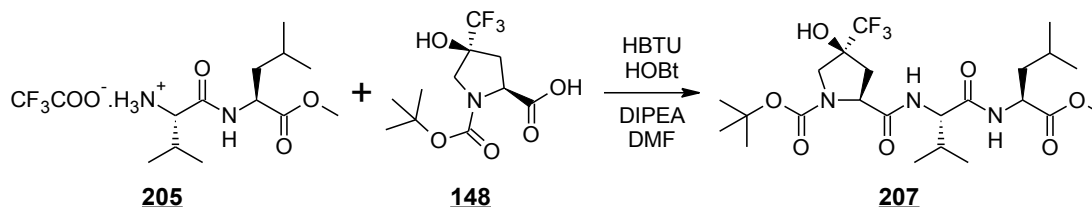
Boc-Val-Pro(OH/CF₃)-Val-Leu-OMe **207**



Formule brute :	: C ₂₃ H ₃₈ F ₃ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 525.56
Aspect	: Solide jaune
R^{dt} (%)	: 88
R_F	: 0.75 (AcOEt/MeOH, 98:2)
T_F (°C)	: 98-100 (forme une pâte vers 80°C)
μ-Analyse	: C ₂₃ H ₃₈ F ₃ N ₃ O ₇ • 0.75 H ₂ O
Théorique	: C(51.24%) H(7.40%) N(7.80%)
Expérimentale	: C(51.27%) H(7.35%) N(7.77%)

IR (cm ⁻¹)	: 3648, 3637, 3496, 3275, 2966, 1745, 1647, 1534
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.61 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, NH), 6.39 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.19 (s, 1H, OH), 4.62-4.56 (m, 2H, H ₁₄ and H ₃), 4.25 (dd, <i>J</i> = 17.4, 10.7 Hz, 1H, H ₉), 3.76 (s, 3H, H ₁), 3.70 (d, <i>J</i> = 11.5 Hz, 1H, H ₁₇), 3.59 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz, 1H, H ₁₇), 2.57-2.36 (m, 2H, H ₁₅), 2.32-2.19 (m, 1H, H ₁₀), 1.74-1.54 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.49 (s, 9H, H _{23/22/21}), 0.98-0.90 (m, 12H, H _{12/12} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.20 (C ₂), 172.52 (C ₁₃), 170.24 (C ₈), 155.03 (C ₁₉), 124.6 (C ₁₈), 81.64 (C ₂₀), 79.30 (C ₁₆), 59.40 (C ₁₄), 59.30 (C ₉), 55.40 (C ₁₇), 52.34 (C ₁), 50.79 (C ₃), 41.37 (C ₄), 34.48 (C ₁₅), 30.89 (C ₁₀), 28.27 (C _{23/22/21}), 24.85 (C ₅), 22.73, 21.88 (C ₇ and C ₆), 19.08, 17.54 (C ₁₂ and C ₁₁).
RMN ¹⁹F (188MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: -78.53
SM (ESI Positif/MeOH)	: 526 [M+H] ⁺

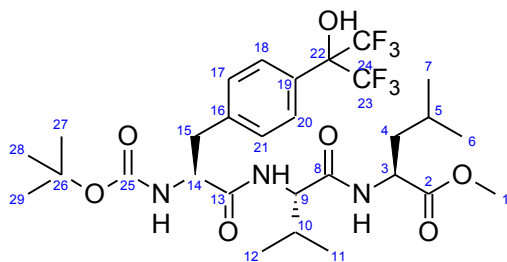
Réaction



Mode opératoire

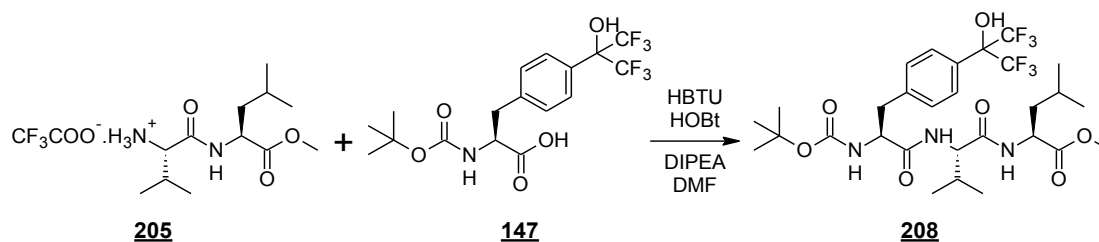
Le dérivé **205** (0.71 g, 1.99 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (1.9 mL, 10.86 mmol) puis successivement, HOBt (0.27 g, 1.99 mmol), HBTU (0.82 g, 2.17 mmol) et **148** (0.54 g, 1.99 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis une nuit à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (30 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (30 mL) et une solution saturée de NaCl (40 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange DCM/MeOH (90/10) comme éluant, pour donner **207** (0.84 g, 1.6 mmol, 88%) sous forme d'un solide jaune.

Boc-Phe(HFIP)-Val-Leu-OMe 208



Formule brute	: C ₂₉ H ₄₁ F ₆ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 657.64
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 50
R_F	: 0.70 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 139-141
μ-Analyse	: C ₂₉ H ₄₁ F ₆ N ₃ O ₇ • C ₃ H ₆ O (Acétone)
Théorique	: C(53.70%) H(6.63%) N(5.87%)
Expérimentale	: C(54.17%) H(6.76%) N(6.06%)
IR (cm⁻¹)	: 3620, 3500, 3258, 2958, 1749, 1637, 1512
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.63 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, H _{20/18}), 7.32-7.18 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, H _{21/17}), 6.73 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.56 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.19 (m, 2H, NH and OH), 4.57 (td, <i>J</i> = 8.4, 5.2 Hz, 1H, H ₃), 4.44 (m, 1H, H ₁₄), 4.31-4.20 (m, 1H, H ₉), 3.72 (s, 3H, H ₁), 3.12 (dd, <i>J</i> = 13.9, 5.8 Hz, 1H, H ₁₅), 3.01 (dd, <i>J</i> = 13.9, 7.7 Hz, 1H, H ₁₅), 2.14-2.04 (m, 1H, H ₁₀), 1.71-1.49 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.36 (s, 9H, H _{29/28/27}), 0.98-0.79 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.09 (C ₂), 171.31 (C ₁₃), 170.66 (C ₈), 155.52 (C ₂₅), 138.84 (C ₁₆), 129.43 (C _{21/17}), 128.86 (C ₁₉), 127.10 (C _{20/18}), 122.80, 122.70 (C ₂₄ and C ₂₃), 80.54 (C ₂₆), 80.49 (C ₂₂), 58.60 (C ₉), 55.50 (C ₁₄), 52.27 (C ₁), 50.83 (C ₃), 41.19 (C ₄), 37.56 (C ₁₅), 30.89 (C ₁₀), 28.14 (C _{29/28/27}), 24.83 (C ₅), 22.64, 21.82 (C ₇ and C ₆), 18.93, 17.83 (C ₁₂ and C ₁₁).
RMN 19F (188 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: -73.29 (m), -73.51 (m).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 680 [M+Na] ⁺

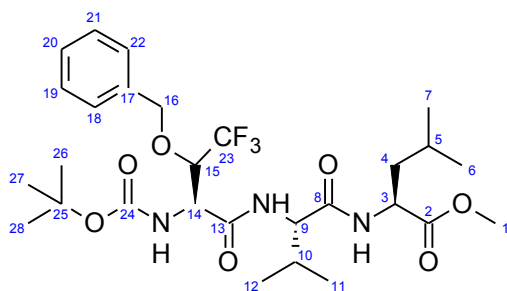
Réaction



Mode opératoire

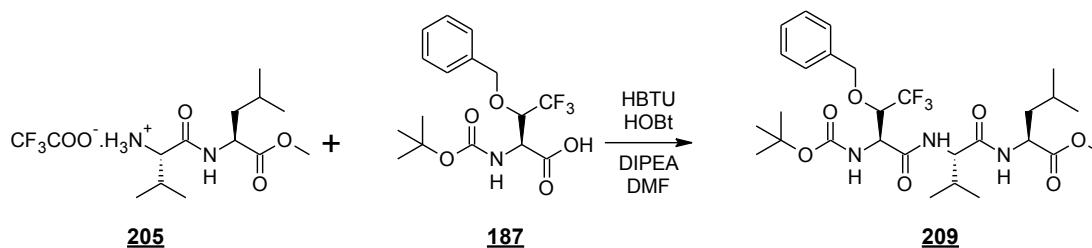
Le sel **205** (0.37 g, 0.92 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.96 mL, 5.50 mmol) puis successivement, HOBt (0.14 g, 1.01 mmol), HBTU (0.42 g, 1.10 mmol) et **147** (0.37 g, 1.01 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (30 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (30 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (30 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange DCM/MeOH (95/5) comme éluant pour donner **208** (0.30 g, 0.46 mmol, 50%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-Ser(Obzl/CF₃)-Val-Leu-OMe 209



Formule brute :	: C ₂₈ H ₄₂ F ₃ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 589.64
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 67
R_F	: 0.8 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 227-229
μ-Analyse	: C ₂₈ H ₄₂ F ₃ N ₃ O ₇
Théorique	: C(57.03%) H(7.18%) N(7.13%)
Expérimentale	: C(56.96%) H(7.17%) N(7.12%)
IR (cm⁻¹)	: 3600, 3554, 3465, 3326, 3271, 2981, 2409, 1750, 1693, 1641, 1532
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.42-7.32 (m, 5H, H _{22/21/20/19/18}), 6.82 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, NH), 6.38 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 1H, NH), 5.24 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, NH), 4.84-4.73 (m, 2H, H ₁₆), 4.70-4.56 (m, 2H, H ₁₄ and H ₃), 4.42 (m, 1H, H ₁₅), 4.33 (dd, <i>J</i> = 8.4, 5.9 Hz, 1H, H ₉), 3.77 (s, 3H, H ₁), 2.32-2.19 (m, 1H, H ₁₀), 1.74-1.51 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.48 (s, 9H, H _{28/27/26}), 1.04-0.88 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 172.98 (C ₂), 170.18 (C ₈), 167.84 (C ₁₃), 167.78 (C ₂₄), 136.06 (C ₁₇), 124.4 (C ₂₃), 81.12 (C ₂₅), 75.90 (C ₁₅), 74.69 (C ₁₆), 58.63 (C ₉), 54.44 (C ₁₄), 52.26 (C ₁), 50.82 (C ₃), 41.24 (C ₄), 30.72 (C ₁₀), 28.17 (C _{28/27/26}), 24.80 (C ₅), 22.71, 21.81 (C ₇ and C ₆), 18.94, 17.62 (C ₁₂ and C ₁₁).
RMN ¹⁹F (188 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: -70.41 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz)
SM (ESI Positif/MeOH)	: 612 [M+Na] ⁺
SM (ESI négatif/MeOH)	: 588 [M-H] ⁻

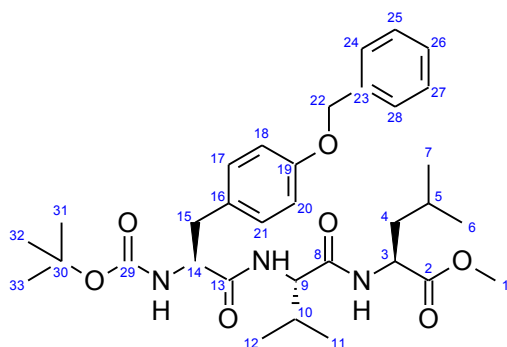
Réaction



Mode opératoire

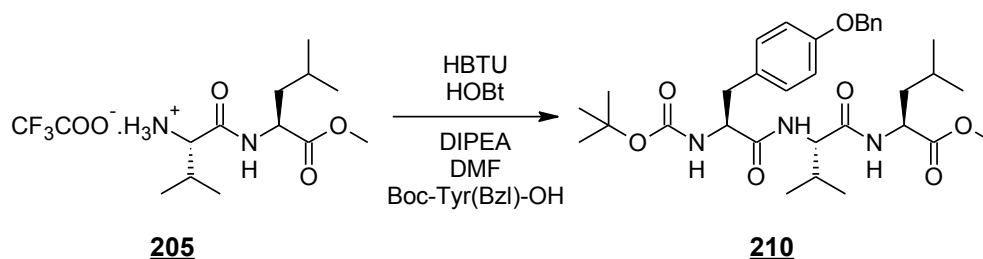
Le dérivé **205** (0.16 g, 0.41 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.43 mL, 2.48 mmol) puis successivement, HOBt (0.06 g, 0.45 mmol), HBTU (0.19 g, 0.50 mmol) et **187** (0.15 g, 0.45 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans de DCM (60 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (30 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM (100%) puis un mélange DCM/MeOH (90/10) comme éluant pour fournir un solide blanc qui après recristallisation dans un mélange AcOEt/MeOH donne **209** (0.22 g, 0.27 mmol, 67%) sous forme d'une poudre blanche.

Boc-Tyr(Bzl)-Val-Leu-OMe 210



Formule brute	: C ₃₃ H ₄₇ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 597.74
Aspect	: Solide Jaune
R^{dt} (%)	: 70
R_F	: 0.75 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 118-120
μ-Analyse	: C ₃₃ H ₄₇ N ₃ O ₇
Théorique	: C(66.31%) H(7.93%) N(7.03%)
Expérimentale	: C(66.19%) H(7.52%) N(6.86%)
IR (cm⁻¹)	: 3435, 3300, 3185, 2957, 1725, 1690, 1637
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.49 -7.32 (m, 5H, H _{28/24} , H _{27/25} and H ₂₆), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H _{21/17}), 6.94 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H _{20/18}), 6.61 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, NH), 6.42 (m, 1H, NH), 5.07 (m, 2H, H ₂₂), 4.99 (s, 1H, NH), 4.62 (td, <i>J</i> = 8.4, 5.2 Hz, 1H, H ₃), 4.36 (m, 1H, H ₁₄), 4.29 (dd, <i>J</i> = 8.2, 6.4 Hz, 1H, H ₉), 3.77 (s, 3H, H ₁), 3.13-3.03 (m, 2H, H ₁₅), 2.20 (m, 1H, H ₁₀), 1.79-1.55 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.45 (s, 9H, H _{33/32/31}), 1.01-0.87 (m, 12H, H _{7/6} and H _{12/11}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.01 (C ₂), 171.42 (C ₁₃), 170.53 (C ₈), 157.91 (C ₁₉), 136.98 (C ₂₃), 130.3 (C _{21/17}), 128.66 (C ₁₆), 128.58 (C _{27/25}), 127.97 (C ₂₆), 127.45 (C _{28/24}), 115.12 (C _{20/18}), 80.4 (C ₃₀), 70.04 (C ₂₂), 58.53 (C ₉), 56 (C ₁₄), 52.26 (C ₁), 50.80 (C ₃), 41.25 (C ₄), 30.69 (C ₁₀), 28.26 (C _{33/32/31}), 24.85 (C ₅), 22.79, 21.87 (C ₇ and C ₆), 19.11, 17.80 (C ₁₂ and C ₁₁).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 598 [M+H] ⁺
SM (ESI négative/MeOH)	: 596 [M-H] ⁻

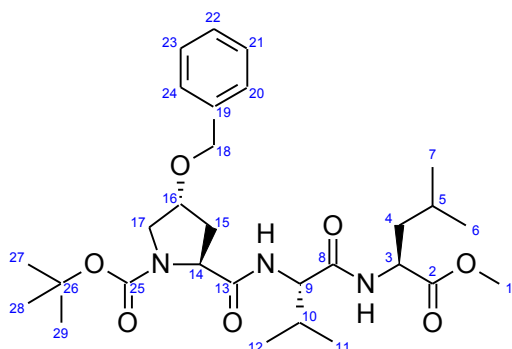
Réaction



Mode opératoire

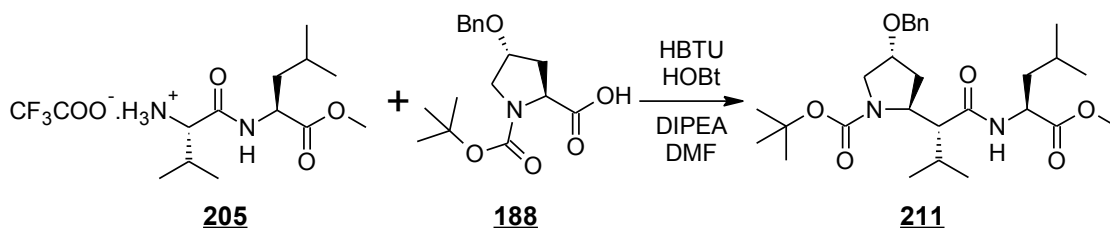
Le dérivé **205** (0.80 g, 2.23 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (2.34 mL, 13.39 mmol) puis successivement, HOBt (0.33 g, 2.46 mmol), HBTU (1.02 g, 2.68 mmol) et le produit commercial **Boc-Tyr (Bzl)-OH 185** (0.91 g, 2.46 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (120 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour donner **210** (0.93 g, 1.56 mmol, 70%) sous forme d'un solide jaune.

Boc-Pro(Obzl)-Val-Leu-OMe 211



Formule brute	: C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 547.68
Aspect	: Solide Jaune
R^{dt} (%)	: 41
R_F	: 0.45 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 147-149
μ-Analyse	: C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₇
Théorique	: C(63.60%) H(8.28%) N(7.67%)
Expérimentale	: C(63.60%) H(8.25%) N(7.37%)
IR (cm⁻¹)	: 3434, 2958, 1739, 1695, 1644, 1556
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.43-7.29 (m, 5H, H _{24/20} , H _{23/21} and H ₂₂), 6.70-6.56 (m, 1H, NH), 6.19 (m, 1H, NH), 4.63 (m, 1H, H ₃), 4.51-4.48 (m, 2H, H ₁₈ and H ₁₄), 4.21-4.27 (m, 2H, H ₁₆ and H ₉), 3.89-3.58 (m, 1H, H ₁₇), 3.77 (s, 3H, H ₁), 3.56-3.48 (m, 1H, H ₁₇), 2.49-2.18 (m, 3H, H ₁₅ and H ₁₀), 1.70-1.56 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.49 (s, 9H, H _{29/28/27}), 1.04-0.89 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.07 (C ₂), 171.75 (C ₁₃), 170.78 (C ₈), 156.02 (C ₂₅), 137.82 (C ₁₉), 128.48 (C _{23/21}), 127.82 (C ₂₂), 127.66 (C _{24/20}), 80.98 (C ₂₆), 77.5 (C ₁₆), 71.36 (C ₁₈), 58.94 (C ₁₄), 58.66 (C ₉), 52.26 (C ₁), 51.97 (C ₁₇), 50.74 (C ₃), 41.40 (C ₄), 33.85 (C ₁₅), 30.14 (C ₁₀), 28.32 (C _{29/28/27}), 26.93 (C ₅), 24.80, 22.79 (C ₁₂ and C ₁₁), 21.89, 19.31 (C ₇ and C ₆).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 570 [M+Na] ⁺
SM (ESI négative/MeOH)	: 546 [M-H] ⁻

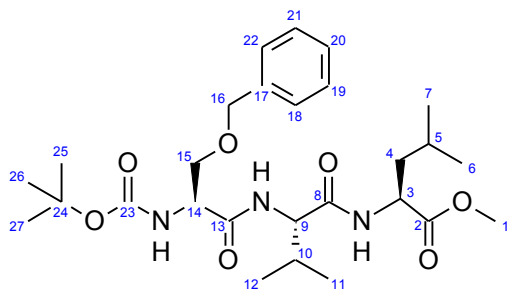
Réaction



Mode opératoire

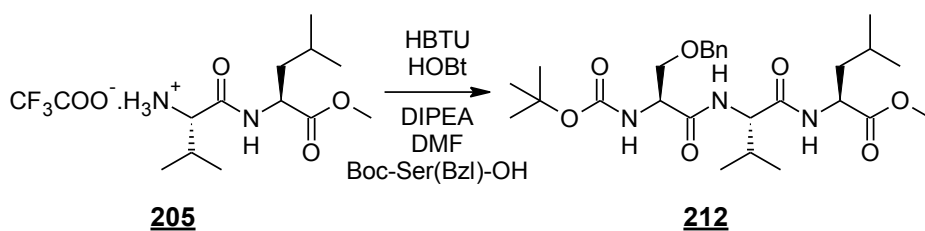
Le dérivé **205** (0.45 g, 1.51 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (1.43 mL, 8.21 mmol) puis successivement, HOBt (0.20 g, 1.51 mmol), HBTU (0.62 g, 1.64 mmol) et le produit commercial **Boc-trans-Pro(OBzl)-OH 188** (0.54 g, 1.37 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (60 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (80 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour donner **211** (0.31 g, 0.57 mmol, 41%) sous forme d'un solide jaune.

Boc-Ser(Bzl)-Val-Leu-OMe 212



Formule brute :	: C ₂₇ H ₄₃ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 521.65
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 48
R_F	: 0.65 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F(°C)	: 94-96
μ-Analyse	: C ₂₇ H ₄₃ N ₃ O ₇
Théorique	: C(62.17%) H(8.31%) N(8.06%)
Expérimentale	: C(61.84%) H(8.52%) N(7.92%)
IR (cm⁻¹)	: 3435, 3308, 2961, 1749, 1643, 1524
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.39-7.20 (m, 5H, H _{22/18} , H _{21/19} and H ₂₀), 6.96 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H, NH), 6.61 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, NH), 5.42 (m, 1H, NH), 4.64-4.47 (m, 3H, H ₁₆ and H ₃), 4.31 (m, 2H, H ₁₄ and H ₉), 3.97-3.85 (m, 1H, H ₁₅), 3.70 (s, 3H, H ₁), 3.61 (dd, <i>J</i> = 9.2, 6.2 Hz, 1H, H ₁₅), 2.17 (m, 1H, H ₁₀), 1.67-1.49 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.44 (s, 9H, H _{25/26/27}), 0.97-0.79 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.07 (C ₂), 170.56 (C ₈), 170.28 (C ₁₃), 155.61 (C ₂₃), 137.29 (C ₁₇), 128.43 (C ₂₀), 127.91 (C _{21/19}), 127.78 (C _{22/18}), 80.39 (C ₂₄), 73.50 (C ₁₆), 69.76 (C ₁₅), 58.52 (C ₉), 52.19 (C ₁), 50.68 (C ₃), 41.23 (C ₄), 30.59 (C ₁₀), 28.23 (C _{27/26/25}), 24.75 (C ₅), 22.72, 21.80 (C ₇ and C ₆), 19.13, 17.65 (C ₁₂ and C ₁₁).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 544[M+Na] ⁺

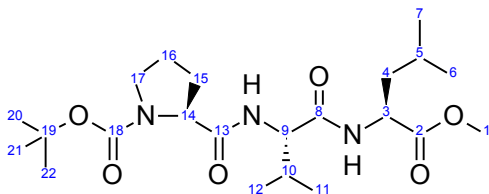
Réaction



Mode opératoire

Le sel **205** (0.5 g, 1.40 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (1.46 mL, 8.37 mmol) puis successivement, HOBt (0.21 g, 1.53 mmol), HBTU (0.7 g, 1.67 mmol) et **Boc-Ser(Bzl)-OH 188** (0.3 g, 1.53 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans de DCM (80 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant successivement un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) puis AcOEt (100%) comme éluant, pour donner **212** (0.35 g, 0.67 mmol, 48%) sous forme d'un solide blanc.

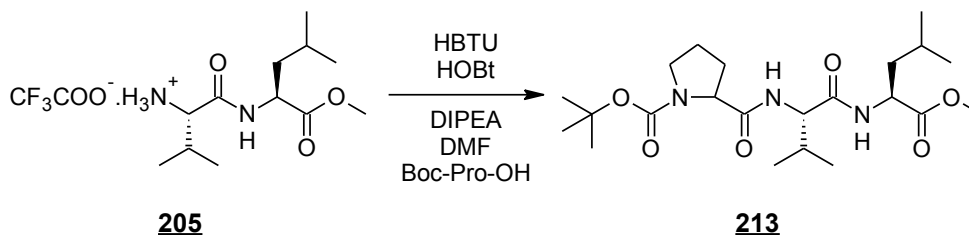
Boc-Pro-Val-Leu-OMe **213**



Formule brute	: C ₂₂ H ₃₉ N ₃ O ₆
Masse molaire (g/mol)	: 441.56
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 59
R_F	: 0.49 (AcOEt/MeOH, 98:2)
T_F (°C)	: 129-131
μ-Analyse	: C ₂₂ H ₃₉ N ₃ O ₆
Théorique	: C(59.84%) H(8.90%) N(9.52%)
Expérimentale	: C(59.72%) H(9.09%) N(9.55%)
IR (cm ⁻¹)	: 3310, 3282, 2956, 1751, 1692, 1643
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.23-6.80 (m, 1H, NH), 6.93 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, NH), 4.52-4.42 (m, 1H, H ₃), 4.29-4.16 (m, 2H, H ₁₄ and H ₉), 3.61 (m, 3H, H ₁), 3.36 (s, 2H, H ₁₇), 2.26-1.98 (m, 5H, H ₁₆ , H ₁₅ and H ₁₀), 1.63-1.43 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.34 (s, 9H, H _{22/21/20}), 0.90-0.71 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.05 (C _{18/2}), 170.88 (C _{13/8}), 80.41 (C ₁₉), 61.07 (C ₁₄), 60.06 (C ₉), 52.02 (C ₁), 50.59 (C ₃), 47.00 (C ₁₇), 40.96 (C ₄), 30.33 (C ₁₀), 28.19 (C _{22/21/20} and C ₁₅), 24.62 (C ₁₆ and C ₅), 22.68, 21.72 (C ₆ and C ₇), 19.08, 17.33 (C _{12/11})

SM (ESI Positif/MeOH) : 464 [M+Na]⁺
SM (ESI négative/MeOH) : 440 [M-H]⁻

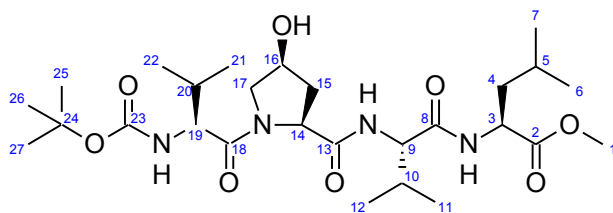
Réaction



Mode opératoire

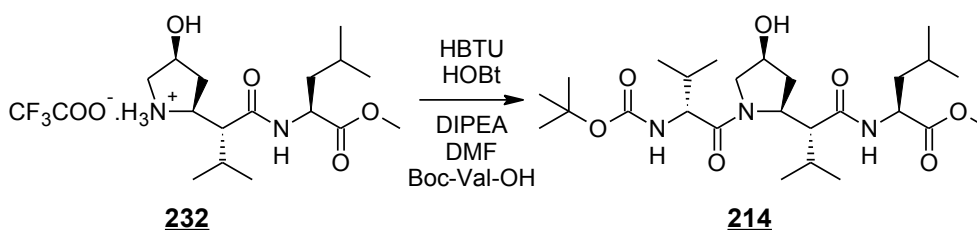
Le dérivé **205** (0.5 g, 1.40 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (1.46 mL, 8.37 mmol) puis successivement, HOBt (0.21 g, 1.53 mmol), HBTU (0.635 g, 1.67 mmol) et **Boc-Pro-OH 182** (0.33 g, 1.53 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans de l'AcOEt (50 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant de l'AcOEt (100%) comme éluant, pour donner **213** (0.36 g, 0.82 mmol, 59%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-Val-*cis*-Pro(OH)-Val-Leu-OMe 214



Formule brute	: C ₂₇ H ₄₈ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 556.69
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 70
R_F	: 0.35 (AcOEt/Cyclohexane, 80:20)
T_F (°C)	: 143-145
μ-Analyse	: C ₂₇ H ₄₈ N ₄ O ₈ • 1.5 H ₂ O
Théorique	: C(55.55%) H(8.82%) N(9.60%)
Expérimentale	: C(55.51%) H(8.51%) N(9.45%)
IR (cm ⁻¹)	: 3650, 3524, 3471, 3296, 2957, 1720, 1633, 1524
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.47 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, NH), 6.26 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.55 (m, 1H, OH), 5.39-5.26 (m, 1H, NH), 4.79-4.70 (m, 1H, H ₁₄), 4.65 (m, 1H, H ₃), 4.50 (m, 1H, H ₁₆), 4.26-4.18 (m, 2H, H ₁₉ and H ₉), 3.90 (dd, <i>J</i> = 10.8, 3.7 Hz, 1H, H ₁₇), 3.78 (m, 4H, H ₁₇ and H ₁), 2.26-2.24 (m, 2H, H ₁₅), 2.16 (m, 1H, H ₁₀), 1.99 (m, 1H, H ₂₀), 1.72-1.54 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.46 (s, 9H, H _{27/26/25}), 1.10-0.89 (m, 18H, H _{22/21} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.11 (C ₂), 172.96, 172.84 (C ₁₈ and C ₁₃), 170.27 (C ₈), 155.85 (C ₂₃), 79.67 (C ₂₄), 71.11 (C ₁₆), 59.96 (C ₁₄), 59.36 (C ₉), 57.67 (C ₁₇), 56.86 (C ₁₉), 52.35 (C ₁), 50.80 (C ₃), 41.46 (C ₄), 35.67 (C ₁₅), 31.41 (C ₂₀), 31.07 (C ₁₀), 28.36 (C _{27/26/25}), 24.86 (C ₅), 22.75, 21.93 (C ₇ and C ₆), 19.40, 19.14, 17.95, 17.56 (C _{22/21} and C _{12/11}).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 557 [M+H] ⁺

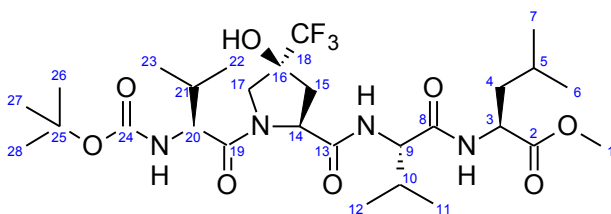
Réaction



Mode opératoire

Le dérivé **232** (0.22 g, 0.38 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (0.4 mL, 2.27 mmol) puis successivement, HOBt (0.06 g, 0.42 mmol), HBTU (0.17 g, 0.45 mmol) et **Boc-Val-OH 177** (0.09 g, 0.42 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (40 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (20 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange DCM/MeOH (95/5) comme éluant pour donner **214** (0.15 g, 0.27 mmol, 70%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-Val-Pro(OH/CF₃)-Val-Leu-OMe **215**



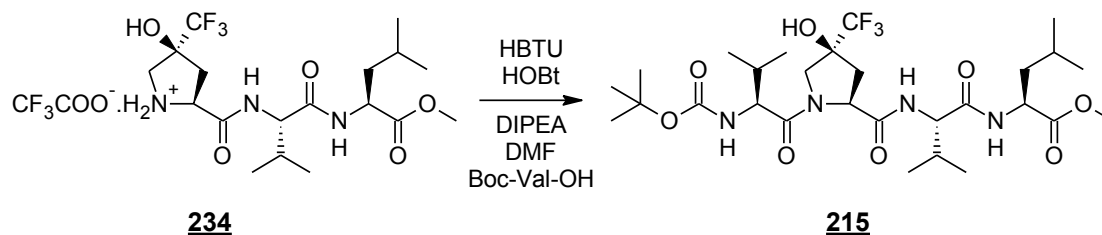
Formule brute :	: C ₂₈ H ₄₇ F ₃ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 624.69
Aspect	: Solide jaune
R^{dt} (%)	: 85
R_F	: 0.55 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 198-200
μ-Analyse	: C ₂₈ H ₄₇ F ₃ N ₄ O ₈ • 0.15 H ₂ O
Théorique	: C(53.60%) H(7.61%) N(8.83%)
Expérimentale	: C(53.58%) H(7.69%) N(8.88%)
IR (cm⁻¹)	: 3632, 3490, 3460, 3288, 2978, 1712, 1626, 1510
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.73 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, NH), 6.83 (s, 1H, OH), 6.34 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.41 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H, NH), 4.90 (dd, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H, H ₁₄), 4.65 (m, 1H, H ₃), 4.29-4.23 (m, 1H, H ₉), 4.23-4.16 (m, 1H, H ₂₀), 4.12 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H, H ₁₇), 3.86 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, H ₁₇), 3.76 (s, 3H, H ₁), 2.47 (dd, <i>J</i> = 13.9, 9.4 Hz, 1H, H ₁₅), 2.35 (dd, <i>J</i> = 19.1, 10.9 Hz, 1H, H ₁₅), 2.12 (m, 1H, H ₁₀), 1.98 (m, 1H, H ₂₁), 1.74-1.54 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.46 (s, 9H, H _{28/27/26}), 1.06-0.90 (m, 18H, H _{23/22} , H _{12/11} and H _{7/6}).

RMN ^{13}C : 173.14, 173.04 (C_{19} and C_2), 172.14 (C_{13}), 170.11 (C_8),
 (101 MHz, CDCl_3) 155.75 (C_{24}), 124.30 (C_{18}), 79.80 (C_{25}), 79.70 (C_{16}),
 δ (ppm) 59.61 (C_{14}), 59.46 (C_9), 56.81 (C_{20}), 56.12 (C_{17}), 50.82
 (C_3), 41.43 (C_4), 34.42 (C_{15}), 31.36 (C_{21}), 31.19 (C_{10}),
 28.33 ($\text{C}_{28/27/26}$), 24.87 (C_5), 22.69, 21.92 (C_7 and C_6),
 19.31, 19.09, 17.99, 17.54 ($\text{C}_{23/22}$ and $\text{C}_{12/11}$).

RMN ^{19}F : -78.24
 (188 MHz, CDCl_3)
 δ (ppm)

SM (ESI Positif/MeOH) : 625 $[\text{M}+\text{H}]^+$

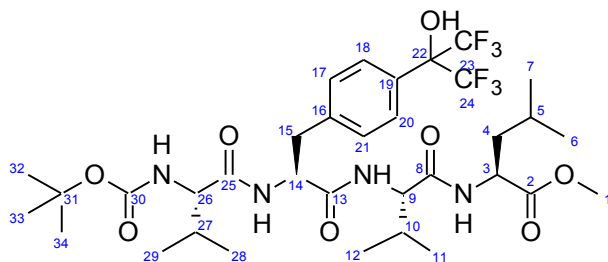
Réaction



Mode opératoire

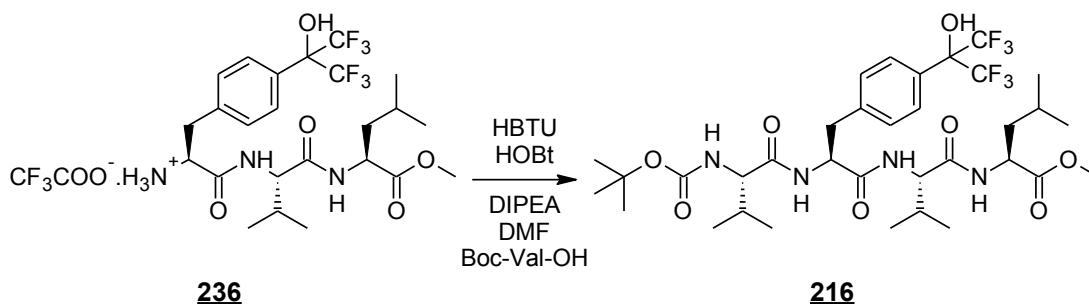
Le dérivé **234** (0.63 g, 1.17 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (1.24 mL, 6.99 mmol) puis successivement, HOBt (0.17 g, 1.28 mmol), HBTU (0.53 g, 1.40 mmol) et **Boc-Val.OH 177** (0.28 g, 1.28 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans de DCM (60 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant successivement du DCM (100%) puis un mélange de DCM/MeOH (90/10) comme éluant pour donner **215** (0.62 g, 0.99 mmol, 85%) sous forme d'un solide jaune.

Boc-Val-Phe(HFIP)-Val-Leu-OMe 216



Formule brute	: $C_{34}H_{50}F_6N_4O_8$
Masse molaire (g/mol)	: 756.77
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: 50%
T_F (°C)	: 221-223
μ-Analyse	: $C_{33}H_{47}F_6N_4O_8 \cdot 1H_2O$
Théorique	: C(52.70%) H(6.78%) N(7.23%)
Expérimentale	: C(52.60%) H(6.64%) N(7.12%)
IR (cm⁻¹)	: 3670, 3477, 3371, 2934, 1661, 1387.
RMN ¹H (300 MHz, Acétone- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 7.65 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H, H _{20/18}), 7.56-7.45 (m, 3H, NH), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, H _{21/17}), 5.97 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.92 (m, 1H, H ₁₄), 4.55 (m, 1H, H ₃), 4.42 (dd, <i>J</i> = 8.9, 6.4 Hz, 1H, H ₉), 3.97 (dd, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H, H ₂₆), 3.69 (s, 3H, H ₁), 3.24 (dd, <i>J</i> = 14.3, 4.5 Hz, 1H, H ₁₅), 3.07-2.90 (m, 1H, H ₁₅), 2.24-2.09 (m, 2H, H _{27/10}), 1.75-1.59 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.41 (s, 9H, H _{34/33/32}), 0.98-0.78 (m, 18H, H _{29/28} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75 MHz, Acétone- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 172.57 (C ₂₅), 171.83 (C ₈), 171.55 (C ₂), 171.48 (C ₁₃), 140.90 (C ₁₆), 130.44 (C _{21/17}), 129.73 (C ₁₉), 127.56 (C _{20/18}), 122.17 (C ₂₄ and C ₂₃), 58.81 (C ₉), 54.60 (C ₁₄), 52.17 (C ₁), 51.50 (C ₃), 41.25 (C ₄), 38.09 (C ₁₅), 31.61 (C ₁₀), 28.55 (C _{34/33/32}), 25.43 (C ₅), 23.21, 21.79 (C ₇ and C ₆), 19.65, 19.59, 18.34, 18.18 (C ₂₉ , C ₂₈ , C ₁₂ and C ₁₁).
RMN ¹⁹F (200 MHz, CDOD) δ (ppm)	: -74.45 (m), 74.52 (m)
SM (ESI Positif/MeOH)	: 779.6 [M+Na] ⁺

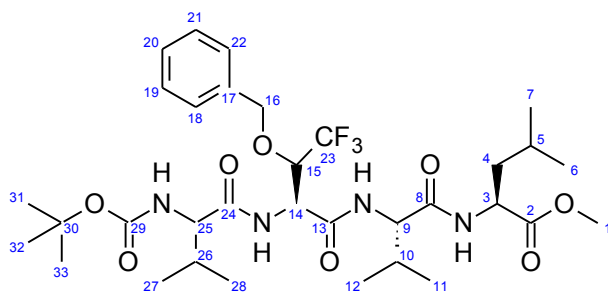
Réaction



Mode opératoire

Le dérivé **236** (0.23 g, 0.34 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.36 mL, 2.05 mmol) puis successivement, HOBt (0.05 g, 0.38 mmol), HBTU (0.16 g, 0.41 mmol) et **Boc-Val-OH 177** (0.08 g, 0.38 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (40 mL) pour fournir un précipité blanc qui après recristallisation dans un mélange DCM/MeOH donne **216** (0.13 g, 0.18 mmol, 50%) sous forme d'une poudre blanche.

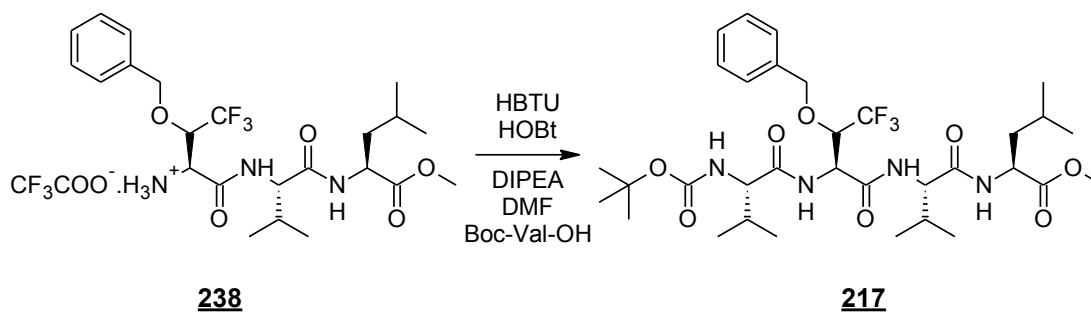
Boc-Val-Ser(OBzl/CF₃)-Val-Leu-OMe **217**



Formule brute	: C ₃₃ H ₅₁ F ₃ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 688.78
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 87
R_F	: 0.9 (AcOEt/MeOH : 90/10)
T_F (°C)	: 262-264
μ-Analyse	: C ₃₃ H ₅₁ F ₃ N ₄ O ₈
Théorique	: C(57.54%) H(7.46%) N(8.13%)
Expérimentale	: C(57.38%) H(7.46%) N(7.96%)
IR (cm⁻¹)	: 3580, 3282, 2960, 1672, 1639, 1529, 1255

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm)	: 8.32 (m, 2H, NH), 8.17 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH), 7.36-7.22 (m, 5H, $\text{H}_{22/21/20/19/18}$), 6.66 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH), 5.01 (dd, $J = 8.9$ Hz, 1H, H_{14}), 4.68 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H_{16}), 4.58 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H_{16}), 4.31-4.19 (m, 3H, H_{15} , H_9 and H_3), 3.81 (dd, $J = 18.8$, 10.9 Hz, 1H, H_{25}), 3.58 (s, 3H, H_1), 2.02-1.83 (m, 2H, H_{26} and H_{10}), 1.65-1.44 (m, 3H, H_5 and H_4), 1.37 (s, 9H, $\text{H}_{33/32/31}$), 0.90-0.70 (m, 18H, $\text{H}_{28/27}$, $\text{H}_{12/11}$ and $\text{H}_{7/6}$).
RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm)	: 172.66 (C_2), 170.84 (C_{24}), 170.61 (C_8), 167.51 (C_{13}), 155.21 (C_{29}), 136.84 (C_{17}), 128.04, 127.78 ($\text{C}_{22/18}$, $\text{C}_{21/19}$, C_{20}), 125.00 (C_{23}), 78.01 (C_{30}), 75.55 (C_{15}), 74.55 (C_{16}), 59.73 (C_{25}), 57.66 (C_9), 51.67 (C_1), 51.00 (C_{14}), 50.29 (C_3), 39.5 (C_4), 30.93 (C_{10}), 30.39 (C_{26}), 28.11 ($\text{C}_{33/32/31}$), 24.11 (C_5), 22.64, 21.19 ($\text{C}_{7/6}$), 19.07, 18.88, 18.08, 17.99 ($\text{C}_{28/27}$ and $\text{C}_{12/11}$).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 711.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

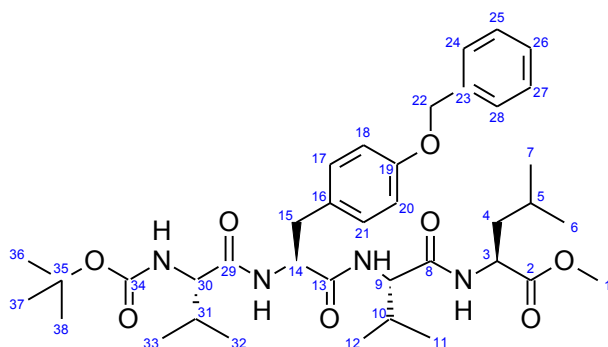
Réaction



Mode opératoire

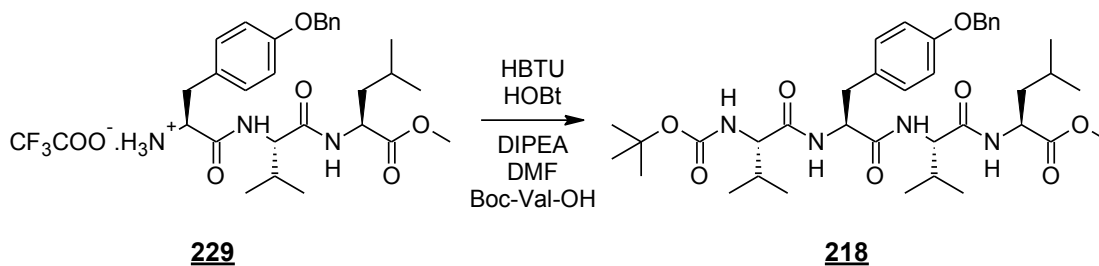
Le dérivé **238** (0.12 g, 0.20 mmol) est mis en solution dans 8 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (0.21 mL, 1.20 mmol) puis successivement, HOBt (0.03 g, 0.22 mmol), HBTU (0.09 g, 0.24 mmol) et **Boc-Val-OH 177** (0.05 g, 0.22 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL) pour fournir un précipité blanc qui après recristallisation dans un mélange AcOEt/DCM donne **217** (0.12 g, 0.17 mmol, 87%) sous forme d'une poudre blanche.

Boc.Val-Tyr(Bzl)-Val-Leu-OMe **218**



Formule brute	: $C_{38}H_{56}N_4O_8$
Masse molaire (g/mol)	: 696.87
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 57
R_F	: 0.1 (Cyclohexane/AcOEt, 60:40)
T_F (°C)	: 226-228
μ-Analyse	: $C_{38}H_{56}N_4O_8 \cdot 2.5 H_2O$
Théorique	: C(61.51%) H(8.30%) N(7.55%)
Expérimentale	: C(61.32%) H(7.51%) N(7.30%)
IR (cm⁻¹)	: 3263, 3290, 3300, 1685, 1639, 1512
RMN ¹H (400MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.73-7.22 (m, 8H, H _{28/24} , H _{27/25} , H ₂₆ and 3NH), 7.07 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H _{21/17}), 6.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H _{20/18}), 5.36 (m, 1H, NH), 4.95-4.78 (m, 3H, H ₂₂ and H ₁₄), 4.64 (m, 1H, H ₃), 4.51 (m, 1H, H ₃₀), 4.08 (m, 1H, H ₉), 3.76 (s, 3H, H ₁), 2.99 (m, 2H, H ₁₅), 2.21 (m, 1H, H ₃₁), 2.07 (m, 1H, H ₁₀), 1.74-1.69 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.45 (s, 9H, H _{38/37/36}), 1.1-0.75 (m, 18H, H _{7/6} , H _{12/11} and H _{33/32}).
RMN ¹³C (101MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.17 (C ₂), 171.96, 171.42, 171.35 (C ₂₉ , C ₁₃ and C ₈), 157.84 (C ₁₉), 155.91 (C ₃₄), 137.07 (C ₂₃), 130.32 (C _{21/17}), 128.60 (C ₁₆), 128.47 (C _{27/25}), 127.82 (C ₂₆), 127.38 (C _{28/24}), 114.97 (C _{20/18}), 79.79 (C ₃₅), 69.81 (C ₂₂), 60.19 (C ₉), 58.82 (C ₃₀), 54.43 (C ₁₄), 52.22 (C ₁), 50.99 (C ₃), 40.46 (C ₄), 37.28 (C ₁₅), 30.71 (C ₁₀), 30.47 (C ₃₁), 28.41 (C _{38/37/36}), 24.96 (C ₅), 22.88, 21.80 (C ₇ and C ₆), 19.15, 18.97, 18.09, 17.87 (C ₃₃ , C ₃₂ , C ₁₂ and C ₁₁).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 719 [M+Na] ⁺
SM (ESI négative/MeOH)	: 695 [M-H] ⁻

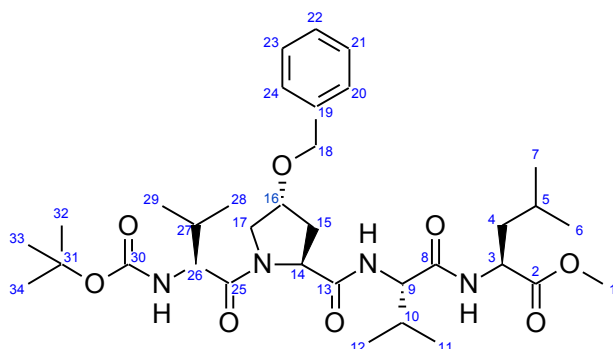
Réaction



Mode opératoire

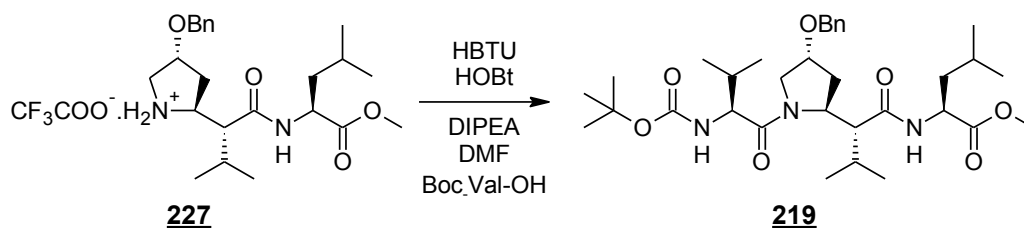
Le dérivé **229** (0.27 g, 0.38 mmol) est mis en solution dans 6 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (1.32 mL, 2.28 mmol) puis successivement, HOBt (0.19 g, 0.42 mmol), HBTU (0.57 g, 0.46 mmol) et **Boc-Val-OH 177** (0.30 g, 0.42 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans de l'AcOEt (60 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le produit **218** (0.15 g, 0.22 mmol, 57%) est obtenu sous forme d'une poudre blanche après recristallisation dans un mélange Cyclohexane/AcOEt.

BocHN.Val-Pro(OBzl)-Val-Leu.OMe 219



Formule brute :	: C ₃₄ H ₅₄ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 646.81
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 47
R_F	: 0.65 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 179-181
μ-Analyse	: C ₃₄ H ₅₄ N ₄ O ₈ • 2H ₂ O
Théorique	: C(59.80%) H(8.58%) N(8.21%)
Expérimentale	: C(59.58%) H(7.91%) N(8.10%)
IR (cm⁻¹)	: 3395, 3364, 2966, 1742, 1697, 1626, 1541
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.35-7.12 (m, 5H, H _{24/23/22/21/20}), 6.62 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.48 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H, NH), 4.64 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, H ₁₄), 4.58-4.47 (m, 2H, H ₁₈ and H ₃), 4.41 (dd, <i>J</i> = 14.3, 7.7 Hz, 2H, H ₁₈), 4.21 (dd, <i>J</i> = 15.6, 7.0 Hz, 3H, H ₂₆ , H ₁₆ and H ₉), 3.99 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 2H, H ₁₇), 3.69-3.55 (m, 4H, H ₁₇ and H ₁), 2.31-2.08 (m, 1H, H ₁₀), 2.06-1.81 (m, 1H, H ₂₇), 1.64-1.39 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.35 (s, 9H, H _{34/33/32}), 0.95-0.74 (m, 18H, H _{29/28} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.6 (C ₂), 172.2 (C ₁₃), 171.9 (C ₈), 171.4 (C ₂₅), 156.4 (C ₃₀), 137.8 (C ₁₉), 128.6 (C ₂₃ and C ₂₁), 128.02 (C ₂₂), 127.96 (C ₂₄ and C ₂₀), 79.9 (C ₃₁), 77.8 (C ₁₆), 71.1 (C ₁₈), 59.4 (C ₁₄), 58.8 (C ₉), 57.5 (C ₂₆), 52.7 (C ₁₇), 52.3 (C ₁), 51.1 (C ₃), 40.8 (C ₄), 35.3 (C ₁₅), 31.5 (C ₂₇), 31.4 (C ₁₀), 28.4 (C _{32/33/34}), 25.0 (C ₅), 22.8, 21.8 (C ₇ and C ₆), 19.3, 19.2, 18.1, 17.7 (C _{29/28} and C _{12/11}).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 669 [M+Na] ⁺

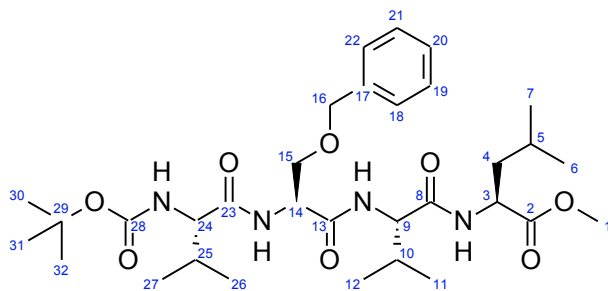
Réaction



Mode opératoire

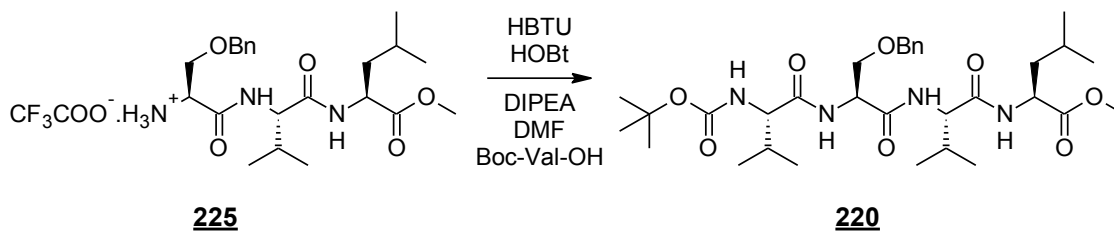
Le dérivé **227** (0.29 g, 0.52 mmol) est mis en solution dans 6 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.55 mL, 3.14 mmol) puis successivement, HOBt (0.09 g, 0.58 mmol), HBTU (0.26 g, 0.63 mmol) et **Boc-Val-OH 177** (0.12 g, 0.58 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans du DCM (60 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour donner **219** (0.16 g, 0.25 mmol, 47%) sous forme d'un solide blanc.

Boc-Val-Ser(Bzl)-Val-Leu-OMe 220



Formule brute :	: C ₃₂ H ₅₂ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 620.78
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 64
R_F	: 0.80 (AcOEt/Cyclohexane, 80:20)
T_F(°C)	: 178-180
IR (cm⁻¹)	: 3266, 2958, 1710, 1689, 1638
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.37-7.28 (m, 5H, H _{18/19/20/21/22}), 6.96 (m, 2H, NH), 6.70 (d, 1H, NH), 4.94 (d, 1H, NH), 4.62-4.47 (m, 4H, H ₁₄ , H ₁₆ , H ₃), 4.43-4.35 (dd, 1H, H ₉), 3.94 (m, 2H, H ₂₄ and H ₁₅), 3.70 (s, 3H, H ₁), 3.61 (dd, J = 9.4, 6.1 Hz, 1H, H ₁₅), 2.34-2.15 (m, 2H, H ₂₅ and H ₁₀), 1.64-1.59 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.40 (s, 9H, H _{32/31/30}), 1.02-0.86 (m, 18H, H _{27/26} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.14 (C ₂), 171.96 (C ₂₃), 170.75 (C ₈), 169.80 (C ₁₃), 156.10 (C ₂₈), 137.15 (C ₁₇), 128.50 (C ₂₀), 128.02 (C _{21/19}), 127.89 (C _{22/18}), 80.53 (C ₂₉), 73.55 (C ₁₆), 69.11 (C ₁₅), 60.40 (C ₂₄), 58.76 (C ₉), 53.40 (C ₁₄), 52.20 (C ₁), 50.66 (C ₃), 40.89 (C ₄), 30.40 (C ₂₅), 30.01 (C ₁₀), 28.18 (C _{32/31/30}), 24.70 (C ₅), 22.88, 21.59 (C ₇ and C ₆), 19.36, 19.13, 17.48 (C _{27/26} and C _{12/11}).
SM (ESI Positif/MeOH)	: 643 [M+Na] ⁺

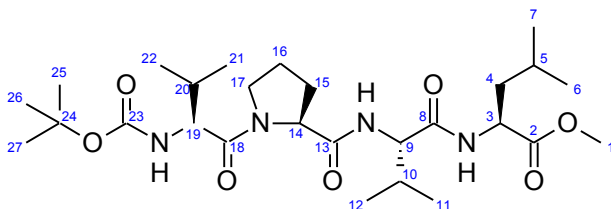
Réaction



Mode opératoire

Le sel **225** (0.31 g, 0.58 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute ensuite de la DIPEA (0.60 mL, 3.46 mmol), puis successivement, HOBt (0.09 g, 0.63 mmol), HBTU (0.26 g, 0.69 mmol) et **Boc-Val-OH 177** (0.14 g, 0.63 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (50 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est lavée alors successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (40 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (40 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (60 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour fournir **220** (0.23 g, 0.38 mmol, 64%) sous forme d'un solide blanc.

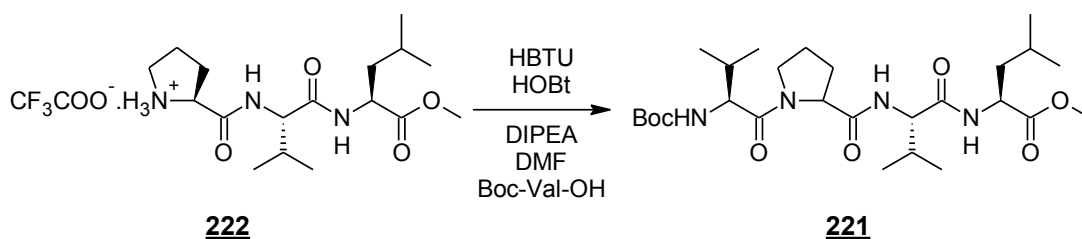
Boc-Val-Pro-Val-Leu-OMe **221**



Formule brute	: C ₂₇ H ₄₈ N ₄ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 540.69
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 66
R_F	: 0.55 (AcOEt/Cyclohexane, 80:20)
T_F (°C)	: 114-116
μ-Analyse	: C ₂₇ H ₄₈ N ₄ O ₇ • 0.15 H ₂ O
Théorique	: C(59.68%) H(8.98%) N(10.31%)
Expérimentale	: C(59.53%) H(9.09%) N(10.17%)
IR (cm ⁻¹)	: 3436, 3390, 3307, 2964, 1982, 1680, 1626
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.40 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, NH), 7.03 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.59 (d, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H, NH), 4.59 (m, 1H, H ₃), 4.54-4.44 (m, 1H, H ₁₉), 4.33-4.25 (t, 1H, H ₁₄), 4.21 (dd, <i>J</i> = 9.1, 6.9 Hz, 1H, H ₉), 3.73 (m, 1H, H ₁₇), 3.61 (m, 4H, H ₁₇ and H ₁), 2.13-1.79 (m, 6H, H ₂₀ , H ₁₇ , H ₁₆ , H ₁₅ and H ₁₀), 1.59 -1.42 (m, 3H, H _{4/5}), 1.33 (s, 9H, H _{27/26/25}), 0.93-0.75 (m, 18H, H _{22/21} , H _{12/11} and H _{7/6}).

RMN ^{13}C : 172.56 (C_2), 171.22 ($\text{C}_{18/13}$), 170.68 (C_8), 155.60 (C_{23}),
 (75MHz, CDCl_3) 80.15 (C_{24}), 60.18 (C_{14}), 58.76 (C_9), 56.83 (C_{19}), 52.26
 δ (ppm) (C_1), 50.65 (C_3), 47.71 (C_{17}), 41.39 (C_4), 31.37 (C_{20}),
 30.58 (C_{10}), 28.31 ($\text{C}_{27/26/25}$), 27.72 (C_{15}), 25.19 (C_{16}),
 24.77 (C_5), 22.75, 21.85 (C_6 and C_7), 19.61, 19.18,
 17.92, 17.39 ($\text{C}_{22/21}$ and $\text{C}_{12/11}$).
SM (ESI Positif/MeOH) : 563 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
SM (ESI négative/MeOH) : 539 $[\text{M}-\text{H}]^-$

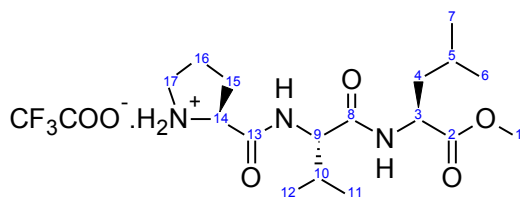
Réaction



Mode opératoire

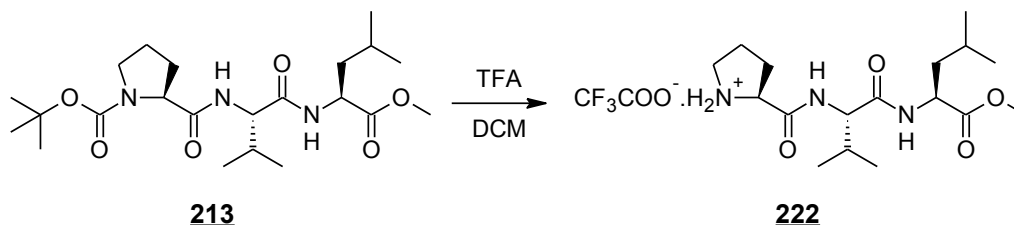
Le sel **222** (0.30 g, 0.69 mmol) est mis en solution dans 5 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (0.73 mL, 4.16 mmol) puis successivement, HOBt (0.12 g, 0.76 mmol), HBTU (0.32 g, 0.83 mmol) et **Boc-Val-OH 177** (0.17 g, 0.76 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau (30 mL) puis reprise avec de l'AcOEt (60 mL). La phase organique, séparée, est alors lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (20 mL), une solution aqueuse de K_2CO_3 10% (20 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (20 mL). Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant successivement un mélange Cyclohexane/AcOEt (50/50) puis AcOEt (100%) comme éluant, pour donner **221** (0.25 g, 0.46 mmol, 66%) sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻H₂N⁺-Pro-Val-Leu-OMe **222**



Formule brute :	: C ₁₉ H ₃₂ F ₃ N ₃ O ₆
Masse molaire (g/mol)	: 455.47
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 9.99 (s, 2H, NH ₂ ⁺), 8.29 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH), 7.80 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.71 (m, 1H, H ₃), 4.56-4.28 (m, 2H, H ₁₄ , H ₉), 3.70 (s, 3H, H ₁), 3.58-3.23 (m, 2H, H ₁₇), 2.43 (m, 1H, H ₁₀), 2.14-1.76 (m, 4H, H ₁₅ , H ₁₆), 1.74-1.42 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.99-0.70 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).

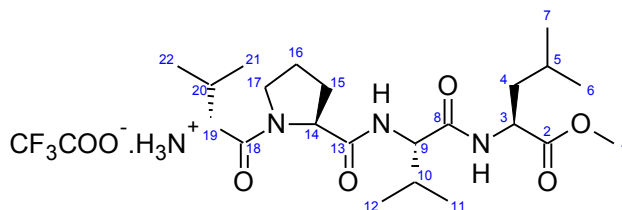
Réaction



Mode opératoire

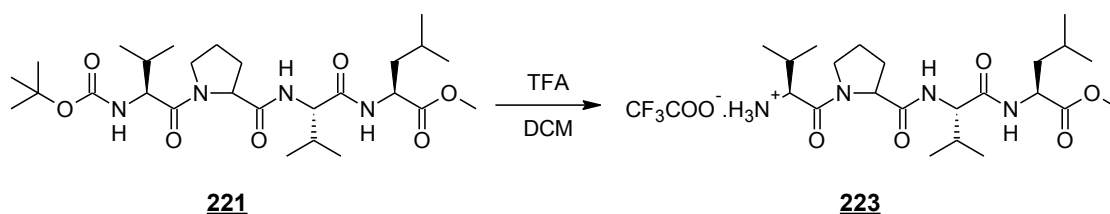
Le dérivé **213** (0.36 g, 0.82 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (3.64 mL, 48.9 mmol). Le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétamide **222** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Val-Pro-Val-Leu-OMe 223



Formule brute	: C ₂₄ H ₄₁ F ₃ N ₄ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 554.60
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN 1H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 8.19-7.92 (m, 4H, NH ₃ ⁺ and NH), 6.73 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NH), 4.72 (m, 1H, H ₃), 4.53 (m, 1H, H ₁₉), 4.24 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H ₁₄), 4.16-4.05 (m, 1H, H ₉), 3.75-3.55 (m, 4H, H ₁₇ and H ₁), 2.35-1.89 (m, 6H, H ₂₀ , H ₁₇ , H ₁₆ , H ₁₅ and H ₁₀), 1.71-1.46 (m, 3H, H ₄ and H ₅), 1.12-0.84 (m, 18H, H _{22/21} , H _{12/11} and H _{7/6}).

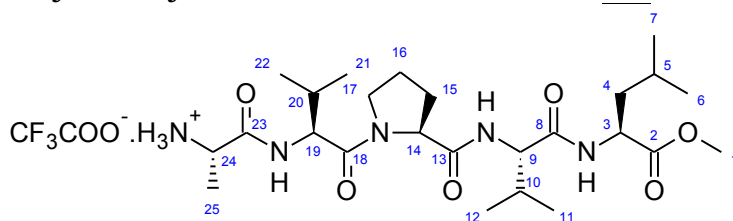
Réaction



Mode opératoire

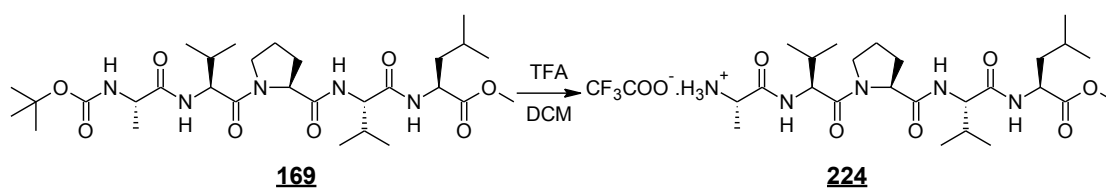
Le dérivé 221 (0.22 g, 0.41 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (2.80 mL, 24.41 mmol), et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate 223 sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Ala-Val-Pro-Val-Leu-OMe **224**



Formule brute :	: C ₂₇ H ₄₆ F ₃ N ₅ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 625.68
Aspect	: Solide jaune
R^{dt} (%)	: Quantitatif
T_F (°C)	: 177-179
RMN ¹H (300MHz/DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 8.49 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 3H, NH), 8.26 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, NH), 8.05 (m, 3H, NH ₃ ⁺), 7.83 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, NH), 4.71-4.21 (m, 4H, H ₂₄ , H ₁₉ , H ₁₄ and H ₃), 4.18-4.05 (m, 1H, H ₉), 3.92 (m, 1H, H ₁₇), 3.66 (m, 1H, H ₁₇), 3.60 (s, 3H, H ₁), 2.06-1.66 (m, 6H, H ₂₀ , H ₁₆ , H ₁₅ and H ₁₀), 1.68-1.41 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.30 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H, H ₂₅), 1.00-0.69 (m, 18H, H _{22/21} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz/ DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 173.18 (C ₂), 171.62 (C ₂₃), 171.55 (C ₁₈), 169.76 (C ₁₃), 169.72 (C ₈), 59.56 (C ₁₄), 57.88 (C ₉), 56.35 (C ₁₉), 52.16 (C ₁), 50.59 (C ₃), 48.35 (C ₂₄), 47.69 (C ₁₇), 41.84 (C ₄), 31.20 (C ₂₀), 30.63 (C ₁₀), 29.43 (C ₁₅), 24.97 (C ₁₆), 24.64 (C ₅), 23.18, 21.65, 19.52, 19.44 (C _{22/21} and C _{12/11}), 18.70 (C ₂₅), 18.59, 17.72 (C _{7/6}).
SM (ESI Négative/MeOH)	: 512 [M-H] ⁻

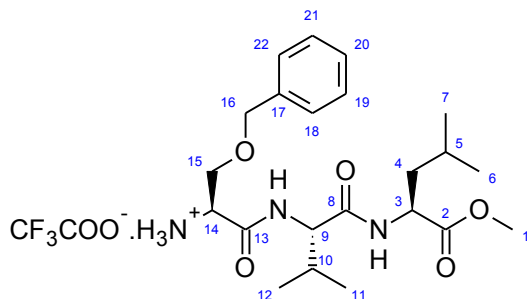
REACTION



Mode opératoire

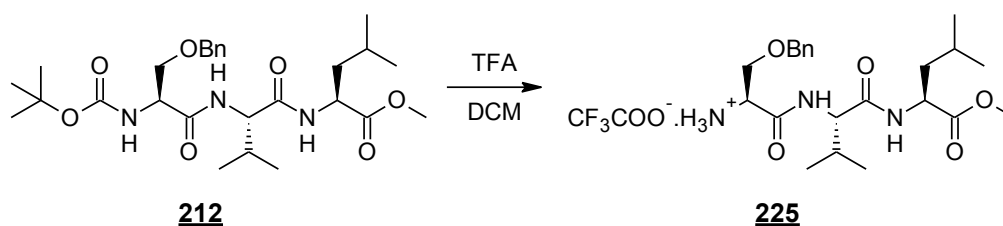
Le dérivé **169** (0.05 g, 0.36 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (0.44 mL, 21.58 mmol) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **224** sous forme d'un solide jaune.

$\text{CF}_3\text{COO}^-\text{H}_3\text{N}^+$ -Ser(Bzl)-Val-Leu-OMe **225**



Formule brute :	: $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7$
Masse molaire (g/mol)	: 535.55
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm)	: 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 7.44 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH), 7.30-7.26 (m, 5H, $\text{H}_{18/19/20/21/22}$), 4.49 (m, 3H, H_{16} and H_3), 4.39-4.29 (, 2H, H_{14} and H_9), 3.80 (dd, $J = 16.9$, 11.9 Hz, 2H, H_{15}), 3.62 (s, 3H, H_1), 2.03 (m, 1H, H_{10}), 1.66 – 1.50 (m, 3H, H_5 and H_4), 0.94-0.80 (m, 12H, $\text{H}_{12/11}$ and $\text{H}_{7/6}$).
RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) δ (ppm)	: 173.15 (C_2), 171.66 (C_8), 167.32 (C_{13}), 136.27 (C_{17}), 128.56 (C_{20}), 128.28 ($\text{C}_{21/19}$), 127.99 ($\text{C}_{22/18}$), 73.82 (C_{16}), 68.98 (C_{15}), 59.85 (C_9), 52.31(C_1), 51.06(C_3), 40.26 (C_4), 30.74 (C_{10}), 24.80 (C_5), 22.54, 21.49 (C_7 and C_6), 18.74, 18.00(C_{12} and C_{11}).

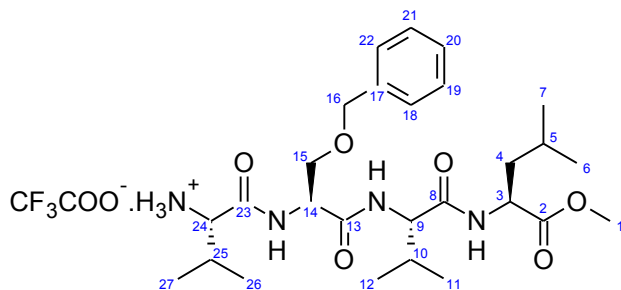
Réaction



Mode opératoire

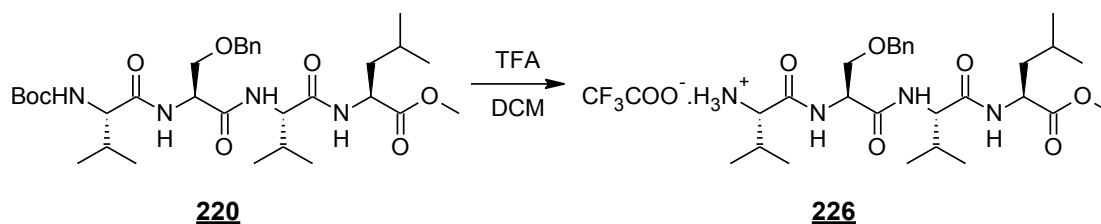
Le dérivé **212** (0.31 g, 0.59 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (4.01 mL, 35.18 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **225** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Val-Ser(Bzl)-Val-Leu-OMe 226



Formule brute	: C ₂₉ H ₄₅ F ₃ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 634.68
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 8.66 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, NH), 8.32 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, NH), 8.17-8.01 (m, 3H, NH ₃ ⁺), 7.38-7.24 (m, 5H, H _{22/21/20/19/18}), 4.74 (dd, <i>J</i> = 13.3, 5.9 Hz, 1H, H ₁₄), 4.50 (m, 2H, H ₁₆), 4.26 (dd, <i>J</i> = 15.0, 6.2 Hz, 2H, H ₉ and H ₃), 3.70 (m, 1H, H ₁₅), 3.60 (m, 4H, H ₁ and H ₁₅), 2.02 (m, 2H, H ₂₅ and H ₁₀), 1.51 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.97-0.74 (m, 18H, H _{27/26} , H _{12/11} and H _{7/6}).

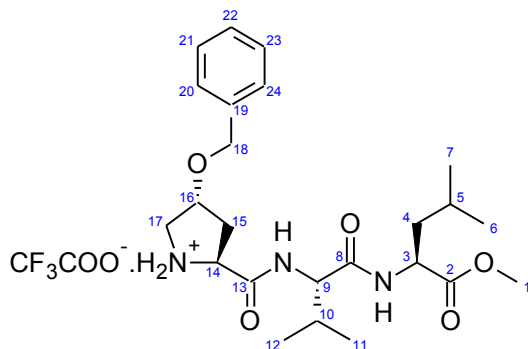
Réaction



Mode opératoire

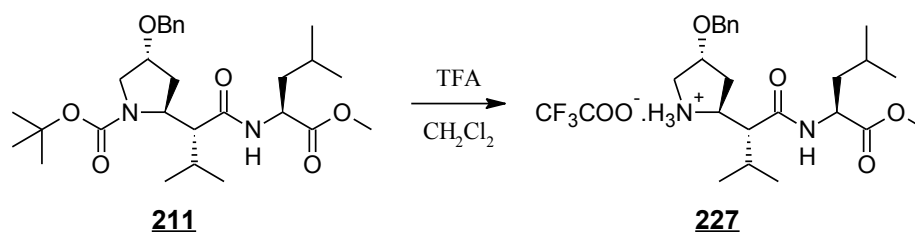
Le dérivé 220 (0.2 g, 0.32 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (1.43 mL, 19.33 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate 226 sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₂N⁺-Pro(Obzl)-Val-Leu-OMe 227



Formule brute	: C ₂₆ H ₃₈ F ₃ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 562.60
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 8.57 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H, NH), 8.34 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.37-7.15 (m, 5H H _{24/20} , H _{23/21} and H ₂₂), 4.49-4.39 (m, 2H, H ₁₈), 4.36-4.24 (m, 2H, H ₃ and H ₁₄), 4.18 (m, 2H, H ₁₆ and H ₉), 3.52 (s, 3H, H ₁), 3.30 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 2H, H ₁₇), 2.49 (m, 2H, H ₁₅), 2.00-1.74 (m, 2H, H ₁₀), 1.60-1.35 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.87-0.71 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm)	: 172.63 (C ₂), 170.42(C ₁₃), 167.44 (C ₈), 137.69 (C ₁₉), 128.20 (C _{23/21}), 127.66 (C ₂₂), 127.58 (C _{24/20}), 76.84 (C ₁₆), 69.85(C ₁₈), 57.89 (C ₁₄ and C ₉), 51.69 (C ₁), 50.92 (C ₁₇), 50.27 (C ₃), 39.48 (C ₄), 35.50 (C ₁₅), 30.60 (C ₁₀), 24.22 (C ₅), 22.62, 21.18 (C ₁₂ and C ₁₁), 18.98, 17.87 (C ₇ and C ₆).

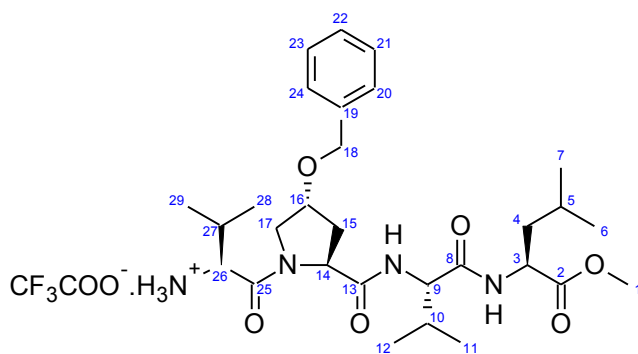
Réaction



Mode opératoire

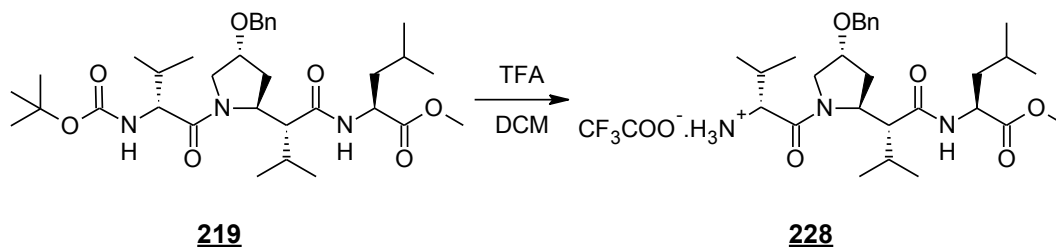
Le dérivé 211 (0.3 g, 0.55 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (2.45 mL, 3.75 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate 227 sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺.Val-Pro(Obzl)-Val-Leu.OMe 228



Formule brute	: C ₃₁ H ₄₇ F ₃ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 660.72
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 8.36-8.13 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 3H, NH ₃ ⁺), 8.00-7.98 (m, 1H, NH), 7.40-7.18 (m, 5H, H _{24/20} , H _{23/21} , H ₂₂), 6.60 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H, NH), 4.87 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, H ₁₄), 4.65-4.52 (m, 2H, H ₁₈ and H ₃), 4.51-4.41 (m, 2H, H ₁₈), 4.31-4.21 (m, 3H, H ₂₆ , H ₁₆ and H ₉), 4.15-3.98 (m, 1H, H ₂₇), 3.80-3.59 (m, 4H, H ₁₇ and H ₁), 2.35-1.97 (m, 2H, H ₂₇ and H ₁₀), 1.63-1.42 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.15-0.73 (m, 18H, H _{29/28} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, MeOD) δ (ppm)	: 172.96 (C ₂), 172.23 (C ₁₃), 172.12 (C ₈), 167.24 (C ₂₅), 137.8 (C ₁₉), 128.04 (C ₂₃ and C ₂₁), 127.60 (C ₂₂), 127.48 (C ₂₄ and C ₂₀), 79.9 (C ₃₁), 77.42 (C ₁₆), 70.60 (C ₁₈), 59.11 (C ₁₄), 58.73 (C ₉), 56.63 (C ₂₆), 53.17 (C ₁₇), 51.15 (C ₁), 50.72 (C ₃), 39.91 (C ₄), 34.41 (C ₁₅), 30.91 (C ₂₇), 29.34 (C ₁₀), 24.51 (C ₅), 21.81, 20.44 (C ₇ and C ₆), 18.29, 17.57, 17.33, 15.87 (C _{29/28} and C _{12/11}).

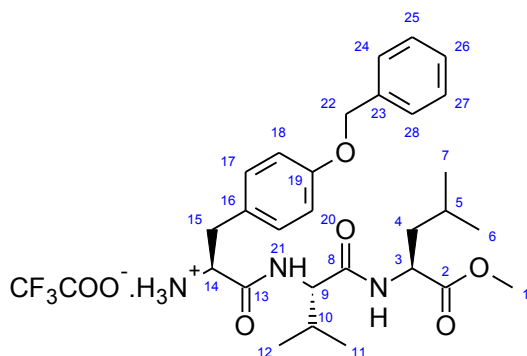
Réaction



Mode opératoire

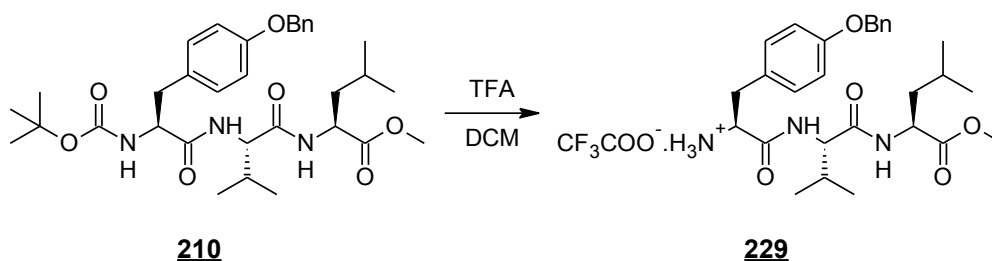
Le dérivé **219** (0.16 g, 0.25 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (1.1 mL, 14.84 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **228** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺.Tyr(Bzl)-Val-Leu.OMe 229



Formule brute	: C ₃₀ H ₄₀ F ₃ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 611.65
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 8.51 (m, 1H, NH), 8.08 (bs, 1H, NH), 7.47-7.29 (m, 5H, H _{28/24} , H _{27/25} and H ₂₆), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H _{21/17}), 6.93 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H _{20/18}), 5.08 (bs, 2H, H ₂₂), 4.35-4.22 (m, 2H, H ₃ and H ₁₄), 4.10 (m, 1H, H ₉), 3.61 (s, 3H, H ₁), 3.01 (dd, <i>J</i> = 14.2, 4.8 Hz, 1H, H ₁₅), 2.85 (dd, <i>J</i> = 14.4, 7.7 Hz, 1H, H ₁₅), 2.05-1.90 (m, 1H, H ₁₀), 1.72-1.44 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.89 (dt, <i>J</i> = 15.0, 6.6 Hz, 12H, H _{7/6} and H _{12/11}).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 172.61 (C ₂), 170.45 (C ₁₃), 167.79 (C ₈), 157.58 (C ₁₉), 137.08 (C ₂₃), 130.61 (C _{21/17}), 128.40 (C _{27/25}), 127.79 (C ₂₆), 127.50 (C _{28/24}), 114.72 (C _{20/18}), 69.16 (C ₂₂), 57.54 (C ₉), 53.11 (C ₁₄), 51.71 (C ₁), 50.13 (C ₃), 36.10 (C ₄), 30.83 (C ₁₀), 24.25 (C ₅), 22.70, 21.17 (C ₇ and C ₆), 18.95, 18.19 (C ₁₂ and C ₁₁).

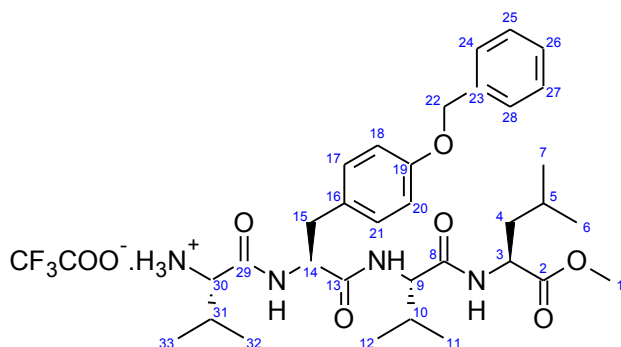
Réaction



Mode opératoire

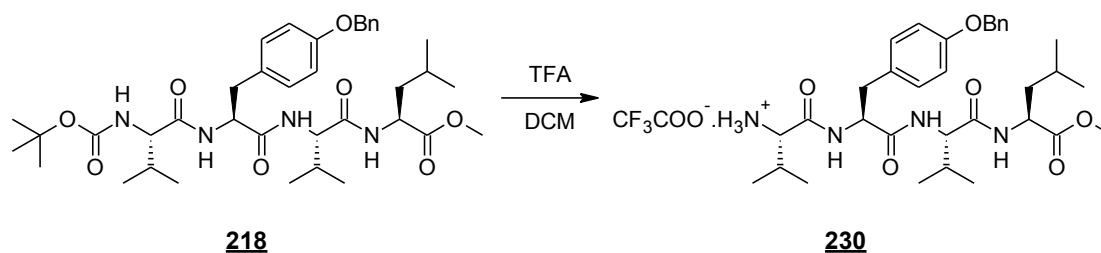
Le dérivé **210** (0.38 g, 0.64 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (2.82 mL, 38.14 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **229** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Val-Tyr(OBzl)-Val-Leu-OMe 230



Formule brute	: C ₃₅ H ₄₉ F ₃ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 710.78
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 8.51 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, NH), 8.31 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, NH), 8.19 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H, NH), 7.99 (s, 3H, NH ₃ ⁺), 7.49-7.28 (m, 5H, H _{28/24} , H _{27/25} and H ₂₆), 7.21 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H _{21/17}), 6.90 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H _{20/18}), 5.06 (s, 2H, H ₂₂), 4.66 (dd, <i>J</i> = 12.6, 8.8 Hz, 1H, H ₃), 4.34-4.13 (m, 3H, H ₃₀ , H ₁₄ and H ₉), 3.60 (s, 3H, H ₁), 2.90 (dd, <i>J</i> = 13.4, 5.0 Hz, 1H, H ₁₅), 2.73 (dd, <i>J</i> = 13.4, 9.6 Hz, 1H, H ₁₅), 2.09 (m, 1H, H ₃₁), 1.96 (m, 1H, H ₁₀), 1.70-1.40 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.87 (m, 18H, H _{33/32} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 174.37 (C ₂), 173.32, 172.94, 169.40 (C ₂₉ , C ₁₃ and C ₈), 159.24 (C ₁₉), 131.27, 137.07 (C ₂₃), 130.32 (C _{21/17}), 129.51 (C ₁₆ and C _{27/25}), 128.87 (C ₂₆), 128.50 (C _{28/24}), 115.98 (C _{20/18}), 71.02 (C ₂₂), 59.81 (C ₉), 59.44 (C ₃₀), 56.34 (C ₁₄), 52.55 (C ₁), 52.24 (C ₃), 41.33 (C ₄), 37.94 (C ₁₅), 32.39 (C ₁₀), 31.63 (C ₃₁), 25.97 (C ₅), 23.26, 22.03 (C ₇ and C ₆), 19.62, 18.96, 18.76, 17.54 (C ₃₃ , C ₃₂ , C ₁₂ and C ₁₁).

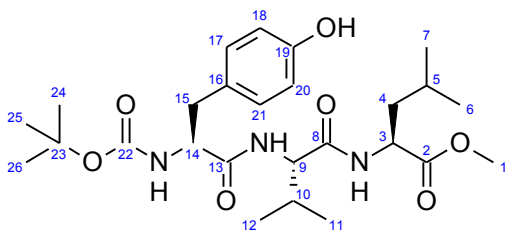
Réaction



Mode opératoire

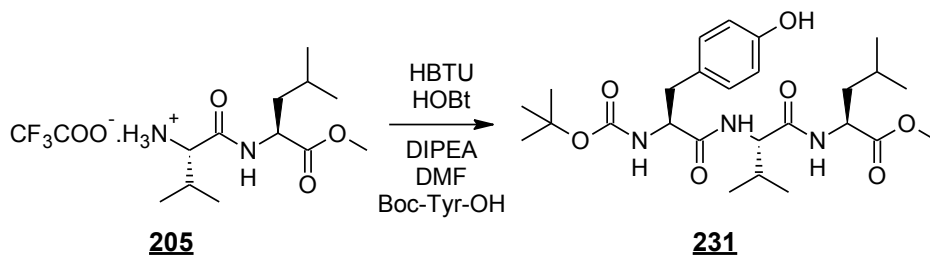
Le dérivé **218** (0.09 g, 0.13 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (0.57 mL, 7.75 mmol) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **230** sous forme d'un solide blanc.

Boc-Tyr-Val-Leu-OMe **231**



Formule brute	: C ₂₆ H ₄₁ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 507.62
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: 36
R_F	: 0.49 (Cyclohexane/AcOEt, 40:60)
T_F (°C)	: 124-126
IR (cm⁻¹)	: 3317, 2963, 1690, 1645, 1516
RMN ¹H (300MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 7.08 (dd, <i>J</i> = 16.8, 8.2 Hz, 1H, NH), 7.00 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H, H _{21/17}), 6.82 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, NH), 6.72 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H, H _{20/18}), 6.63 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, NH), 4.57 (t, <i>J</i> = 4.9 Hz, 1H, H ₁₄), 4.27 (m, 2H, H ₉ and H ₃), 3.71 (s, 3H, H ₁), 3.08-2.88 (m, 2H, H ₁₅), 2.17-2.05 (m, 1H, H ₁₀), 1.60 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.39 (bs, 9H, H _{24/25/26}), 0.89 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	: 173.00 (C ₂), 171.71 (C ₈), 170.78 (C ₁₃), 155.58 (C ₂₂), 155.18 (C ₁₉), 130.33 (C _{21/17}), 127.74 (C ₁₆), 121.36, 115.65 (C _{20/18}), 80.47 (C ₂₃), 58.60 (C ₉), 52.27 (C ₁₄), 50.82 (C ₃), 41.03 (C ₄), 37.71, 37.00 (C ₁₅), 30.79 (C ₁₀), 28.30 (C _{26/25/24}), 24.79 (C ₅), 22.72, 21.81 (C ₇ and C ₆), 19.01, 17.65 (C ₁₂ and C ₁₁).

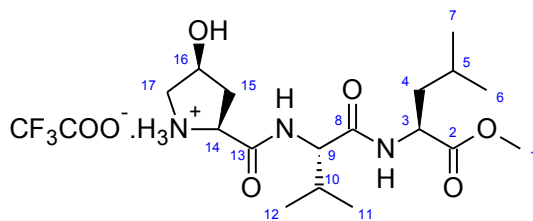
Réaction



Mode opératoire

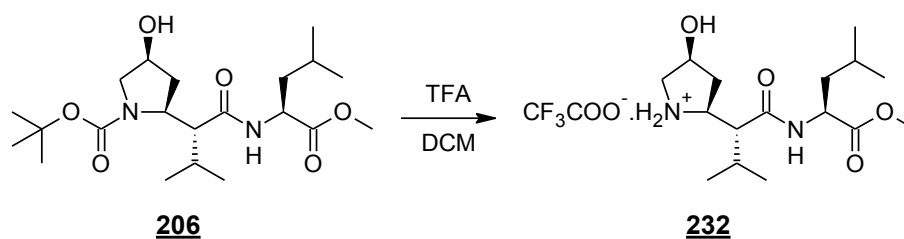
Le dérivé **205** (0.54 g, 1.51 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF anhydre à 0°C. On ajoute, ensuite, de la DIPEA (1.58 mL, 9.04 mmol) puis successivement, HOBt (0.22 g, 1.66 mmol), HBTU (0.75 g, 1.81 mmol) et **Boc-Tyr-OH 180** (0.47 g, 1.66 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0°C puis 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans de l'AcOEt (100 mL). La phase organique est alors successivement lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (50 mL), une solution aqueuse de K₂CO₃ 10% (50 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange Cyclohexane/AcOEt (70/30) comme éluant pour donner **231** (0.27 g, 0.53 mmol, 35%) sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Val-*cis*-Pro(OH)-Val-Leu-OMe 232



Formule brute	: C ₁₉ H ₃₃ F ₃ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 472.48
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, MeOD) δ (ppm)	: 4.41 (m, 1H, H ₁₆), 4.35 (dd, <i>J</i> = 8.6, 6.4 Hz, 1H, H ₁₄), 4.28 (m, 1H, H ₃), 4.19 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, H ₉), 3.61 (s, 3H, H ₁), 3.26-3.22 (m, 2H, H ₁₇), 2.52 (m, 1H, H ₁₅), 2.09-1.94 (m, 2H, H ₁₅ and H ₁₀), 1.68-1.45 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.95-0.78 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).

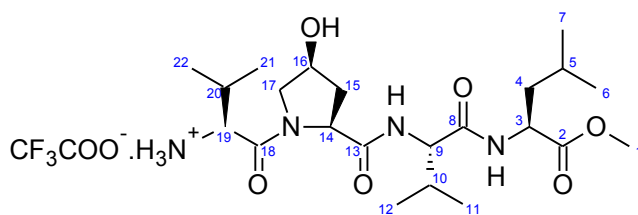
Réaction



Mode opératoire

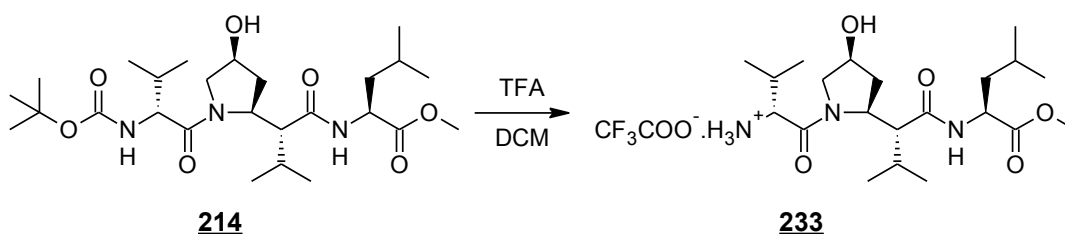
Le dérivé **206** (0.21 g, 0.46 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (2.04 mL, 27.54 mmol) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **232** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Val-*cis*-Pro(OH)-Val-Leu-OMe 233



Formule brute	: C ₂₄ H ₄₁ F ₃ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 570.60
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 8.31 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, NH), 8.14-7.90 (m, 4H, NH and NH ₃ ⁺), 5.49 (m, 1H, OH), 4.68 (dd, <i>J</i> = 9.4, 4.1 Hz, 1H, H ₁₄), 4.54-4.45 (m, 1H, H ₃), 4.33-4.10 (m, 4H, H ₁₉ , H ₁₆ , and H ₉), 3.87 (dd, <i>J</i> = 10.8, 3.7 Hz, 1H, H ₁₇), 3.73 (d, <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H), 3.60 (m, 4H, H ₁₇ and H ₁), 3.29 (dd, <i>J</i> = 10.8, 3.7 Hz, 1H, H ₁₇), 2.41-2.25 (m, 2H, H ₁₅), 2.21-1.88 (m, 2H, H ₂₀ and H ₁₀), 1.71-1.41 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.07-0.74 (m, 18H, H _{22/21} , H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 173.15 (C ₂), 171.55, 171.37 (C ₁₈ and C ₁₃), 169.69 (C ₈), 69.32 (C ₁₆), 58.82 (C ₁₄), 58.25 (C ₉), 57.64 (C ₁₇), 56.02 (C ₁₉), 52.17 (C ₁), 50.64 (C ₃), 37.23 (C ₄), 33.72 (C ₁₅), 31.41 (C ₂₀), 30.03 (C ₁₀), 28.36 (C _{27/26/25}), 24.67 (C ₅), 23.16, 23.05, 21.67, 21.62 (C ₇ and C ₆), 19.51, 19.46, 18.61, 18.52, 18.33, 17.63 (C _{22/21} and C _{12/11}).

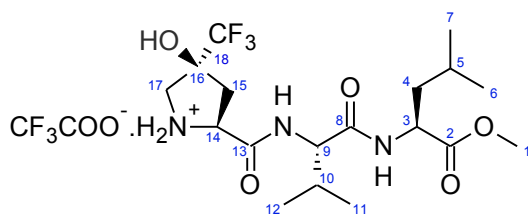
Réaction



Mode opératoire

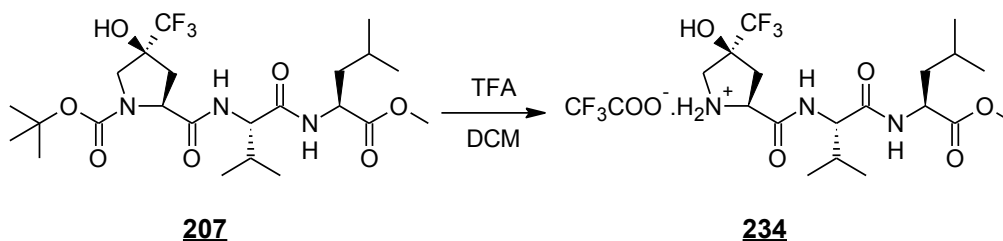
Le dérivé 214 (0.11 g, 0.20 mmol) est mis en solution dans 8 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (0.96 mL, 1.28 mmol) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate 233 sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻H₃N⁺-Pro(OH/CF₃)-Val-Leu-OMe 234



Formule brute :	: C ₂₀ H ₃₂ F ₆ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 540.47
Aspect	: Solide jaune
R^{dt} (%)	: Quantitatif
T_F (°C)	: 208-210
IR (cm⁻¹)	: 3661, 3633, 3442, 3167, 2961, 1710, 1679, 1660, 1561
RMN ¹H (300 MHz/ DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 9.56 (m, 2H, NH ₂ ⁺), 8.61 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, NH), 8.43 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, NH), 6.99 (s, 1H, OH), 4.36-4.14 (m, 2H, H ₁₄ and H ₃), 3.65 (d, <i>J</i> = 10.6 Hz, 1H, H ₉), 3.61 (s, 3H, H ₁), 3.53 (t, <i>J</i> = 11.4 Hz, 1H, H ₁₇), 3.43 (d, <i>J</i> = 12.5 Hz, 1H, H ₁₇), 2.13-1.93 (m, 2H, H ₁₀), 1.69-1.41 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.96-0.76 (m, 12H, H _{12/12} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75 MHz/ DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 173.12 (C ₂), 170.86 (C ₁₃), 166.96 (C ₈), 124.6 (C ₁₈), 79.30 (C ₁₆), 59.06 (C ₁₄), 55.40 (C ₁₇), 52.21 (C ₁), 50.85 (C ₃), 38.24 (C ₄), 34.48 (C ₁₅), 31.34 (C ₁₀), 24.69 (C ₅), 23.12, 21.73 (C ₇ and C ₆), 19.50, 18.17 (C ₁₂ and C ₁₁).

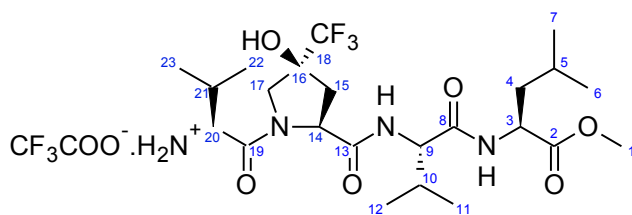
Réaction



Mode opératoire

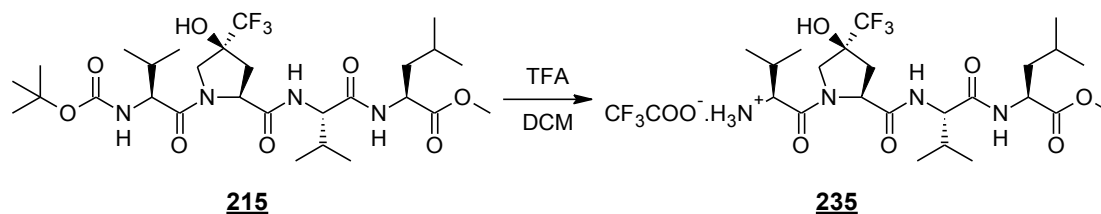
Le dérivé 207 (0.74 g, 1.41 mmol) est mis en solution dans 20 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (6.27 mL, 9.65 mmol) et le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate 234 sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺.Val-Pro(OH/CF₃)-Val-Leu.OMe 235



Formule brute	: C ₂₅ H ₄₀ F ₆ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 638.60
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 4.84-4.77 (m, 1H, H ₁₄), 4.51-4.42 (m, 1H, H ₃), 4.23 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, H ₉), 4.16-4.08 (m, 2H H ₂₀ and H ₁₇), 3.84 (m, 1H, H ₁₇), 3.71 (s, 3H, H ₁), 2.67 (dd, <i>J</i> = 14.1, 9.6 Hz, 1H, H ₁₅), 2.16 (m, 3H, H ₁₅ , H ₂₁ and H ₁₀), 1.75-1.57 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.19-0.88 (m, 18H, H _{23/22} , H _{12/11} and H _{7/6}).

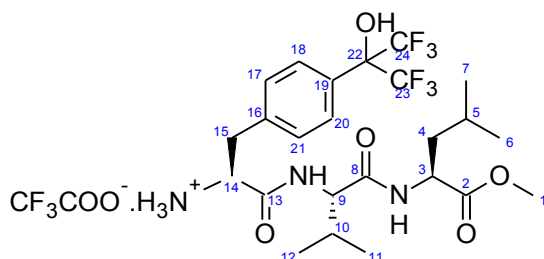
Réaction



Mode opératoire

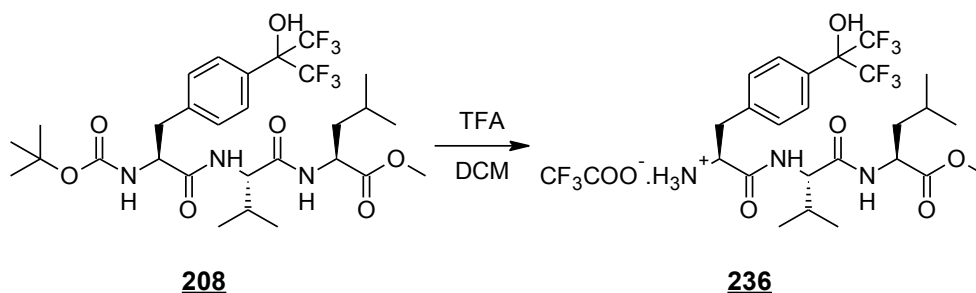
Le dérivé **215** (0.62 g, 0.99 mmol) est mis en solution dans 15 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (4.41 mL, 59.55 mmol) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **235** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Phe(HFIP)-Val-Leu-OMe **236**



Formule brute	: C ₂₆ H ₃₄ F ₉ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 671.55
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300 MHz/MeOD) δ (ppm)	: 7.74 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, H _{20/18}), 7.40 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, H _{21/17}), 4.58-4.43 (m, 1H, H ₁₄), 4.35-4.19 (m, 2H, H ₉ and H ₃), 3.73 (s, 3H, H ₁), 3.26 (m, 1H, H ₁₅), 3.12 (dd, <i>J</i> = 14.6, 7.8 Hz, 1H, H ₁₅), 2.12 (m, 1H, H ₁₀), 1.73 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.09-0.91 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75 MHz/CD ₃ OD) δ (ppm)	: 172.92 (C ₂), 171.87 (C ₁₃), 167.88 (C ₈), 136.05 (C ₁₆), 130.81 (C _{21/17}), 129.35 (C ₁₉), 127.38 (C _{20/18}), 124.98, 121.17 (C ₂₄ and C ₂₃), 80.49 (C ₂₂), 58.80 (C ₉), 53.51 (C ₁₄), 51.16 (C ₁), 50.78 (C ₃), 39.93 (C ₄), 36.56 (C ₁₅), 30.78 (C ₁₀), 24.56 (C ₅), 21.83, 20.45 (C ₇ and C ₆), 18.18, 17.33 (C ₁₂ and C ₁₁).
SM (ESI Positif/CD ₃ OD)	: 558 [M+H] ⁺

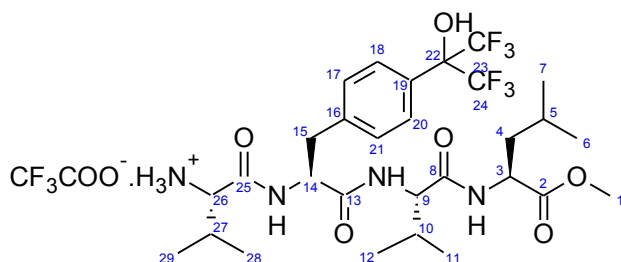
Réaction



Mode opératoire

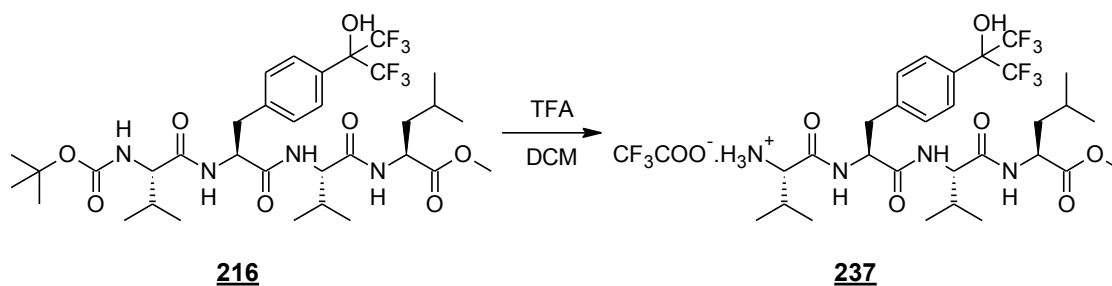
Le dérivé **208** (0.26 g, 0.4 mmol) est mis en solution dans 6 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (0.48 mL, 23.72 mmol) et le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **236** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Val-Phe(HFIP)-Val-Leu-OMe237



Formule brute :	: C ₃₁ H ₄₃ F ₉ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 770.68
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 7.66 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, H _{20/18}), 7.38 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, H _{21/17}), 4.52-4.24 (m, 4H, H ₂₆ , H ₁₄ , H ₉ and H ₃), 3.70 (s, 3H, H ₁), 3.22 (dd, <i>J</i> = 14.4, 5.4 Hz, 1H, H ₁₅), 3.08-2.96 (m, 1H, H ₁₅), 2.85-2.16 (m, 2H, H ₂₇ and H ₁₀), 1.81-1.58 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 1.09-0.86 (m, 18H, H _{29/28} , H _{12/11} and H _{7/6}).
SM (ESI negatif/MeOH)	: 771 [M-H] ⁻

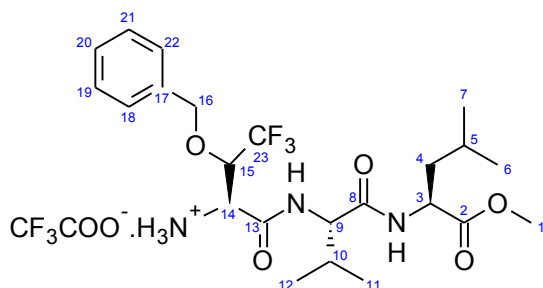
Réaction



Mode opératoire

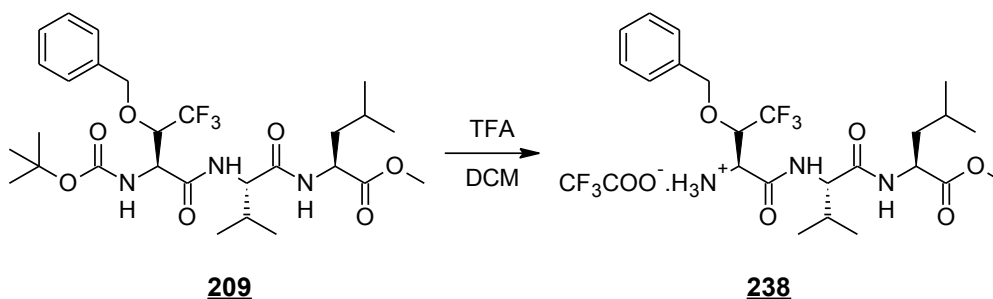
Le dérivé **216** (0.09 g, 0.12 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (0.53 mL, 7.14 mmol). Le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **237** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Ser(OBzl/CF₃)-Val-Leu-OMe **238**



Formule brute :	: C ₂₅ H ₃₅ F ₆ N ₃ O ₇
Masse molaire (g/mol)	: 603.55
Aspect	: Solide Blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 8.78 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H, NH), 8.52 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, NH), 8.39 (bs, 3H, NH ₃ ⁺), 7.44-7.28 (m, 5H, H _{22/21/20/19/18}), 4.75 (dd, <i>J</i> = 36.5, 11.3 Hz, 2H, H ₁₆), 4.59-4.37 (m, 2H, H ₁₄ and H ₃), 4.38- 4.18 (m, 2H, H ₁₅ and H ₉), 3.61 (s, 3H, H ₁), 1.97 (dd, <i>J</i> = 13.9, 7.1 Hz, 1H, H ₁₀), 1.63-1.40 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.97-0.70 (m, 12H, H _{12/11} and H _{7/6}).
RMN ¹³C (75 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	: 174.31 (C ₂), 172.94 (C ₈), 165.17 (C ₁₃), 137.39 (C ₁₇), 129.59, 127.08 (C _{22/21/20/19/18}), 123.32 (C ₂₃), 76.07 (C ₁₅), 75.67 (C ₁₆), 60.32 (C ₉), 53.75 (C ₁₄), 52.57 (C ₁), 52.14 (C ₃), 41.28 (C ₄), 32.47 (C ₁₀), 25.75 (C ₅), 23.27, 21.66 (C ₇ and C ₆), 19.52, 18.86 (C ₁₂ and C ₁₁).

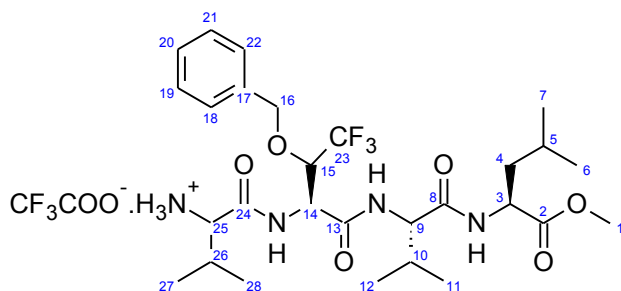
Réaction



Mode opératoire

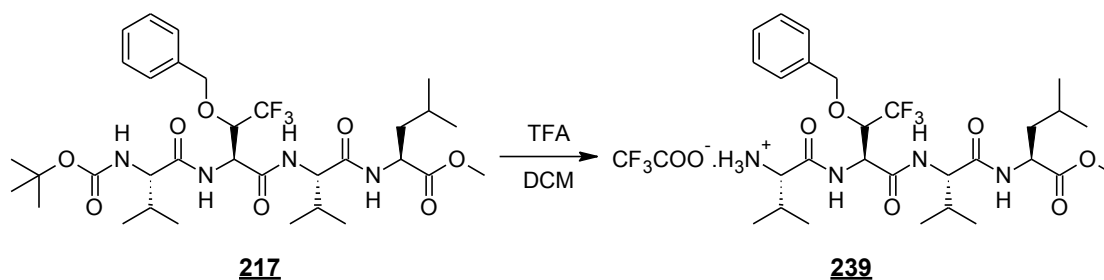
Le dérivé **209** (0.14 g, 0.24 mmol) est mis en solution dans 15 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (1.08 mL, 1.05 mmol). Le mélange réactionnel a été agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **238** sous forme d'un solide blanc.

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Val-Ser(OBzl/CF₃)-Val-Leu-OMe 239



Formule brute	: C ₃₀ H ₄₄ F ₆ N ₄ O ₈
Masse molaire (g/mol)	: 702.68
Aspect	: Solide blanc
R^{dt} (%)	: Quantitatif
RMN ¹H (300 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	: 7.57 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, NH), 7.36-7.14 (m, 5H, H _{22/21/20/19/18}), 4.94 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, H ₁₄), 4.78-4.60 (m, 2H, H ₁₆), 4.49-4.24 (m, 4H, H ₂₅ , H ₁₄ , H ₉ and H ₃), 3.57 (s, 3H, H ₁), 2.44-2.01 (m, 2H, H ₂₆ and H ₁₀), 1.68-1.45 (m, 3H, H ₅ and H ₄), 0.85-0.82 (m, 18H, H _{28/27} , H _{12/11} and H _{7/6}).

Réaction



Mode opératoire

Le dérivé **217** (0.10 g, 0.15 mmol) est mis en solution dans 15 mL de DCM. On ajoute alors du TFA (0.64 mL, 8.71 mmol). Le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient quantitativement le trifluoroacétate **239** sous forme d'un solide blanc.

Références Bibliographiques

- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I., Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* **2009**, 12(12), 1567-1576.
- Adams DJ, Clark JH, Hansen LB, Sanders VC, Taverner SJJ., Reaction of tetramethylammonium fluoride with trifluoromethyltrimethylsilane. *Fluorine Chem.* **1998**, 92(2), 123-125.
- Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, Gautier E, Robb E, Cortes M, Volitakis I, Liu X, Smith JP, Perez K, Laughton K, Li QX, Charman SA, Nicolazzo JA, Wilkins S, Deleva K, Lynch T, Kok G, Ritchie CW, Tanzi RE, Cappai R, Masters CL, Barnham KJ, Bush AI., Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta. *Neuron.*, **2008**, 59(1), 43-55
- Ahmed M, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, Elliott JI, Van Nostrand WE, Smith SO., Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol.*, **2010**, 17(5), 561-567.
- Alzheimer A., Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin.*, **1907**, 64, 146-148.
- Alzheimer's Association, Thies W, Bleiler L., 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.*, **2011**, 7(2), 208-244.
- Alzheimer's Association., 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.*, **2012**, 8(2), 131-168.
- Anderson JT, Toogood PL, Marsh EN., A short and efficient synthesis of L-5,5,5,5',5',5'-hexafluoroleucine from N-Cbz-L-serine. *Organic Lett.*, **2002**, 4(24), 4281-4283.
- Antzutkin ON, Iuga D, Filippov AV, Kelly RT, Becker-Baldus J, Brown SP, Dupree R., Hydrogen bonding in Alzheimer's amyloid- β fibrils probed by $^{15}\text{N}\{^{17}\text{O}\}$ REAPDOR solid-state NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl.*, **2012**, 51(41), 10289-10292.
- Bachurin SO., Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Med Res Rev.*, **2003**, 23(1), 48-88.

- Barrow CJ, Zagorski MG., Solution structures of beta peptide and its constituent fragments : relation to amyloid deposition. *Science.*, **1991**, 253(5016), 179-182.
- Barrow CJ., Yasuda A., Kenny PT., Zagorski MG., Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol.*, **1992**, 225(4), 1075-1093.
- Bartolini M, Bertucci C, Bolognesi ML, Cavalli A, Melchiorre C, Andrisano V., Insight into the kinetic of amyloid beta (1-42) peptide self-aggregation: elucidation of inhibitors' mechanism of action. *Chem Bio Chem.*, **2007**, 8(17), 2152-2161.
- Bartolini M, Naldi M, Fiori J, Valle F, Biscarini F, Nicolau DV, Andrisano V., Kinetic characterization of amyloid-beta 1-42 aggregation with a multimethodological approach. *Anal Biochem.*, **2011**, 414, 215-225.
- Bastos RS., (Trifluoromethyl)trimethylsilane (TMSCF₃) - Ruppert's Reagent: An Excellent Trifluoromethylation Agent. *Synlett.*, **2008**, 9, 1425-1426.
- Beaulieu PL., Diastereospecific synthesis of D- and L-allo-threonines and trichlorinated derivatives suitable for the preparation of tritium labelled material. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32(8), 1031-1034.
- Beckers H, Bürger H, Bursch P, Ruppert IJ., Synthesis and properties of (trifluoromethyl)trichlorosilane, a versatile precursor for CF₃Si compounds. *Organomet Chem.*, **1986**, 316(1-2), 41-50.
- Bégue JP, Bonnet-Delpon D., Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine, Wiley, Ed. 2008.
- Bégue JP, Bonnet-Delpon D., Chimie bioorganique et médicinale du fluor, EDP Sciences, 2005.
- Benzinger TL, Gregory DM, Burkoth TS, Miller-Auer H, Lynn DG, Botto RE, Meredith SC., Two-dimensional structure of beta-amyloid (10-35) fibrils. *Biochemistry.*, **2000**, 39(12), 3491-3499.
- Biancalana M, Koide S., Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta.*, **2010**, 1804(7), 1405-1412.
- Bieschke J, Zhang Q, Bosco DA, Lerner RA, Powers ET, Wentworth P Jr, Kelly JW., Small Molecule Oxidation Products Trigger Disease-Associated Protein Misfolding. *Acc. Chem. Res.*, **2006**, 39(9), 611-619.

- Binkert C, Frigerio M, Jones A, Meyer S, Pesenti C, Prade L, Viani F, Zanda., Replacement of isobutyl by trifluoromethyl in pepstatin A selectively affects inhibition of aspartic proteinases. *Chem. Bio. Chem.*, **2006**, 7(1), 181-186.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB., Amyloid-Protein (A) Assembly : A40 and A42 Oligomerize through Distinct Pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2003**, 100(1), 330-335.
- Blazer LL, Neubig RR., Small molecule protein-protein interaction inhibitors as CNS therapeutic agents : current progress and future hurdles. *Neuropsychopharmacology*. **2009**, 34(1), 126-141.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C., Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem.*, **1992**, 267(1), 546-554.
- Burton DJ, Yang ZY., Fluorinated organometallics: Perfluoroalkyl and functionalized perfluoroalkyl organometallic reagents in organic synthesis. *Tetrahedron.*, **1992**, 48(2), 189-275.
- Carter DB, Chou KC., A model for structure-dependent binding of Congo red to Alzheimer beta-amyloid fibrils. *Neurobiol Aging.*, **1998**, 19(1), 37-40.
- Caupène C, Chaume G, Ricard L, Brigaud T., Iodocyclization of Chiral CF₃-Allylmorpholinones : A Versatile Strategy for the Synthesis of Enantiopurer-Tfm-Prolines and r-Tfm-Dihydroxyprolines. *Org Lett*, **2009**, 11(1), 209-212.
- Cerf E, Sarroukh R, Tamamizu-Kato S, Breydo L, Derclaye S, Dufrêne YF, Narayanaswami V, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Raussens V., Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *Biochem J.*, **2009**, 421(3), 415-423.
- Cerf E., Sarroukh R. and others. *Biochem. J.*, **2009**, 421, 415-423.
- Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, Sarazin P, Stea D, Tremblay P., *J Biol Chem.*, **2003**, 278(37), 34874-34881.
- Chaume G, Van Severen MC, Marinkovic S, Brigaud T, Straightforward Synthesis of (S)- and (R)-alpha-Trifluoromethyl Proline from Chiral Oxazolidines Derived from Ethyl Trifluoropyruvate. *Org Lett.*, **2006**, 8(26), 6123-6126.
- Chaume G, Van Severen MC, Ricard L, Brigaud T, Concise access to enantiopure (S)- and (R)-a-trifluoromethyl pyroglutamic acids from ethyl trifluoropyruvate-based chiral CF₃-oxazolidines (Fox). *J Fluor Chem.*, **2008**, 129(11), 1104-1109.

- Chimon S, Shaibat MA, Jones CR, Calero DC, Aizezi B, Ishii Y., Evidence of fibril-like β -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's β -amyloid., *Nat Struct Mol Biol.* **2007**, 14(12), 1157-1164.
- Del Valle JR, Goodman M., Asymmetric hydrogenations for the synthesis of Boc-protected 4-alkylprolinols and prolines. *J Org Chem.*, **2003**, 68(10), 3923-3931.
- Del Valle JR, Goodman M., Stereoselective Synthesis of Boc-Protected *cis* and *trans*-4-Trifluoromethylprolines by Asymmetric Hydrogenation Reactions. *Angew Chem Int Ed.*, **2002**, 41(9), 1600-1602.
- Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG., Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem.*, **2005**, 280, 17294-17300.
- Dong J, Canfield JM, Mehta AK, Shokes JE, Tian B, Childers WS, Simmons JA, Mao Z, Scott RA, Warncke K, Lynn DG., Engineering metal ion coordination to regulate amyloid fibril assembly and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2007**, 104(33), 13313-13318.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA., Calcium in cell injury and death, *Annu Rev Pathol.*, **2006**, 1, 405-434
- Estrada LD, Soto C., Disrupting beta-amyloid aggregation for Alzheimer disease treatment. *Curr Top Med Chem.*, **2007**, 7(1), 115-126.
- Etcheberrigaray R, Tan M, Dewachter I, Kuiperi C, Van der Auwera I, Wera S, Qiao L, Bank B, Nelson TJ, Kozikowski AP, Van Leuven F, Alkon DL., Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2004**, 101(30), 11141-11146.
- Fagan T, Kagan B, Corbin D, Hwang W, GlabeC, Nault L, Lal R, Teplow D, Albensi B, Sokolov Y., Alzheimer Research Forum Live Discussion : Now you see them, now you don't : The amyloid channel hypothesis, *J Alzheimers Dis.*, **2006**, 9(2), 219-224.
- Ferrari GV, Canales MA, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC., A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry*, **2001**, 40(35), 10447-10457.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M, and Alzheimer's Disease International., Global

- prevalence of dementia : a Delphi consensus study. *Lancet.*, **2005**, 366(9503), 2112-2117.
- Fradinger EA, Monien BH, Urbanc B, Lomakin A, Tan M, Li H, Spring SM, Condron MM, Cruz L, Xie CW, Benedek GB, Bitan G., C-terminal peptides coassemble into Abeta42 oligomers and protect neurons against Abeta42-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2008**, 105(37), 14175-14180.
 - Gardberg AS, Dice LT, Ou S, Rich RL, Helmbrecht E, Ko J, Wetzel R, Myska DG, Patterson PH, Dealwis C., Molecular basis for passive immunotherapy of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2007**, 104(40), 15659-15664.
 - Gestwicki JE, Crabtree GR, Graef IA., Harnessing chaperones to generate small-molecule inhibitors of amyloid beta aggregation. *Science.*, **2004**, 306(5697):865-9.
 - Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA., Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med.*, **1998**, 4, 827-831.
 - Glenner GG, Wong CW, Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, **1984**, 120(3), 885-890.
 - Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al., Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.*, **1991**, 349(6311), 704-706.
 - Golde TE, Cai XD, Shoji M, Younkin SG., Production of amyloid beta protein from normal amyloid beta-protein precursor (beta APP) and the mutated beta APPS linked to familial Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.*, **1993**, 695, 103-108.
 - Gong CX, Iqbal K., Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Curr Med Chem.*, **2008**, 15(23), 2321-2328.
 - Gordon DJ, Meredith SC., Probing the role of backbone hydrogen bonding in beta-amyloid fibrils with inhibitor peptides containing ester bonds at alternate positions. *Biochemistry.*, **2003**, 42(2), 475-485.
 - Gorevic PD, Castano EM, Sarma R, Frangione B., Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation

- and its characteristic x-ray diffraction pattern. *Biochem Biophys Res Commun.*, **1987**, 147(2), 854-862.
- Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B., High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience*. **2006**, 143(2), 461-475.
 - Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ. Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci*. **1993**, 695, 109-116.
 - Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al., Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. **1992**, 359(6393), 322-325.
 - Hagmann WK., The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *J Med Chem.*, **2008**, 51(15), 4359-4369.
 - Hagmann WK., The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J Med Chem.*, **2008**, 51(15), 4359-4369.
 - Hajduk PJ, Burns DJ., Integration of NMR and high-throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen.*, **2002**, 5(8), 613-621.
 - Hardy J, Selkoe DJ., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics. *Science.*, **2002**, 297(5580), 353-356.
 - Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT., Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol.*, **1997**, 4(2), 119-125.
 - Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ., Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci.*, **1999**, 19(20), 8876-8884.
 - Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA., Alzheimer disease in the US population : prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.*, **2003**, 60(8), 1119-1122.
 - Howard R, McShane R, Lindsay J, Ritchie C, Baldwin A, Barber R, Burns A, Denning T, Findlay D, Holmes C, Hughes A, Jacoby R, Jones R, Jones R, McKeith I, Macharouthu A, O'Brien J, Passmore P, Sheehan B, Juszczak E, Katona C,

- Hills R, Knapp M, Ballard C, Brown R, Banerjee S, Onions C, Griffin M, Adams J, Gray R, Johnson T, Bentham P, Phillips P. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, **2012**, 366(10), 893-903.
- Huang HC, Jiang ZF, Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein : relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, **2009**, 16(1), 15-27.
 - Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, Yankner BA., Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. *J Biol Chem.* **2006**, 281(38), 27916-27923.
 - Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y., Visualization of A beta 42 (43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron.*, **1994**, 13(1), 45-53.
 - Jaroniec CP, MacPhee CE, Bajaj VS, McMahon MT, Dobson CM, Griffin RG., High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *PNAS.*, **2004**, 101(3), 711-716.
 - Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr., The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.*, **1993**, 32(18), 4693-4697.
 - Jiang ZX, Qin YY, Qing FL., Asymmetric synthesis of both enantiomers of anti-4,4,4-trifluorothreonine and 2-amino-4,4,4-trifluorobutanoic acid. *J Org Chem.*, **2003**, 68(19), 7544-7547.
 - Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ., Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2011**, 108(14), 5819-5824.
 - Johnson GV, Hartigan JA., Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain : an update. *J Alzheimers Dis.*, **1999**, 1(4-5), 329-351.
 - Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B., The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.*, **1987**, 325(6106), 733-736.

- Karran E, Mercken M, De Strooper B., The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*, **2011**, 10(9), 698-712.
- Kaye R, Head E, Thompson JL., McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG., Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science.*, **2003**, 300(5618), 486-489.
- Kaye R, Pensalfini A, Margol L, Sokolov Y, Sarsoza F, Head E, Hall J, Glabe C., Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem.*, **2009**, 284(7), 4230-4237.
- Kaye R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG., Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem.*, **2004**, 279(45), 46363-46366.
- Kaye R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe, CG., Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem.*, **2004**, 279(45), 46363-46366.
- Kihara M, Chatani E, Sakai M, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y., Seeding-dependent Maturation of β_2 -Microglobulin Amyloid Fibrils at Neutral pH. *J Bio Chem.*, **2005**, 280(12), 12012-12018.
- Kirk KL., Fluorine in medicinal chemistry : Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules, *J Fluor Chem.*, **2006**, 127(8), 1013-1029.
- Kirschner DA, Inouye H, Duffy LK, Sinclair A, Lind M, and Selkoe DJ., Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1987**, 84(19), 6953-6957.
- Klein WL., Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neuro Chem Int.*, **2002**, 41(5), 345-352.
- Klunk WE, Jacob RF, Mason RP., Quantifying amyloid beta-peptide (Abeta) aggregation using the Congo red-Abeta (CR-Abeta) spectrophotometric assay. *Anal Biochem.*, **1999**, 266(1):66-76.
- Kodali R, Wetzel R., Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr Opin Struct Biol.*, **2007**, 17(1), 48-57.
- Kourie JI, Culverson AL, Farrelly PV, Henry CL, Laohachai KN., Heterogeneous amyloid-formed ion channels as a common cytotoxic mechanism : implications for

- therapeutic strategies against amyloidosis, *Cell Biochem. Biophys.*, **2002**, 36(2-3), 191-207.
- Kumar S, Walter J., Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*., **2011**, 3(8), 803-812.
 - LaFerla FM., Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.*, **2002**, 3(11), 862-872.
 - LaFerla FM., Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.*, **2002**, 3(11), 862-872.
 - Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL., Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1998**, 95(11), 6448-6453.
 - Lashuel HA, Lansbury PT Jr., Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins ? *Q Rev Biophys.*, **2006**, 39, 167-201.
 - Lazo ND, Grant MA, Condon MC, Rigby AC, Teplow DB., On the nucleation of amyloid beta-protein monomer folding. *Protein Sci.*, **2005**, 14(6), 1581-1596.
 - Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM., Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol.* **2000**, 149(4), 793-798.
 - Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. **2006**., 440(7082), 352-357.
 - LeVine H 3rd., Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides : detection of amyloid aggregation in solution., *Protein Sci.* **1993**, 2(3), 404-410.
 - Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D., Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron.*, **2009**, 62(6), 788-801.
 - Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS., Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci.*, **2003**, 23(5), 1605-1611.

- Lin H, Bhatia R, Lal R., Amyloid beta protein forms ion channels : implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.*, **2001**, 15(13), 2433-2444.
- Lipton SA., Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov.*, **2006**, 5(2), 160-170.
- Lorenzo A, Yankner BA., Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1994**, 91(25), 12243-12247.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J., Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*, **1999**, 155(3), 853-862.
- Lührs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Döbeli H, Schubert D, Riek R., 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta (1-42) fibrils., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2005**, 102(48), 17342-17347.
- Maji SK, Ogorzalek Loo RR, Inayathullah M, Spring SM, Vollers SS, Condrón MM, Bitan G, Loo JA, Teplow DB., Amino acid position-specific contributions to amyloid beta-protein oligomerization. *J Biol Chem.* **2009**, 284(35), 23580-23591.
- Mason JM, Kokkoni N, Stott K, Doig AJ., Design strategies for anti-amyloid agents. *Curr Opin Struct Biol.*, **2003**, 13(4), 526-532.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K., Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1985**, 82(12), 4245-4249.
- McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, Tian X, Phinney AL, Manea M, French JE, Lambermon MH, Darabie AA, Brown ME, Janus C, Chishti MA, Horne P, Westaway D, Fraser PE, Mount HT, Przybylski M, St George-Hyslop P., Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med.*, **2002**, 8(11), 1263-1269.
- McLaurin J, Kierstead ME, Brown ME, Hawkes CA, Lambermon MH, Phinney AL, Darabie AA, Cousins JE, French JE, Lan MF, Chen F, Wong SS, Mount HT, Fraser PE, Westaway D, St George-Hyslop P., Cyclohexanehexol inhibitors of Aβ aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med.*, **2006**, 12(7), 801-808.

- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL., Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, **1999**, 46(6), 860-866.
- Meyer B., Peters T., NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed.*, **2003**, 42(2), 864-890.
- Mizuta S, Shibata N, Hibino M, Nagano S, Nakamura S, Toru T., Ammonium bromides/KF catalyzed trifluoromethylation of carbonyl compounds with (trifluoromethyl)trimethylsilane and its application in the enantioselective trifluoromethylation reaction. *Tetrahedron* **2007**, 63(35), 8521-8528.
- Molteni M, Pesenti C, Sani M, Volonterio A, Zanda M., Fluorinated peptidomimetics: synthesis, conformational and biological features. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2004**, 125(11), 1735-1743.
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L., A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis.*, **2010**, 19 (2), 441-419.
- Murakami K, Irie K, Ohigashi H, Hara H, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T., Formation and stabilization model of the 42-mer Abeta radical: implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Am Chem Soc.* **2005**, 127(43), 15168-15174.
- Murphy MP, LeVine H 3rd., Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis.*, **2010**, 19(1), 311-323.
- Nakagami Y, Nishimura S, Murasugi T, Kaneko I, Meguro M, Marumoto S, Kogen H, Koyama K, Oda T., A novel beta-sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid beta-induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation in vitro. *Br J Pharmacol.*, **2002**, 137(5), 676-682.
- Nelson O, Tu H, Lei T, Bentahir M, de Strooper B, Bezprozvanny I., Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca^{2+} leak function of presenilin 1. *J Clin Invest.*, **2007**, 117(5), 1230-1239.
- Nie Q, Du XG, Geng MY., Small molecule inhibitors of amyloid β peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin.*, **2011**, 32 (5), 545-551.
- O'Brien RJ, Wong PC., Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci.*, **2011**, 34, 185-204.

- O'Hagan D., Fluorine in health care: Organofluorine containing blockbuster drugs. *J Fluor Chem.*, **2010**, 131(11), 1071-1081.
- Ojima I., Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *Wiley* **2009**.
- Palop JJ, Mucke L., Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease : from synapses toward neural networks, *Nat Neurosci.*, **2010**, 13, 812-818.
- Panne P, Naumann D, Hoge B., Cyanide initiated perfluoroorganylations with perfluoroorgano silicon compound. *J Fluorine Chem.*, **2001**, 112, 283-286.
- Pedersen JS, Christensen G, Otzen DE., Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *J Mol Biol.*, **2004**, 341(2), 575-588.
- Permanne B, Adessi C, Saborio GP, Fraga S, Frossard MJ, Van Dorpe J, Dewachter I, Banks WA, Van Leuven F, Soto C., Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J.*, **2002**, 16(8), 860-862.
- Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R., Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel beta-sheet registry in fibrils formed by a beta-amyloid peptide. *J Mol Biol.*, **2004**, 335(1), 247-260.
- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R., A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2002**, 99(26), 16742-16747.
- Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP, Tycko R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science.*, **2005**, 307(5707), 262-265.
- Petkova AT, Yau WM, Tycko R., Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry.*, **2006**, 45(2), 498-512.
- Petkova AT, Yau WM, Tycko R., Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry*, **2006**, 45(2), 498-512.
- Pierrot N, Ghisdal P, Caumont AS, Octave JN., Intraneuronal amyloid-beta1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J Neurochem.*, **2004**, 88(5), 1140-1150.

- Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW., Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem.*, **1995**, 270(41), 23895-23898.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW., In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.*, **1991**, 563, 311-314.
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW., Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides : contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem.* **1995**, 64(1), 253-265.
- Prakash GKS, Mandal M., Nucleophilic trifluoromethylation tamed. *J Fluorine Chem.*, **2001**, 112, 123-131.
- Prakash GKS, Yudin AK., Perfluoroalkylation with Organosilicon Reagents. *Chem Rev.*, **1997**, 97, 757-786.
- Prakash, G.K.S., Krishnamurti, R., Olah, G.A., Synthetic methods and reactions. 141. Fluoride-induced trifluoromethylation of carbonyl compounds with trifluoromethyl-trimethylsilane (TMS-CF₃). A trifluoromethide equivalent. *J Am Chem Soc.*, **1989**, 111(1), 393-395.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O., Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus., *J Neurosci.* **2008**, 28(53), 14537-14545.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O., Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus., *J Neurosci.*, **2008**, 28(53), 14537-14545.
- Qing FL, Peng S, Hu CM., Synthesis of (2R)-N-Boc-2-amino-4,4,4-trifluorobutanoic acid using trifluoromethylation of Garner's aldehyde. *J Fluorine Chem.*, **1998**, 88 (1), 79-81.
- Qiu XL, Qing FL., Synthesis of cis-4-trifluoromethyl- and cis-4-difluoromethyl-L-pyroglutamic acids. *J Org Chem.* **2003**, 68(9), 3614-3617.
- Qiu XL, Qing FL., Practical Synthesis of Boc-Protected cis-4-Trifluoromethyl and cis-4-Difluoromethyl-L- prolines. *J Org Chem.*, **2002**, 67(20), 7162-7164.
- Querfurth HW, LaFerla FM., Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* **2010**, 362(4), 329-344.

- Rauk A., Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Trans.*, **2008**, 14(10), 1273-1282.
- Reinke AA, Gestwicki JE., Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin : influence of linker length and flexibility. *Chem Biol Drug Des.*, **2007**, 70(3), 206-215.
- Sarroukh R, Cerf E, Derclaye S, Dufrêne YF, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Raussens V., Transformation of amyloid β (1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cell Mol Life Sci.*, **2011**, 68(8), 1429-1438.
- Sciarretta KL, Gordon DJ, Meredith SC., Peptide-based inhibitors of amyloid assembly. *Methods Enzymol.*, **2006**, 413, 273-312.
- Scolastico C, Conca E, Prati L, Guanti G, Banfi L, Berti A, Farina P, Valcavi U., Diastereo- and Enantioselective Synthesis of Fluorinated Threonines. *Synthesis.*, **1985**, 9, 850-855.
- Selkoe DJ., Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med.*, **2011**, 17(9), 1060-1065.
- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL., Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*, **2000**, 289(5483), 1317-1321.
- Serpell LC, Smith JM., Direct visualisation of the beta-sheet structure of synthetic Alzheimer's amyloid. *J Mol Biol.*, **2000**, 299(1), 225-231.
- Serpell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB, Fraser PE., The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol.*, **2000**, 300(5), 1033-1039.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ., Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.*, **2008**, 14(8), 837-842.
- Shirahama T, Cohen AS., High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J Cell Biol.*, **1967**, 33(3), 679-708.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al., Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, **1992**, 258(5079), 126-129.

- Shreeve JM, Singh RP., Nucleophilic Trifluoromethylation Reactions of Organic Compounds with (Trifluoromethyl)trimethylsilane. *Tetrahedron.*, **2000**, 56(39), 7613-7632.
- Simakova O, Arispe NJ., Early and late cytotoxic effects of external application of the Alzheimer's Abeta result from the initial formation and function of Abeta ion channels, *Biochemistry.*, **2006**, 45(18), 5907-5915.
- Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN, et al., Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol.*, **1994**, 45(3), 373-379.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P., Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci.*, **2005**, 8(8), 1051-1058.
- Sood A, Abid M, Hailemichael S, Foster M, Török B, Török M., Effect of chirality of small molecule organofluorine inhibitors of amyloid self-assembly on inhibitor potency. *Bioorg Med Chem Lett.*, **2009**, 19(24), 6931-6934.
- Sood A, Abid M, Sauer C, Hailemichael S, Foster M, Török B, Török M., Disassembly of preformed amyloid beta fibrils by small organofluorine molecules. *Bioorg Med Chem Lett.* **2011**, 21(7), 2044-2047.
- Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B., Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **1996**, 226(3), 672-680.
- Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B., Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **1996**, 226(2), 672-680.
- Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B., Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **1996**, 226(3), 672-680.
- Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castaño EM, Frangione B., Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis : implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.*, **1998**, 4(7), 822-826.
- Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castaño EM, Frangione B., Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy., *Nat Med.*, **1998**, 4(7), 822-826.

- Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castaño EM, Frangione B., Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.*, **1998**, 4(7), 822-826.
- Stains CI, Mondal K, Ghosh I., Molecules that target beta-amyloid. *Chem Med Chem.*, **2007**, 2(12), 1674-1692.
- Stelzmann RA, Schnitzlein HN, MurtaghFR., An English translation of alzheimer's 1907 paper “über eine eigenartige erkankung der hirnrinde”. *Clinical Anatomy*, **1995**, 8(6), 429-431.
- Suh YH, Checler F., Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.*, **2002**, 54(3), 469-525.
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC., Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol.*, **1997**, 273(3), 729-739.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG., An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science.*, **1994**, 264(5163), 1336-1340.
- Takahashi T, Mihara H., Peptide and protein mimetics inhibiting amyloid beta-peptide aggregation. *Acc Chem Res.*, **2008**, 41(10), 1309-1318.
- Tanzi RE, Bertram L., Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis : a genetic perspective. *Cell.*, **2005**, 120(4), 545-555.
- Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I; Memantine Study Group., Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA*. **2004**, 291(3), 317-324.
- Tjernberg L, Hosia W, Bark N, Thyberg J, Johansson J., Charge attraction and beta propensity are necessary for amyloid fibril formation from tetrapeptides. *J Biol Chem.*, **2002**, 277(45), 43243-43246.
- Tjernberg LO, Callaway DJ, Tjernberg A, Hahne S, Lilliehook C, Terenius L, Thyberg J, Nordstedt C., A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation. *J Biol Chem.*, **1999**, 274(18), 12619-12625.

- Tjernberg LO, Lilliehook C, Callaway DJ, Naslund J, Hahne S, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C., Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands. *J Biol Chem.*, **1997**, 272(19), 12601-12605.
- Tjernberg LO, Lilliehook C, Callaway DJE, Naslund J, Hahne S, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C., Controlling amyloid β -peptide fibril formation with protease-stable ligands. *J Biol Chem.*, **1997**, 272(19), 12601-12605.
- Tjernberg LO, Näslund J, Lindqvist F, Johansson J, Karlström AR, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C., Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem.*, **1996**, 271(15), 8545-8548.
- Tjernberg O, Söderholm S, Chiaia G, Girard R, Karlsson UO, Nylén H, Lindau I L., Influence of magnetic ordering on the NiO valence band. *Phys Rev B Condens Matter.*, **1996**, 54(15), 10245-10248.
- Török B, Sood A, Bag S, Kulkarni A, Borkin D, Lawler E, Dasgupta S, Landge S, Abid M, Zhou W, Foster M, LeVine H 3rd, Török M., Structure-activity relationships of organofluorine inhibitors of β -amyloid self-assembly. *Chem Med Chem.*, **2012**, 7(5), 910-919.
- Török M, Abid M, Mhadgut SC, Török B., Organofluorine inhibitors of amyloid fibrillogenesis. *Biochemistry.*, **2006**, 45(16), 5377-5383.
- Tumiatto V, Minarini A, Bolognesi ML, Milelli A, Rosini M, Melchiorre C, "Tacrine derivatives and Alzheimer's disease," *Curr Med Chem.*, **2010**, 17(17), 1825-1838.
- Tycko R., Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Curr Opin Struct Biol.*, **2004**, 14(1), 96-103.
- Urbanc B, Cruz L, Yun S, Buldyrev SV, Bitan G, Teplow DB, Stanley HE., In silico study of amyloid beta-protein folding and oligomerization. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2004**, 101(50), 17345-17350.
- Viegas C Jr, Bolzani VS, Pimentel LS, Castro NG, Cabral RF, Costa RS, Floyd C, Rocha MS, Young MC, Barreiro EJ, Fraga CA., New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. *Bioorg Med Chem.*, **2005**, 13(13), 4184-4190.
- Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB., Rapid Communication : Characterization of β -Amyloid Peptide from Human Cerebrospinal Fluid. *J Neurochem.*, **1993**, 61(5), 1965-1968.

- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB., Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem.*, **1999**, 274(36), 25945-25952.
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB., Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem.*, **1997**, 272(35), 22364-22372.
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM., The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol.*, **1999**, 158(2), 328-337.
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM., The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol.*, **1999**, 158(2), 328-337.
- Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH., Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science.*, **2008**, 319(5869), 1523-1526.
- Whitty A, Kumaravel G., Between a rock and a hard place? *Nat Chem Biol.*, **2006**, 2(3), 112-118.
- Whitty A, Kumaravel G., Between a rock and a hard place? *Nat Chem Biol.* **2006**, 2(3), 112-118.
- Williams AD, Portelius E, Kheterpal I, Guo JT, Cook KD, Xu Y, Wetzel R., Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J Mol Biol.*, **2004**, 335(335), 833-842.
- Winblad B, Jones RW, Wirth Y, Stöfler A, Möbius HJ., Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease : a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dement Geriatr Cogn Disord.*, **2007**, 24(1), 20-27.
- Xu Y, Shen J, Luo X, Zhu W, Chen K, Ma J, Jiang H., Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2005**, 102(15), 5403-5407.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slaterry T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM., RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.*, **1996**, 382(6593), 685-691.

- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA., Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein : reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, **1990**, 250(4978), 279-282.
- Zeng CM, Kerrigan SA, Katzenellenbogen JA, Slocum C, Gallacher K, Shomalic M, Lyttle R, Hattersley G, Miller CP., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51(41), 5361-5363.
- Zhang R, Hu X, Khant H, Ludtke SJ, Chiu W, Schmid MF, Frieden C, Lee JM., Interprotofilament interactions between Alzheimer's Abeta1-42 peptides in amyloid fibrils revealed by cryoEM. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2009**, 106(12), 4653-4658.
- Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S., Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience.*, **2002**, 15(1), 201-211.